

03062

2015



**Universidad Nacional Autónoma
de México**

**Unidad Académica de los Ciclos
Profesional y de Posgrado**

**ASIMETRIA EN LAS REACCIONES DE SINTESIS E HIDROLISIS
DE LA ATPasa MITOCONDRIAL, Y SU ANALISIS A TRAVES
DEL INHIBIDOR DIFERENCIAL TRIFENILESTAÑO (TPSt_n)**

T E S I S

**Que para obtener el grado de
Licenciada en Investigación Biomédica Básica
p r e s e n t a**

SILVIA ELENA FRENK MORA

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

México, D. F.

1988



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.

Un tercer tigre buscaremos. Este
Será como los otros una forma
De mi sueño, un sistema de palabras
Humanas y no el tigre vertebrado
Que, más allá de las mitologías,
Fija la tierra. Bien lo sé, pero algo
Me impone esta aventura indefinida,
Insensata y antigua, y persevero
En buscar por el tiempo de la tarde
El otro tigre, el que no está en el verso.

J. L. Borges (1960).

INDICE

A. INTRODUCCION.

I. Estructura de la Protón-ATPasa.

1. Sector catalítico.

- a. Subunidades alfa y beta.
- b. Subunidades gamma, delta, epsilon y PI.
- c. Subunidades del cuello: OSCP, Fo y F_o.

2. Sector membranar Fo.

II. Mecanismo Catalítico de la Protón-ATPasa.

- a. Modelo de tres sitios catalíticos alternantes.
- b. Modelo de dos sitios catalíticos alternantes y uno regulador.
- c. Modelo de un sitio catalítico y dos reguladores.

III. Una Manifestación del Mecanismo Catalítico de la Protón-ATPasa: el Fenómeno de la Inhibición Diferencial.

B. MATERIALES Y METODOS.

I. Preparaciones Biológicas.

- a. Aislamiento de mitocondrias.

b. Preparación de partículas submitocondriales
Mg²⁺-ATP.

II. Activación de Partículas Mg²⁺-ATP.

III. Determinación de Proteína.

IV. Métodos Espectrofotométricos de Cuantificación de la
Actividad.

a. Ensayo de actividad de hidrólisis.

b. Ensayo de actividad de síntesis.

V. Métodos Radioactivos de Cuantificación de la Actividad.

a. Ensayo de actividad de hidrólisis.

b. Ensayo de actividad de síntesis.

VI. Medición del CO_2 generado por la actividad respiratoria.

VII. Cuantificación de ³H-adenin nucleótidos unidos a la
enzima.

C. RESULTADOS.

I. Análisis Cinético del Efecto Diferencial del TPhSn sobre
las Actividades de Síntesis e Hidrólisis.

II. Exploración del Mecanismo de Inhibición del TPhEn a través de la Evaluación del Número de Enzimas Funcionales en una Población Inhibida.

III. Reconocimiento de los Sitios Catalíticos de la ATPasa Mitocondrial a través de sus Propiedades de Intercambio de Nucleótidos. Evaluación de la Equivalencia de Sitios Catalíticos Sintéticos y Sitios Catalíticos Hidrolíticos.

- a. Determinación de sitios catalíticos por su desplazamiento durante la catálisis.
- b. Conversión del ADP de sitios catalíticos hidrolíticos en ATP.

D. DISCUSION.

- a. Conclusión 1.
- b. Conclusión 2.
- c. Conclusión 3.
- d. Conclusión 4.

E. APENDICE.

INTRODUCCION

Uno de los temas de creciente interés en enzimología, se refiere al estudio de las propiedades e interacciones que se desprenden de la existencia de simetría en la estructura cuaternaria de una proteína. La mayor parte de los estudios se han centrado en proteínas oligoméricas compuestas por varias subunidades o monómeros idénticos, que se agregan en arreglos simétricos. Las subunidades interactúan entre sí a través de uniones no covalentes; la comunicación que se establece entre ellas contribuye a la regulación alostérica, y al comportamiento cooperativo y anticooperativo de la proteína (1, 2). Algunas proteínas oligoméricas cuentan con estructuras relativamente simples como dímeros (ej.: rodanasa) o tetrameros (ej.: lactato deshidrogenasa), mientras que otras muestran una organización mucho más compleja (ej.: oligómero de la cápside del virus del Mosaico del Tabaco, compuesto por 17 subunidades colocadas en simetría radial) (3). Diversos estudios enfocados en el análisis estereoquímico de estas macromoléculas (4, 5, 6) han concluido que su organización simétrica es directamente responsable de la formación de estructuras asimétricas, que se generan cuando alguna de las subunidades interactúa con sustratos, activadores o inhibidores. El trabajo de Gust, et al ejemplifica este concepto tomando como modelo a la enzima aspartato transcarbamilasa (6). La aspartato transcarbamilasa constituye uno de los ejemplos mejor

estudiados del comportamiento cooperativo y alostérico. Está compuesta por seis subunidades idénticas, cada una de las cuales cuenta con un polipéptido catalítico y otro regulatorio (7). Cada subunidad es capaz de unir una molécula de sustrato y otra de activador (ATP) o de inhibidor no competitivo (CTP). Los autores Gust, et al reportan que la unión de cada una de estas moléculas a cada subunidad cambia la conformación de ésta última. Debido a esto, aquellos casos en los que la adhesión de moléculas no sea homogénea en cada subunidad, se generarán formas asimétricas de la enzima. Por lo tanto, la aspartato transcarbamilasa puede encontrarse en un gran número de estados o formas -teóricamente hasta en $6! = 720$ -, dependiendo de la cantidad y localización de las moléculas que tenga unidas. Los autores especulan acerca de la posibilidad de que cada forma presente variaciones en su reactividad y mecanismo de reacción.

Sin embargo, cabe imaginar que las proteínas oligoméricas pueden presentar otros tipos de asimetrías (ej.: asimetría estructural), además de las que se inducen por la interacción con metabolitos, como sucede en el caso de la aspartato transcarbamilasa. Quisiera ejemplificar este punto trayendo a escenario a la proton-ATPasa, enzima estudiada en el presente trabajo. A reserva de analizar con detalle la estructura de esta enzima en la próxima sección, baste por el momento mencionar que su sector catalítico (F1) está compuesto por tres subunidades beta (catalíticas) y tres subunidades alfa (regulatorias); cada subunidad beta se asocia con una alfa para formar tres parejas

alfa-beta. Gran parte de los modelos que se han formulado acerca de la estructura del sector catalítico (F1), conciben un arreglo simétrico de las tres parejas alfa-beta. Sin embargo, Anzel y Pedersen ofrecen una visión radicalmente diferente, basándose en el estudio por difracción de rayos X del cristal de la F1 de hígado de rata (8). A partir de las imágenes obtenidas, han concluido que el sector catalítico (F1) está formado por dos masas equivalentes alfa-beta, y por una tercera asociada con las subunidades menores de la F1, gamma, delta y epsilon. Esta asociación le confiere una posición asimétrica y un ambiente distinto al de las dos primeras. Los autores especulan acerca de las posibles repercusiones funcionales de la asimetría estructural detectada (8, 9). El siguiente esquema muestra la estructura propuesta por Anzel y Pedersen.



En la misma vena se ubica el trabajo de Lotscher y Capaldi, quienes a través de experimentos de entrecruzamiento químico llevados a cabo sobre la H⁺-ATPase de *E. coli*, sugieren que las subunidades gamma, delta, epsilon, que intervienen en el acoplamiento de la F1 a la porción membranal de la enzima, se asocian permanentemente con sólo una de las tres subunidades beta (10). Sus datos indican que se trata de una subunidad beta que no interacciona con inhibidores como el DCCD y el NBDCl dicitclohexilcarbodiimida y 4-cloro-7-nitrobenzofurano) los

cuales, uniéndose a sólo una subunidad beta, abaten casi por completo la actividad hidrolítica. Por lo tanto, estos datos apuntan hacia la existencia, en la H^+ -ATPasa bacteriana, de una subunidad beta diferente en términos de su asociación con otras subunidades de la enzima y de su participación en la actividad hidrolítica total.

Es en el marco de la asimetría, anteriormente descrito, en el que quisiera ubicar el presente trabajo. El sistema biológico que se utilizó fue la ATPasa de mitocondria de corazón de res. Se analizaron sus características en presencia del compuesto trifenilestaño, el cual interacciona con la enzima induciendo una inhibición diferencial sobre cada una de sus actividades (síntesis e hidrólisis de ATP). A grandes rasgos, los resultados parecen sugerir que existen dos tipos de asimetrías estructurales en esta enzima:

a) la primera se refiere a la ubicación de sus centros activos con respecto al sector conductor de protones;

b) la segunda concierne a una subunidad beta localizada en una posición asimétrica, cuyas propiedades catalíticas no son equivalentes a las de las dos subunidades beta restantes.

A continuación se presenta una descripción de las propiedades estructurales de la enzima, seguida de una revisión de los modelos más aceptados que se han propuesto para explicar sus mecanismos catalíticos.

I. ESTRUCTURA DE LA PROTON-ATPasa.

La H⁺-ATPasa mitocondrial es la enzima capaz de acoplar el transporte de protones del gradiente electroquímico, generado por la actividad respiratoria, a la síntesis de ATP. También realiza la reacción reversible de hidrólisis, a través de la cual la ruptura del ATP crea un gradiente de protones a través de la membrana. En condiciones fisiológicas, la primera dota a la célula con la capacidad de transducir la energía electroquímica de la oxidación de la glucosa, a energía química (ATP) aprovechable por el metabolismo celular. La segunda, en cambio, no parece ocurrir en condiciones fisiológicas en mitocondrias (con excepción de las propias de adipocitos productores de calor), cloroplastos y bacterias aeróbicas (11).

Expresada en términos químicos, la reacción catalizada por la H⁺-ATPasa mitocondrial es la siguiente:



La H⁺-ATPasa se localiza en la cara interna de las crestas mitocondriales y está compuesta por dos sectores: una porción hidrofílica que protruye de la membrana (F₁), y una porción hidrofóbica enbebida en la membrana (F₀). Experimentos de modificación covalente con inhibidores (12-15, 30) y de fotomercajeo (16) han demostrado que el sector F₁ desempeña las

funciones catalíticas de la enzima a través de sus tres centros activos. Por otro lado, el sector Fo ha sido reconocido como un canal de protones que transloca en dirección inversa tanto a los protones del potencial electroquímico que se requieren para que se lleve a cabo el proceso de síntesis, como a los que se generan como producto de la reacción de hidrólisis.

La H⁺-ATPasa es una enzima que ha sufrido pocos cambios durante el proceso de evolución. Gracias a esto, los estudios que se han realizado sobre la H⁺-ATPasas de organismos simples como las bacterias, se pueden aplicar a la enzima de organismos más complejos. De aquí que esta sección incluya referencias propias de la enzima bacteriana.

Las preparaciones que se han obtenido a partir de diferentes organismos no son totalmente homogéneas en lo que a su número de subunidades se refiere. Es así que se ha reportado la existencia de 9-10 polipéptidos para la enzima de hígado de rata (17), 11-12 polipéptidos en el caso de hongos y algunos mamíferos (18-21), y 14 polipéptidos propios de la enzima de corazón de bovino (22). Con estos datos se ha llegado a un consenso de un mínimo de 12 polipéptidos para la H⁺-ATPasa de mamífero. Propios del sector catalítico F₁ son: alfa, beta, gamma, delta, epsilon y un péptido disociable, la proteína inhibidora (23); correspondientes a la interfase entre el sector F₁ y la porción Fo son los polipéptidos del cuello: OSCP, F₃ y F₄ (24, 25); por último, aquellos que forman el canal de protones o Fo son: a, b y c (26-28).

SECTOR CATALITICO F1

Los polipeptidos alfa, beta, gamma, delta, epsilon y la proteina inhibidora, que componen a la F1, forman un agregado multimérico de 347,000 (29) ó 360,000 (30) de peso molecular. A través de estudios de recuperación de subunidades (31) y de marcaje de grupos sulfhidrilo (32), se ha establecido que la estequiometria de las subunidades que forman la F1 es de alfa₃, beta₃, gamma₁, delta₁, epsilon₁, FI₁.

a) Subunidades alfa y beta

Se cuenta con la secuencia de aminoácidos de las subunidades alfa y beta de la enzima de E. coli (33) y de corazón de bovino (34, 35). Su análisis revela que, aunque la homología entre las subunidades alfa y beta es menor que la que existe entre sus equivalentes en toda la escala filogenética (35), es suficientemente alta como para postular la existencia de un parentesco evolutivo (33, 35, 36). Dado que las secuencias homólogas entre alfa y beta también se han detectado en otras proteínas que unen ATP, -entre ellas, la Ca²⁺-ATPasa, la ATP/ADP translocasa, la miosina, la adenilato ciclasa, la fosfofructocinasa, el péptido bacteriano REC A y la aspartato cinasa-, puede sugerirse que la misma secuencia se distribuyó en el genoma a través de eventos secuenciales de duplicación génica.

Se ha reportado que tanto la subunidad alfa como la beta cuentan con un sitio de unión de nucleótidos (44, 45). De acuerdo

con el criterio de Cross, et al (44), tres de los sitios de unión son catalíticos debido a que el nucleótido que albergan se intercambia por nucleótido del medio durante la actividad; los tres restantes, por interaccionar con la enzima a través de una unión más fuerte, no se intercambian a una velocidad compatible con el proceso catalítico. Se ha propuesto que los sitios de unión de nucleótidos no catalíticos se localizan exclusivamente en la subunidad alfa, por lo que ésta sólo cuenta con un papel regulador durante la catálisis (46-50). No obstante, otros autores consideran que los sitios de unión de nucleótidos (catalíticos y no catalíticos) se localizan en la interfase entre la subunidad alfa y la beta (51-54). Recientemente, se ha sugerido que un sitio catalítico puede coexistir con un sitio no catalítico en una subunidad beta (55).

Por otro lado, se cuenta con evidencias muy fuertes que indican que la subunidad beta es la responsable de la actividad catalítica. Esta conclusión se obtuvo a través del uso de análogos fotorreactivos de ATP y de inhibidores de la actividad que se unen covalentemente al sitio activo (12-15, 29, 32); en ambos casos, el marcaje se localizó exclusivamente en la subunidad beta, evidencia que muestra a dicha subunidad como el centro activo responsable de la actividad catalítica. Estos estudios también han incidido en el conocimiento de los residuos de aminoácidos que intervienen en la actividad de la subunidad beta. Entre ellos, residuos de ácido glutámico, tirosina, lisina y arginina, que intervienen respectivamente en la unión de Mg^{2+}

(37), ADP (37), adenin nucleótidos (38) y fosfato (39, 40).

b) Subunidades gamma, delta, epsilon y PI

Diversos estudios acerca de la estructura tridimensional de la enzima muestran que las subunidades menores de la F₁, gamma, delta y epsilon, se encuentran en la porción intermedia del complejo F₁-F₀, acoplado la zona catalítica (parejas alfa-beta) al canal de protones F₀ (36, 56, 57). En forma congruente, experimentos de entrecruzamiento químico (58) y de reconstitución de la F₁ de E. coli (59), ubican a la subunidad delta en contacto con la alfa, y la subunidad epsilon en contacto tanto con gamma como con beta. Por lo tanto, puede concluirse que las subunidades menores son las responsables de comunicar el resto de la porción F₁ con el sector F₀. Cabe destacar que cualquier modelo que se postule para explicar la catálisis de la H⁺-ATPasa, tendrá que explicar cómo un solo grupo de subunidades gamma, delta y epsilon interacciona con tres posibles parejas catalíticas alfa-beta.

La proteína inhibidora (PI) es la subunidad responsable de la inhibición de la actividad de hidrólisis de la H⁺-ATPasa (60). También es capaz de inhibir la actividad de síntesis pero sólo en su fase inicial y no cuando ésta ha alcanzado el estado estacionario (61-63). Existen evidencias que indican que ejerce su función asociándose a sólo una de las tres subunidades beta (64). Dicha asociación depende del estado energético de la membrana (62, 65, 66). Mientras que el potencial electroquímico desplaza a la proteína inhibidora de su sitio de acción (63), la

hidrólisis de ATP constituye un requisito indispensable para que pueda interactuar inhibitoriamente con la subunidad beta (64, 67, 68). Estudios acerca de su mecanismo de inhibición, han revelado que la reacción de recambio ATP-Pi es menos sensible a la proteína inhibidora que la reacción de hidrólisis (69, 70). Siendo que la reacción de recambio implica la hidrólisis de ATP y su posterior re-síntesis a partir de los productos (ADP y Pi) albergados en el sitio activo, Tuena de Gómez Puyou, et al racionalizaron que la acción de la proteína inhibidora consiste en interferir con la liberación del ADP pegado a la enzima (71). Debido a que la reacción de recambio ATP-Pi no involucra la liberación de ADP, es mucho menos susceptible al efecto de la proteína inhibidora que la actividad de hidrólisis, cuyo paso limitante es, precisamente, el desprendimiento de este nucleótido.

c) Subunidades del cuello: OSCP, F₄, F₆

La H⁺-ATPasa mitocondrial cuenta con dos subunidades que participan en la unión del sector catalítico F₁ al sector membranal F₀. Estas son la OSCP, el factor 6, y el factor B.

La proteína OSCP es la subunidad que confiere a la H⁺-ATPasa su característica sensibilidad a oligomicina, aunque no constituye el sitio de unión de este inhibidor (57, 14). Se ha sugerido que esta subunidad mantiene contacto con la subunidad beta (72, 73). Su función más probable es la de intervenir en la unión entre F₁ y F₀ (74).

El factor δ o F_{δ} también participa en la unión entre F_1 y F_0 , con la particularidad de que reestablece las reacciones acopladas a energía en preparaciones tripsinizadas del complejo F_1 - F_0 (75).

El factor B o F_B se ha identificado como una subunidad que se asocia a la F_0 a través de su subunidad c, influyendo en la organización del canal de protones a través de sus grupos tiol (24). Se sabe que estimula las reacciones acopladas a energía, como el recambio ATP-Pi, probablemente porque promueve la transferencia de energía desde la F_0 hacia la F_1 , y viceversa (76).

SECTOR MEMBRANAL F_0

Se ha comprobado que el sector F_0 es el responsable de la translocación de protones a través de la membrana, permitiendo un acoplamiento entre las reacciones del sector catalítico y los procesos energéticos (21, 78).

En *E. coli* está compuesto por tres subunidades -a, b y c-, con una estequiometría a_1, b_2, c_{10} (79, 11). En el caso de mitocondrias, se ha reportado una estequiometría a_1, b_2, c_4 (32).

De estas subunidades, la más estudiada es la c, también conocida como proteolípido debido a su solubilidad en cloroformo/metanol, aunque no contiene lípidos unidos covalentemente. La interacción del proteolípido con el inhibidor

DCCD (diciclohexilcarbodiimida) repercute en una inhibición del flujo de protones a través del canal o sector Fo (80). Se ha reportado que el proteolípido incorporado a liposomas, les confiere la posibilidad de conducir protones; esta conducción se inhibe con DCCD (81-83).

II. MECANISMO CATALITICO DE LA PROTON-ATPasa.

Los estudios que se han realizado hasta el momento, han revelado tres características de la catálisis llevada a cabo por la H⁺-ATPasa mitocondrial:

1) La energía del gradiente electroquímico de protones -que se genera como producto de la actividad respiratoria-, se utiliza en el proceso de síntesis de ATP durante la unión de sustratos y liberación de producto (84-86).

2) La conversión reversible de ATP en ADP y Pi ocurre en el sitio catalítico en ausencia de un cambio en la energía libre del sistema ($\Delta G \approx 0$) (87-91).

3) La actividad de hidrólisis muestra una cinética cooperativa. La unión de sustrato a un segundo sitio acelera 10⁴ veces la velocidad de hidrólisis del primer sitio. Esta aceleración involucra un incremento tanto en la velocidad de ruptura del enlace como en la liberación del producto (44, 88, 92-96). Concomitantemente, la enzima presenta una cooperatividad negativa en la unión de nucleótidos (84, 97).

A continuación se comentan brevemente tres de los modelos que se han propuesto para explicar el mecanismo catalítico de la

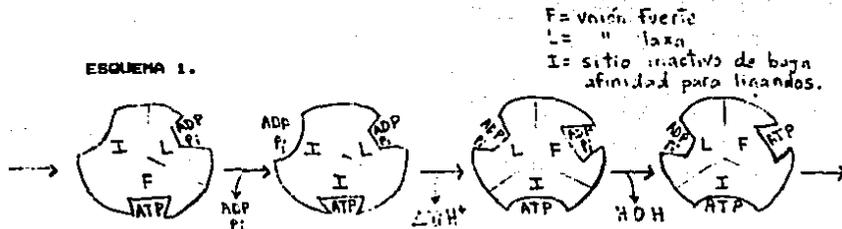
H⁺-ATPasa mitocondrial; Estos son: el modelo de tres sitios catalíticos alternantes, el modelo de dos sitios catalíticos alternantes y uno regulador, y el modelos de un sitio catalítico y dos reguladores. Cabe destacar que una diferencia central entre estos modelos, se refiere a la participación relativa de las tres subunidades beta durante la catálisis.

★

a) Modelo de tres sitios catalíticos alternantes

Propuesto por el grupo de Boyer, este modelo intenta explicar el mecanismo molecular de la H⁺-ATPasa a través de la participación secuencial de tres sitios catalíticos idénticos, que a lo largo del ciclo catalítico, sufren alternadamente cambios en su afinidad por nucleótidos (revisión en 47). Durante la actividad de hidrólisis cada sitio, en secuencia, lleva a cabo los siguientes tres pasos: unión de ATP, interconversión de ATP fuertemente unido a ADP y Pi, y liberación de estos productos. Este modelo predice el mismo comportamiento pero en sentido inverso para el proceso de síntesis. Cabe notar que durante la hidrólisis, la unión de ATP promueve la salida de los productos ADP y Pi. Del mismo modo, durante la síntesis, la unión de los sustratos ADP y Pi estimula la liberación del ATP formado (B4, B6, B7).

ESQUEMA 1.



b) Modelo de dos sitios catalíticos alternantes y uno regulador

Este modelo surge como una modificación del modelo boyeriano, propuesta por Grubmeyer y Penafsky (92, 93). Estos autores postulan que la enzima cuenta con sólo dos sitios catalíticos para la hidrólisis. Para esto, se basaron en experimentos de fijación del análogo hidrolizable TNT-ATP, en los que observaron que este nucleótido sólo cuenta con dos sitios de unión en la H^+ -ATPase. Por lo demás, este modelo no difiere sustancialmente del modelo boyeriano; también considera que los sitios actúan secuencialmente y con una cinética cooperativa. Por su parte, el grupo de Gautheron, sugiere que la subunidad beta no catalítica cuenta con funciones reguladoras (98).

c) Modelo de un sitio catalítico y dos reguladores

Diversos experimentos de reconstitución en partículas y de rearrreglo de subunidades con LiCl en la F1 soluble, se

interpretan por el grupo de Wang como evidencia de la existencia de una subunidad catalítica y dos reguladoras. Proponen un modelo en el que un único centro activo se ve constantemente influido por las diferentes etapas de ligación que ocurren en las dos subunidades reguladoras (99-101).

III. UNA MANIFESTACION DEL MECANISMO CATALITICO DE LA PROTON - ATPasa: EL FENOMENO DE LA INHIBICION DIFERENCIAL.

La literatura ofrece muchos ejemplos de compuestos inhibidores que actúan de forma diferente sobre cada una de las actividades de la H^+ -ATPasa. Entre ellos, la aurovertina (102), algunos análogos de ATP (103) y los compuestos de trialkylestano (104, 105) -todos ellos inhibidores potentes de la hidrólisis que afectan de forma mucho más somera la síntesis. Dado que la mayor parte de los modelos que se han postulado para explicar el mecanismo catalítico de la H^+ -ATPasa (véase modelos referidos en la sección anterior), parten de la premisa de que síntesis e hidrólisis ocurren en una misma vía catalítica reversible, el problema de la inhibición diferencial constituye una paradoja no resuelta. La dificultad de explicar cómo un compuesto, que obstaculiza un único camino enzimático, afecta preferencialmente sólo una de las dos actividades que en él ocurren, ha sido abordada por muchos modelos a través de consideraciones cinéticas. Es así como los modelos de tres y dos sitios catalíticos alternantes explican la inhibición drástica de la hidrólisis a través de la pérdida de la cooperatividad. Consideran que el efecto superficial sobre la síntesis obedece a que esta actividad ocurre a velocidades mucho menores. Por su parte, el modelo de un sitio catalítico y dos reguladores sugiere que la inhibición diferencial ocurre cuando un compuesto

interacciona con un sitio regulador que influye preferencialmente sobre la actividad de hidrólisis.

Sin embargo, la carencia de explicaciones totalmente satisfactorias, ha llevado a la postulación de otros mecanismos de inhibición diferencial. A continuación se comentan brevemente dos de ellos.

Matsuno-Yagi, et al han propuesto que la síntesis de ATP puede operar en dos modalidades cinéticas, dependiendo de la relación $\frac{[H^+]}{[ATP]_{funcional}}$. Postulan que cuando esta relación es alta, la enzima funciona con una baja K_m^{ATP} y un bajo recambio; por el contrario, cuando la relación se invierte, como sucede en presencia de inhibidores, la síntesis se lleva a cabo con una alta K_m^{ATP} y un alto recambio. Con estos datos, razonan que la relativa insensibilidad de la síntesis es la consecuencia del efecto compensatorio que produce la transición a una modalidad cinética de mayor recambio, la cual ocurre en el momento en que disminuye el número de ATPasas funcionales. De acuerdo con esto, consideran que la sensibilidad de la hidrólisis está ocasionada por la ausencia de efectos compensatorios que aumenten los valores de la actividad, como sucede en el caso de la síntesis (106).

Por otro lado, el grupo de Griffiths ha interpretado que el fenómeno de la inhibición diferencial es una manifestación de la existencia de dos caminos catalíticos diferentes para síntesis e hidrólisis. Propone que ambas actividades no son imágenes en el espejo, por lo que la H^+ -ATPasa mitocondrial debe

considerarse como una enzima bifuncional, y por ende, asimétrica (105).

Los resultados del presente trabajo y las conclusiones que de ellos se derivan, pueden ser explicados por mecanismos similares a los propuestos por el grupo de Griffiths. La sospecha de que la inhibición diferencial es consecuencia de la estructura asimétrica de la H^+ -ATPasa, urge a una exploración más detallada de los mecanismos moleculares que le dan origen. De aquí la importancia de estudiar la cinética y el mecanismo de acción de un inhibidor diferencial como el trifenilestaño.

MATERIAL Y METODOS

I. Preparaciones Biológicas.

a) Aislamiento de mitocondrias.

Aplicando la metodología descrita por Low y Valin (107), se obtiene una preparación enriquecida de mitocondrias de corazón de res. Esta técnica consiste, básicamente, en el rompimiento mecánico de las células y en la obtención de las mitocondrias por centrifugación diferencial. El siguiente esquema describe los detalles de este proceso:

Un corazón limpio de grasa, coágulos y tejido conjuntivo



Molimiento durante 1' en una licuadora industrial



Adición de 4l. de buffer (sacarosa 250mM, EDTA 15mM, Tris 5mM
pH 7.4)



Ajuste del pH a pH 7.4 con una solución saturada de Tricma
base



Homogenización de la mezcla licuando durante 1' 30"



Certificación del valor del pH (pH = 7.4)

Centrifugación a 1100 g durante 10'

Sobrenadante

Paquete de células enteras y núcleos

Filtración por tres capas de gasa

Centrifugación a 16,000 g durante 10'

Sobrenadante

Precipitado

Resuspensión en buffer (sacarosa
250mM, Tris 5mM pH 7.4)

Centrifugación a 600 g durante 10'

Sobrenadante

Paquete de miosina

Centrifugación a 10,000 r.p.m. por 15'

Precipitado de mitocondrias pesadas (acopladas) y ligeras

b) Preparación de partículas submitocondriales Mg^{2+} -ATP.

La obtención de partículas submitocondriales Mg^{2+} -ATP se llevó a cabo según la metodología reportada por Lee y Ernster (108).

Consiste en la formación de vesículas invertidas, de la membrana interna de la mitocondria, por sonicación con ondas de ultrasonido. Esta preparación ofrece grandes ventajas para la experimentación, pues en ella, el sector catalítico F₁ se encuentra en la parte externa de la vesícula; de esta forma, se encuentra en contacto directo con los componentes del medio de reacción.

La purificación de estas partículas se lleva a cabo en presencia de Mg²⁺-ATP, sustrato de la enzima. En estas condiciones, se obtienen con un alto grado de acoplamiento y con una actividad hidrolítica muy baja debido a su alto contenido de proteína inhibidora. Los pasos a seguir en esta metodología son:

Suspensión de mitocondrias en sacarosa 250mM y ATP 6mM, a una concentración final de 20mg/ml.

Ajuste del pH a 6.9-7.2

Sonicación durante 1' en baño de hielo

Centrifugación a 17,000 \times g durante 15'

Sobrenadante

Paquete de mitocondrias intactas

Centrifugación a 105K \times g durante 40'

Sobrenadante

Precipitado



Resuspensión en sacarosa 250mM



Centrifugación a 105K x g durante 40'



Precipitado de partículas submitocondriales

Sobrenadante



Resuspensión en sacarosa 250mM a una concentración final de 40-60 mg/ml.

II. Activación de Partículas Mg^{2+} -ATP.

Como ya se ha mencionado, las partículas Mg^{2+} -ATP presentan una actividad hidrolítica muy baja que obedece a su alto contenido de proteína inhibidora. La remoción de esta subunidad de su sitio de acción, repercute en una estimulación de la actividad hidrolítica de hasta 10 y 15 veces. A este proceso se le conoce como activación de la enzima. Beltrán, et al (109) han reportado que la H^+ -ATPasa mitocondrial puede ser activada sin desacoplamiento en presencia de fosfato e incubando a 38 C en un pH neutro o alcalinizante. Las condiciones del ensayo son: sacarosa 250mM, H_2PO_4 , pH 7.4 y 38 C. Conviene utilizar un medio acuoso compuesto por agua deuterada (D_2O), debido a que esta

favorece las interacciones hidrofóbicas, y por lo tanto, preserva la estructura membranal y el estado acoplado de las partículas.

NOTA IMPORTANTE: La mayor parte de los experimentos descritos en este trabajo se realizaron con partículas submitocondriales activadas. En aquellos pocos casos en los que esto no ocurrió, se especifica claramente el uso de partículas submitocondriales no activadas. La actividad de las diferentes preparaciones (activadas) obtenidas osciló entre una velocidad de 4.6 y 5.2 $\mu\text{moles/mg min}$ en la hidrólisis, y 0.3 y 0.4 $\mu\text{moles/mg min}$ en la síntesis.

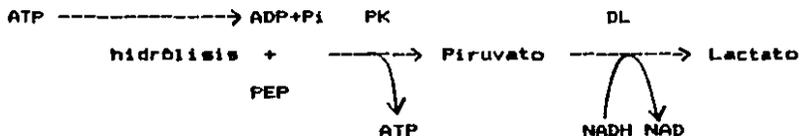
III. Determinación de Proteína.

En todos los casos, la concentración de proteína de las muestras se determinó utilizando la técnica reportada por Lowry, et al (110), la cual funciona en un intervalo de 0-60 μg . En este procedimiento se agregan a la muestra: agua hasta 0.8 ml, 0.1 ml SDS al 10% y 2 ml de solución C (1 ml de Cu SO_4 + tartrato de Na^+-K^+ + 1 ml Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1N). Se reposa 10' la muestra en este medio alcalino, y posteriormente se adiciona 0.1 ml de reactivo de fenol de Folin-Ciocalteu 2N. Después de 15', se registra la absorbancia a 560nm. Se utiliza albúmina sérica bovina para trazar una curva estándar.

IV. Métodos Espectofotométricos de Cuantificación de la Actividad.

a) Ensayo de actividad de hidrólisis.

Se registró la actividad de hidrólisis de las partículas submitocondriales a 30 C, siguiendo el método reportado por Pullman, et al (111). El medio del ensayo está compuesto por sacarosa 50mM, Tris-DAC 25mM pH 7.4, K(DAC) 30mM, Mg²⁺-ATP 3mM, NADH 0.2mM, fosfoenolpiruvato 1mM, rotenona 3µg, FCCP 3µg, piruvato cinasa 10U y deshidrogenasa láctica 10U. En este sistema ocurren las siguientes reacciones:



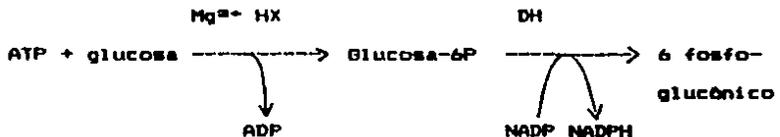
A 340nm la velocidad de desaparición de NADH permite calcular la velocidad de hidrólisis mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Vel.} = \frac{\Delta \text{abs.}/\text{min} \times \text{Vol. cubeta}}{6.22 \times \text{mg}} = [\text{micromol}/\text{mg min}]$$

donde, 6.22 corresponde al coeficiente de extinción molar del NADH.

b) Ensayo de actividad de síntesis.

La actividad de síntesis de las partículas submitocondriales se midió a 30 C en un medio con Tris-DAC 25mM pH 7.4, Mg(DAC)₂ 10mM, glucosa 50mM, NADP 1µmol/ml, ADP 2mM, KH₂PO₄ 15mM, AMP 5mM, hexoquinasa 5u y glucosa 6 fosfato deshidrogenasa 5u. En presencia de ATP, se llevan a cabo las siguientes reacciones:



A 340nm, la velocidad de formación de NADPH se utiliza para calcular la velocidad de síntesis:

$$\begin{array}{l}
 \Delta \text{abs./min} \times \text{Vol. cubeta} \\
 \text{Vela} = \frac{\hspace{10cm}}{6.22 \times \text{mg}} = \text{Enterosoles/mg min}
 \end{array}$$

donde 6.22 corresponde al coeficiente de extinción molar del NADPH.

V. Métodos Radioactivos de Cuantificación de la Actividad.

a) Ensayo de actividad de hidrólisis.

La velocidad hidrolítica de las partículas submitocondriales se determina a 30°C cuantificando la formación de $^{32}\text{P}\text{P}\text{i}$ a partir de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$, de acuerdo a la metodología reportada por el grupo de Gómez Puyou (112). La muestra se procesa agregándole 1 ml de agua, 0.3 ml de acetona y 1 ml de reactivo de molibdato (5g de heptamolibdato de amonio, 40 ml de ácido sulfúrico 10N en un volumen final de 100 ml). El Pi del medio se incorpora a un compuesto de fosfomolibdato soluble en solventes orgánicos. A continuación, se agrega 1 ml de acetato de butilo (fase orgánica), se agita perfectamente en un mezclador Vortex y se centrifuga a 1,500 r.p.m. durante 2 min para separar la fase orgánica de la fase acuosa. Se toma una alícuota de 0.4 ml de la fase orgánica y se coloca en un papel filtro, que se cuenta en viales con líquido de centelleo de Bray.

b) Ensayo de actividad de síntesis.

La velocidad de síntesis de las partículas submitocondriales se obtuvo evaluando a 30°C la formación de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ a partir de ADP y $^{32}\text{P}\text{P}\text{i}$. El procedimiento consiste en agregar a la muestra 0.5 ml de molibdato de amonio (al 3.3% en H_2SO_4 , 3.7N) y 0.1 ml de acetona. Todo el Pi no incorporado en ATP reacciona formando un compuesto de fosfomolibdato, el cual puede extraerse agregando

una fase orgánica (2 ml de isobutanol benceno). Se realizan 7 extracciones más en presencia de 20 ul de KH_2PO_4 20mM (acarreador), 0.1 ml de acetona y 1 ml de isobutanol benceno. De la fase acuosa, libre de $^{32}\text{P}_i$, se toma una muestra de 0.4 ml, se aplica a papel filtro y se cuantifica el contenido de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ en líquido de centelleo BRAY.

VI. Medición del $\Delta\Psi$ generado por la actividad respiratoria.

El potencial electroquímico se define como:

$$\Delta\mu_{\text{H}^+} = \Delta\Psi + (-\Delta\text{pH}Z)$$

El componente eléctrico del potencial ($\Delta\Psi$) se midió registrando el cambio de absorbancia del oxonol V, que ocurre cuando se acumulan cargas positivas en la superficie de la membrana. Se utilizó 0.5 μM de oxonol V en el amortiguador de síntesis (Tris-OAc 25mM, Mg(OAc) $_2$ 10mM y glucosa 50mM). La medición se llevó a cabo en un espectrofotómetro de doble haz calibrado en 630nm (monocromador 1) y 603nm (monocromador 2).

VII. Cuantificación de los ³H-adenin nucleótidos unidos a la enzima.

Se determinó el contenido de ³H-adenin nucleótidos de la enzima utilizando la metodología reportada por Penefsky (113). Esta técnica consiste en incubar la enzima con ³H-adenin nucleótidos en un medio de hidrólisis (sacarosa 200mM, Tris-DAC 20mM pH 7.4, Mg²⁺-³H-ATP 50µM, fosfoenolpiruvato 20mM, K(DAC) 20mM, carboxiatractilósido 50µM, 5'adenosina pentafofato 50µM); posteriormente, se filtra 2 veces centrifugando 1' en una columna de Sephadex (fine), debidamente equilibrada con buffer (sacarosa 200mM, Tris-DAC 50mM pH 7.4). Las partículas filtradas carecen de los componentes del medio de reacción. Se le adiciona BDS (2% final) y se toma una alícuota para medir proteína y otra para cuantificar el tritio en líquido de centelleo TRITOSOL. La adhesión de ³H-adenin nucleótidos se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\begin{array}{r}
 \text{(c.p.m. - blanco)} \times \frac{1 \text{ ml}}{\text{Vol. contado}} \times \frac{\text{nmol } ^3\text{H M.Reacción}}{\text{cuentas totales}} \\
 \times \frac{1 \text{ mg}}{0.42 \text{ nmol Fl}} \times \frac{1}{\text{mg/ml}}
 \end{array}$$

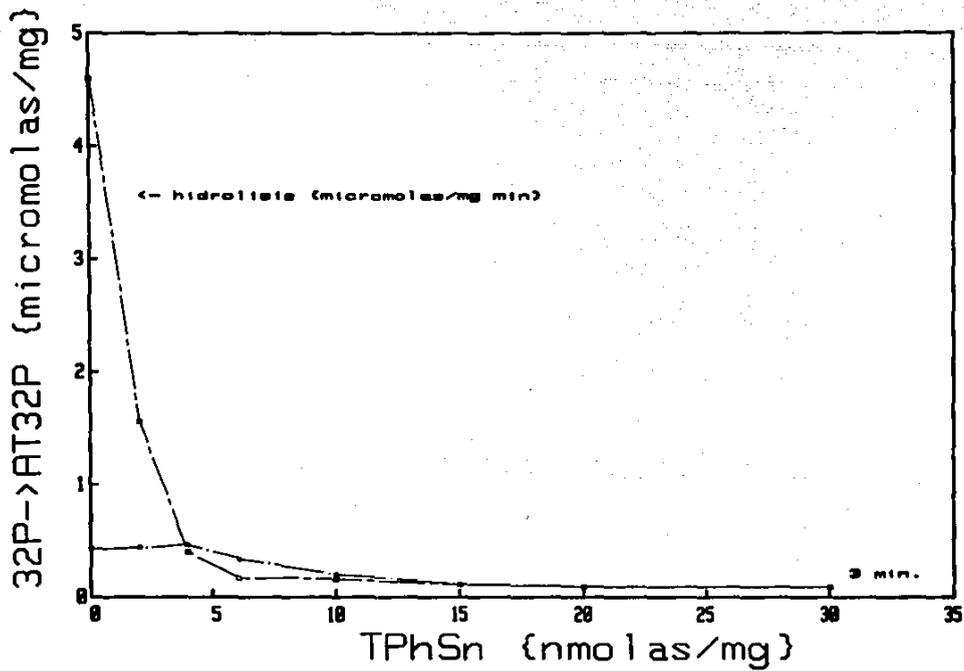
RESULTADOS

I. Análisis cinético del efecto diferencial del TPhSn sobre las actividades de síntesis e hidrólisis.

Entre los inhibidores diferenciales, la familia de compuestos de trialquilestaño son los que producen una diferencia más drástica entre la inhibición que producen en la actividad hidrolítica y la que causan en la actividad sintética de la ATPasa mitocondrial. Ejercen su acción inhibitoria interactuando con un sitio de alta afinidad localizado en la porción Fo de la enzima que no es compartido por otros inhibidores de canal como oligomicina y dicitclohexilcarboxidimida (DCCD) (114,115). Hasta la fecha, se desconoce la localización exacta de dicho sitio, aunque existen reportes que establecen que los compuestos de trialquilestaño pueden reaccionar con residuos de histidina y cisteína (116, 117) o unirse a tioles, monotioles y ditioles (118, 119, 120). Diversos estudios realizados con el compuesto trifenilestaño, muestran que este inhibidor presenta una cinética no competitiva, y que su efecto sobre la ATPasa estriba en su capacidad para disminuir la translocación de protones a través de la porción Fo (121). Esta conclusión se obtuvo observando que el TPhSn inhibe la relajación anaeróbica del potencial en partículas carentes de F₁, y no afecta la actividad de la F₁ soluble.

El análisis de la cinética de inhibición del TPhSn (Figura 1) muestra que concentraciones que inhiben un 80% la hidrólisis (4nmoles/mg), no afectan de forma alguna la actividad sintética. Concentraciones mayores sí inhiben la actividad de síntesis. Dado que en presencia de Cl^- el TPhSn es capaz de funcionar como intercambiador Cl^-/OH^- , sus propiedades desacoplantes son muy ostensibles. Sin embargo, todos los experimentos descritos en este trabajo fueron realizados en ausencia de Cl^- . Por lo tanto, la inhibición que se observa de la síntesis es real y no obedece a un abatimiento del componente eléctrico del potencial a altas concentraciones del inhibidor. Para corroborar este hecho, se realizó la medición experimental del $\Delta\psi$ generado por la oxidación de succinato en la cadena respiratoria, a diferentes concentraciones del inhibidor. La figura 2 claramente muestra que el exceso de TPhSn no afecta la formación del $\Delta\psi$, ni su magnitud. Como control interno de la inhibición de la hidrólisis, la figura 2 presenta la medición del potencial generado por la hidrólisis de Mg^{2+} -ATP. La caída que se observa de este último potencial al incrementarse la concentración de TPhSn, correlaciona con la inhibición de la actividad hidrolítica.

FIG. 1



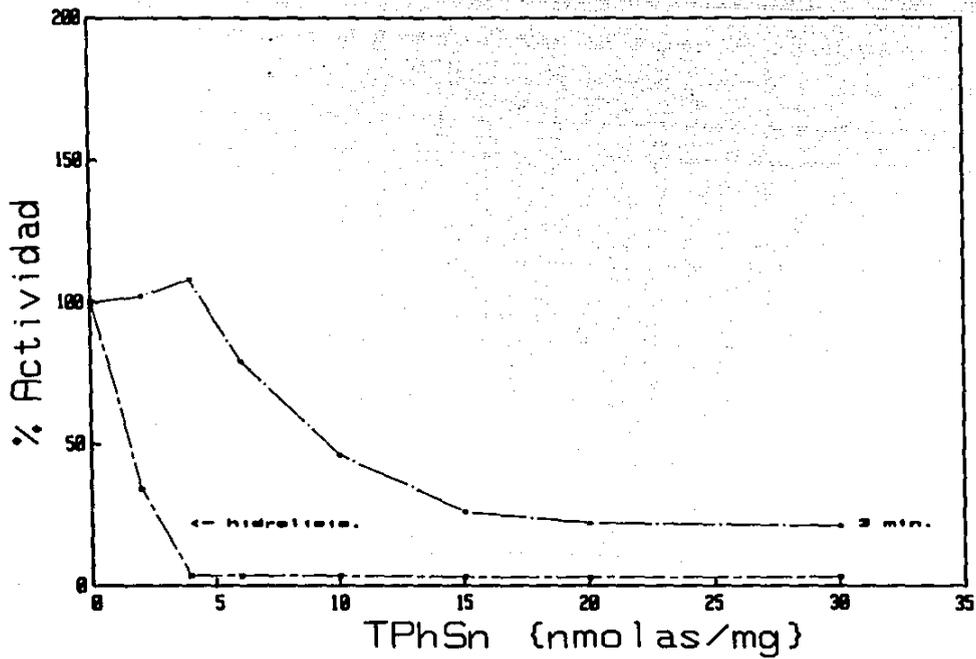


Fig. 2

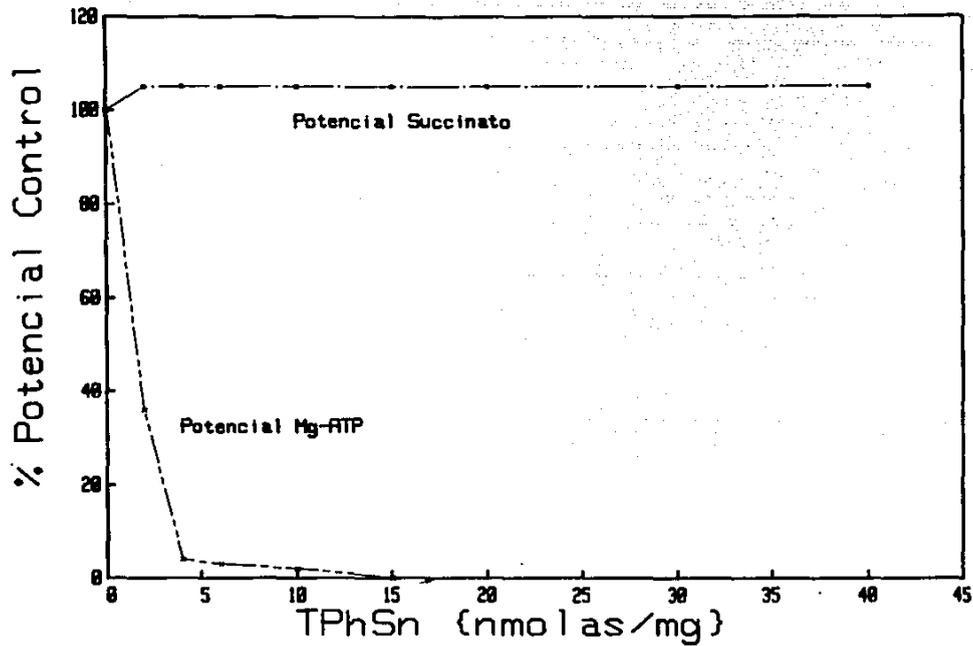


Figura 1. - (a) Efecto de diferentes concentraciones de TPhSn sobre la síntesis y la hidrólisis de ATP.

Las partículas submitocondriales fueron incubadas durante 5' con el inhibidor. La síntesis ($^{32}\text{P} \rightarrow [\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$) se midió 3' después de que las partículas entraron en contacto con un medio compuesto por sacarosa 200mM, Tris-OAc 20mM pH 7.4, $^{32}\text{P}_i$ 10mM, $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ 10mM, succinato 20mM, ADP 2mM y Ap5A 50 μM . Posteriormente, se cuantificó el $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ formado tal y como se describe en "Material y Métodos". La hidrólisis se midió espectrofotométricamente en un medio con sacarosa 50mM, Tris-OAc 25mM pH 7.4, K(OAc) 30mM, Mg^{2+} -ATP 3mM, NADH 0.2mM, PEP 1mM, rotenona 3 μg , FCCP 3 μg , piruvato cinasa 10u y deshidrogenasa láctica 10u.

(b) Datos del panel (a) expresados en términos del porcentaje de la actividad inicial.

Figura 2. - Efecto de diferentes concentraciones de TPhSn sobre el potencial generado por succinato y por Mg^{2+} -ATP.

El registro se llevó a cabo en un medio con Tris-OAc 25mM, $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ 10mM, glucosa 50mM, 0.5 μM oxonol y 0.1 mg de partículas submitocondriales previamente incubadas 5' con el inhibidor.

El análisis de la actividad de síntesis evaluada a través de la acumulación de [γ - 32 P]ATP en presencia del inhibidor y a diferentes tiempos de incubación en el medio de reacción (Figura 3), muestra un comportamiento cinético, en el que se observa una marcada influencia del tiempo sobre la inhibición producida por el TPhSn. En este experimento se usaron dos concentraciones del compuesto inhibidor: 1) 4 nmolas/mg, que no afectan la actividad sintética y 2) 6 nmolas/mg, que inhiben esta actividad en aproximadamente un 20%.

Un acercamiento más detallado de este fenómeno involucró su exploración en un amplio espectro de concentraciones del inhibidor (Figura 4). Los tiempos elegidos para este análisis corresponden al minuto treinta y al minuto cuarenta y cinco de la figura 3. Como puede observarse en la figura 4, la inhibición llevada a cabo por el TPhSn sufre alteraciones cuando las partículas son incubadas por tiempos de treinta y cuarenta y cinco minutos en el medio de síntesis.

La interpretación de que han sido objeto los resultados de la figura 4, descarta la posibilidad de que la aparición de los picos que rebasan el 100% (Fig. 4 (b)) de la actividad esté ligada a un efecto de estimulación de la síntesis por parte del TPhSn. Por el contrario, se considera que la elevación de los

FIG. 5

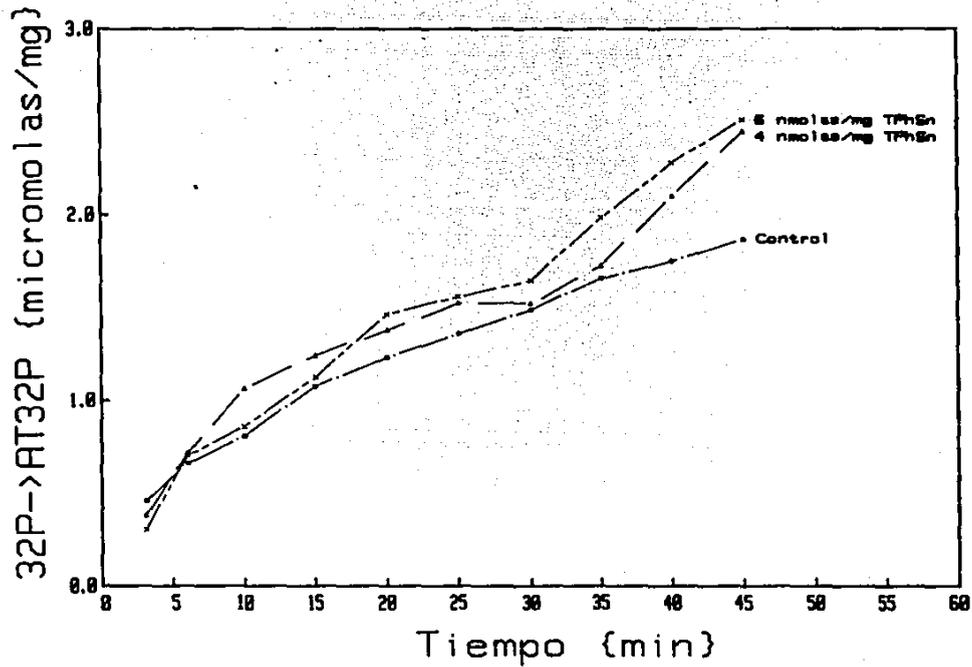
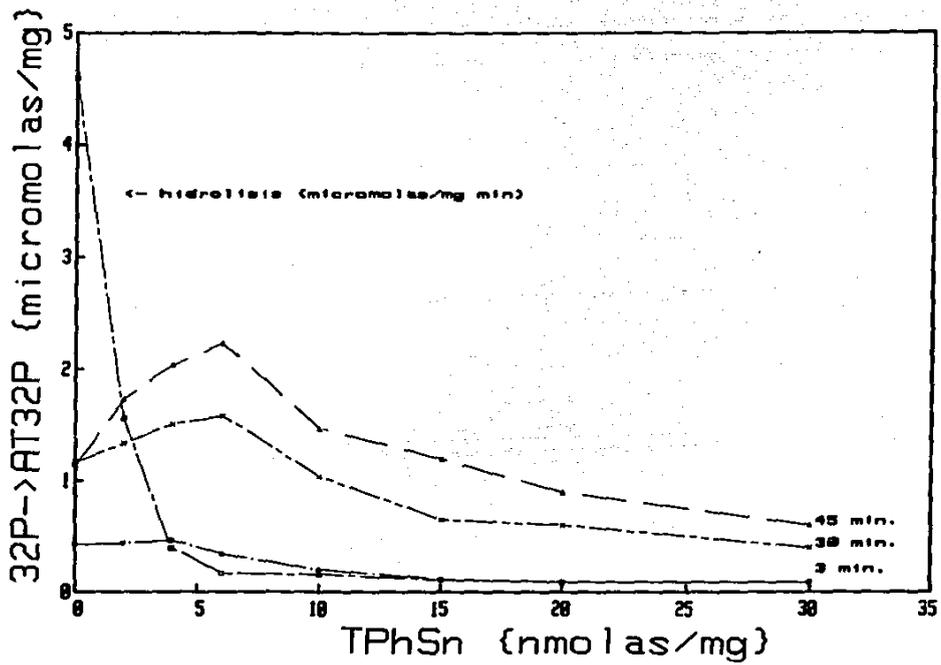


FIG. 4



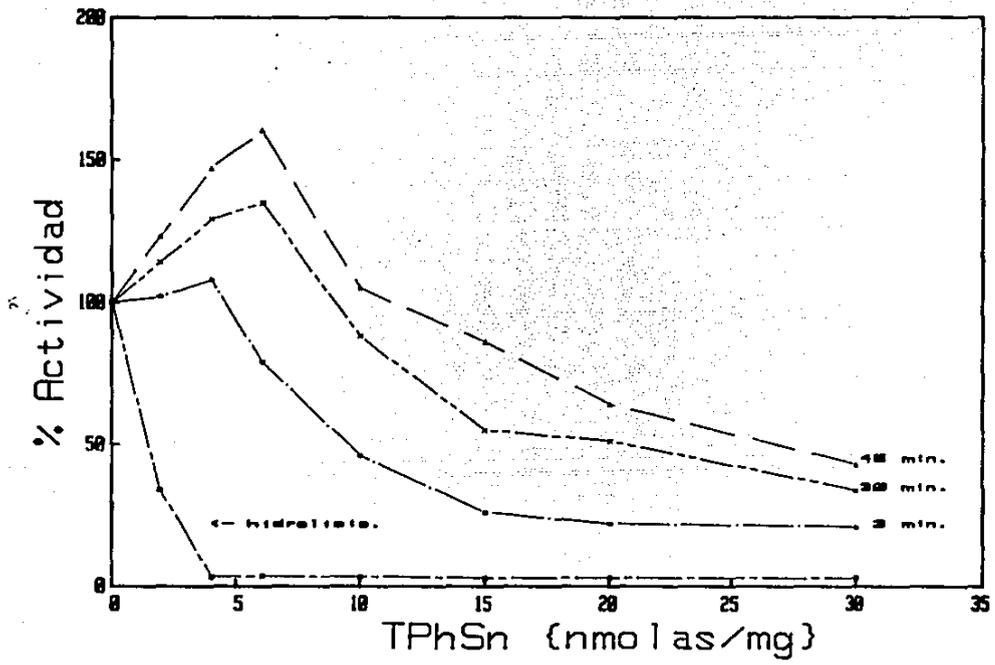


Figura 3. - Efecto del tiempo en la acumulación de [γ - 32 P]ATP de partículas submitocondriales control, + 4nmol/mg min TPhSn, + 6nmol/mg min TPhSn.

El ensayo se llevó a cabo en un medio con sacarosa 200mM, Tris-DAC 20mM pH 7.4, Mg(DAC) $_2$ 10mM, 32 Pi 10mM, succinato 20mM, ADP 2mM, Ap5A 50 μ M y partículas submitocondriales (1.7mg). La cuantificación del [γ - 32 P]ATP formado se llevó a cabo como se describe en "Material y Métodos".

Figura 4. - (a) Efecto de diferentes concentraciones de TPhSn sobre la acumulación de [γ - 32 P]ATP a los tiempos 3, 30 y 45 minutos.

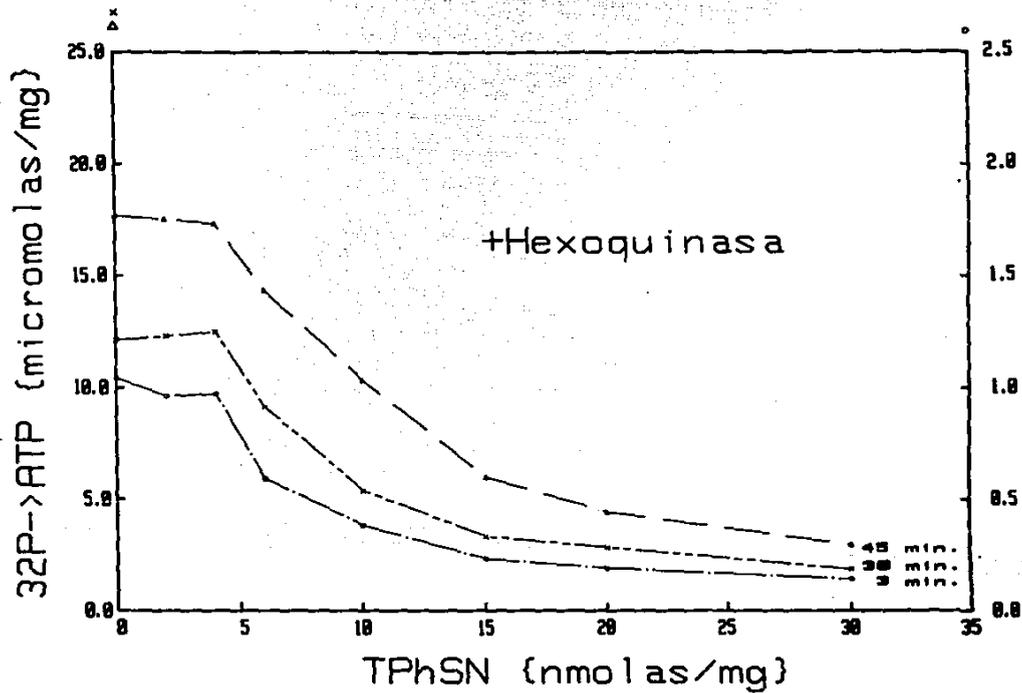
Las muestras con y sin inhibidor (0.73mg) se incubaron durante los tiempos indicados en un matraz oxigenado con medio compuesto por sacarosa 200mM, Tris-DAC 20mM, Mg(DAC) $_2$ 10mM, 32 Pi 10mM, succinato 20mM, ADP 2mM y Ap5A 50 μ M. La formación de [γ - 32 P]ATP se determinó como se reporta en "Material y Métodos". La curva de hidrólisis referencia se obtuvo espectrofotométricamente en presencia de sacarosa 50mM, Tris-DAC 25mM, K(DAC) 30mM, Mg $^{++}$ -ATP 3mM, NADH 0,2mM, PEP 1mM, rotenona 3 μ g, FCCP 3 μ g, piruvato cinasa 10u y deshidrogenasa láctica 10u.

(b) Datos del panel (a) expresados en términos del porcentaje de la actividad inicial.

valores de acumulación de ATP es una consecuencia esperada de la fuerte inhibición de la hidrólisis a concentraciones bajas de TPhSn. Como todos los experimentos se realizaron en ausencia de glucosa y de la enzima hexoquinasa (trampa de ATP que utiliza todo el ATP del medio para fosforilar la glucosa y producir ADP), el ATP producto de la actividad de síntesis se acumula en el medio de reacción. Mientras que durante tres minutos de incubación en el medio propicio para la síntesis, la acumulación de ATP es escasa (V_{max} síntesis = 150 nmolas/mg), a los treinta y cuarenta y cinco minutos su valor es considerable. Por ende, a estos tiempos, los niveles del nucleótido sintetizado serán muy altos, debido a que la cancelación de la actividad hidrolítica por el TPhSn repercute en la conservación del mismo. De forma contraria, en ausencia del inhibidor (vease el intercepto), los niveles de ATP serán menores y reflejarán el balance que se establece entre la síntesis y la depleción por hidrólisis.

Dado que el comportamiento anómalo de las curvas de incorporación de $^{32}P_i$ a los tiempos de treinta y cuarenta y cinco minutos se interpretó como consecuencia de la acumulación de $^{32}P_i$ ATP en el medio de reacción, se decidió realizar el mismo experimento en presencia de glucosa y de la enzima hexoquinasa, para asegurar la reacción de la mayor parte del ATP del medio. La figura 5 muestra los resultados obtenidos.

FIG. 5



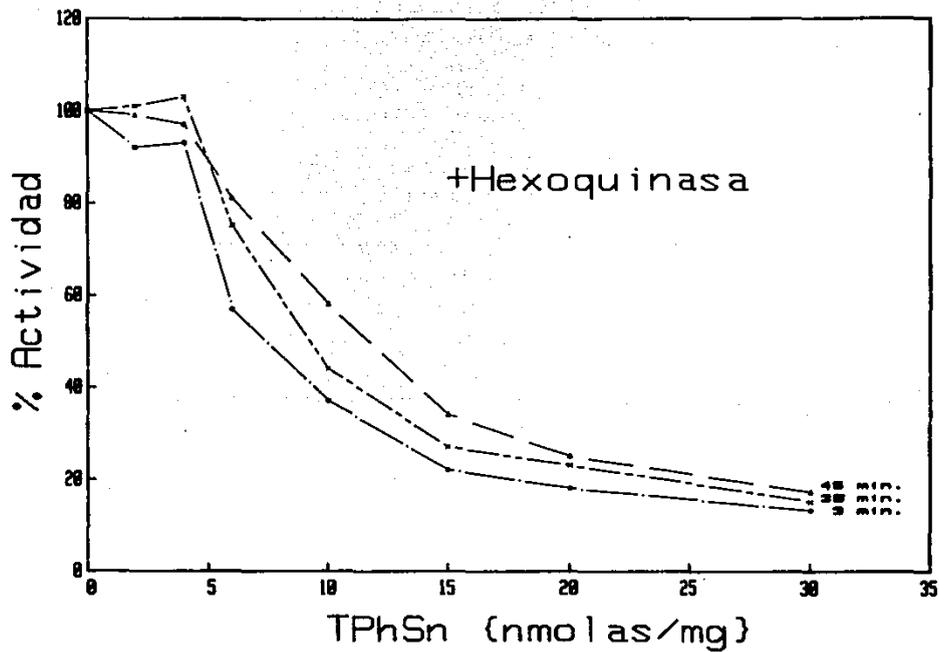


Figura 5. - Efecto de diferentes concentraciones de TPhSn sobre la acumulación de [γ - 32 P]ATP a los tiempos 3, 30 y 45 minutos en presencia de hexoquinasa.

Las muestras con y sin inhibidor (0.73mg) se incubaron durante los tiempos indicados en un matraz oxigenado con medio compuesto por sacarosa 200mM, Tris-DAC 20mM pH 7.4, Mg(DAC) 10mM, glucosa 30mM, 32 Pi 10mM, succinato 20mM, ADP 2mM, Ap5A 50 μ M y hexoquinasa 100u. En este caso se determinó la formación de [γ - 32 P]ATP midiendo la desaparición de 32 Pi a través de la técnica que se utiliza para cuantificar la formación de este anión (ver "Material y Métodos").

(b) Datos del panel (a) expresados en términos del porcentaje de la actividad inicial.

La enzima hexoquinasa, por remover el ATP del medio, anula la actividad hidrolítica de la ATPasa mitocondrial. Lógicamente, la inhibición que se observa en estas condiciones corresponde enteramente a la inhibición de la actividad de síntesis. En estas condiciones, a diferencia del experimento de la figura 4, la inhibición del TPhSn no varía en el tiempo y se presenta idéntica a la que puede registrarse espectrofotométricamente (ver Fig 5 (b)). Por lo tanto, puede concluirse que la discrepancia que se observa entre los resultados de las figuras 5(b) y 4(b), indica que la presencia de ATP en el medio es la responsable de las alteraciones en la inhibición del TPhSn comentadas anteriormente.

Con el objeto de discriminar entre un efecto netamente cinético, ocasionado por la inhibición de la hidrólisis, y una participación real del ATP en el proceso de inhibición del TPhSn, se decidió evaluar el efecto de dicho inhibidor sobre la fosforilación en presencia de un exceso de ATP frío, es decir, en condiciones de hidrólisis. La figura 6 muestra los resultados de los estudios sobre:

- 1) el efecto del TPhSn sobre la fosforilación en presencia de 1mM ATP.
- 2) el efecto del TPhSn sobre la hidrólisis en condiciones de fosforilación (es decir, en presencia de succinato y ADP, y en ausencia de desacoplantes).
- 3) el efecto del TPhSn sobre la fosforilación normal.

Para facilitar el análisis de las cinéticas presentadas en la figura 6, me permitiré comentar cada pànel por separado:

Pànel (a).- Se muestra nuevamente que las cinéticas de acumulación control y con 4nmolas/mg de TPhSn son similares a tiempos cortos. En presencia de una concentración de 6nmolas/mg TPhSn, que causa una disminución del 20% en la velocidad de síntesis, los valores de acumulación son consistentemente, 20% menores.

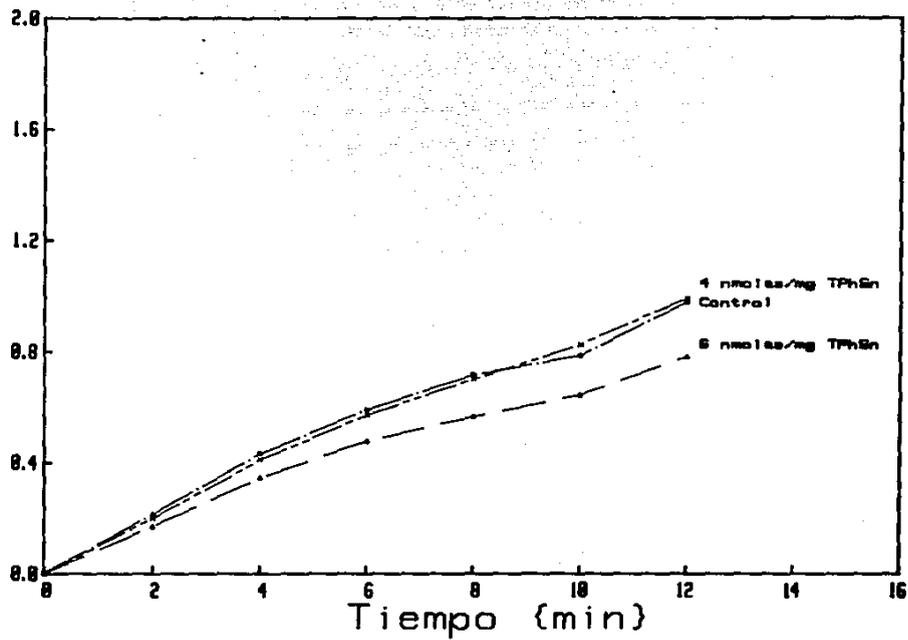
Pànel (b).- Se evidencia el aumento congruente en los valores de acumulación de ATP sintetizado al adicionar al medio 1mM de ATP frío. Existen dos razones cinéticas que justifican este hecho. La primera consiste en que parte del exceso del ATP frío añadido, será hidrolizado y contribuirá a aumentar la magnitud del potencial de membrana; como consecuencia, se llevará a cabo una síntesis neta de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ a partir de ^{32}P , cuyos valores se sumarán a la síntesis neta. El segundo factor que interviene en este fenómeno es que el exceso de ATP "exógeno" (no sintetizado por la enzima) será hidrolizado por la ATPasa, probabilísticamente, en mayor proporción que el $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ recién sintetizado. Debido a esto, se conserva más $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ que en la condición control (sin ATP frío) en donde se ponen en juego las contribuciones de síntesis e hidrólisis. La adición de 1mM de ATP detiene prácticamente la hidrólisis del $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ sintetizado; por ende, puede considerarse, fenomenológicamente, como una condición de síntesis absoluta, equivalente a la que ocurre en presencia de hexoquinasa. Por esta consideración, uno esperaría

que a una concentración de 4nmolas/mg de TPhSn, que sólo inhibe la hidrólisis y no la síntesis, las curvas que muestran la fosforilación + 1mM ATP y la fosforilación + 4nmolas/mg de TPhSn + 1mM ATP debieran ser iguales. Por lo mismo, la curva que presenta la fosforilación + 4nmolas/mg de TPhSn, que sigue conservando un 15% de hidrólisis, debía presentar valores ligeramente menores que los de la curva que refleja la fosforilación + ATP. El mismo criterio puede aplicarse a las partículas incubadas con 6nmolas/mg de TPhSn, aunque esperando valores 20% menores que los de la curva de fosforilación + ATP y de la curva teórica de fosforilación + 4nmolas/mg de TPhSn + ATP, debido a la disminución real del 20% que dicha concentración de TPhSn ocasiona en la actividad sintética.

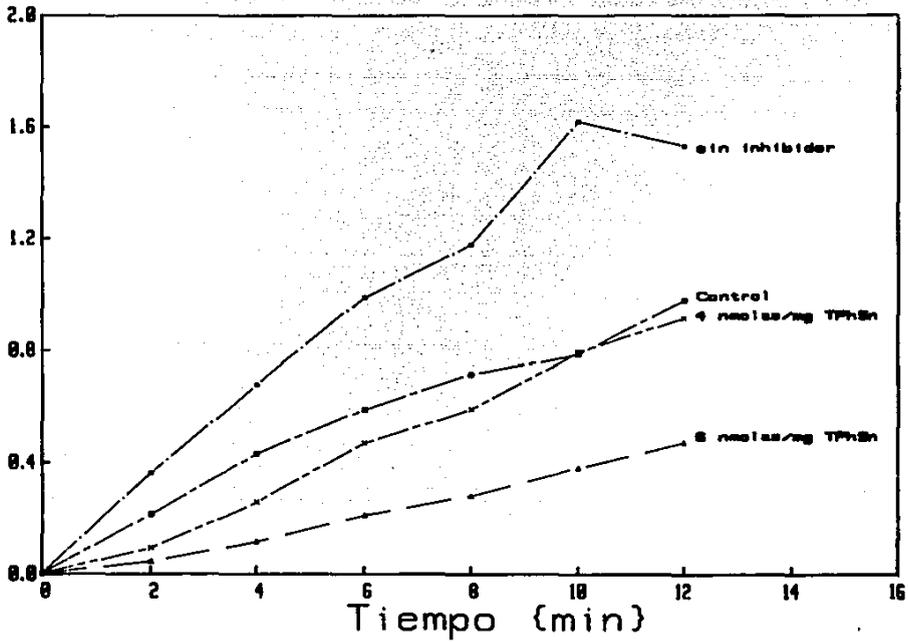
Sin embargo, en contra de lo esperado, se observa experimentalmente que en presencia de 1mM de ATP "exógeno" la inhibición del TPhSn sobre la acumulación de ATP es mucho más drástica.

Panel (c).- Se presenta la curva de hidrólisis obtenida en condiciones de fosforilación. En dichas condiciones, la actividad hidrolítica es muy baja. Este efecto se encuentra ampliamente documentado en la literatura; se sabe que la presencia de ADP inhibe la velocidad hidrolítica (122-124); se supone que el succinato desplaza la catálisis de la enzima hacia la dirección de síntesis, probablemente confiriéndole una nueva conformación en la que la afinidad por ADP y Pi es mayor (125, 126); y por último, se conoce que en ausencia de desacoplantes la actividad

Fig. 9
32P → AT32P {micromolas/mg}



$^{32}\text{P} \rightarrow \text{AT32P}$ (micromolas/mg)



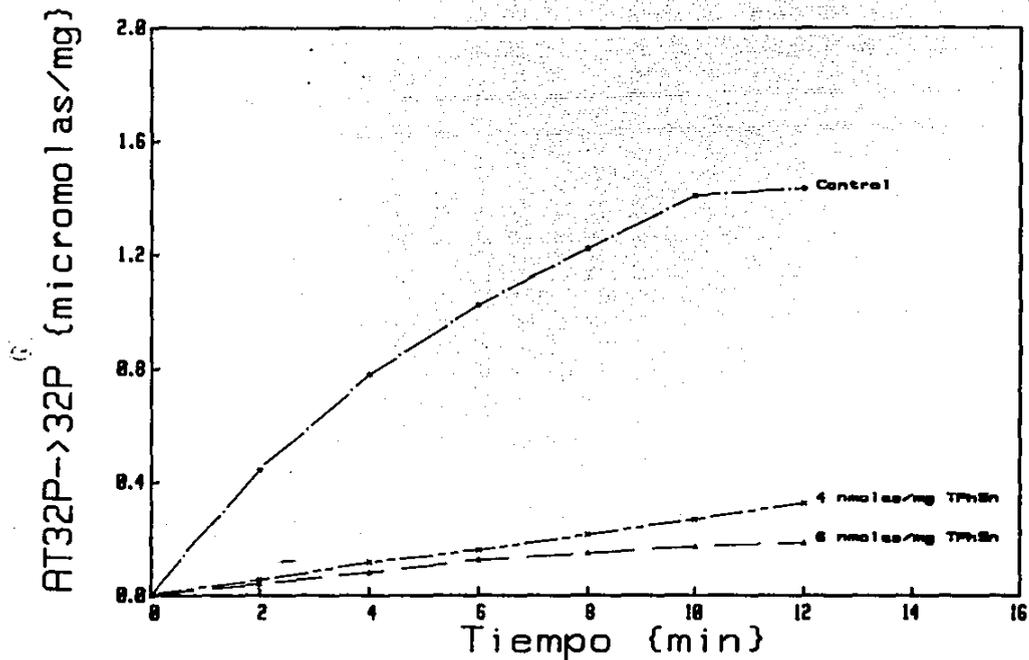


Figura 6. - (a) Efecto del TPhSn en la acumulación de [γ - 32 P]ATP medida a tiempos cortos (0-12 minutos).

El ensayo se llevó a cabo con partículas submitocondriales (1 mg) con y sin inhibidor (control) en un medio compuesto por sacarosa 200mM, Tris-OAc 20mM pH 7.4, Mg(OAc) 10mM, 32 Pi 10mM, succinato 20mM, ADP 2mM y Ap5A 50 μ M.

(b) Efecto del TPhSn en la acumulación de [γ - 32 P]ATP medida a tiempos cortos (0-12 minutos) en presencia de Mg $^{2+}$ -ATP 1mM.

Se siguió el mismo protocolo que en el panel (a) pero en presencia de Mg $^{2+}$ -ATP 1mM. Con el fin de comparar las curvas de ambos paneles, se incluye la curva control del panel (a).

(c) Curso de la actividad hidrolítica de las partículas submitocondriales cuando estas se encuentran en las condiciones experimentales del panel (b) (Mg $^{2+}$ -ATP).

hidrolítica nunca llega a su V_{max} . Este panel también muestra la actividad muy baja de la hidrólisis inhibida por 4 y 6 $\mu\text{mol/L}$ de TPhSn.

Por todas las consideraciones anteriores, se llega a la conclusión de que el TPhSn es capaz de inhibir la síntesis de una manera más poderosa en presencia de ATP. Esta conclusión invita a la revaloración de la figura 4. Un análisis superficial de la figura 4(b) podría llevarnos a la conclusión errónea de que el aumento de la concentración de ATP en el medio, al aumentar el tiempo de reacción, conduce a una inhibición cada vez más sonora. Por el contrario, los datos emanados de la figura 6 confirman el efecto opuesto. La solución de esta aparente paradoja se encuentra en la racionalización de que si el ATP no afectara la inhibición de la síntesis por el TPhSn, los valores de acumulación de la figura 4, en el minuto treinta y cuatro y cinco, serían mucho más altos.

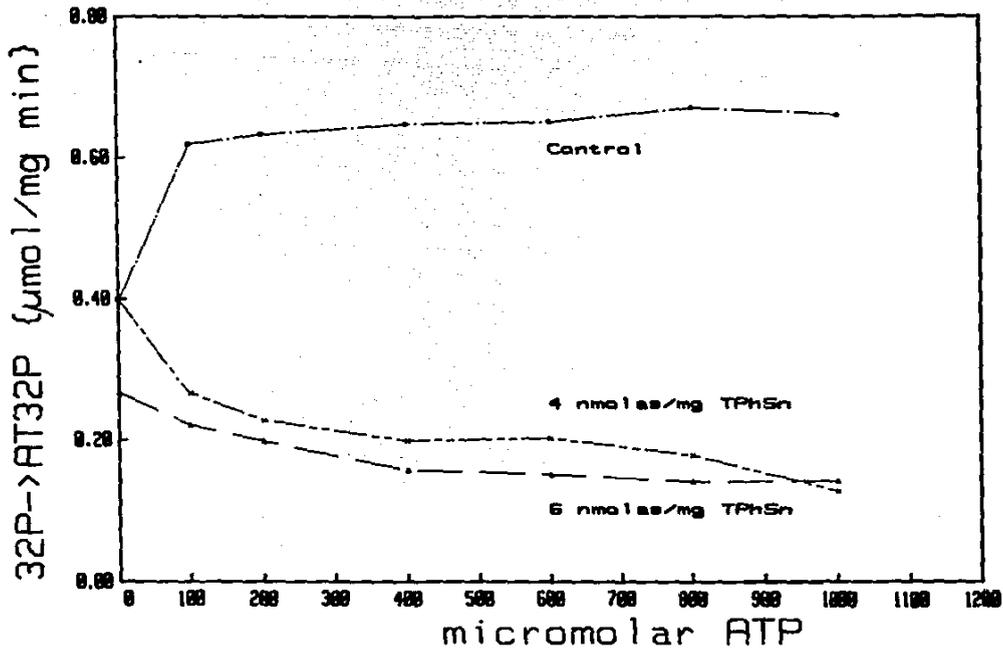
Con objeto de caracterizar el papel del ATP en el proceso de inhibición del TPhSn, se procedió a estudiar, a través de una curva de concentración, la influencia de diferentes concentraciones de Mg^{2+} -ATP en los valores de la actividad de síntesis (sin y con TPhSn) y de la actividad de hidrólisis en condiciones de fosforilación (sin y con TPhSn).

Resulta importante destacar que cada punto del experimento que muestra la figura 7 se realizó con una concentración muy baja de

partículas submitocondriales (12.5 μ g.), con el fin de que las variaciones en la concentración de ATP del medio, dadas por la síntesis del nucleótido a partir de ADP y P_i , y por su hidrólisis, no fueran significativas. De esta forma, se pueden evaluar los resultados del experimento sin temer que sean la consecuencia de alteraciones fuertes en la constante de equilibrio de la reacción.

La curva de fosforilación control de la figura 7 muestra el curso que sigue la acumulación de ATP al ir aumentando la concentración de Mg^{2+} -ATP en el medio. El incremento inicial que se observa en la velocidad de síntesis, al pasar de la condición de $0\mu M$ ATP no radioactivo a la de $100\mu M$, obedece a la cancelación de la hidrólisis del $ATP^{32}P$ recién sintetizado causada por la hidrólisis, probabilísticamente preferente, de $100\mu M$ de ATP no radioactivo presente en el medio. Gracias a esto, las velocidades de síntesis registradas corresponden a la síntesis absoluta (no mermada por la actividad hidrolítica). La estabilidad de los puntos subsiguientes (obtenidos a 200, 400, 600, 800 y $1000\mu M$) no es sino el reflejo de la constancia en la relación $ATP / \Delta\mu H^+$. Es un hecho conocido que en el estado estacionario, el juego que se establece entre la síntesis impulsada por el gradiente electroquímico y la hidrólisis del ATP recién formado -que a su vez genera un potencial de protones que contribuye a la síntesis de ATP-, conduce a un valor constante de conservación de ATP. Este efecto puede observarse claramente al comparar las curvas de fosforilación e hidrólisis control (pánel (a) y pánel (b)).

Fig. 7



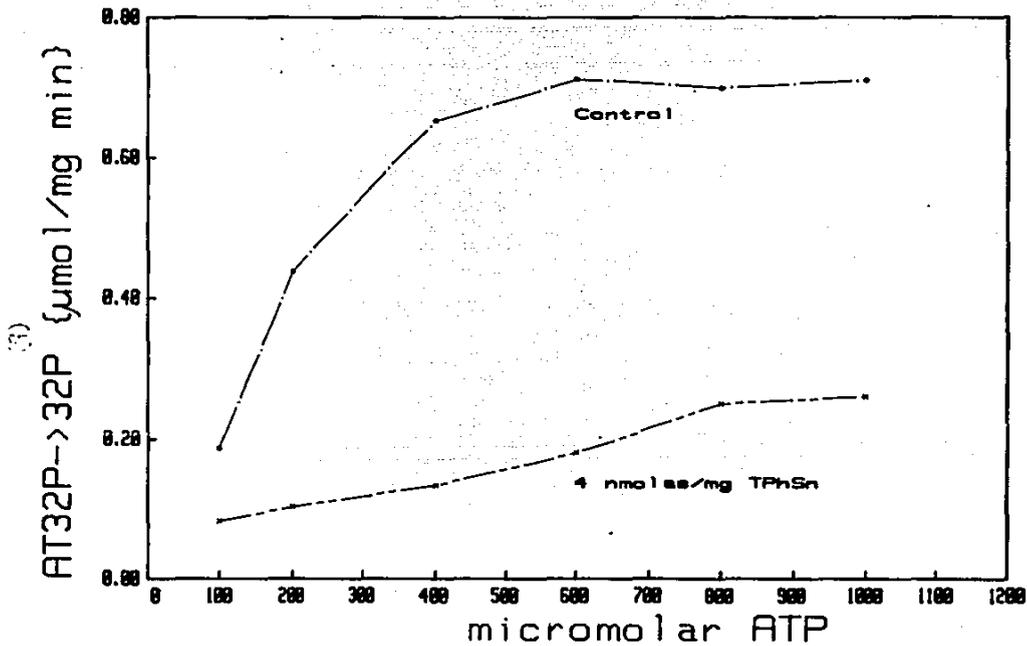


Figura 7. - (a) Efecto de la concentración de ATP en la inhibición que provoca el TPhSn sobre la acumulación de [γ - 32 P]ATP.

12.5ug de partículas submitocondriales se incubaron durante 3' en un medio compuesto por sacarosa 200mM, Tris-OAc 20mM, Mg(OAc) $_2$ 10mM, 32 Pi 10mM, succinato 20mM, ADP 2mM y Ap5A 50 μ M. Posteriormente, se determinó el [γ - 32 P]ATP formado como se especifica en "Material y Métodos".

(b) Valores de la actividad hidrolítica en las condiciones experimentales del panel (a).

respectivamente) en sus últimos puntos, que corresponden a un estado estacionario. En estos puntos, la relación síntesis/hidrólisis es igual a 1; ésto es, una vez alcanzada cierta acumulación de ATP en el medio, todo aquello que se sintetice será reciclado a través de su hidrólisis para la formación de potencial utilizable por la síntesis. Por su lado, la curva de hidrólisis control (ver Fig. 7(b)) muestra el aumento en la velocidad de esta actividad, al incrementar la molaridad del ATP del medio, hasta alcanzar su V_{max} en condiciones de fosforilación.

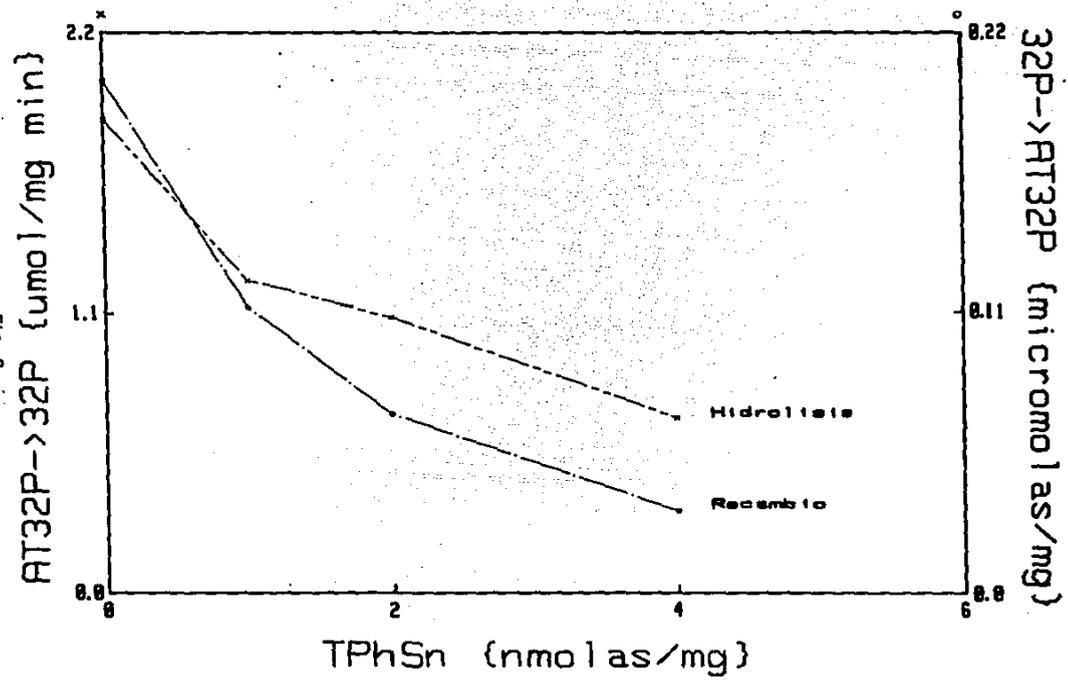
Congruente con los resultados de las figuras anteriores, las curvas de fosforilación en presencia de TPhSn de la figura 7(a), muestran el aumento notable en la inhibición que provoca el TPhSn al irse incrementando la concentración de Mg^{2+} -ATP. A 400 μ M de ATP, se registran valores de síntesis 50% menores que los que corresponden a la inhibición por TPhSn en ausencia de ATP (ver intercepto). Dado que el exceso de ATP frío "exógeno" conserva al nucleótido radioactivo recién sintetizado, los registros muestran la síntesis absoluta. Por lo tanto, el incremento en la inhibición del TPhSn en presencia de ATP es real y no obedece a la contribución -de cualquier forma mínima-, de la hidrólisis en condiciones de fosforilación inhibida por TPhSn.

Con el fin de explorar un poco más el mencionado efecto del ATP sobre la inhibición diferencial del TPhSn, se exploró el

efecto de dicho compuesto sobre la reacción de recambio ATP-Pi. A través de la reacción de recambio ATP-Pi es posible evaluar la síntesis de ATP (recambio) impulsada exclusivamente por el potencial generado por la hidrólisis de Mg^{2+} -ATP. Consecuentemente, las mediciones de cada una de las actividades se llevan a cabo en condiciones idénticas, es decir, en presencia de 1mM Mg^{2+} -ATP, 1mM Mg^{2+} -ADP y 10mM Pi. Los registros se llevaron a cabo variando la concentración de TPhSn.

En este experimento se utilizó una concentración de TPhSn que no inhibe la síntesis (ver Figura 1). De acuerdo con esto, el resultado esperado sería la inhibición del recambio absolutamente dependiente y proporcional a la inhibición de la hidrólisis. La figura 8 muestra, por el contrario, un aumento notable de la relación hidrólisis/recambio; esto es, el recambio se inhibe aún más de lo que se inhibe la hidrólisis. Siendo que esta reacción se mide con 1mM Mg^{2+} -ATP, interpretamos que una concentración de TPhSn que no afecta la síntesis en ausencia de este nucleótido, se vuelve poderosamente inhibitoria en su presencia, tal y como se desprende de las figuras anteriores.

Fig. 8



(3)

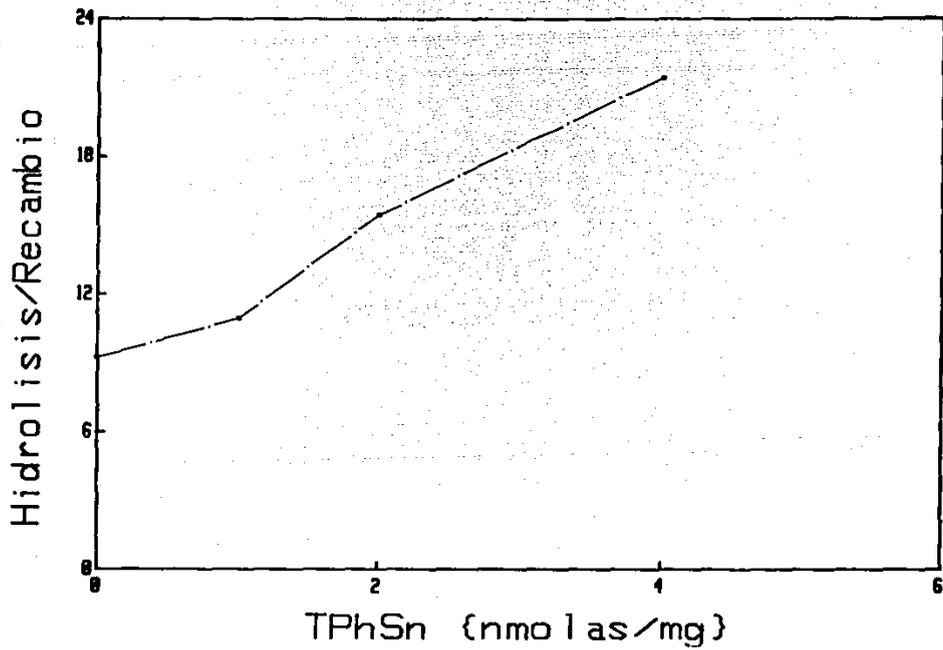


Figura 8.- (a) Efecto del TPhSn sobre la reacción de recambio ATP-Pi.

La síntesis de [γ]- 32 P]ATP (recambio) se midió en un medio con sacarosa 200mM, Tris-DAC 20mM pH 7.4, Mg(OAc) $_2$ 10mM, 32 Pi 10mM, ADP 1mM y Ap5A 50 μ M. La hidrólisis de [γ]- 32 P]ATP se registró en un medio con sacarosa 200mM, Tris-DAC 20mM pH 7.4, Mg(OAc) $_2$ 10mM, Pi 10mM, ADP 1mM, [γ]- 32 P]ATP 1mM y Ap5A 50 μ M. La formación (recambio) y ruptura (hidrólisis) del [γ]- 32 P]ATP se cuantificó como se describe en "Material y Métodos".

(b) Efecto del TPhSn sobre la relación hidrólisis/recambio. Esta curva se elaboró con los datos experimentales del panel (a).

IMPORTANCIA DE LOS RESULTADOS ANTERIORES

Los experimentos descritos representan una aproximación a la caracterización cinética de la inhibición diferencial del compuesto TPhSn sobre la ATPasa de partículas submitocondriales de corazón de res. El hallazgo del efecto estimulador del ATP sobre el poder inhibitorio de este compuesto puede resultar interesante en tanto ayude a comprender la fenomenología de la inhibición diferencial. Puede considerarse que dado que el mecanismo intrínseco de inhibición del TPhSn requiere de concentraciones micromolares de ATP, resulta coherente que la actividad hidrolítica ejercida sobre este nucleótido, sea afectada de forma mucho más drástica que la actividad sintética, que en tiempos cortos produce tan sólo concentraciones nanomolares de ATP. Además, durante la síntesis la K_m^{ATP} es mayor que durante la hidrólisis (127).

Desde otro punto de vista, los resultados obtenidos sugieren que la unión de un nucleótido -en este caso ATP-, a la porción F₁ de la enzima, constituye una señal que es capaz de propagarse al sector F₀, confiriéndole un cambio de conformación o un nuevo estado en el que la acción inhibitoria del TPhSn es mayor.

II. Exploración del mecanismo de inhibición del TPhSn a través de la evaluación del número de enzimas funcionales en una población inhibida.

Paralelamente al análisis cinético referido en la sección anterior, se recurrió a otros enfoques experimentales que permitieran un acercamiento más incisivo en los mecanismos catalíticos de la ATPasa mitocondrial. Dado que el objetivo del presente trabajo se ubica en el contexto del entendimiento de las relaciones (simétricas o asimétricas) que existen entre F_0 y F_1 , y a su vez entre las dos actividades catalíticas de esta última, se procedió a realizar una serie de experimentos encaminados a esclarecerlas. En términos generales, la estrategia utilizada en esta segunda parte del trabajo se basó en el análisis de la cantidad y composición de nucleótidos asociados a la enzima como sustratos y productos de la catálisis.

Tal como se comenta en la introducción (pág.18), las hipótesis que hasta ahora se han esgrimido en la literatura para explicar la inhibición diferencial de los compuestos de trialquilestaño, se basan en la premisa de que las enzimas de la población que entran en contacto con el inhibidor pierden por completo su actividad catalítica. Este axioma emana de analogías establecidas con otros inhibidores de canal como la oligomicina y el DCCD, casos en los que ampliamente se ha descrito este fenómeno.

Se consideró que el primer punto a conocer para deducir algún

modelo del mecanismo de inhibición del TPhSn consiste en dilucidar si la inhibición que provoca sobre cada molécula de enzima es parcial o total. Con este fin se procedió a cuantificar, de acuerdo a la metodología descrita en "Material y Métodos", la proporción de enzimas que después de haber entrado en contacto con $^3\text{H-ATP}$, albergan en su interior nucleótido radioactivo, específicamente $^3\text{H-ADP}$. Esta es una medida muy adecuada del número de enzimas hidrolíticas funcionales dentro de una población. Los datos obtenidos de muestras severamente inhibidas por TPhSn se resumen en la tabla siguientes:

TABLA 1	% Actividad Hidrolítica	Adhesión de $^3\text{H-nucleótidos}$ mol $^3\text{H-ANP}$ /molF1
1) SMP control	100%	0.720 (100%)
2) SMP + 2.8nmol/mg TPhSn	20%	0.684 (95%)
3) SMP + 6 nmol/mg TPhSn	3.5%	0.669 (93%)
4) SMP + 7.2nmol/mg TPhSn	3.0%	0.633 (88%)
5) SMP + 11 nmol/mg TPhSn	3.0%	0.612 (85%)
6) SMP + 6.0ug/mg Oligomicina	5.0%	0.324% (45%)

La semejanza en los valores de asociación de $^3\text{H-ANP}$ entre partículas (SMP) no inhibidas y partículas inhibidas es un

indicio de que las enzimas con TPhSn realizan ciclos catalíticos iguales, aunque de menor velocidad, que los de las enzimas que carecen del inhibidor. Sin embargo, la correcta interpretación de estos datos requiere del análisis de la composición de nucleótidos por cromatografía líquida de alta presión (H.P.L.C.). Esta necesidad se vuelve evidente en la muestra con oligomicina, incorporada al experimento como control de inhibición total de cada molécula de enzima que interactúa con el compuesto (128, 129). Como puede observarse, la asociación de ^3H -nucleótidos en presencia de oligomicina es bastante menor que la que se registra en presencia de TPhSn. Sin embargo, el 5% de enzimas que permanecen funcionales en presencia de 6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de oligomicina no puede generar por hidrólisis valores tan altos de asociación de ^3H -nucleótidos. El análisis cromatográfico aclara que la mayor parte de los ^3H -nucleótidos unidos a la enzima en presencia de este inhibidor, está constituida por ^3H -ATP (130). Este hecho corrobora que las enzimas con oligomicina pierden por completo su actividad hidrolítica, no obstante conserven cierta capacidad para unir ^3H -ATP.

Se llevó a cabo el análisis por cromatografía líquida de alta presión de las muestras 1) y 3) de la Tabla 1. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 2. Resulta conveniente aclarar que los adenín nucleótidos que participan en la catálisis de la ATPasa mitocondrial son exclusivamente ADP y ATP. El contenido de ^3H -AMP que presentan las muestras analizadas no proviene de la actividad de esta enzima, sino de la catálisis de alguna otra

proteína presente en las partículas submitocondriales.

TABLA 2

	$^3\text{H}/\text{F1}$	% de ^3H -ANP unidos a partículas submitocondriales		
		AMP	ADP	ATP
SMP control	0.628	39%	47%	14%
SMP + 6nmol/mg TPhSn	0.584	29%	50%	21%

Los datos de la Tabla 2 muestran que el porcentaje de ^3H -ADP producto de la hidrólisis, es el mismo en ambas condiciones. La conclusión más viable es que en presencia de 6nmol/mg de TPhSn, la mayor parte de las enzimas se encuentran funcionales, contribuyendo a la actividad total con un recambio muy bajo. Este corolario es de extrema importancia ya que pone en evidencia una característica fundamental de la inhibición provocada por el TPhSn: a saber, el hecho de que las enzimas sean funcionales implica que todavía pueden bombear protones a través del canal. Por lo tanto, siendo un inhibidor de canal, el TPhSn no detiene por completo el flujo de protones.

Como se desprende de las Tablas 1 y 2, los valores de asociación de nucleótidos en partículas activadas son sumamente bajos; esta inconveniencia impide discernir con claridad la composición de las 3 molas de sitios catalíticos que contiene la

ATPasa en un mol de enzima. Siendo que la conclusión que se desprende de las tablas anteriores es de gran relevancia en el entendimiento del mecanismo de inhibición del TPhSn, se decidió realizar una variante de ambos experimentos con partículas no activadas (ATPasa + péptido inhibidor), con el fin de corroborar los resultados anteriores. El razonamiento fundamental que respalda dicha decisión es que las partículas no activadas adhieren aproximadamente 3 molas de ^3H -nucleótidos/mol Fi, correspondientes a los 3 sitios catalíticos que posee la enzima, al entrar en contacto con ^3H -ATP. La Tabla 3 muestra los resultados obtenidos al analizar la asociación de ^3H -ANP a la enzima no activada en presencia y ausencia del inhibidor. El análisis se llevó a cabo a dos tiempos de incubación de las partículas en el medio de reacción: 1' y 30'. Experimentos realizados con anterioridad por el grupo del Dr. Gómez Puyou indican que después de 1' de incubación, se registra el mayor grado de asociación de ^3H -ADP; en los minutos posteriores esta disminuye notablemente. Hasta el momento, este fenómeno ha sido explicado en términos de una disminución en la afinidad de la enzima por ATP y ADP, como consecuencia del incremento de la velocidad hidrolítica al avanzar el tiempo de reacción.

TABLA 3

	time	% Actividad Hidrolítica	³ H-ANP/FI
SMP no act. control	1'	100%	3.099
SMP " +6nmol/mg TPhSn	1'	5%	3.067
SMP " control	30'	100%	1.203
SMP " +6nmol/mg TPhSn	30'	5%	1.089

Al igual que las partículas activadas, los valores de adhesión de ³H-ANP en presencia de TPhSn son muy semejantes que en ausencia del inhibidor. Como se comentó anteriormente, este hecho sugiere que aunque su velocidad de recambio sea menor, la mayor parte de las enzimas de la población, en presencia de TPhSn se mantienen funcionales. El análisis de la composición de nucleótidos (ver Tabla 4) de los puntos de la Tabla 3, por cromatografía líquida de alta presión, muestra niveles iguales de ³H-ADP en presencia y ausencia del inhibidor; este hecho constituye evidencia directa de que las enzimas inhibidas conservan actividad hidrolítica.

TABLA 4

	time	% de ^3H -ANP unidos a partículas submitocondriales		
		AMP	ADP	ATP
SMP control	1'	43.7%	28.6%	27.6%
SMP + 6nmol/mg TPhSn	1'	44.0%	32.1%	23.7%
SMP control	30'	51.5%	29.0%	19.5%
SMP + 6nmol/mg TPhSn	30'	44.3%	28.0%	27.5%

	time	# de sitios catalíticos ocupados por		
		AMP	ADP	ATP
SMP control	1'	1.3	0.8	0.8
SMP + 6nmol/mg TPhSn	1'	1.1	0.8	0.6
SMP control	30'	0.6	0.3	0.2
SMP + 6nmol/mg TPhSn	30'	0.5	0.3	0.3

(ver Figs. 15 y 16 de apéndice)

Los datos de la Tabla 4 ofrecen especial interés pues proporcionan información particularmente relevante para el objetivo del presente trabajo:

- 1) El número de sitios ocupados por ^3H -ADP, producto de la

actividad hidrolítica, no varía durante la inhibición causada por el TPhSn. Se comprueba que la inhibición que este compuesto ejerce sobre las enzimas con las que interactúa es parcial, y no total, como es el caso de la oligomicina. Esta evidencia obliga a plantear modelos de inhibición del TPhSn en los que este compuesto no bloquee por completo la translocación de protones. La relevancia de éstos en el mecanismo de acción del inhibidor se evaluará con mayor detalle en la sección de "Discusión" de la presente tesis.

2) Los niveles tan elevados de $^3\text{H-ADP}$ en ausencia y presencia del inhibidor disipan la sospecha de que se hayan incorporado a la enzima a partir del medio de reacción, después de un proceso de catálisis y liberación. Cabe mencionar que los ensayos de unión de nucleótidos se llevan a cabo en presencia de la enzima piruvato cinasa, con el fin de que remueva el ADP producto de la hidrólisis del medio, y evite la incorporación de éste a un sitio no catalítico de la ATPasa. Sin embargo, muestras del laboratorio procesadas por H.P.L.C. revelan la existencia de una concentración remanente de ADP en el medio de reacción, que corresponde al 1% del ADP generado en las presentes condiciones experimentales. No obstante, dado que esta concentración remanente es sumamente baja, no puede ser la responsable de los niveles de $^3\text{H-ADP}$ que muestra la Tabla 4. Para evaluar esta posibilidad, el Dr. Gómez Puyou y la Dra. Tuena midieron la adhesión de $^3\text{H-ADP}$, proveniente de un medio sin piruvato cinasa, a la ATPasa. Observaron que la adición al medio de una

concentración de $^3\text{H-ADP}$ cinco veces mayor que la que se conserva en presencia de piruvato cinasa, provoca una incorporación de $^3\text{H-ADP}$ a la enzima despreciable frente a los valores de asociación antes descritos. (Tomar en cuenta que en las condiciones hidrolíticas en las que se lleva a cabo este experimento, la $K_m^{\text{ADP}} = 500-600\mu\text{M}$, mientras que en condiciones de fosforilación la $K_m^{\text{ADP}} = 10\mu\text{M}$ (127)). Se concluye que el ADP unido a la enzima proviene directamente de la actividad enzimática; por lo tanto, su sitio de unión es catalítico y puede brindar información acerca del mecanismo de reacción de la enzima.

Con el fin de afirmar la validez de esta conclusión en el caso de las partículas activadas, se analizó la unión de $^3\text{H-ANP}$ a la enzima a diferentes tiempos de incubación en el medio de reacción. En el caso de que la marca se acumulara en la enzima a partir del medio, cabría esperar un aumento progresivo de la incorporación de la misma en el tiempo. Sin embargo, como muestra la Figura 9, la adhesión es máxima desde los primeros segundos. Este hecho apoya fuertemente el origen catalítico de los $^3\text{H-ANP}$ unidos a la enzima.

Los resultados anteriores sugieren que el TPHsn reduce la translocación de protones pero no la detiene por completo. Esta conclusión se ve apoyada por el trabajo de Papa, et al., en el que

FIG. 9

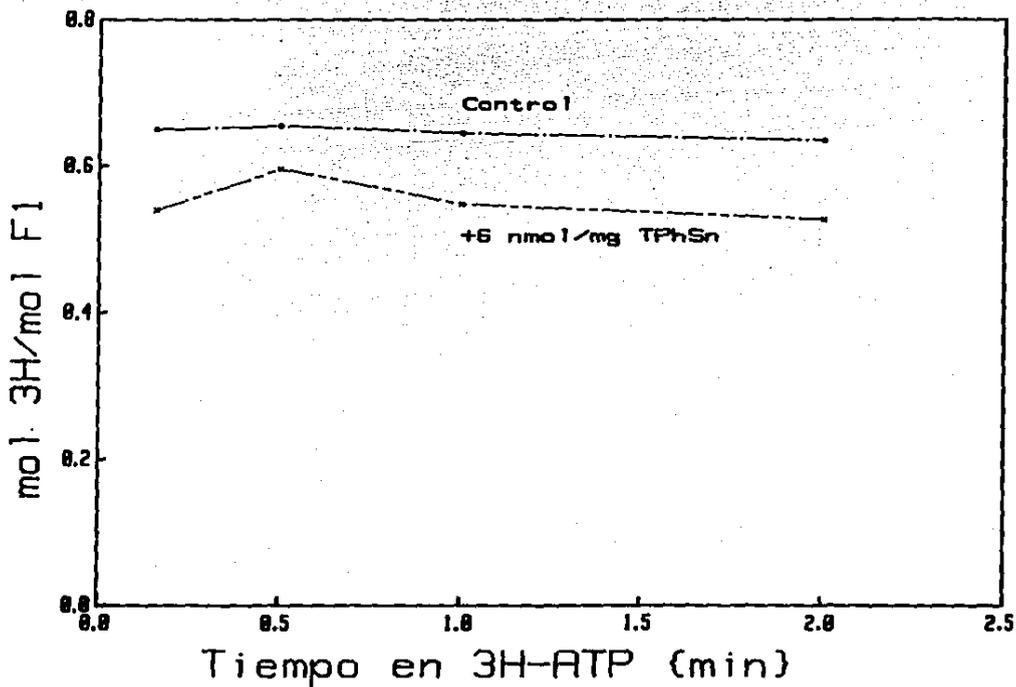


Figura 9. - Unión de ^3H WAMP a la F1 de partículas submitocondriales a diferentes tiempos de incubación en el medio de reacción.

Las partículas fueron expuestas a un medio de hidrólisis compuesto por sacarosa 200mM, Tris-OAc 20mM pH 7.4, Mg^{2+} - ^3H -ATP 50 μM , PEP 20mM, K(OAc) 20mM, CAT 50 μM , Ap5A 50 μM y PK 15u. A los tiempos indicados, se filtraron dos veces centrifugando 1' en una columna de Sephadex. Tal y como se reporta en "Material y Métodos", a partir del filtrado se cuantifican los nucleótidos radioactivos unidos a la enzima y se determina la concentración de proteína.

se muestra que la disminución en el flujo de protones que provoca el TPhSn es menor que la que ocurre en presencia de oligomicina (122). El presente hallazgo permite entender la inhibición diferencial en términos de la susceptibilidad que cada una de las actividades de la ATPasa presenta ante una disminución en el flujo de protones. Los estudios que se han realizado acerca del número de protones translocados por el canal indican que éste es el mismo en la reacción de síntesis y en la reacción de hidrólisis, siendo su valor de 2 (131-133) o de 3 (134, 135). Debido a que la actividad hidrolítica de las partículas utilizadas (4.5 $\mu\text{moles/mg min}$) es 15 veces mayor que la actividad sintética (0.3 $\mu\text{moles/mg min}$), cabe esperar que la conducción de protones sea 15 veces mayor en el caso de la primera. Por lo tanto, podría suponerse que aquellas concentraciones de TPhSn que no inhiben la síntesis, preservan un flujo de protones remanente que satisface las demandas de la fosforilación oxidativa. En el mismo tenor, podría colegirse que siendo tan elevada la actividad hidrolítica, ésta depende del bombeo libre de los protones que se generan como producto de la reacción, por lo que cualquier disminución en su velocidad de expulsión, dada por el TPhSn, repercutirá en una reducción de la actividad a la manera de una inhibición por producto. Esta hipótesis fue puesta a prueba midiendo la inhibición, por TPhSn, de la hidrólisis a concentraciones muy bajas de ATP, es decir, con valores de actividad muy bajos. La Tabla 5 muestra los resultados obtenidos. Se puede observar que una actividad hidrolítica aún menor que la

actividad sintética (obtenida con 10 μ M de ATP), si es inhibida por TPhSn, de forma análoga a la inhibición que se presenta sobre actividades mayores (medidas a 3mM ATP). Este experimento se realizó a concentraciones muy bajas de proteína y a tiempos muy cortos (30" y 3') para impedir que los niveles tan escasos de ATP (10 μ M) se agotaran en el curso de la reacción. Resulta adecuado aclarar que los valores bajos de actividad hidrolítica que se detectan con 3mM de ATP y 3' de incubación, reflejan la inhibición que produce la acumulación de ADP en el medio.

TABLA 5

M	t _{inc.}	Actividad - TPhSn	Actividad +1.2 nmol/mg TPhSn	Actividad +12 nmol/mg TPhSn
10 μ M	30"	0.169	0.132	0.012
10 μ M	3'	0.168	0.117	0.020
3mM	30"	2.736	1.556	0.027
3mM	3'	0.721	0.616	0.029

Los datos de la Tabla 5 señalan que aunque el flujo de protones remanente a la inhibición del TPhSn teóricamente debía satisfacer las necesidades de la hidrólisis a 10 μ M de ATP (como sucede con la síntesis), esta actividad sigue siendo vulnerable al inhibidor. La imposibilidad de explicar este hecho a través

del modelo de un canal rígido, invita a la postulación de 1) un canal dinámico que, a través de cambios de conformación, cambia sus propiedades de conducción de acuerdo a la reacción que se esté catalizando, o de 2) un canal que se acopla a las reacciones de síntesis e hidrólisis de forma asimétrica. Los datos experimentales parecen sugerir que 4nmol/mg de TPhSn, no obstaculizan el flujo de protones que impulsan la síntesis, mientras que el paso del mismo número de protones en condiciones de hidrólisis se ve fuertemente retardado. Este punto es elaborado con mayor detalle en la sección de "Discusión" de la presente tesis.

III. Reconocimiento de los sitios catalíticos de la ATPasa mitocondrial a través de sus propiedades de intercambio de nucleótidos. Evaluación de la equivalencia de sitios catalíticos sintéticos y sitios catalíticos hidrolíticos.

Dado que el fenómeno de la inhibición diferencial no es más que un reflejo de la organización funcional de la enzima en que se presenta, decidimos dedicar esta tercera parte del trabajo a profundizar en los mecanismos catalíticos de la ATPasa mitocondrial. En particular, decidimos estudiar si existe equivalencia entre los tres centros activos de esta enzima; esto es, si una pareja alfa-beta cualquiera (centro activo) es capaz de catalizar tanto la reacción de síntesis como la reacción de hidrólisis. La definición del planteamiento anterior resulta de capital importancia pues conduce a la generación de modelos de catálisis radicalmente opuestos: o bien síntesis e hidrólisis ocurren por caminos distintos, o ambas actividades son producto de un mismo camino catalítico que opera reversiblemente en los tres centros activos de la enzima. Dado que tanto la paradoja de la inhibición diferencial como la imposibilidad de explicar algunos datos cinéticos de la enzima, provienen de modelos en los que se supone la equivalencia de sus centros catalíticos, el presente estudio representa un paso obligado en el desarrollo de este trabajo.

La estrategia utilizada se resume en los siguientes puntos:

a) Identificación de sitios catalíticos a través del intercambio que sufren los nucleótidos que albergan en presencia de ATP, ADP e ITP.

b) Determinación de la capacidad que presenta un ADP producto de la hidrólisis para transformarse en ATP en condiciones de fosforilación.

a) Determinación de sitios catalíticos por su desplazamiento durante la catálisis

Los resultados correspondientes a la cinética de intercambio de nucleótidos adheridos a la enzima - dado por ATP, ADP e ITP-, que presentan las partículas activadas, se muestran en las Figuras 10, 11 y 12. Cabe aclarar que el tiempo cero en cada una de estas figuras representa partículas submitocondriales expuestas previamente a $^3\text{H-ATP}$; una fracción de este nucleótido se transforma en $^3\text{H-ADP}$ y $^3\text{H-AMP}$, los cuales permanecen adheridos a la enzima en las proporciones indicadas en la Tabla 2. Hasta el momento, el criterio más aceptado para discernir entre sitios catalíticos y no catalíticos es el que se refiere a sus propiedades de intercambio. Según Cross, *et al* (44, 55, 136) aquellos nucleótidos que puedan ser intercambiados por nucleótidos del medio, se encontrarán en sitios catalíticos, mientras que aquellos que permanezcan fuertemente unidos contarán con funciones regulatorias o estructurales no catalíticas.

La Figura 10 muestra el desprendimiento de los $^3\text{H-nucleótidos}$ pegados a la enzima al agregar 1mM Mg^{2+} -ATP no radioactivo. Se

Fig. 10

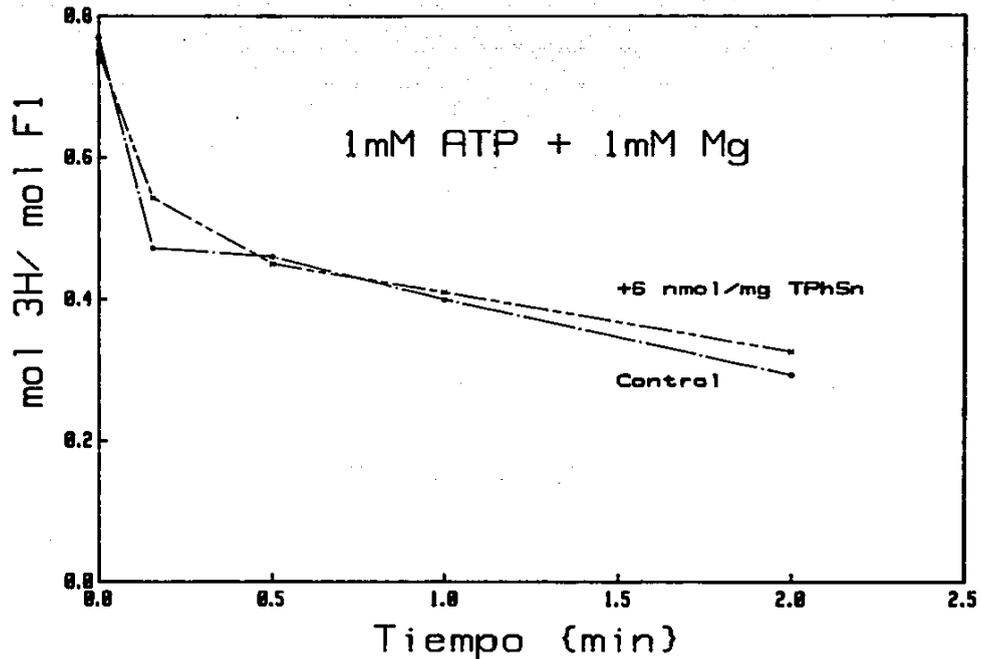


Fig. 11

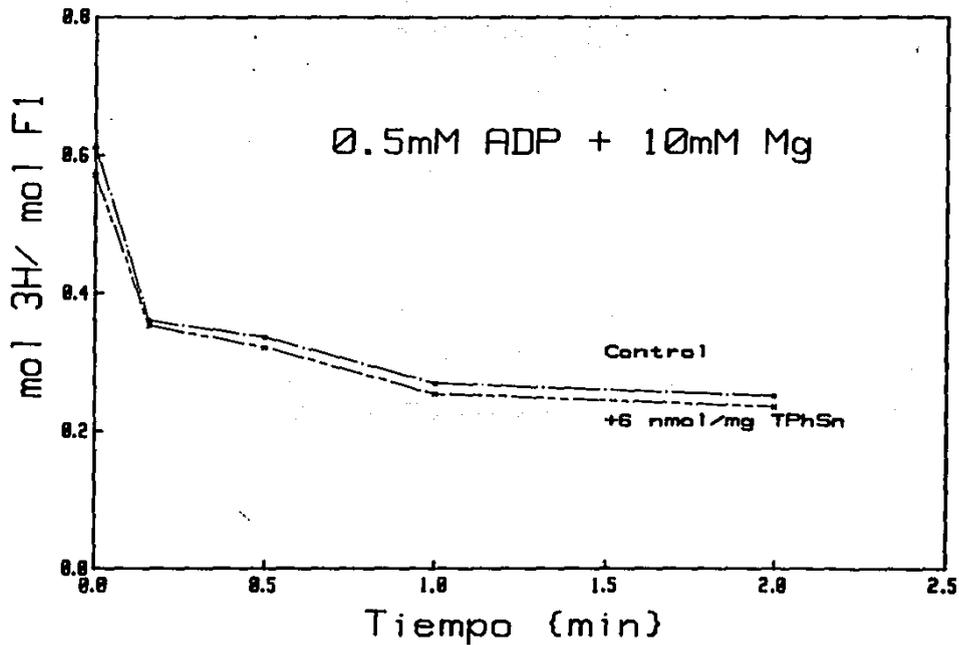


Figura 10. - Cinética de intercambio de ^3H -ANP unidos a la enzima, dada por 1mM de Mg^{2+} -ATP no radioactivo.

Inicialmente, las partículas incorporaron ^3H -ANP al ser incubadas durante 10" en un medio compuesto por sacarosa 200mM, Tris-OAc 20mM pH 7.4, Mg^{2+} - ^3H -ATP 50 μM , PEP 20mM, K(OAc) 20mM, CAT 50 μM , Ap5A 50 μM y PK 15u. Posteriormente, estas partículas fueron incubadas con 1mM de Mg^{2+} -ATP no radioactivo a diferentes tiempos, y procesadas por columnas de Sephadex como se especifica en "Material y Métodos".

Figura 11. - Cinética de intercambio de ^3H -ANP unidos a la enzima, dada por 0.5mM de Mg^{2+} -ADP no radioactivo.

El protocolo de esta figura es el mismo que se presenta en la figura 10, salvo que el intercambio se lleva a cabo con 0.5mM de Mg^{2+} -ADP no radioactivo.

observa una cinética compuesta por un componente rápido y otro lento. Interpretamos que el componente rápido representa el lavado de $^3\text{H-ATP}$ y de $^3\text{H-ADP}$ por intercambio y por hidrólisis, respectivamente, del ATP frío. En cambio, la componente lenta muestra el lavado del $^3\text{H-AMP}$ no generado por la ATPasa. De igual forma, el abatimiento en los niveles de $^3\text{H-nucleótidos}$ en presencia de $1\text{mM Mg}^{2+}\text{-ADP}$ (Fig. 11) revela una cinética con dos componentes. Como en el caso anterior, creemos que la componente rápida corresponde a la salida, por intercambio, del $^3\text{H-ADP}$ adherido a la enzima, mientras que la lenta señala el desprendimiento del $^3\text{H-AMP}$ de las partículas submitocondriales. Cabe mencionar que bajo el criterio de Cross, et al., la marca remanente que se observa en ambas figuras (10 y 11) debe considerarse adherida a sitios no catalíticos, proveniente del medio de reacción y no de un centro activo.

La importancia de los experimentos mencionados radica en que muestran que una buena proporción de los nucleótidos que se adhieren a la enzima (62%, según Fig. 10), se encuentran en sitios catalíticos pues se desprenden por hidrólisis. Esta determinación constituye un control fundamental para el experimento central de esta última parte del trabajo: ver si el ADP que se encuentra en un sitio catalítico de la hidrólisis es capaz de formar ATP.

Por su parte, el experimento de la Figura 10 corrobora la conclusión de que las enzimas inhibidas conservan actividad

hidrolítica, pues intercambian su ^3H -ANP de la misma forma que las enzimas no inhibidas.

Por el contrario, el intercambio de ^3H -nucleótidos adheridos a la enzima en presencia de ITP presenta un comportamiento no esperado. Como puede observarse en la Figura 12, el ITP no es capaz de liberar la marca de la enzima ni a tiempos de incubación prolongados; experimentos realizados por el Dr. Gómez Puyou y la Dra. Tuena muestran los mismos resultados en el caso de partículas no activadas. Dado que se sabe que la ATPasa mitocondrial es capaz de hidrolizar el ITP ($V_{\text{max}}^{\text{ITP}} = V_{\text{max}}^{\text{ATP}}$; $K_m^{\text{ITP}} (\mu\text{M}) > K_m^{\text{ATP}} (\mu\text{M})$) (137), resulta realmente sorprendente que no logre desprender ^3H -nucleótidos en el curso de su camino catalítico. La imposibilidad de explicar este hecho en el contexto de los modelos de hidrólisis del ATP, invita a la postulación de nuevos caminos o caminos alterados para la hidrólisis del ITP. La literatura ofrece una alternativa en el trabajo de Harris *et al.* (138) en el que se afirma que, debido a que la ATPasa no tiene afinidad por el IDP, el paso limitante en su hidrólisis es la ruptura del enlace y no la salida de productos, como ocurre en el caso de la hidrólisis del ATP. Con esta perspectiva, podríamos considerar que el ITP no desprende los nucleótidos adheridos a sitios catalíticos pues apenas se hidroliza se libera, como ejemplifica el siguiente esquema:

E --1--> E.ATP --2--> E.ADP-Pi --3--> E.ADP --4--> E

1.- Entrada de ATP

3.- Salida de Pi

4.- Salida de ADP

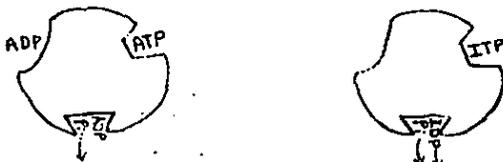
En el caso del ITP:

E --1--> E.ITP --2--> E.IDP-Pi --3--> E

1.- Entrada de ITP

3.- Salida de IDP y de Pi

En el esquema boyeriano de tres sitios alternantes podríamos pensar que:



De acuerdo con esta hipótesis, sólo el 32 P-ATP adherido a la enzima podrá ser desplazado por el ITP. Los datos experimentales muestran que las partículas utilizadas conservan solamente un 14 y 21% (partículas sin y con 32 P, respectivamente) de

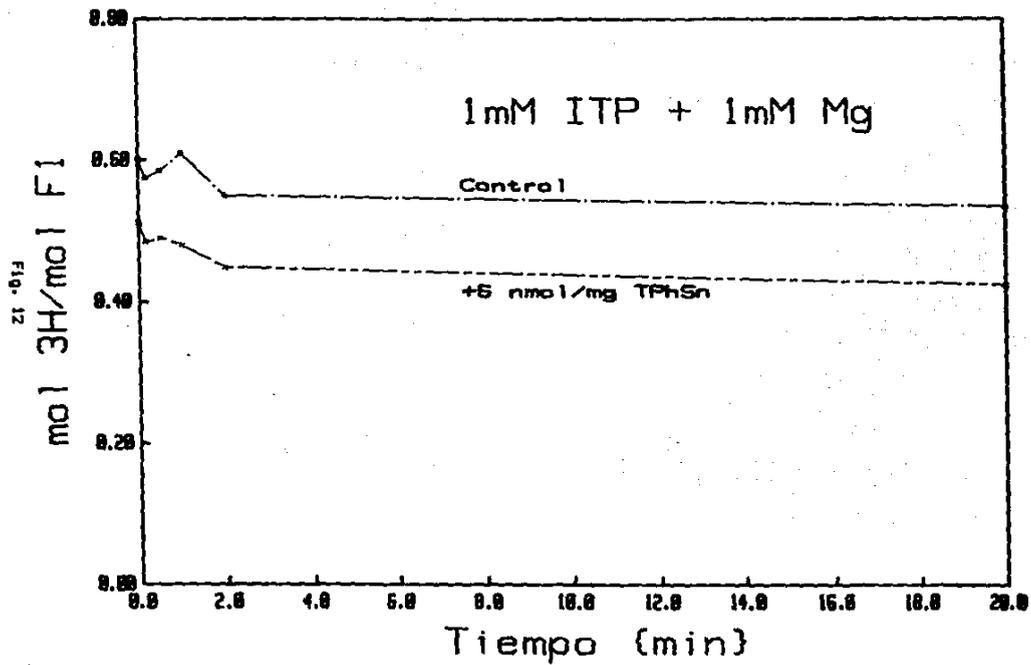


Figura 12.- Cinética de intercambio de ^3H -ANP unidos a la enzima, dada por 1mM Mg^{2+} -ITP no radioactivo.

Inicialmente, las partículas incorporaron ^3H -ANP al ser incubadas durante 10" en un medio compuesto por sacarosa 200mM, Tris-DAC 20mM pH 7.4, Mg^{2+} - ^3H -ATP 50 μM , PEP 20mM, K(DAC) 20mM, CAT 50 μM , Ap5A 50 μM y PK 15u. Posteriormente, estas partículas fueron incubadas con 1mM de Mg^{2+} -ITP no radioactivo a diferentes tiempos, y procesadas por columnas de Sephadex como se describe en "Material y Métodos".

nucleótidos en forma de ATP (ver Tabla 2). Por lo tanto, la disminución, causada por ITP, de un 11 y 17% (partículas sin y con TPhSn, respectivamente) (ver Figura 12), apoya la hipótesis anterior; esto es, el mecanismo de reacción del ITP sólo lo permite intercambiar ATP, el cual se encuentra escasamente representado en las partículas activadas.

NOTA: Se realizaron curvas de titulación de la hidrólisis de ITP por TPhSn que muestran que esta actividad se inhibe en la misma proporción que la hidrólisis de ATP.

b) Conversión del ADP de sitios catalíticos hidrolíticos en ATP.

Uno de los objetivos principales del presente trabajo, se refiere al esclarecimiento de la equivalencia entre los sitios catalíticos de la ATPasa mitocondrial. En el campo de la bioquímica, un sitio catalítico es equivalente a otro en tanto pueda ser permutado por éste, sin que esta operación repercuta en un cambio estructural o funcional (6). Hasta hace muy poco tiempo, la simetría de los sitios catalíticos de la ATPasa se tomaba como un hecho incontrovertible, dado que podía catalizar dos reacciones de lo que se consideraba como un camino catalítico único reversible. Por ende, la mayor parte de los modelos cinéticos fueron elaborados a partir de esta premisa. Sin embargo, recientemente se ha obtenido evidencia experimental que debilita el axioma de la simetría (8, 9), favoreciendo una exploración más detallada de la función de cada uno de los

centros activos de la enzima.

El trabajo que aquí se refiere intenta contribuir a la controversia de la equivalencia entre sitios analizando la reversibilidad de la actividad hidrolítica. En otras palabras, se exploró la capacidad que tiene la enzima para formar ATP a partir de un ADP producto de la hidrólisis.

La estrategia experimental consistió en exponer la ATPasa a $^3\text{H-ATP}$ en condiciones de hidrólisis, con el fin de promover la adhesión de $^3\text{H-ADP}$ a la enzima. A continuación se le sometió a un medio de fosforilación compuesto por succinato, Mg^{2+} , ADP y Pi, y se procedió a analizar la composición de nucleótidos unidos a la enzima por cromatografía líquida de alta presión (H.P.L.C.).

TABLA 6

	formación de	% de $^3\text{H-AMP}$ unidos a		
		partículas submitocondriales	AMP	ADP
	ATP frío			
SMP control	-	39%	47%	14%
SMP " + M. Fosf.	+	36%	52%	12%
SMP + 6nmol/mg TPhSn	-	29%	50%	21%
SMP " + M. Fosf.	+	30%	58%	11%

(ver Figs. 17 y 18 de apéndice)

Como indica la primera columna de la Tabla 6, las muestras en contacto con medio de fosforilación, presentan actividad sintética que se manifiesta a través de la formación de ATP frío. Sin embargo, no se observa fosforilación del $^3\text{H-ADP}$ producto de la hidrólisis, pues sus niveles permanecen inalterados en presencia del medio de fosforilación. Cabe notar que incluso se observa una disminución en los niveles de $^3\text{H-ATP}$ en las muestras en contacto con dicho medio. Se ha interpretado que este fenómeno se debe al desplazamiento que sufre el $^3\text{H-ATP}$ por el ATP frío recién formado, que se libera al medio y regresa a la enzima a ocupar el sitio del ATP correspondiente al ciclo hidrolítico. Otra explicación se encuentra en la postulación de que los niveles de $^3\text{H-ATP}$ disminuyen por hidrólisis. La conclusión final de este experimento es de interés ya que el $^3\text{H-ADP}$ proveniente de la vía hidrolítica no se encuentra en un sitio catalítico para la fosforilación. Por lo tanto, las parejas alfa-beta (centros activos) de la enzima no son equivalentes. De acuerdo con esto, es válido postular la existencia de centros activos exclusivamente sintéticos y centros activos puramente hidrolíticos.

Con el fin de detallar más ampliamente el experimento anterior, cabe señalar que las muestras estuvieron en contacto con el medio de fosforilación por sólo 5", para evitar una caída brusca en los niveles de $^3\text{H-ADP}$, provocada por el ADP del medio. No obstante la brevedad del tiempo de incubación, es suficiente para detectar fosforilación. En la misma vena, se exploró la

influencia del potencial generado por la oxidación del succinato en los niveles de ^3H -ANP unidos a la enzima. Sorprendentemente, la Tabla 7 muestra una disminución del 20% en la marca incorporada a la enzima cuando se expone a un gradiente electroquímico. Este dato resulta muy interesante ya que pone en evidencia el hecho de que, incluso en ausencia de fosforilación, el potencial es capaz de provocar cambios conformacionales en la enzima que inciden directamente en el comportamiento de sus sitios de unión de nucleótidos.

Tabla 7

	mol ^3H /mol F1
SMP control	0.701
SMP + succinato	0.555 (79%)
SMP control + 6nmol/mg TPhSn	0.568
SMP + 6nmol/mg TPhSn + succinato	0.460 (81%)

DISCUSION

La ATPasa mitocondrial es una enzima multimérica compuesta por un sector hidrofóbico transmembranal (Fo) y un sector hidrofílico que protruye de la membrana (F1). Se sabe que la porción F1 está integrada por cinco subunidades, -alfa, beta, gamma, delta, y epsilon-, arregladas respectivamente en la siguiente estequiometria: 3:3:1:1:1 (79, 139, 140). En diversos estudios (141) se ha concluido que las parejas alfa-beta forman una estructura hexagonal que da origen a tres sitios catalíticos; éstos se comunican con el sector transmembranal o canal de la enzima (Fo) a través de las subunidades gamma, delta y epsilon. Experimentos de entrecruzamiento químico (58) y de reconstitución de la porción F1 de E. coli (59), muestran que las subunidades gamma, delta y epsilon conjuntamente se asocian con sólo una de las parejas alfa-beta. Esta breve descripción de la organización de la ATPasa pone de relieve la asimetría intrínseca propia de la estructura de la enzima. No obstante, la mayor parte de los modelos cinéticos que se han elaborado para explicar sus procesos catalíticos, soslayan la asimetría estructural invocando mecanismos moleculares que conducen a un funcionamiento simétrico. Es así como el modelo de sitios alternantes de Boyer (86, 142) postula una asociación secuencial de las subunidades gamma, delta y epsilon con cada una de las parejas alfa-beta.

Existe un reporte en la literatura que, ajeno a las hipótesis más aceptadas (10), proporciona datos experimentales que indican

que el contacto de gamma, delta y épsilon es permanente sobre sólo una de las parejas alfa-beta, aquella que no se asocia con inhibidores de la actividad hidrolítica como el DCCD. Este resultado ha sido interpretado por los autores como evidencia de la existencia de subunidades alfa-beta no equivalentes; ésto es, la estructura asimétrica de la F₁ da origen a un centro activo (sintético) -asociado a las subunidades gamma, delta y épsilon-, y a dos centros activos (hidrolíticos) que unen inhibidores diferenciales (DCCD, NBDCI), los cuales reducen drásticamente la actividad hidrolítica afectando de forma mucho más somera la actividad sintética. Es en este ámbito de asimetría que propone Lotscher, et al., en el que se desarrolla el presente trabajo.

Los experimentos referidos inciden en 1) la exploración de la relación que establece el canal o porción F_o con cada uno de los centros activos de la enzima, y 2) en el esclarecimiento del grado de equivalencia que éstos guardan entre sí. El panorama que emana de los resultados obtenidos se asienta sobre una base de asimetría general que puede detallarse enlistando una serie de conclusiones:

CONCLUSION 1.- La ³H-ATPasa de mitocondria de corazón de res cataliza la reacción de síntesis y la reacción de hidrólisis a través de dos caminos diferentes que no se comunican entre sí.

Esta conclusión se deriva de la imposibilidad de fosforilar el ADP que se encuentra en un sitio catalítico de la hidrólisis. Por lo tanto, puede postularse la existencia de centros activos hidrolíticos y centros activos sintéticos. Existen muchos datos experimentales que, bajo la óptica del presente trabajo, pueden interpretarse como indicadores de la ocurrencia de dos sitios catalíticos hidrolíticos y uno sintético. El más poderoso, se refiere al comportamiento cooperativo que muestra la actividad hidrolítica (93, 97, 143), el cual ha sido explicado en términos de la participación de más de un centro activo en la expresión de esta actividad. El planteamiento de vías independientes de síntesis e hidrólisis, representa la contrapartida funcional de las observaciones estructurales que postulan la existencia de una subunidad beta asimétrica (8, 9).

CONCLUSION 2.- Coherentemente con los resultados de Lotscher, et al., los centros activos hidrolíticos muestran un grado de acoplamiento al canal menor que el que presenta el centro activo sintético. Este corolario surge al observar la gran interferencia que produce el inhibidor TPhSn en la expulsión de los protones producto de la hidrólisis, bloqueo que no se presenta con el flujo de protones que impulsa la síntesis, incluso cuando éste último es de mayor magnitud (ver exp. pág.). El fenómeno que ocurre consiste en la inhibición preferencial del flujo de

protones hidrolítico sobre el flujo de protones sintético. La sugerencia que en este trabajo se plantea, radica en la existencia de conexiones asimétricas entre el canal y los diferentes centros activos. Dicha asimetría puede presentarse a través de una estructura rígida, o puede ser inducida por cambios conformacionales propios de la condición de síntesis y de la condición de hidrólisis.

CONCLUSION 3.- El inhibidor diferencial de canal, TPhSn, no bloquea por completo el flujo de protones. Este hecho nos aleja de la necesidad de postular la existencia de dos canales (uno hidrolítico susceptible a TPhSn, y otro sintético no vulnerable), o la ausencia de interacción inhibitoria entre TPhSn y el canal en condiciones de síntesis. (Cabe mencionar que este último punto fue explorado experimentalmente, obteniéndose evidencia de que el TPhSn inhibe la hidrólisis incluso en un medio de fosforilación.) Por lo tanto, se comprueba que el canal con TPhSn conserva su capacidad para translocar protones, condición indispensable para que ocurra la síntesis de ATP.

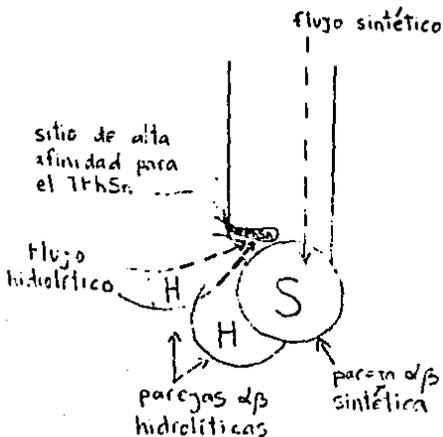
CONCLUSION 4.- La presencia de ATP en el medio estimula la inhibición de la síntesis por el TPhSn. Este hecho pone de relieve que señales originadas en el sector catalítico F₁ pueden transmitir información hacia la porción F₀ de la enzima. La

literatura cuenta con muchos reportes de cambios que viajan en la dirección opuesta, es decir, que se originan en el sector F_0 y llegan a alterar la conformación de la porción F_1 . Tal es el caso de la influencia de los inhibidores de canal oligomicina y dicitclohexilcarbodiimida (DCCD) que disminuyen notablemente la capacidad de la F_1 para pegar ATP; se cree que este fenómeno se presenta a raíz de un cambio en la estructura tridimensional de la F_1 , consecuencia de las alteraciones que sufre el canal al interactuar con los inhibidores mencionados (130). Sin embargo, existen pocos ejemplos de cambios en la dirección opuesta. Sólo recientemente, se reportó que la unión conjunta de ADP y P_i a la F_1 de la ATPasa de cloroplasto (144), o la reacción de la proteína inhibidora (145), aumenta la translocación de protones a través de la apertura del canal protónico. En esta última categoría, que se refiere a la influencia que tiene el estado catalítico de la F_1 sobre el canal de protones, debe ubicarse el efecto del ATP descrito.

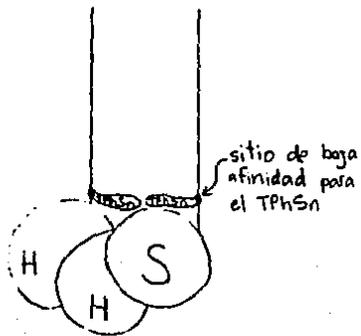
Por el momento, se carece de información sobre el mecanismo a través del cual el ATP estimula la inhibición de la síntesis por TPhSn. Sólo podemos sugerir que este inhibidor cuenta con dos sitios de unión en el canal, uno de alta afinidad y otro de baja afinidad. La asimetría de la colocación de la F_1 con respecto al canal repercute en la inhibición exclusiva de la hidrólisis cuando el TPhSn se une al sitio de alta afinidad. Por el contrario, la unión de este inhibidor a su sitio de baja afinidad también afecta la actividad sintética pues interfiere

con el flujo de protones del gradiente electroquímico. Este modelo supone que la unión del TPhSn al sitio de baja afinidad, que sólo ocurre en presencia de altas concentraciones del inhibidor, se promueve en presencia de ATP; ésto es, la incorporación de ATP a la porción F₁, aumenta la afinidad de un segundo sitio de unión de TPhSn.

La reunión de las conclusiones anteriores valida la representación de la estructura de la ATPasa con las siguientes características:



INHIBICIÓN DE
LA HIDROLISIS



INHIBICIÓN DE
LA SÍNTESIS

OPENDICE

FIG. 15

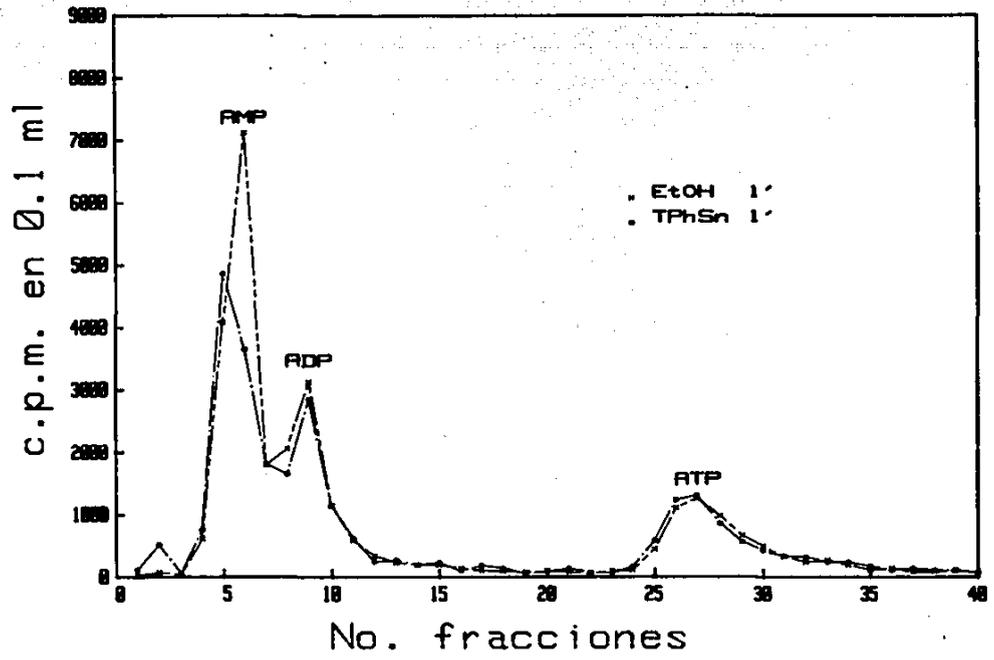
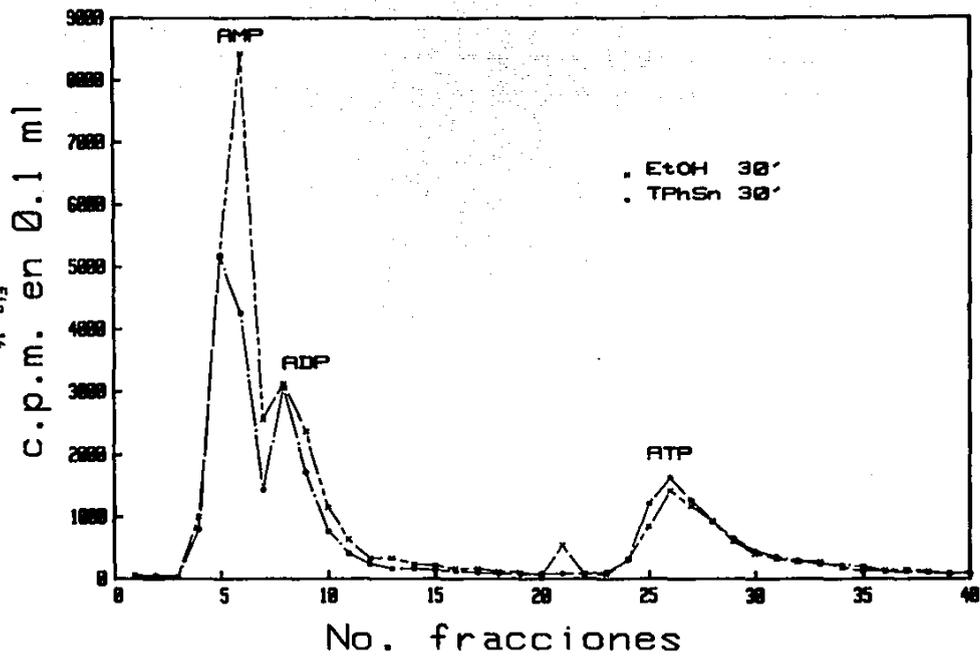


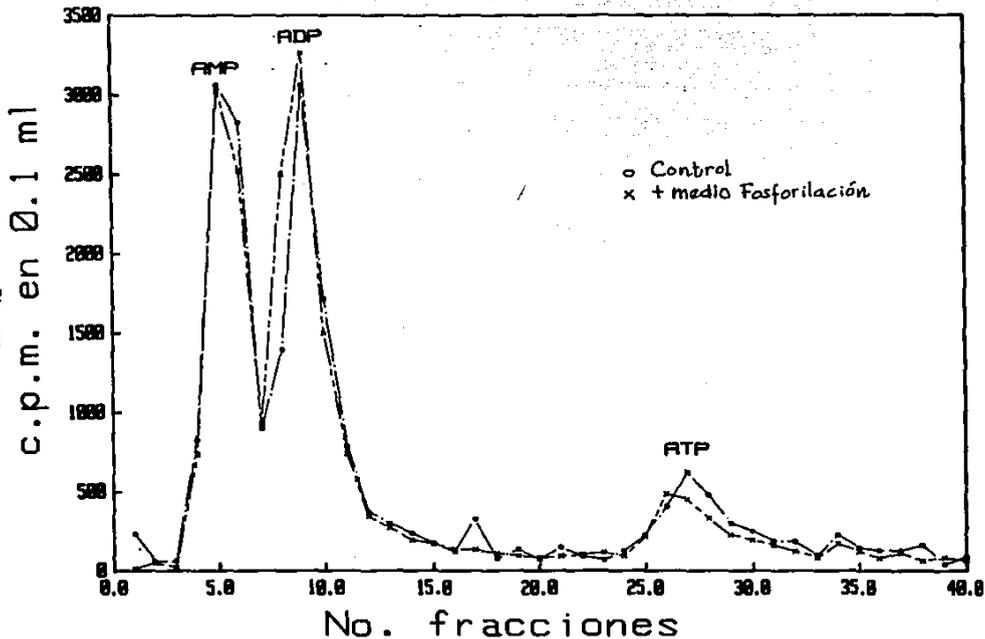
Fig. 16



Figuras 15 y 16.- Analisis por cromatografia liquida de alta presion (H.P.L.C.) del contenido de ^3H -AMP, ^3H -ADP y ^3H -ATP unido a 0.1 ml de particulas submitocondriales no activadas.

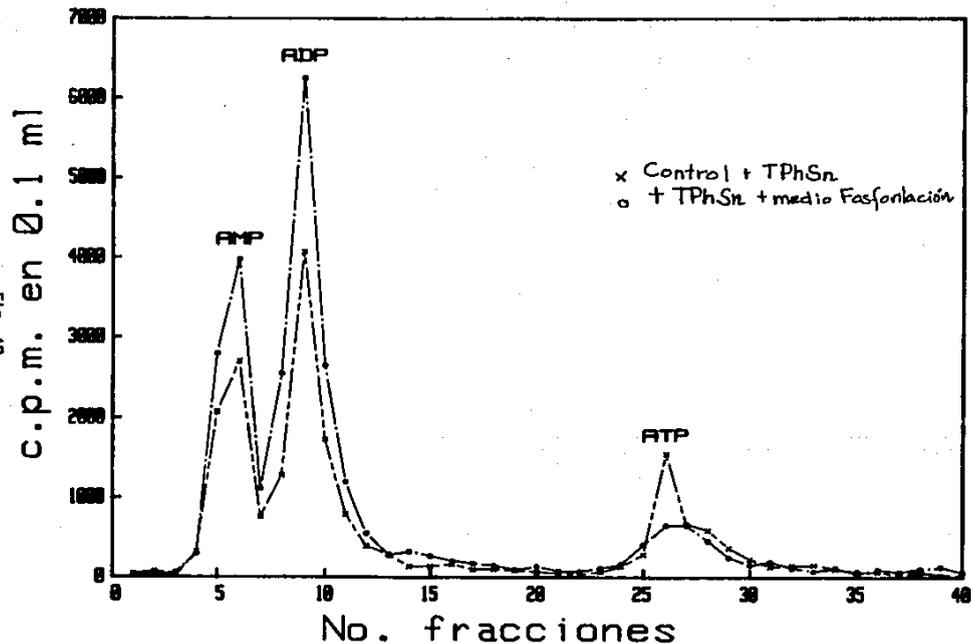
Previamente, estas particulas con y sin TPShn fueron incubadas durante 1' (Fig. 15) y 30' (Fig.16) en un medio compuesto por sacarosa 200mM, Tris-DAC 20mM pH 7.4, Mg^{++} - ^3H -ATP 50 μM , PEP 20mM, K(DAC) 20mM, CAT 50 μM , Ap5A 50 μM y PK 15u; a continuacion se removio el medio de las particulas filtrando dos veces por una columna de Sephadex (ver "Material y Metodos").

FIG. 17



ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Fig. 18



Figuras 17 y 18. - Análisis por cromatografía líquida de alta presión (H.P.L.C.) del contenido del ^3H -AMP, ^3H -ADP y ^3H -ATP unido a 0.1 ml de partículas submitocondriales activadas.

Previamente, estas partículas con (Fig. 18) y sin (Fig. 19) TPhSn fueron incubadas durante 10" en un medio compuesto por sacarosa 200mM, Tris-DAC 20mM pH 7.4, Mg^{2+} - ^3H -ATP 50 μM , PEP 20mM, K(DAC) 20mM, CAT 50 μM , Ap5A 50 μM y PK 15u. El medio libre se separó de las partículas filtrando dos veces por una columna de Sephadex, después de lo cual se les expuso a un medio de fosforilación ($\text{Mg}(\text{OAc})_2$ 10mM, succinato 10mM, ADP 0.5mM y Pi 5mM).

BIBLIOGRAFIA

- 1) Monod, J., J.W. Wyman y J.P. Changeux
J. Mol. Biol. 12, p. 88-100, 1965.
- 2) Levitzki, A.
FEBS Lett. 24, p. 301-307, 1972.
- 3) Mattern, C.F.T.
Virology 17, p. 76-83, 1962.
- 4) Nourse, J.G.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, p. 2385-2391, 1975.
- 5) Klempner, W.G.
J. Chem. Phys. 56, p. 5478-5482, 1972.
- 6) Gust, D. y G. Dirks
J. Theor. Biol. 92, p. 39-55, 1981.
- 7) Hammes, G.B. y C.W. Wu
Science 172, p. 1205-1215, 1971.
- 8) Amzel, L.M. y P.L. Pedersen
J. Biol. Chem. 253, p. 2067-2069, 1978.
- 9) Amzel, L.M., M. McKinney, P. Narayanan y P.L. Pedersen
Proc. Natl. Sci. USA 79, p. 5852-5856, 1982.
- 10) Lotzcher, H.R. y R.A. Capaldi
Biochem. Biophys. Res. Commun. 121, p. 331-339, 1984.
- 11) Fillingame, R.H.
Curr. Top. Bioenerg. 11, p. 35-106, 1981.
- 12) Esch, F.S., P. Bohlen, A.S. Otsuka, M. Yoshida y W.S.

Allison

- J. Biol. Chem. 256, p. 9084-9086, 1981.
- 13) Budker, V.G., I.A. Kozlov, V.A. Krubatov y Y.M. Milgrom
FEBS Lett. 83, p. 11-14, 1977.
- 14) Esch, F.S. y W.S. Allison
J. Biol. Chem. 252, p. 6100-6106, 1978.
- 15) Drutsa, V.L., I.A. Kozlov, Y.M. Milgrom, Z.A. Shabarova y
N.I. Sokolova
Biochem. J. 182, p. 617-619, 1979.
- 16) Lauquin, G., R. Pougeois y P.V. Vignais
Biochemistry 19, p. 4620-4626, 1980.
- 17) Mc Enery, M.W., W.L.Jr. Buhle, U. Aebi y P.L. Pedersen
J. Biol. Chem. 259, p. 4642-4651, 1984.
- 18) Ryrle, I.J.
Arch. Biochem. Biophys. 184, p. 464-475, 1977.
- 19) Tzagoloff, A.
Methods Enzymol. 55, p. 351-358, 1979.
- 20) Sebald, W. y G. Wild
Methods Enzymol. 55, p. 344-351, 1979.
- 21) Serrano, R., B.I. Kanner y E. Racker
J. Biol. Chem. 251, p. 2453-2461, 1976.
- 22) Galante, Y.M., S.-Y. Wong y Y. Hatefi
J. Biol. Chem. 254, p. 12372-12378, 1979.
- 23) Pullman, M.E. y G.C. Monroy
J. Biol. Chem. 238, p. 3762-3769, 1963.
- 24) Sanadi, D.R.

- Biochim. Biophys. Acta 683, p. 39-56, 1982.
- 25) You, K.-B. y Y. Hatefi
Biochim. Biophys. Acta 423, p. 398-412, 1976.
- 26) Futai, M. y H. Kanazawa
Microbiol. Rev. 47, p. 285-312, 1983.
- 27) Heppel, J. y W. Sebald
Biochim. Biophys. Acta 768, p. 1-27, 1984.
- 28) Sebald, W., T. Graf y H.B. Lukins
Eur. J. Biochem. 93, p. 587-599, 1979.
- 29) Knowles, A.F. y H.S. Penefsky
J. Biol. Chem. 245, p. 6468-6472, 1972.
- 30) Lamberth, D.O., H.A. Lardy, A.E. Senior y J.C. Brooks
FEBS Lett. 17, p. 330-337, 1971.
- 31) Esch, F.B. y W.S. Allison
J. Biol. Chem. 254, p. 10740-10746, 1979.
- 32) Yoshida, M., N. Sone, H. Hirata, Y. Kagawa y N. Ui
J. Biochem. 254, p. 9575-9535, 1979.
- 33) Saraste, M., N.J. Gay, A. Eberle, M.J. Runswick y J.E.
Walker
Nucleic Acids Res. 9, p. 5287-5296, 1981.
- 34) Gay, N.J. y J. E. Walker
Nucleic Acids Res. 9, p. 2187-2194, 1981.
- 35) Walker, J.E., A. Eberle, N.J. Gay, M.J. Runswick y M.
Saraste
Biochem. Soc. Trans. 10, p. 203-206, 1982.
- 36) Knowles, A.F. y H.S. Penefsky

- J. Biol. Chem. 247, p. 6624-6630, 1972.
- 37) Pougeois, R., M. Satre y P.V. Vignais
Biochemistry 18, p. 1408-1413, 1979.
- 38) Nalin, C.M. y R.L. Cross
Fed. Proc. 39, p. 1843-1848, 1980.
- 39) Kasahara, M. y H.B. Penefsky
J. Biol. Chem. 253, p. 4180-4187, 1978.
- 40) Kohlbrenner, W.E. y R.L. Cross
J. Biol. Chem. 253, p. 7609-7611, 1978.
- 41) Senior, A.E. y J.B. Wise
J. Membr. Biol. 73, p. 105-124, 1983.
- 42) Futai, M. y H. Kanazawa
Microb. Rev. 47, p. 285-312, 1983.
- 43) Vignais, P.V. y J. Lunardi
Ann. Rev. Biochem. 54, p. 977-1014, 1985.
- 44) Cross, R.L. y C.M. Nalin
J. Biol. Chem. 257, p. 2874-2881, 1982.
- 45) Wise, J.B., T.M. Duncan, R.L. Latchney, D.N. Cox y A.E.
Senior
Biochem. J. 215, p. 343-350, 1983.
- 46) Gresser, M., J. Gordon, G. Rosen y P.D. Boyer
J. Biol. Chem. 254, p. 10649-10653, 1979.
- 47) Rosen, G., M. Gresser, B. Vinkler y P.D. Boyer
J. Biol. Chem. 254, p. 10654-10661, 1979.
- 48) Kozlov, I. y Y.M. Milgrom
Eur. J. Biochem. 106, p. 457-462, 1980.

- 49) Lunardi, J., M. Satre y P.V. Vignais
Biochemistry, 20, p. 473-480, 1981.
- 50) Sloothaak, M., J.A. Berden, M.A. Herweifer y A. Kemp
Biochim. Biophys. Acta 809, p. 27-38, 1985.
- 51) Cosson, J.J. y R.J. Guillory
J. Biol. Chem. 254, p. 2946-2955, 1979.
- 52) Williams, N. y P.S. Coleman
J. Biol. Chem. 257, p. 2834-2841, 1982.
- 53) Schafer, H.-J. y K. Dose
J. Biol. Chem. 259, p. 15301-15306, 1984.
- 54) Gromet-Elhanan, Z. y D. Khananshvilii
Biochemistry 23, p. 1022-1028, 1984.
- 55) Kironde, F.A.S. y R.L. Cross
J. Biol. Chem. 262, p. 3488-3495, 1987.
- 56) Dunn, S.D. y L.A. Heppel
Arch. Biochem. Biophys 210, p. 421-436, 1981.
- 57) Erns, K. y R.S. Criddle
Arch. Biochem. Biophys. 183, p. 742-752, 1977.
- 58) Bragg, P.D. y C. Hou
Arch. Biochem. Biophys. 167, p. 311-321, 1975.
- 59) Dunn, S.D.
J. Biol. Chem. 257, p. 7354-7359, 1982.
- 60) Schwerzmann, K. y P.L. Pedersen
Arch. Biochem. Biophys. 250, p. 1-18, 1986.
- 61) Gómez Puyou, A., M. Tuena de Gómez Puyou y L. Ernster
Biochim. Biophys. Acta 547, p. 252-257, 1979.

- 62) Harris, D.A., V. Von Tscharner y G.K. Radda
 Biochim. Biophys. Acta 548, p. 72-84, 1979.
- 63) Schwerzmann, K. y P.L. Pedersen
 Biochemistry 20, p. 6305-6311, 1981.
- 64) Gómez-Fernández, J.C. y D.A. Harris
 Biochem. J. 176, p. 967-975, 1978.
- 65) Van de Stadt, R.J., B.L. Boer y K Van Dam
 Biochim. Biophys. Acta 548, p. 72-84, 1973.
- 66) Dreyfus, G., A. Gómez Puyou y M. Tuena de Gómez Puyou
 Biochem. Biophys. Res. Commun. 100, p. 400-406, 1981.
- 67) Hortsman, L.L. y E. Racker
 J. Biol. Chem. 245, p. 1336-1344, 1970.
- 68) Wong, S.-Y., Y.M. Galante y Y. Hatefi
 Biochemistry 21, p. 5781-5787, 1982.
- 69) Galante, Y.M. S.-Y. Wong y Y. Hatefi
 Biochemistry 20, p. 2671-2678, 1981.
- 70) Cintrón, N.M., J. Hüllihen, K. Schwerzmann y P.L. Pedersen
 Biochemistry 21, p. 1878-1885, 1982.
- 71) Tuena de Gómez Puyou, M., U. Muller, G. Dreyfus, G. Ayala y
 A. Gómez Puyou
 J. Biol. Chem. 258, p. 13680-13684, 1983
- 72) Dupuis, A., J.-P. Issartel y P.V. Vignais
 Biochemistry 24, p. 728-733, 1985.
- 73) Dupuis, A., J. Lunardi, J.-P. Issartel y P.V. Vignais
 Biochemistry 24, p. 734-739, 1985.
- 74) Dupuis, A. y P.V. Vignais

- Biochemistry 26, p. 410-418, 1987.
- 75) Kanner, K.I., R. Serrano, M.A. Kandrach y E. Racker
Biochem. Biophys. Res. Commun. 68, p. 1050-1056, 1976.
- 76) Matsuno-Yagi, T. y T. Hatefi
Biochemistry 23, p. 2449-2455, 1984.
- 77) Liang, A.M. y R.L. Fisher
J. Biol. Chem. 258, p. 4784-4788, 1983.
- 78) Foster, D.L. y R.H. Fillingame
J. Biol. Chem. 254, p. 8230-8234, 1979.
- 79) Senior, A.E. y J.G. Wise
J. Membr. Biol. 73, p. 105-124, 1983.
- 80) Sebald, W., W. Machleidt y E. Wachter
PNase USA 77, p. 785-788, 1980.
- 81) Celis, H.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 92, p. 26-31, 1980.
- 82) Sigrist-Nelson, K. y A. Azzi
J. Biol. Chem. 255, p. 10638-10643, 1980.
- 83) De Pinto, V., M. Tommasino, R. Benz y F. Palmieri
Biochim. Biophys. Acta 813, p. 230-242, 1985.
- 84) Kayalar, C., J. Rosing y P.D. Boyer
J. Biol. Chem. 252, p. 2486-2491, 1977.
- 85) Kozlov, I.A. y V.P. Skulachev
Biochim. Biophys. Acta 463, p. 27-89, 1977.
- 86) Hackney, D.D. y P.D. Boyer
J. Biol. Chem. 253, p. 3164-3170, 1978.
- 87) Choate, G.L., R.L. Hutton y P.D. Boyer

- J. Biol. Chem. 254, p. 286-290, 1979.
- 88) Grubmeyer, C., R.L. Cross y H.S. Penefsky
J. Biol. Chem. 257, p. 12092-12100, 1982.
- 89) Feldman, R.I. y D. S. Sigman
J. Biol. Chem. 257, p. 1676-1683, 1982.
- 90) de Meis, L., D.B. Martins y E.W. Alves
Biochemistry 19, p. 4252-4261, 1980.
- 91) Sakamoto, J. y Y. Tonomura
J. Biol. Chem. 93, p. 1601-1614, 1983.
- 92) Grubmeyer, C. y H.S. Penefsky
J. Biol. Chem. 256, p. 3718-3727, 1981.
- 93) Grubmeyer, C. y H.S. Penefsky
J. Biol. Chem. 256, p. 3728-3734, 1981.
- 94) Schuster, S., R.E. Ebel y H.A. Lardy
J. Biol. Chem. 250, p. 7848-7853, 1975.
- 95) Ebel, R.E. y H.A. Lardy
J. Biol. Chem. 250, p. 191-196, 1975.
- 96) Gresser, M.J., J.A. Myers y P.D. Boyer
J. Biol. Chem. 257, p. 12030-12038, 1982.
- 97) Cross, R.L., C. Grubmeyer y H.S. Penefsky
J. Biol. Chem. 257, p. 12101-12105, 1982.
- 98) Di Pietro, A., C. Bodinot, J.C. Martin y D.C. Gautheron
Biochemistry 18, p. 1738-1745, 1979.
- 99) Wang, J.H.
Biochemistry 23, p. 6350-6354, 1984.
- 100) Soong, K.S. y J.H. Wang

- Biochemistry, 23, p. 136-141, 1984.
- 101) Wang, J.H.
J. Biol. Chem. 260, p. 1374-1377, 1985.
- 102) Lardy, H.A., J.L. Connelly y D. Johnson
Biochemistry 3, p. 1961-1968, 1964.
- 103) Schafer, G.
FEBS Lett. 139, p. 271-275, 1982.
- 104) Van Der Bend, R.L., W. Duetz, A.M.A.F. Colon, K. Van Dam y
J.A. Berden
Arch. Biochem. Biophys. 241, p. 461-471, 1985.
- 105) Emanuel, E.L., M.A. Carver, G.C. Solani y D.E. Griffiths
Biochim. Biophys. Acta 766, p. 209-214, 1984.
- 106) Matsuno-Yagi, A. y Y. Hatefi
J. Biol. Chem. 261, p. 14031-14038, 1986.
- 107) Low, H. y I. Vallin
Biochim. Biophys. Acta 69, p. 361-374, 1963.
- 108) Lee, C.P. y L. Ernster
Methods in Enzymol. 10, p. 543-548, 1967.
- 109) Beltrán, C., M. Tuena de Gómez Puyou, A. Darzon y A. Gómez
Puyou
Eur. J. Biochem. 160, p. 163-168, 1986.
- 110) Lowry, O.H., N.J. Rosbrough, A.L. Farr y R.J. Randall
J. Biol. Chem. 193, p. 265-275, 1951.
- 111) Pullman, M.E., H.S. Penefsky, A. Datta y E. Racker
J. Biol. Chem. 235, p. 3322-3329, 1960.
- 112) Tuena de Gómez Puyou, M., G. Ayala, A. Darzon y A. Gómez

Puyou

- J. Biol. Chem. 259, p. 9472-9478, 1984.
- 113) Penefsky, H.S.
J. Biol. Chem. 252, p. 2891-2899, 1977.
- 114) Farrow, B.G. y A.P. Dawson
Eur. J. Biochem. 86, p. 85-95, 1978.
- 115) Dawson, A.P., B.G. Farrow y M.J. Selwyn
Biochem. J. 202, p. 163-169, 1982.
- 116) Rose, M.S.
Biochem. J. 111, p. 129-137, 1969.
- 117) Elliot, B.M., W.N. Aldridge y J.W. Bridges
Biochem. J. 177, p. 461-470, 1979.
- 118) Gould, J.M.
Eur. J. Biochem. 62, p. 567-575, 1976.
- 119) Gould, J.M.
FEBS Lett. 94, p. 90-94, 1978.
- 120) Guerrieri, F. y S. Papa
Eur. J. Biochem. 128, p. 9-13, 1982.
- 121) Papa, S., F. Guerrieri, M. Tuena de Gómez Puyou, J. Barranco y A. Gómez Puyou
Eur. J. Biochem. 128, p. 1-7, 1982.
- 122) Di Pietro, A., F. Penin, C. Godinot y D.C. Gautheron
Biochemistry, 19, p. 5671-5678, 1980.
- 123) Di Pietro, A., C. Godinot y D.C. Gautheron
Biochemistry, 20, p. 6312-6318, 1981.
- 124) Drobinskaya, I.Y., I.A. Kozlov, M.B. Monastaliev y E.N.

- Vulfson
FEBS Lett. 182, p. 419-424, 1985.
- 125) Hatofi, Y., T. Tagi, D.C. Phelps, S.Y. Wong, S.B. Vik y Y.M. Galante
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, p. 1756-1760, 1982.
- 126) Kayalar, C., J. Rosing y P.D. Boyer
Biochem. Biophys. Res. Commun. 72, p. 1153-1159, 1976.
- 127) Boyer, P.D., R.L. Cross y W. Momsen
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, p. 2837-2839, 1973.
- 128) Glaser, E., B. Norling y L. Ernster
Eur. J. Biochem. 110, p. 225-235, 1980.
- 129) Glaser, E., B. Norling, J. Kopecky y L. Ernster
Eur. J. Biochem. 121, p. 525-531, 1982.
- 130) Penafsky, H.S.
Proc. Natl. Acad. Sci. 82, p. 1589-1593, 1985.
- 131) Mitchell, P. y J. Moyle
Eur. J. Biochem. 4, p. 530-539, 1968.
- 132) Mitchell, P. y J. Moyle
FEBS Lett. 30, p. 317-320, 1973.
- 133) Thayer, W.S. y P.C. Hinkle
J. Biol. Chem. 248, p. 5395-5402, 1973.
- 134) Alexandre, A., B. Reynafarje y A.L. Lehninger
Proc. Natl. Acad. Sci. 75, p. 5296-5300, 1978.
- 135) Sorgato, M.C., F. Galiazzo, L. Fanato y B. Ferguson
Biochim. Biophys. Acta 682, p. 184-188, 1982.
- 136) Kironde, F.A.S. y R.L. Cross

- J. Biol. Chem. 261, p. 12544-12549, 1986.
- 137) Stiggall, D.L., Y.M. Galante y Y. Hatefi
J. Biol. Chem. 253, p. 956-964, 1978.
- 138) Harris, D.A., T.D. Larsen y L. Klungoyr
Biochim. Biophys. Acta 635, p. 412-428, 1981.
- 139) Futai, M. y H. Kanazawa
Microbiol. Reviews, 47, p. 285-312, 1983.
- 140) Fillingame, R.H.
Ann. Rev. Biochem. 49, p. 1079-1113, 1980.
- 141) Lunsdorf, H., K. Ehrig, P. Friedl y H.U. Schairer
J. Mol. Biol. 173, p. 131-136, 1984.
- 142) Rosing, J., C. Kayalar y P.D. Boyer
J. Biol. Chem. 252, p. 2478-2485, 1977.
- 143) Hutton, R.L. y P.D. Boyer
J. Biol. Chem. 254, p. 9990-9993, 1979.
- 144) Wagner, R., G. Ponce y H. Strotmann
Eur. J. Biochem. 161, p. 205-209, 1986.
- 145) Guerrieri, F., R. Scarfo, F. Zanotti, Y.W. Cho y S. Papa
FEBS Lett. 213, p. 67-72, 1987.