

54
2ej



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

Estudios sobre la existencia y caracterización
de la proteína inhibidora de la H^+ ATPasa de
Rhodospirillum rubrum

T E S I S

Que para obtener el título de

B I O L O G O

presenta

GUILLERMO ELIZONDO AZUELA



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.

Índice

Introducción	1
1 Características	2
1.1 Taxonomía y descripción de las bacterias fotosintéticas	3
1.2 Taxonomía y descripción de la bacteria <i>Rhodospirillum rubrum</i>	4
1.3 Hipótesis de la transducción energética	5
1.3.1 Hipótesis Química	
1.3.2 Hipótesis Conformational	
1.3.3 Hipótesis Quimiosmótica	
1.4 Descripción del complejo H+ATP sintetasa	8
1.5 Descripción del complejo H+ATP sintetasa de <i>Rhodospirillum rubrum</i>	11
1.6 Antecedentes	12
1.7 Objetivo	18
2 Materiales y métodos	20
2.1 Crecimiento de las bacterias	20
2.1.1 Medios de cultivo	
2.1.2 Siembra de bacterias	
2.1.3 Cosecha de bacterias	
2.2 Obtención del extracto crudo de inhibidor	23

2.3 Obtención de la FoF1 de <i>Rhodospirillum rubrum</i>	23
2.4 Obtención de la proteína inhibidora y del Factor F1 de mitocondria de corazón de res	25
2.5 Técnicas utilizadas	27
2.5.1 Determinación de proteína	
2.5.2 Determinación de la actividad hidrolítica de la H+ATPasa	
2.5.3 Determinación del Pi liberado.	
2.5.4 Determinación de la actividad inhibitoria del extracto de inhibidor de <i>Rhodospirillum rubrum</i>	
2.5.5 Tratamiento con tripsina al extracto de inhibidor	
2.5.6 Electroforésis en placa gel de acrilamida- SDS	

3 Identificación	30
3.1 Efecto del extracto de inhibidor de <i>Rhodospirillum rubrum</i> sobre la Fo-F ₁ de la bacteria	30
3.2 Efecto del extracto de inhibidor de <i>Rhodospirillum rubrum</i> sobre la F1 de mitocondria de corazón de res	30
3.3 Efecto en la inhibición al tratar al extracto de inhibidor con tripsina	33
3.4 Efecto del pH en el medio de preincubación sobre la actividad inhibitoria	36
3.5 Efecto de la variación del catión y del ATP en el medio de preincubación durante el proceso inhibitorio	36
3.6 Electroforésis en placa gel de acrilamida-SDS	38
3.7 Efecto del inhibidor natural de la H+ATPasa de mitocondria de corazón de res sobre la actividad hidrolítica de la FoF1 de <i>Rhodospirillum rubrum</i>	42
3.8 Eliminación del TCA como posible artefacto en la actividad inhibitoria	42
3.8.1 Diálisis del extracto de inhibidor	
3.8.2 Paso del extracto de inhibidor por una columna de Sephadex G-50	
3.8.3 Efecto del TCA neutralizado sobre la actividad hidrolítica de la F1 de mitocondria de corazón de res	

4 Discusión	49
--------------------	----

5 Conclusions	51
6 References	52

INTRODUCCION

Es bien sabida la necesidad de energía para la existencia de los seres vivos. Para esto la bioenergética, rama de la bioquímica, estudia la transformación y el empleo de la energía por las células. Dicha transformación se lleva a cabo, en última instancia, mediante un sistema fosforilante cuyo producto final es el trifosfato de adenosina (ATP), el cual proporciona la energía suficiente para las actividades celulares.

Dicha molécula es sintetizada por una enzima llamada H^+ ATP sintetasa (H^+ ATPasa) que se encuentra acoplada al transporte de electrones, la cual atraviesa la membrana celular y utiliza el potencial electroquímico, producto del transporte de electrones, para llevar a cabo su actividad enzimática.

La H^+ ATPasa ha sido y es objeto de numerosas investigaciones debido a su gran importancia. Entre estas investigaciones se encuentran aquellas que estudian la regulación de esta enzima (potencial electroquímico, necesidades energéticas de la célula, concentraciones de ATP, ADP y Pi).

Se ha purificado una proteína inhibidora de la actividad enzimática hidrolítica de la H^+ ATPasa en cloroplastos, mitocondrias y bacterias no fotosintéticas, sin embargo no se ha reportado la existencia de dicha proteína en bacterias fotosintéticas.

Esta investigación surgió con base en los experimentos previos de Baccharini-Melandri (1); en ellos se observó que la H^+ ATPasa de *Rhodospirillum rubrum* pierde gran parte de su actividad al ser solubilizada, pero que la recupera al ser reconstituida. Por otro lado, en esos experimentos también se observó que, al purificar la enzima, tanto la actividad específica como la total aumentan. Estos dos últimos hechos podrían deberse a la acción de una proteína inhibidora.

El siguiente trabajo describe una serie de experimentos que, junto con el apoyo de información bibliográfica, demuestra la existencia de una proteína inhibidora natural de la H^+ ATP sintetasa de la bacteria fotosintética *Rhodospirillum rubrum*.

La información presentada en este trabajo ha sido dividida en cuatro apartados. En el primero de ellos se exponen conceptos generales acerca del sistema sobre el cual se estuvo trabajando. Después se presentan los materiales y métodos utilizados, en la tercera parte los resultados y finalmente la discusión y las conclusiones.

1 GENERALIDADES

1.1 Taxonomía y descripción de las bacterias fotosintéticas.

Existen dos clases de bacterias fotosintéticas: las verdes y las púrpuras. Ambas pertenecen al orden Rhodospirillales, el cual se diferencia de las cianobacterias en que estas llevan a cabo una fotosíntesis anoxygenica con un sólo fotosistema y que requieren de donadores de electrones cuyo potencial redox es más bajo que el del agua, como lo son componentes sulfurados; mientras que las cianobacterias realizan una fotosíntesis oxygenica mediante dos fotosistemas.

Las bacterias verdes forman parte del suborden Chlorobineae cuyos pigmentos son las bacterioclorofilas *c, d o e*, las cuales se encuentran dentro de las llamadas vesículas de chlorobium. En general dichas bacterias no son móviles, con excepción de *Chloroflexus sp*.

Las bacterias púrpuras pertenecen al suborden Rhodospirillineae. La mayoría de estas son flageladas con respuestas fototácticas y quimiotácticas. Se caracterizan por tener como pigmentos a las bacterioclorofilas *a o b* dentro de sistemas membranales intracitoplásmicos, que forman pequeños bulbos denominados cromatóforos en donde se lleva a cabo la fotosíntesis.

Dichos pigmentos son regulados en su síntesis por la intensidad de la luz. En la oscuridad obtienen energía mediante la fermentación.

El suborden Rhodospirillineae se divide en dos familias:

-Familia Chromatiaceae (antes Thiorhodaceae). Son propiamente las bacterias sulfuradas. Utilizan como fuente reductora a H_2S , S , S_2O_3 , H_2 y substratos orgánicos.

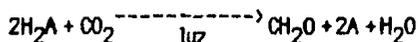
-Familia Rhodospirillaceae (antes Athiorhodaceae). Son las llamadas bacterias púrpuras no sulfuradas. Esta familia, en el curso de la evolución, perdió la capacidad de oxidar elementos sulfurados o sulfatados. Oxidan compuestos orgánicos como el succinato, glutamato y H_2 en algunas especies. Esta diferencia con la familia Chromatiaceae, seguramente, está muy relacionada con la carencia en las bacterias púrpuras no sulfuradas de la enzima adenil sulfato reductasa.

La familia Rhodospirillaceae tiene la capacidad de desarrollarse tanto en anaerobiosis como aeróbicamente. Cuando son crecidas en luz anaeróbicamente su metabolismo es fotosintético, mientras que cuando son crecidas en ausencia de luz y aeróbicamente su metabolismo es respiratorio, por lo que se dice que son bacterias facultativas. La tolerancia por el oxígeno depende de la especie y va desde microaerófilas hasta aerófilas.

Sus hábitats naturales son, en aguas dulces, en medios orgánicos simples y a temperaturas no extremas que van desde los 15 hasta los 35° C.

Otros substratos fotoasimilados por dicha familia son el acetato, piruvato y ácidos dicarboxílicos. Algunas especies son cultivadas en ácidos grasos, metanol o etanol, mientras que otras lo son en azúcares. Algunas necesitan de vitaminas.

La ecuación generalizada para la fotosíntesis de bacterias, según Van Niel (2), es la siguiente:



1.2 Taxonomía y descripción de la bacteria *Rhodospirillum rubrum*.

Las bacterias utilizadas son el género tipo de la familia Rhodospirillaceae y su ubicación taxonómica es la siguiente:

Orden: Rhodospirillales

Suborden: Rhodospirillineae

Familia: Rhodospirillaceae

Género: *Rhodospirillum*

Especie: *rubrum*.

Tienen una forma espiral. Miden de 0.6 a 1.0 μ de ancho y de 7.0 a 10.0 μ de largo. El color del cultivo anaeróbico con luz es rojo. Tiene flagelos polares y el mecanismo de reproducción es por división binaria. Son aeróbicas facultativas. Su crecimiento anaeróbico ocurre en luz mediante la fotosíntesis y el aeróbico en la oscuridad mediante la energía de la oxidación de compuestos orgánicos, en el que se observa un bajo desarrollo de los cromatóforos.

Un factor importante que se requiere para su crecimiento es la biotina.

Presentan una pared celular separada por el espacio periplásmico (3) de la membrana celular, la cual envuelve al citoplasma y contiene el transporte de electrones. La membrana plasmática forma invaginaciones llamadas cromatóforos, dicho sistema intracitoplásmico de membrana se toma como criterio para la clasificación entre especies.

French y col.(4), reportaron que los pigmentos fotosintéticos de *Rhodospirillum rubrum* están asociados a los cromatóforos.

El caroteno predominante en esta bacteria es la espirilloxantina. Las quinonas presentes son la Ubiquinona 10 y la Rhodoquinona.

El espectro de *Rhodospirillum rubrum* es único en cuanto a que presenta una banda de absorción a 550 nm debido a la espirilloxantina y una a 885 nm por la BCl (Bacterioclorofila) a. Todas las demás especies con BCl a muestran dos bandas de absorción de 800 a 890 nm.

Orientadas hacia el espacio periplásmico encontramos proteínas que participan en el transporte de electrones como es el caso del citocromo C_2 .

1.3 Hipótesis de la transducción energética.

En los últimos años la investigación en el campo de la bioenergética se ha enfocado en las reacciones involucradas en la captura y conversión de la energía por las células, sobre todo en la transducción de energía en sistemas membranales.

En particular se sabe bastante acerca de la síntesis del ATP y su dependencia con el transporte de electrones, el cual proporciona la energía para la formación del ATP mediante reacciones de óxido-reducción y la enzima H^+ ATPasa. Sin embargo, aún hay preguntas sin respuestas: ¿cuales son los mecanismos moleculares por los cuales se lleva a cabo la transducción energética?, ¿de que manera operan los cambios conformacionales?, ¿cómo son procesadas y ensambladas, en la membrana, las subunidades involucradas en la transducción energética?

Existen 3 hipótesis principales, las cuales están basadas en estudios sobre mitocondrias que se han utilizado para explicar, también, la fotofosforilación en cloroplastos y bacterias. A continuación se presentan dichas hipótesis.

1.3.1 Hipótesis Química

Esta hipótesis fue formulada por E.C. Slater en 1953 (5). Propone un intermediario covalente de alta energía, el cual se forma en el transporte electrónico que después se rompe cediendo energía para la formación de ATP, es decir, por medio de dicho intermediario químico hay un acoplamiento entre las reacciones de óxido-reducción y la síntesis del ATP.

Esta proposición es un recuerdo del papel desempeñado por el 1, 3 difosfoglicérico, intermediario en la glucólisis en la formación del ATP en la mencionada secuencia, el cual utiliza la energía liberada de la oxidación de un aldehído a carboxilo.

Este intermediario debería de tener una energía libre de hidrólisis fuertemente negativa, la cual aportaría la energía necesaria para la formación del ATP a partir de ADP (Difosfato de adenosina) y Pi(Fósforo inorgánico). Lo anterior se esquematiza de la siguiente manera:



Donde: A y B son transportadores redox

X es el intermediario común.

Sin embargo esta hipótesis tiene algunas limitaciones. En primer lugar no se ha aislado ningún tipo de intermediario químico de alta energía, además de que no se toma en cuenta otros procesos involucrados en la transducción energética como lo son los cambios estructurales, flujos de iones, potenciales eléctricos, la importancia de una membrana continua, así como la estequiometría.

1.3.2 Hipótesis Conformacional.

Esta hipótesis, principalmente propuesta por Paul D. Boyer (6), menciona que las transducciones energéticas podrían estar relacionadas con cambios conformacionales de proteínas. En alguna época

se pensó que la energía del transporte de electrones podría estar vinculada a la formación de tioéster a través de un cambio conformacional protéico (7).

Lumry (8) también reconoce cambios conformacionales relacionados con la transmisión y uso de la energía libre, debido a que en la fosforilación la energía libre es pequeña y por lo mismo podría participar en una pequeña distorsión protéica sin que esté acompañada por otro proceso. Menciona que el desarrollo y la transmisión de cambios conformacionales esté acompañado por transiciones de carga incluyendo movimientos de grupos protonados.

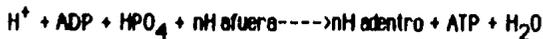
Dicho cambio conformacional podría ser provocado por una molécula del transporte de electrones o por la $H^+ATPasa$. La energía inherente al cambio conformacional provoca la formación del ATP a partir de ADP y P_i .

Hasta la fecha se han obtenido resultados interesantes que mantienen viable a la hipótesis Conformacional pero que sin embargo no ha tenido la importancia y la contribución de la hipótesis Quimiosmótica la cual veremos a continuación.

1.3.3 Hipótesis Quimiosmótica.

Mitchell (9,10) es el creador de esta hipótesis, la cual incluye la $H^+ATPasa$, el transporte de electrones y la transferencia de protones como componentes principales; mediados por la translocación de electrones y elementos del agua a través de la membrana.

Mitchell se basa principalmente en el hecho de que el transporte de electrones provoca una salida de protones fuera de la membrana; que la membrana es impermeable a los iones, especialmente al OH^- y H^+ , excepto por vía específica mediante cierto sistemas de transporte; y que atravesando la membrana se encuentra la H^+ATP sintetasa que cataliza la siguiente reacción:



El gradiente de protones proporciona la energía necesaria, al atravesar la membrana vía F_0 (subunidad membranal de la H^+ ATPasa), para que ésta lleve a cabo la reacción anteriormente descrita.

Dicho gradiente está formado por dos componentes: el potencial de membrana o eléctrico ($\Delta\psi$) y el potencial químico ($\Delta\mu$), que forman la llamada fuerza protomotriz (Δp), cuya relación es la siguiente:

$$\Delta p = \Delta\psi - Z \Delta\mu / f$$

Donde $Z = 2.303 R T / f$

Siendo $R =$ Constante de los gases.

$T =$ Temperatura absoluta.

$f =$ Constante de Faraday.

Se ha observado que la síntesis de ATP es más dependiente del potencial eléctrico en mitocondrias, mientras que en el cloroplasto lo es del potencial químico (11). En bacterias puede depender de ambos o de uno u otro según el medio ambiente en que se encuentren.

Respecto a esta hipótesis, Boyer menciona que el gradiente de protones no es la única manera de transmitir la energía. Cita trabajos en los que se observa síntesis de ATP en partículas no vesiculares (12) o que en cloroplastos se observa la formación de ATP y luego la formación del gradiente electroquímico (13).

Esta teoría aún tiene detalles que causan controversia, sin embargo sus postulados básicos ya han sido probados experimentalmente (14), por lo que ha sido tomada como base de este trabajo.

1.4 Descripción del complejo H^+ ATP sintetasa.

El complejo H^+ ATP sintetasa de mitocondrias, cloroplastos y bacterias es muy similar en cuanto a estructura. Este consiste en dos partes designadas como F_1 y F_0 (fig. 1).

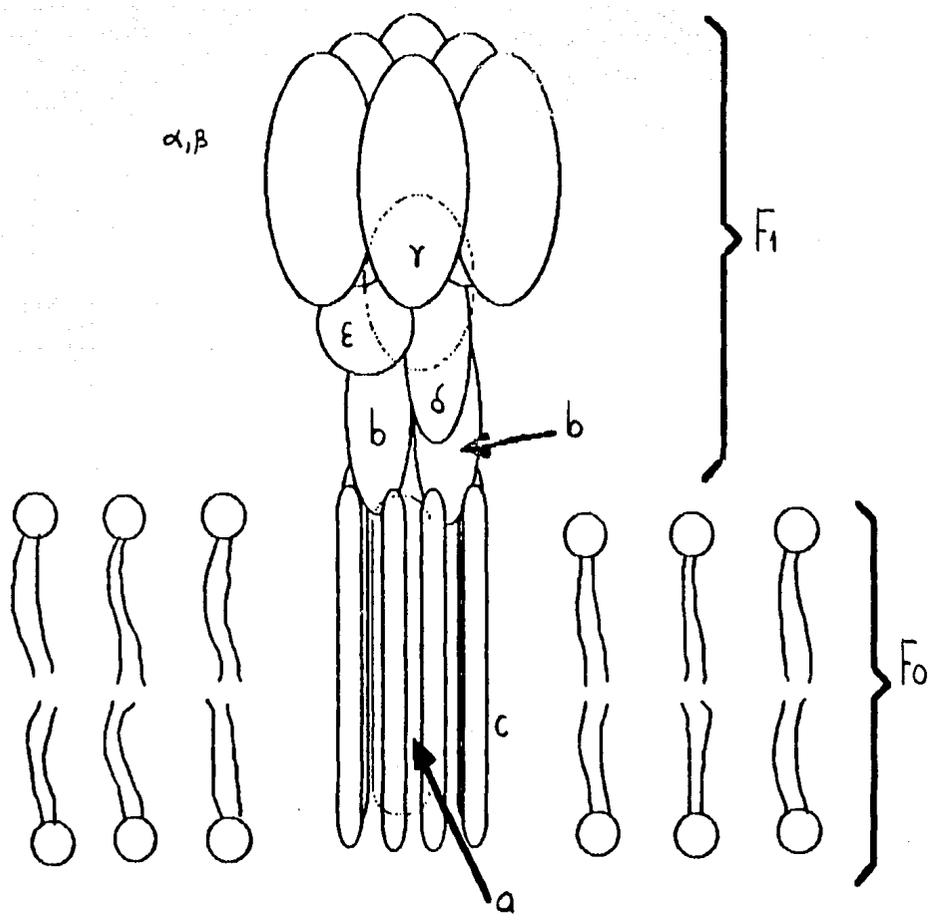


Fig 1 Modelo de la F₀F₁ de Escherichia coli. Este modelo está basado en experimentos de reconstitución, estequiometría de las subunidades y en predicciones de estructuras secundarias (17).

La F_1 es hidrofílica y se encuentra en la parte interna del compartimiento de la membrana; está compuesta por 5 subunidades, determinadas por técnicas de secuenciación de DNA. Los pesos moleculares de las diferentes subunidades en *Escherichia coli* son:

α 55, 264

β 50, 157

γ 31, 410

δ 19, 310

ϵ 14, 194

La estequiometría de las diferentes subunidades es la siguiente: $\alpha_3 \beta_3 \gamma \delta \epsilon$. Las subunidades α y β forman la parte catalítica de la F_1 ya que en éstas se encuentran los sitios de unión para los nucleótidos y es en esta región donde se lleva a cabo la síntesis y la hidrólisis.

Por otro lado la función de las subunidades δ y ϵ es la de unirse a la F_0 , mientras que la subunidad γ une la parte catalítica $\alpha\beta$ con $\delta\epsilon F_0$ (15).

Asociada a la F_1 se encuentra una proteína que previene la actividad hidrolítica de la enzima llamada el inhibidor natural de la H^+ ATPasa.

La F_0 se encuentra en la bicapa lipídica de la membrana, su función es la de permitir el paso de protones al complejo catalítico de la H^+ ATPasa y unir la porción F_1 a la membrana. En *Escherichia coli* está formada por 3 polipéptidos. La proteína *a* es hidrofóbica con un peso molecular de 30,000. La proteína *c* es altamente hidrofóbica y se une covalentemente al DCCD (Diciclohexilamida), alterando la permeabilidad de la F_0 a los protones e inhibiendo la síntesis de ATP.

La evidencia química y genética parece indicar que la subunidad *c* sólo funciona en forma de oligómero. En cloroplastos, levaduras y mitocondrias se ha encontrado que reconstituida en liposomas permite el paso de protones (16).

La subunidad *b* tiene un peso molecular de 17,220. Contiene una región hidrofóbica y otra hidrofílica; esta última es la que seguramente une la F_1 a la membrana al tener contacto con la subunidad δ (11,15).

La estequiometría de la Fo aún no está bien definida, algunas Fo bacteriales carecen de la subunidad ϵ y se ha propuesto que sólo tienen 1 subunidad ϵ (11).

1.5 Descripción del complejo H^+ ATP sintetasa de *Rhodospirillum rubrum*.

Se han desarrollado varios métodos de purificación del factor de acoplamiento de *Rhodospirillum rubrum* los cuales se basan en sonicaciones con EDTA 1 mM (1), lavados con soluciones de alta fuerza iónica (18,19,20), polvos acetónicos (21), extracciones con cloroformo (22,23) y lavados con soluciones de Tritón X-100 (24,25,26). El peso molecular de la FoF₁ es de 480,000 \pm 30,000 (25). Requiere de las subunidades α , β y γ para llevar a cabo su actividad enzimática, mientras que la subunidad δ es necesaria para la unión entre la F₁ y Fo. Los pesos moleculares de la F₁ son los siguientes:

α 58,000

β 53,000

γ 39,000

δ 18,500

ϵ 7,500.

Por otro lado se han podido deducir las funciones de algunas subunidades gracias a diferentes técnicas de purificación. Por ejemplo, la extracción del factor de acoplamiento mediante LiCl libera a la subunidad β . Al ser despojado de dicha subunidad la FoF₁ unida a la membrana pierde su actividad enzimática la cual se recupera al ser reconstituida (20). De lo anterior se sugiere que la actividad catalítica reside en la subunidad β .

Las preparaciones membranales poseen una H^+ ATPasa dependiente de Mg^{++} , sensible a desacoplantes como el FCCP (Paratriluorometoxicarbonil-Cianuro-Fenilhidrazina), DCCD (Diciclohexil-Carbodiimida) y a inhibidores de la transferencia de energía como la oligomicina y la aurovertina. Otros cationes metálicos pueden sustituir al Mg^{++} tales como el Mn^{++} , Co^{++} y Ca^{++} aunque con menor eficiencia (27,28).

La solubilización de la enzima trae consigo cambios en las propiedades catalíticas, especialmente a lo que se refiere al requerimiento de cationes, por ejemplo, la enzima purificada de un extracto de polvos acetónicos presenta una actividad alta en presencia de Ca^{++} y baja en presencia de Mg^{++} , incluso éste último puede llegar a inhibir la actividad. La solubilización de la H^+ ATPasa con Tritón x-100 es dependiente de Ca^{++} y de Mg^{++} sin embargo un exceso de Mg^{++} produce un efecto inhibitorio mientras que con un exceso de Ca^{++} sólo se observa una pequeña inhibición. Lo anterior no ocurre cuando la enzima se encuentra unida a la membrana, por lo que se sugiere que la membrana protege a la enzima del Mg^{++} libre (29). Estos cambios en los requerimientos por el catión son explicados por Webster y col (22) como un posible cambio en la sensibilidad por el catión.

Otras características de la enzima son: la capacidad de hidrolizar otros nucleótidos como el GTP (Trifosfato de guanina) y el ITP (Imidotrifosfato) (25), no sufre cambios conformacionales bruscos cuando es solubilizada en detergentes no iónicos (30), su punto isoelectrico es de 4.5 (25) y su pH óptimo es de 8.0 (28).

En cuanto a la regulación de la H^+ ATPasa en bacterias fotosintéticas Baccarini y Melandri (1, 31) mencionan la necesidad de encontrar en dicho sistema la presencia de subunidades regulatorias como la proteína inhibidora.

1.6 Antecedentes.

Uno de los descubrimientos importantes dentro de la bioenergética fue el de la proteína inhibidora de la ATPasa por Pullman y Monroy (32). A partir de entonces se han realizados varias investigaciones que sugieren una regulación fisiológica como función principal de la proteína inhibidora de la ATPasa de mitocondria. Proteínas similares fueron aisladas en cloroplastos(33) y en bacterias (34,35), ampliando los estudios a relaciones filogenéticas.

Para finales de la década de 1970 la fuerza protomotriz, generada por la cadena de transporte de electrones, y la proteína inhibidora fueron consideradas como las responsables de la "direccionalidad" de la H^+ ATPasa (36,37,38).

Las proteínas inhibidoras aisladas de diferentes fuentes mitocondriales (levadura, hígado y corazón) son muy similares. Son ácidas, estables al calor, con pesos moleculares que van de 7,000 en levaduras a 16,000 en el músculo esquelético. Su composición de aminoácidos muestra un alto porcentaje de cargas residuales (arriba del 50 %) : ácido glutámico, lisina, arginina, ácido aspártico pero carece de cisteína y triptófano (37).

La estructura primaria de la proteína inhibidora de mitocondria de corazón de res (39,40) y de *Saccharomyces cerevisiae* (41) muestran un alto grado de homología. También se sabe que las proteínas inhibidoras de mitocondria cruzan funcionalmente con ATPasas de diferentes especies (42). Las proteínas inhibidoras de cloroplastos y bacterias tienen la misma función a la de la mitocondria, es decir, regulan la actividad hidrolítica de la enzima. Sin embargo son diferentes clases de proteínas. Sus pesos moleculares van de 14,000 a 16,000, y sus composiciones de aminoácidos muestran más residuos neutros e hidrofóbicos los cuales le dan un carácter hidrofóbico (30,35,40). Al igual que la proteína inhibidora de mitocondria, las encontradas en bacterias y cloroplastos son estables al calor y al ácido. Hasta la fecha no se ha encontrado un cruce funcional entre H^+ ATPasas de eucariontes y proteínas inhibidoras de procariontes (33,34,35).

Cuando una proteína inhibidora es tratada con radiactividad y se agrega a vesículas submitocondriales se observa una unión saturable además de que la cantidad de proteína unida es proporcional a la inhibición de la actividad enzimática (43). Resultados similares se han obtenido en mitocondrias de levaduras (44,45). Dicho sitio de unión se conserva tanto en la F_0-F_1 purificada como en la F_1 , aunque la constante de disociación aumenta. La estequiometría de unión es muy cercana a 1 en preparaciones de F_1 y F_0-F_1 (46,47).

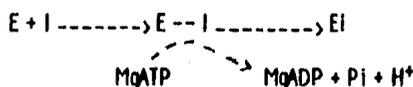
Klein y colaboradores (46) han demostrado mediante compuestos radiactivos que la proteína inhibidora se une en la subunidad β o muy cerca a esta. Por otro lado, varios autores (43,48,49) han observado que la unión de la proteína inhibidora en la enzima aislada es menos estable que en la enzima unida a la membrana. Hashimoto y colaboradores (49) han aislado dos pequeñas proteínas, de 9 y 15 Kd (kilodalton), de las membranas mitocondriales de levadura, las cuales estabilizan la

unión de la proteína inhibidora con la ATP sintetasa aislada pero que sin embargo no lo hacen con la F1.

Uno de los requerimientos para la unión a la enzima es la hidrólisis de algunas moléculas de ATP en un medio de incubación a pHs ligeramente ácidos (46,48,50). Lo anterior parece sugerir que el inhibidor se encuentra unido a la enzima "improductivamente" y que al ocurrir la hidrólisis, la unión pasa a un estado "productivo" que inactiva a la enzima (49). Al ocurrir hidrólisis se produce un exceso de ADP, Pi y de H⁺ los cuales, probablemente, inducen a una interacción inhibidor-F1 productiva. Panchenko y Vinogradov (51) observaron en sus experimentos una inhibición considerable de la actividad ATPásica cuando se utiliza un medio de preincubación sin cationes y nucleótidos a un pH de 4.8. Ellos sugieren que la proteína inhibidora sufre una pequeña transición al haber un cambio de un pH neutro a uno ácido, lo que permite la unión con la enzima.

Existen otros factores que al parecer influyen en la unión de la proteína inhibidora con la enzima como por ejemplo, la presencia de ciertos fosfolípidos en la vecindad del sitio común (52,53).

El esquema general de la unión de la proteína inhibidora a la ATPasa es:



Muchos autores han demostrado la liberación de la proteína inhibidora, de la enzima, bajo diferentes condiciones como por ejemplo al remover los iones Mg⁺⁺ con EDTA (Acido Etilendiamino Tetra-acético) (52,54), aumentando la fuerza iónica (55) o el pH arriba de 8 (56). Sin embargo en todos los ejemplos anteriores el proceso de liberación es muy lento. Van De Stadt y colaboradores (57) observaron un aumento en la actividad en partículas submitocondriales al incubarlas con un sustrato respiratorio, lo que sugiere la liberación de la proteína inhibidora, aunque aún sigue siendo un proceso lento.

Se ha observado que la proteína inhibidora puede actuar sobre la reacción de recambio ATP-Pi pero con muy bajo efecto a diferencia de la reacción de hidrólisis donde se observa un fuerte efecto inhibitorio. Gómez-Puyou y colaboradores (58), con base en lo anterior, han propuesto que es en el último paso de la hidrólisis, al liberarse el ADP, cuando actúa la proteína inhibidora.

En todos los sistemas probados el efecto del inhibidor es no competitivo al utilizar todos los nucleótidos hidrolizables (37,38,48,50). Esto, junto con los estudios que indican que la proteína inhibidora no se une al sitio catalítico de la subunidad B, da lugar a la hipótesis de que existe un sitio regulador en la subunidad B (15). Los estudios realizados por Citrón y col (50) apoyan lo anterior al obtener resultados que sugieren que el inhibidor enmascara un sitio regulador alostérico para el ATP.

Klein y col. (59) han propuesto que la proteína inhibidora ejerce su efecto inhibitorio bloqueando la unión de los nucleótidos, en una posición que les hace inaccesible su sitio de unión. También observaron que la capacidad inhibitoria cambia al variar el tipo de nucleótido.

Pullman y Monroy (32) determinaron que la proteína inhibidora no afecta la actividad de síntesis de la H⁺ATPasa. Numerosos trabajos han corroborado lo anterior además de que el gradiente de protones promueve la síntesis de ATP y la liberación de la proteína inhibidora.

Harris y Croft (60) observaron que la activación tanto de la hidrólisis como de la síntesis, en cloroplastos, mediante flashes de luz, es muy similar. Cuando los cloroplastos son tratados con ditiotreitol, el cual se supone remueve a la proteína inhibidora, se acelera la fosforilación aun disminuyendo el número de flashes. Lo anterior parece indicar que el inhibidor se desplaza del sitio activo antes de que la H⁺ATPasa se active.

Se han realizado experimentos (61) en los que se observa un pequeño retardo en la síntesis, en partículas submitocondriales, al agregar la proteína inhibidora. Este retardo desaparece al incubarse con NADH (Nicotinamida dinucleótido reducido). Sin embargo esta fase de retardo en la síntesis también depende de la temperatura, del tipo de sustrato respiratorio, del grado de acoplamiento, pero no de la cantidad de la proteína inhibidora (62). Además de que se ha observado

que la liberación de la proteína inhibidora es del orden de minutos mientras que la fase de retardo es sólo de segundos (61).

No sólo se ha propuesto el gradiente de protones como determinante en la interacción de la proteína inhibidora, también lo son los cationes divalentes como el Mg^{++} y el Ca^{++} (44,48,50,54).

Se ha propuesto un modelo bioquímico de la interacción de la proteína inhibidora con la H^+ATP sintetasa (36), el cual se basa en los cambios conformacionales que sufre la F_1 durante el transporte de electrones. Propone que los diferentes cambios conformacionales que sufre la enzima dictan los diferentes estados de interacción, se supone que la proteína inhibidora afecta la velocidad con la cual ocurren los cambios conformacionales (Fig.2).

En el estado I, en ausencia del potencial electroquímico, la proteína inhibidora se encuentra unida a la H^+ATP sintetasa en la que, de alguna forma bloquea su actividad catalítica. Esto se explica por el bloqueo del sitio de unión para el nucleótido (59,63).

En el estado II es generada la fuerza protomotriz por la translocación de electrones, la H^+ATP asa sufre entonces un cambio conformacional el cual es observado por un incremento en la fluorescencia de la unión de la aurovertina (64). La proteína inhibidora disminuye la velocidad del cambio conformacional, lo que explica el retraso observado en la síntesis de ATP en partículas submitocondriales y cloroplastos cuando éstos contienen a la proteína inhibidora. Hangarter y Ort (65) postulan que la formación de un complejo cooperativo entre el transporte de electrones y la translocación de protones requiere de la producción de un umbral en la fuerza protomotriz el cual es alcanzado por el retraso provocado por la proteína inhibidora.

En esta etapa la proteína inhibidora se encuentra asociada a la H^+ATP sintetasa en una posición intermedia lo que permite la actividad de síntesis pero no de hidrólisis. Una explicación bastante razonable acerca de la diferencia del efecto de la proteína inhibidora sobre la direccionalidad de la actividad enzimática, es la propuesta por Asami y col (38), la cual sugiere que la proteína inhibidora controla la permeabilidad a los protones en la porción F_o de la H^+ATP sintetasa, y así permite el paso de protones en una sola dirección.

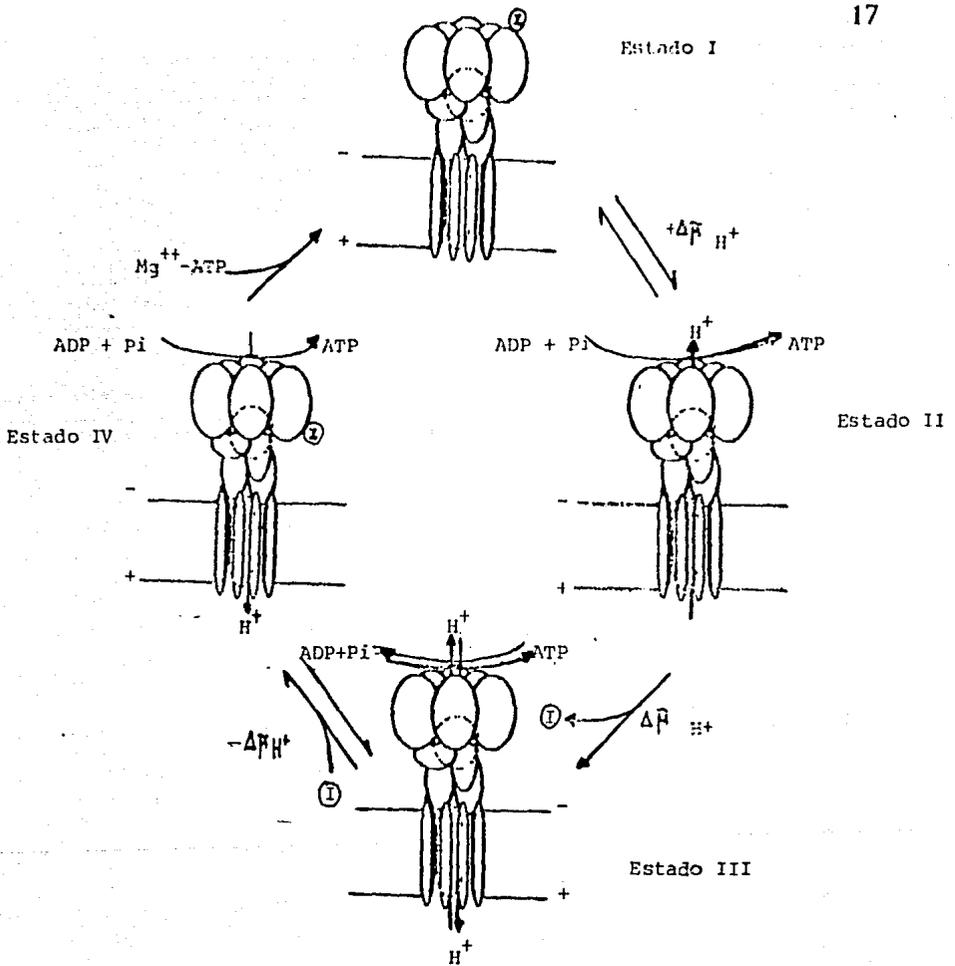


Figura 2.- Modelo en el cual se muestran los cuatro estados de interacción entre la proteína inhibidora y la ATP sintetasa (36)

En el estado III el potencial electroquímico permanece constante durante cierto tiempo, en el que la proteína inhibidora es liberada, disminuyendo la afinidad de ésta por la H^+ ATP sintetasa "energizada". En términos generales la H^+ ATP sintetasa, en este momento, es capaz de realizar la catálisis en ambas direcciones, lo cual está determinado por la permanencia del potencial electroquímico.

Durante el estado IV la proteína inhibidora interactúa con la H^+ ATP sintetasa en una forma no efectiva. La formación de dicho complejo intermedio es promovido cuando se colapsa el potencial transmembranal, y es entonces cuando ocurre un rápido cambio conformacional de la H^+ ATPasa, sugerido por el decremento en la fluorescencia del sitio de la aurovertina (64). Se puede pensar que dicha transición causa un incremento en la afinidad por la proteína inhibidora. La unión de la proteína inhibidora podría ser, también, promovida por una variedad de factores como lo es el estado activo de la enzima (50,54), por los cationes divalentes (48,50,66), por un pH bajo en la matriz (51), por proteínas adicionales (49) y a fosfolípidos (53).

1.7 Objetivo.

Como se puede observar las investigaciones acerca de la regulación de la ATP sintetasa, por la proteína inhibidora, tienen más de 20 años y aún existe una gran cantidad de preguntas acerca del mecanismo de regulación. Ciertamente hay otros mecanismos de regulación dados por una variedad de factores cuyas interrelaciones aún se desconocen del todo.

El cómo funciona la proteína inhibidora será realmente comprendido cuando se entienda completamente el mecanismo de transducción energética en mitocondrias, bacterias y cloroplastos.

El objetivo del siguiente trabajo es demostrar la existencia de la proteína inhibidora de la H^+ ATP sintetasa de la bacteria fotosintética *Rhodospirillum rubrum*. El interés por esta investigación surgió debido a los experimentos previos (67) en que se sugiere la existencia de la proteína inhibidora (tabla 1); dichos experimentos, en los que se observó la activación de la enzima, consisten en tratamientos comparativos entre la H^+ ATPasa de mitocondria de corazón de res y la de *Rs. rubrum*, con tripsina, calor, frío y paso por una columna de sephadex G-50.

Tratamiento	Mitochondria	<i>Rhodospirillum rubrum</i>
1) Columna de Sephadex G-50.	Se activa la ATPasa	Hay una estimulación de la ATPasa de cromatóforo de 40 %
2) Baja temperatura	La F_1 se inactiva en frío pero se mantiene estable con el inhibidor	La ATPasa solubilizada se mantiene estable a 4 °C o incluso congelada *
3) Calor	La ATPasa se activa al ser calentada a 62 °C	La ATPasa solubilizada se estimula un 80 % cuando se le calienta a 62 °C *

Tabla 1. Criterios indirectos para demostrar la existencia del inhibidor.

* Medida en reconstitución. (67).

2 Materiales y métodos.

2.1 Crecimiento de las bacterias.

Las bacterias utilizadas en todos los experimentos fue la cepa silvestre de *Rhodospirillum rubrum*.

2.1.1 Medios de cultivo.

Se utilizaron dos tipos de medio, uno sólido y el otro líquido. El primero contiene lo siguiente para un litro:

Extracto de levadura 3 gr

Peptona de gelatina 2 g

Agar bacteriológico 1 %.

El medio fue esterilizado por 15 min en la autoclave, en frascos de 15 a 20 ml con rosca.

El medio líquido se preparó según la fórmula de Cohen- Bazire y col (68), con la modificación utilizada por Hutner (69).

Para la preparación del medio se partió de las siguientes soluciones:

a) Base concentrada, para dos litros:

Acido Triacético de Nitrilo - $N(CH_2COOH)_3$ - 20 gr

Sulfato de Magnesio - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 28.9 gr

Cloruro de Calcio - $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ - 8.7 gr

Molibdato de Amonio - $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ - 0.185 gr

Sulfato Ferroso - $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0.195 gr

Metales '44' - 100 ml

Se ajusta el pH a 6.8.

La solución de metales contiene lo siguiente:

EDTA - 2.5 gr
 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 5.0 gr
 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 11.0 mg
 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 1.54 gr
 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0.392 gr
 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0.248 gr
 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0.177 gr

Se afora a un litro con agua destilada y se ajusta el pH a 6.8.

- b) KH_2PO_4 - 136.09 gr para 1 lt de agua destilada, se ajusta el pH a 6.8
- c) Acido succínico - 100 gr para 1 lt de agua destilada y se ajusta el pH a 6.8
- d) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 100 gr para 1 lt de agua destilada
- e) NaCl_2 - 50 gr para 1 lt de agua destilada
- f) Acido L-glutámico - 25 gr para 250 ml de agua destilada
- g) Acido L-aspártico - 5 gr para 250 ml de agua destilada.

El medio líquido final contiene, para 12.5 lt, las siguientes soluciones:

Base concentrada - 250 ml
 KH_2PO_4 - 250 ml
 Acido succínico - 250 ml
 Sulfato de Amonio - 62.5 ml
 NaCl_2 - 125 ml
 Acido L-glutámico - 25 ml
 Acido L-aspártico - 25 ml
 Extracto de carne - 12.5 gr
 Acido nicotínico - 12.5 mg
 Tiamina - 6.25 mg

d-Biotina - 0.125 mg.

Se ajusta el pH a 6.8. El medio se esteriliza en la autoclave durante una hora, con escape lento. El medio presenta un precipitado que al agitarse y llegar a temperatura ambiente, se disuelve. El medio tiene un color amarillo claro transparente.

2.1.2 Siembra de bacterias.

Las bacterias se sembraron en placas para formar colonias sencillas. De estas se tomaron muestras para sembrarlas, por picadura, en los frascos con medio sólido. Se incubaron en la oscuridad para que las bacterias consumieran el oxígeno presente. Después fueron expuestas a la luz para provocar el crecimiento fotosintético en anaerobiosis utilizando focos de tungsteno de 40 watts a una distancia de 30 cm. Una vez observado el desarrollo de la colonia, los cultivos pueden mantenerse así durante largo tiempo para darles más tarde la utilidad que se requiera.

Para obtener mayores cantidades de bacterias se utilizó el medio líquido, para lo cual se añadió éste en los frascos que contenían colonias en medio sólido, se agitó. Después de 10 días, al observarse crecimiento en el medio líquido, se transfirió a frascos de 10 ml, al obtener una mayor población se pasaron a frascos de 1 lt y finalmente a frascos de 16.5 lt.

En todos los casos los frascos utilizados fueron cerrados con tapones de hule esterilizados, dejando entre estos y el medio el menor espacio posible para reducir al máximo la cantidad de oxígeno. Es por eso que los cultivos se mantuvieron en la oscuridad previamente al crecimiento con la luz, de manera que las bacterias consumieran el poco oxígeno para luego crecer anaeróbicamente.

Los cultivos se mantuvieron a 30°C, se dejó crecer a las bacterias hasta la fase logarítmica tardía determinada por curvas de crecimiento al medir la densidad óptica del cultivo a diversos intervalos de tiempo en el fotocolorímetro.

2.1.3 Cosecha de bacterias.

Las bacterias fueron cosechadas directamente de los frascos de 16.5 lt mediante una centrifuga de flujo continuo Sharples. De la cosecha se obtuvo una masa de bacterias libre del medio líquido, la

cual fue lavada con MOPS (Acido 3-N-Morfolinopropanosulfónico) 50 mM, KCl 50 mM pH 7.5 para eliminar por completo los residuos y desechos del medio. Se centrifugó a 8,000 x g, 20 min. Los precipitados se pesaron y se almacenaron a -30°C en un congelador hasta ser utilizados.

2.2 Obtención del extracto crudo de inhibidor.

Para obtener el extracto crudo de inhibidor se usaron combinaciones de diferentes métodos para purificar inhibidores de diferentes sistemas (37).

Se resuspendieron 50 gr de bacterias en 65 ml de agua bidestilada. Se calentaron a 90°C en baño María, 20 min. Se agitaron en hielo 20 min y se dejaron agitando a una temperatura de 4°C durante 15 hrs.

Se centrifugaron a 15,000 rpm 20 min, el sobrenadante es precipitado con TCA (Acido tricloroacético) a una concentración final del 10%. Se centrifuga a 15,000 rpm 20 min, el sobrenadante es desechado y el precipitado es resuspendido en un buffer Tris-HCl (Hidroximetilaminometano) 10 mM pH 7, se ajusta el pH 7 con KOH. Una vez neutralizado se centrifuga a 40,000 rpm 1 hr, el sobrenadante es el extracto crudo de inhibidor, el cual mantiene su actividad inhibitoria después de haber sido congelado a -70°C durante 5 meses (Fig.3).

2.3 Obtención de la F₀-F₁ de *Rhodospirillum rubrum*.

El método utilizado para purificar la F₀F₁ fue el descrito por Gromet-Eltanan (26). Se prepararon cromatóforos a partir de bacterias, para lo cual se resuspendieron las bacterias en un buffer de Tris-HCl 10 mM pH 7.5, en una proporción de 1:3 (bacterias: buffer), se les añadió 1 mg de DNasa por cada 10 gr de peso húmedo de bacterias y MgSO₄ 1 mM.

Para romper las células se sonicaron en lotes de 25 ml durante 2 min, en un sonicador Branson, enfriando con agua a 4°C.

Se centrifugó a 15,000 rpm 20 min para remover células sin romper, cápsulas, etc, que quedan en el precipitado. Se tomó el sobrenadante y se centrifugó a 40,000 rpm 1 hr. En el precipitado se encuentran los cromatóforos los cuales son lavados en buffer Tris 10 mM. pH 7.5.

Bacterias diluidas en agua (50 gr)

24

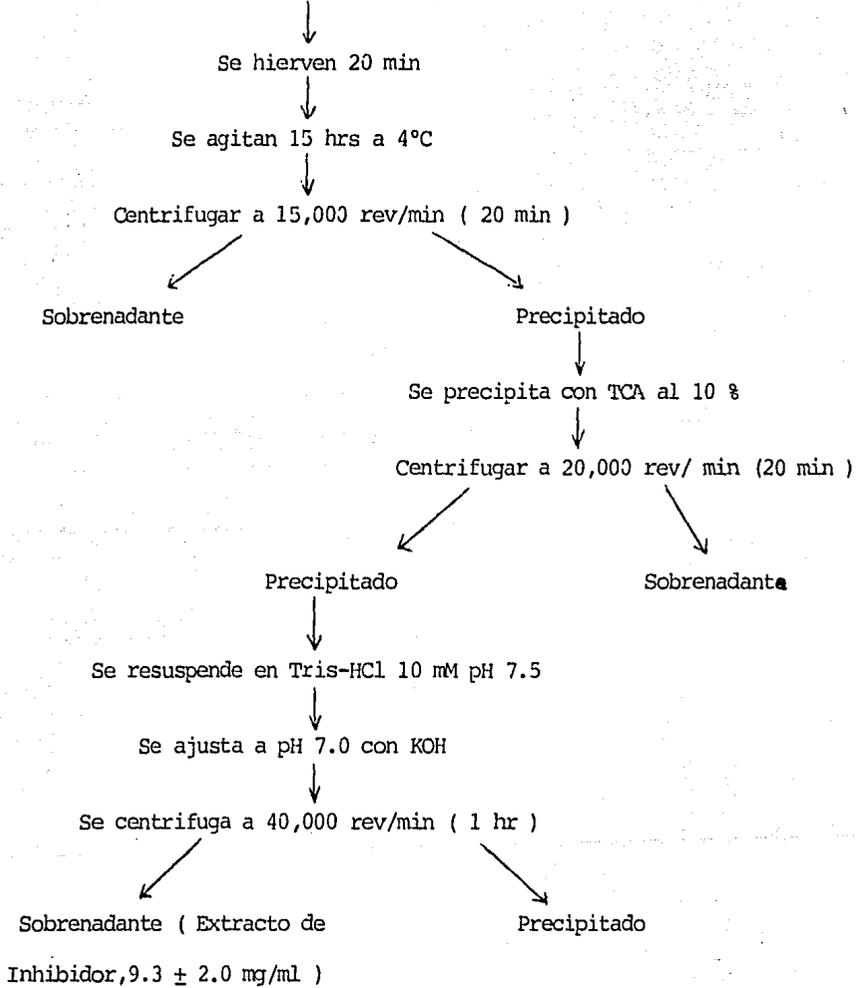


Figura 3. Método para obtener el extracto de inhibidor

Los cromatóforos fueron resuspendidos a una concentración de 5 mg prot/ml en una solución que contenía 0.2% Tritón X-100 (v/v) y Hepes 1 mM pH 8.0. Se dejó reposar por 30 min a la temperatura ambiente. La suspensión fue centrifugada a 140,000 x g 90 min a 4°C. El resto de las operaciones se realizaron a 4°C.

El sobrenadante, que contiene aproximadamente 1 mg prot/ml, fue concentrado a 8 mg prot/ml mediante una membrana de diálisis y Acucida. El concentrado se paso a un gradiente lineal de glicerol (5/15 %, v/v) con 0.1 % Tritón X-100 y Hepes 5 mM pH 8.0. El gradiente fue centrifugado por 15 hrs a 26,000 rpm en un rotor Beckman SW-27. El complejo FoF₁ se encuentra en las fracciones 3, 4 y 5 el cual es dependiente de Ca⁺⁺ (Fig 4). La tabla de purificación se presente a continuación.

	mg prot/ml	μmoles Pi/mg prot/hr
Cromatóforos	24.0	2.84
Extracto Tritón X-100	6.9	1.90
Gradiente de glicerol	0.61	4.24

Tabla 2. Promedio de las purificaciones obtenidas de la FoF₁ de *Rhodospirillum rubrum*.

2.4 Obtención de la proteína inhibidora y del factor F₁ de mitocondria de corazón de res.

La proteína inhibidora fue donada por Dreyfus y col del Instituto de Fisiología Celular; para su separación se siguió el método de Kenner y colaboradores (70).

La purificación del factor F₁ de mitocondria de corazón de res se llevó a cabo según el método de Tuena y Gómez-Puyou (71). El factor F₁ de mitocondria de corazón de res fue donado por Gómez-Puyou y col del Instituto de Fisiología Celular.

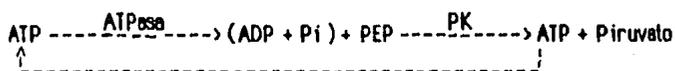
2.5 Técnicas utilizadas.

2.5.1 Determinación de proteína.

La cantidad de proteína se estimó utilizando el método de Lowry (72), utilizando como estándar albúmina de suero de bovino (BSA).

2.5.2 Determinación de la actividad hidrolítica de la H⁺ATPasa.

La actividad de la ATPasa fue determinada por la liberación de Pi, del ATP hidrolizado, mediante un sistema regenerador:



La reacción se lleva a cabo en un medio que contiene ATP 3mM, MgCl₂ o CaCl₂ 3mM, PEP (Fosfoenol piruvato) 1.45 mM, PK (Piruvato Kinasa) 7mg, Tris-Acetato 50 mM, KCl 60 mM, pH 8.0. La reacción se inició al agregar la enzima y se paró con una concentración final del 6 % de TCA, después de incubar a 30^o C durante 20 min.

Las muestras fueron centrifugadas a 3,000 rpm 10 min.

2.5.3 Determinación del Pi liberado.

Para determinar el Pi liberado por la hidrólisis del ATP se utilizaron dos métodos, uno para la F₁ de *Rhodospirillum rubrum* y otro para la F₁ de mitocondria de corazón de res. Lo anterior es debido a que la actividad hidrolítica de la F₁ de la bacteria es relativamente baja para lo cual se utilizó un método muy sensible (73), el cual puede determinar hasta 10 nmola de Pi.

Para determinar el Pi liberado en el caso de la F₁ de mitocondria de corazón de res se utilizó otro método (74) no tan sensible. El Pi fue determinado por una curva estándar utilizando diferentes cantidades de H₃PO₄. La actividad específica se expresó en μmolas Pi/ mg prot/ min o por hr en el caso de *Rs. rubrum*.

2.5.4 Determinación de la actividad inhibitoria del extracto de inhibidor de *Rhodospirillum rubrum*.

Para determinar la inhibición de la actividad hidrolítica de la FoF₁ de la bacteria o de la F₁ mitocondrial se preincubó el extracto de inhibidor con la enzima durante 10 min a 30 °C en 100 µl de un medio de preincubación que contenía: Tris-mes 150 mM pH 6.8, ATP 0.3 mM pH 7.4 y CaCl₂ o MgCl₂ 0.4 mM. La reacción de hidrólisis se inició al agregar el medio de incubación descrito en la sección 2.5.2, la reacción se paró con TCA al 6 % después de 20 min. Los controles contenían ambos medios, agregados en las mismas circunstancias pero el extracto de inhibidor fue sustituido por un volumen igual de agua.

2.5.5 Tratamiento con tripsina al extracto de inhibidor.

Se preparó tripsina en HCl 1mM a una concentración final de 5 mg/ml, el inhibidor de tripsina se preparó en agua a una concentración final de 25 mg/ml (75). Al extracto de inhibidor (5mg/ml) se le incubó con 2 mg de tripsina a temperatura ambiente por 1, 2 ó 4 hrs. La reacción se paró agregando 10 mg de inhibidor de tripsina

2.5.6 Electroforesis en placa gel de acrilamida-SDS

Se utilizó la técnica descrita por Von Jagow (76) debido a que tiene una alta resolución, sólo se necesitan del orden de µg de proteína, el SDS (Dodecil sulfato de sodio) evita la agregación de la proteína inhibitoria, además de ser un método simple. La ATPasa de *Rhodospirillum rubrum*, la F₁ de mitocondria de corazón de res y sus inhibidores homólogos fueron sometidos a una electroforesis en geles de acrilamida en condiciones desnaturalizantes para ver el grado de pureza y de homología.

El gel resoledor al 16 %, para 20 ml, contenía:

- 0.1 ml de persulfato de amonio al 10 %
- 16 ml de acrilamida-bisacrilamida (30%-0.9%)
- 10 ml de buffer Tris 3M, HCl 1M, SDS 0.3%
- 4ml de glicerol 79.5% (v/v)

El gel concentrador al 4 % , para 12 ml, contenía:

-7.4 ml de H₂O bidestilada

-0.1 ml de persulfato de amonio al 10 %

-1.6 ml de acrilamida-bisacrilamida (30%-0.9%)

-3 ml de buffer Tris 3M, HCl 1M, SDS 0.3%

La polimerización se llevó a cabo con 0.010 ml de TEMED (N,N,N',N'-Tetrametil etilendiamina).

El buffer inferior con Tris 0.2M pH 8.9 (HCl) y el superior con Tris 0.1M, Tricina 0.1M, SDS 0.1%.

La tinción se llevó a cabo sumergiendo el gel en la siguiente solución: isopropanol al 25 %, ácido acético al 10 % y azul de comassieu al 1 %. Se destiñó en la siguiente solución: etanol 25 % y ácido acético al 10 %. Se dejó inchar el gel en agua durante 2 hrs, se montó y secó sobre papel filtro.

3 Resultados.

3.1 Efecto del extracto de inhibidor de *Rhodospirillum rubrum* sobre la FoF₁ de la bacteria.

Una vez obtenido el extracto de inhibidor, se realizaron experimentos para determinar la actividad inhibitoria del extracto de inhibidor sobre la FoF₁ homóloga, obtenida por el método de Gromet-Elhanan (26).

Al ser preincubado el extracto de inhibidor con la FoF₁ e iniciada la reacción de hidrólisis, se obtuvieron los resultados expresados en la figura 5.

Estos experimentos claramente el efecto inhibitorio del extracto de inhibidor sobre la actividad hidrolítica de la FoF₁ de la bacteria. Asimismo, muestran, al igual que en mitocondria de corazón de res (32), cloroplasto (33), levadura(44) y *Escherichia coli* (35,42), una disminución de la actividad hidrolítica de la enzima al aumentar la concentración de la proteína inhibidora.

A diferencia de otros experimentos en los que se requiere de 1 µg de proteína inhibidora para inhibir 100% la actividad hidrolítica de la enzima (32), en el nuestro se requirieron hasta dos órdenes de magnitud más de extracto de inhibidor para obtener una inhibición significativa. Al respecto, cabe señalar que se utilizó un extracto y no la proteína inhibidora purificada.

3.2 Efecto del extracto de inhibidor de *Rhodospirillum rubrum* sobre la F₁ de mitocondria de corazón de res.

Se decidió cuantificar el efecto inhibitorio del extracto de inhibidor sobre la F₁ de mitocondria de corazón de res para determinar la existencia de un posible cruce funcional entre estas dos moléculas. Los resultados se presentan en la figura 6.

Al igual que en el experimento anterior, el extracto de inhibidor inhibe ampliamente la actividad hidrolítica de la enzima. En este experimento también se requirieron altas concentraciones del extracto de inhibidor, pero la inhibición fue mucho más significativa debido a que la F₁ mitocondrial tiene una mayor actividad específica que la FoF₁ de *Rhodospirillum rubrum*. Por

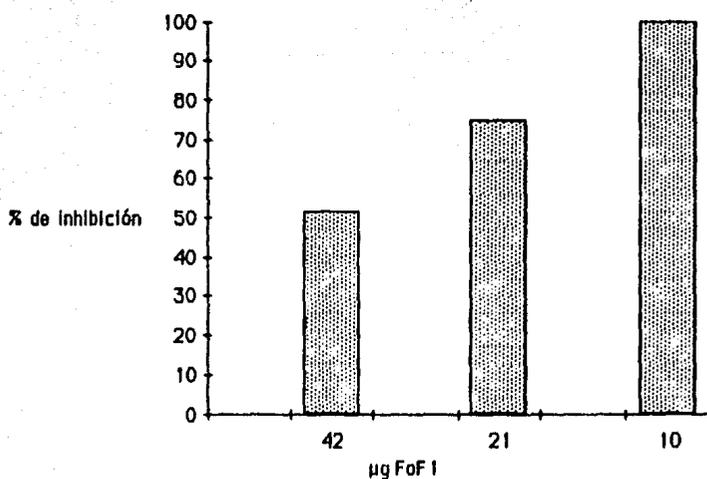


Fig 5 Efecto del extracto de inhibidor sobre la FoF1 de *Rhodospirillum rubrum*

El extracto de inhibidor (710 µg) se preincubó con cantidades variables de FoF1 de la bacteria con una actividad específica de 3.6 µmoles Pi/mg prot/hr. Las condiciones experimentales son presentadas en métodos.

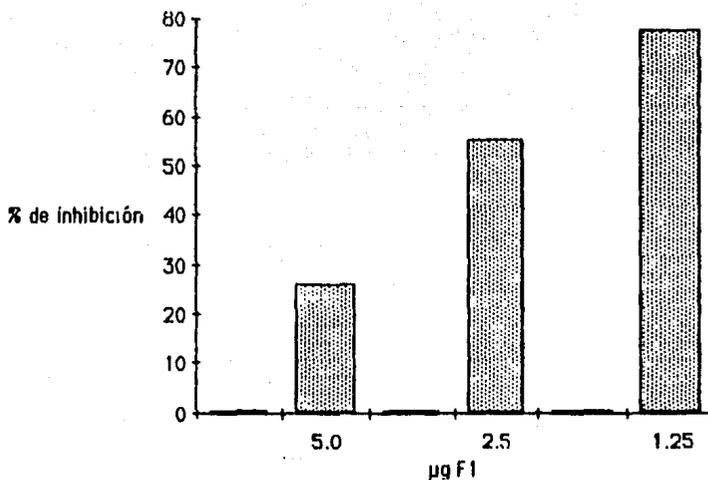


Fig 6. Efecto del extracto de inhibidor de la H^+ ATPasa de *Rhodospirillum rubrum* sobre la F1 de mitocondria de corazón de res.

Se preincubaron 600 µg de extracto de inhibidor con diferentes cantidades de F1 de mitocondria de corazón de res con una actividad específica de 8.7 µmolas Pi/mg prot/min. Las condiciones experimentales han sido referidas en métodos

otro lado, es importante mencionar el hecho de que aún no se ha reportado una proteína inhibidora de procarionte que cruce funcionalmente con una $H^+ATPasa$ de eucarionte (36). Estos experimentos nos indican la posibilidad de dicho cruce funcional.

3.3 Efecto en la inhibición al tratar el extracto de inhibidor con tripsina.

Para corroborar que la inhibición del extracto de inhibidor se debe a una proteína, se sometió éste a la acción de la tripsina. Una vez tripsinizado el extracto de inhibidor durante 1 hr y detenida la reacción de tripsinización con inhibidor de tripsina, se preincubó e incubó con F_1 de mitocondria de corazón de res. Los resultados se presentan en la figura 7.

En estos experimentos se demuestra que, como los casos de proteínas inhibidoras de mitocondria (32) y cloroplasto (33), el extracto de inhibidor también es sensible a la acción de la tripsina. Tanto la cantidad que se usó de tripsina como el tiempo de tripsinización fueron suficientes para desaparecer totalmente la actividad inhibitoria, independientemente de la cantidad agregada de extracto de inhibidor tripsinizado.

Por otro lado, se demuestra que las mismas concentraciones de extracto de inhibidor sin tripsinizar provocan inhibición de la actividad hidrolítica de la enzima.

Con base en los resultados anteriores, se realizaron otros experimentos, similares al anterior, pero con FoF_1 de *Rhodospirillum rubrum* y con la F_1 de mitocondria de corazón de res. Los resultados se presentan en la figura 8.

Estos últimos experimentos indican que la tripsina no previene la actividad inhibitoria del extracto de inhibidor sobre la FoF_1 de la bacteria. Sin embargo, la tripsinización si elimina el efecto inhibitorio del extracto de inhibidor en la F_1 mitocondrial. Ya se ha reportado que en el caso de la mitocondria de corazón de res, la región de la proteína inhibidora que interactúa con la $H^+ATPasa$ se conserva aún después de someter dicha proteína a la acción de varias enzimas proteolíticas, entre ellas la tripsina (77).

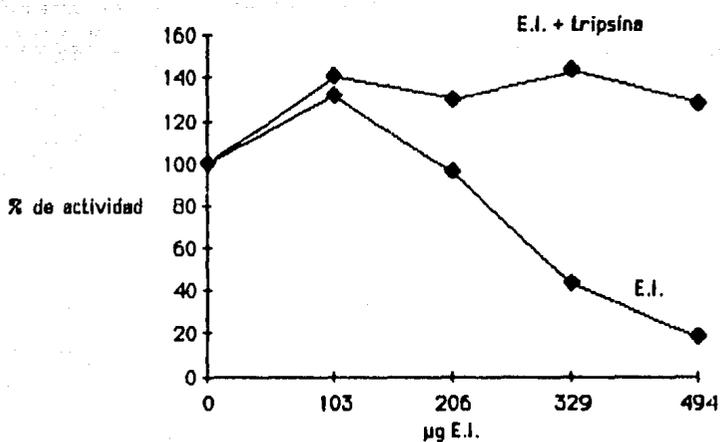


Fig. 7 Efecto del extracto de inhibidor tripsinizado sobre la F1 de mitocondria de corazón de res.

Las condiciones de tripsinización, preincubación e incubación fueron descritas en métodos. Se utilizaron 2 µg de F1 con una actividad específica de 8.7 µmoles Pi/mg prot./min.

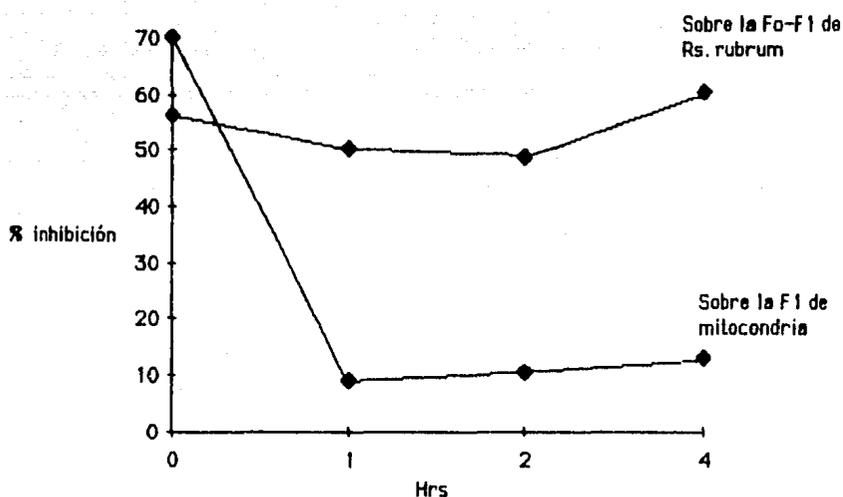


Fig. 8 Efecto del inhibidor tripsinizado a diferentes tiempos sobre la actividad de la F1 de mitocondria y la FoF1 de *Rhodospirillum rubrum*

Se sometió 1.19 mg de extracto de inhibidor a la acción de la Tripsina a diferentes tiempos como lo indica la gráfica. Una vez parada la reacción con Inhibidor de Tripsina se preincubó, por un lado con F1 de mitocondria de corazón de res (3.1 μg) con una actividad de 123 μmol Pi/mg prot/hr y por otro con la FoF1 de la bacteria (82 μg) con una actividad de 2.7 μmol Pi/mg prot/hr. Las condiciones experimentales fueron descritas en métodos.

Una explicación del por qué el extracto de inhibidor tripsinizado mantiene su actividad inhibitoria sobre la FoF₁ de *Rhodospirillum rubrum*, es que, a pesar de la proteólisis, se mantiene activa alguna región de la proteína inhibitoria; región que, por otra parte, es incapaz de inhibir la actividad hidrolítica de la F₁ mitocondrial.

3.4 Efecto del pH en el medio de preincubación sobre la actividad inhibitoria.

Uno de los factores que intervienen en la interacción del inhibidor con la H⁺ATPasa, es el pH del medio de preincubación. Se ha mostrado que en algunos sistemas mitocondriales el pH óptimo de interacción de la proteína inhibitoria con la H⁺ATPasa es ligeramente ácido (32,37,44). El pH óptimo de interacción es de 8.0 en *Escherichia coli* (42) y en cloroplastos (33). También ha sido demostrado que el pH juega un papel importante para lograr una inhibición significativa de la actividad hidrolítica de la H⁺ATPasa. Por todo lo anterior, en este trabajo se consideró interesante determinar el pH óptimo de interacción del extracto de inhibidor y la F₁ mitocondrial (figura 9).

Los resultados indican que la mayor inhibición corresponde a un medio de preincubación con pH 8.0; este valor coincide con el pH que permite el máximo de actividad de la F₁ de mitocondria.

Nótese que el pH óptimo determinado fue sobre la F₁ de mitocondria y no sobre la FoF₁ de *Rhodospirillum rubrum*.

3.5 Efecto de la variación del catión y del ATP en el medio de preincubación durante el proceso inhibitorio.

Otro de los requisitos para lograr la interacción del inhibidor con la H⁺ATPasa es la preincubación con nucleótidos; cationes (32,44). Algunas proteínas inhibitorias no necesitan de nucleótidos ni de cationes, pero sí de una preincubación con la enzima, como para el caso de *Escherichia coli* (42).

Otros sistemas, como *Saccharomyces cerevisiae* (78) y cloroplastos (33), no requieren de preincubación.

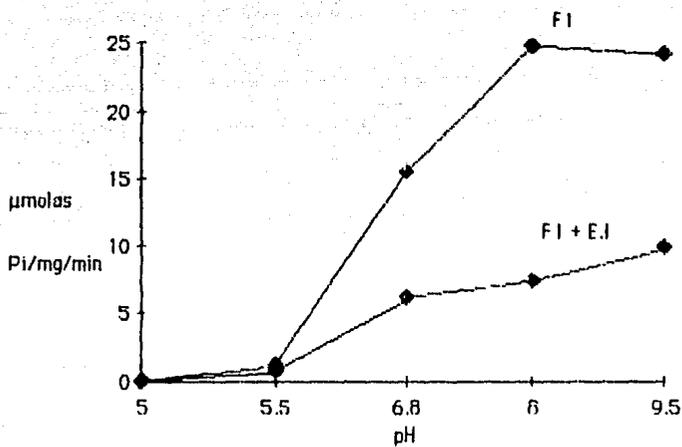


Fig 9 Efecto del cambio de pH en el medio de preincubación sobre la actividad inhibitoria del extracto de inhibidor.

Para el medio de preincubación se utilizó Tris-maleico 300 mM al pH indicado en la gráfica. Se utilizaron 2.5 μg de F I de mitocondria de corazón con una actividad específica de 24 $\mu\text{moles Pi/mg prot/min}$ y 800 μg de extracto de inhibidor. Las condiciones experimentales se describieron en métodos.

Para determinar si es o no necesario preincubar con nucleótidos y cationes el extracto de inhibidor con la enzima se realizaron dos experimentos: en el primero (figura 10), se probó el efecto de la ausencia de ATP o Mg^{++} sobre la actividad inhibitoria del extracto de inhibidor en la F_1 de mitocondria de corazón de res; este experimento mostró la necesidad del nucleótido y del catión para lograr un efecto inhibitorio significativo, ya que si se suprime del medio de preincubación al catión, al ATP o a ambos, la inhibición disminuye considerablemente.

El experimento anterior se repitió con la F_1 de *Rhodospirillum rubrum*, pero con Ca^{++} debido a que la F_1 de la bacteria es dependiente de éste. Los resultados, que se presentan en la figura 11, muestran que en este caso no existe la necesidad ni de ATP ni de Ca^{++} para lograr la inhibición de la actividad hidrolítica de la F_1 de *Rhodospirillum rubrum*.

Aún quedaría por determinar si el propio hecho de preincubar es necesario para lograr la interacción con la F_1 homóloga.

3.6 Electroforésis en placa gel de acrilamida-SDS.

Para determinar el grado de pureza del extracto de inhibidor se le corrió en un gel de acrilamida-SDS. Como punto de comparación también se corrió en el mismo gel a la proteína inhibidora de la H^+ ATPasa de mitocondria de corazón de res, a la F_1 de *Rhodospirillum rubrum* y a la F_1 mitocondrial (figura 12).

El gel mostró que el extracto de inhibidor se encuentra muy contaminado por varias proteínas; sin embargo, se encontró una banda, la de mayor concentración, que tiene un R_f muy similar al del inhibidor de la H^+ ATPasa de mitocondria de corazón de res, lo que nos hace pensar que dicha banda es la proteína inhibidora de la H^+ ATPasa de *Rhodospirillum rubrum*. La sugerencia anterior se ve reforzada por el hecho de que las proteínas inhibitoras tienen pesos moleculares que van desde 6,000 en *Candida utilis* (44) a 13,000 en cloroplasto (33). Por otro lado, la posibilidad de que la proteína inhibidora se encuentre agregada, enmascarando el verdadero peso molecular, queda descartada ya que el SDS evita dicha agregación.

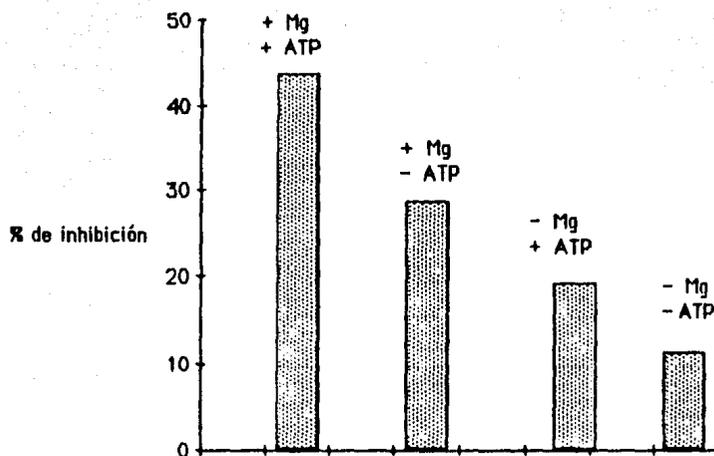


Fig 10 Efecto en la variación del Mg y ATP en la preincubación sobre la actividad inhibitoria del extracto crudo en la F1 de mitocendria de corazón de res.

El medio de preincubación en este experimento varía en cuanto a la presencia o ausencia del catión y del nucleótido como se muestra en la gráfica. Todas las demás condiciones fueron como las indicadas en métodos. Se usaron 1.6 μg de F1 con una actividad específica de 10 μmol Pi/mg prot/min y 450 μg de inhibidor.

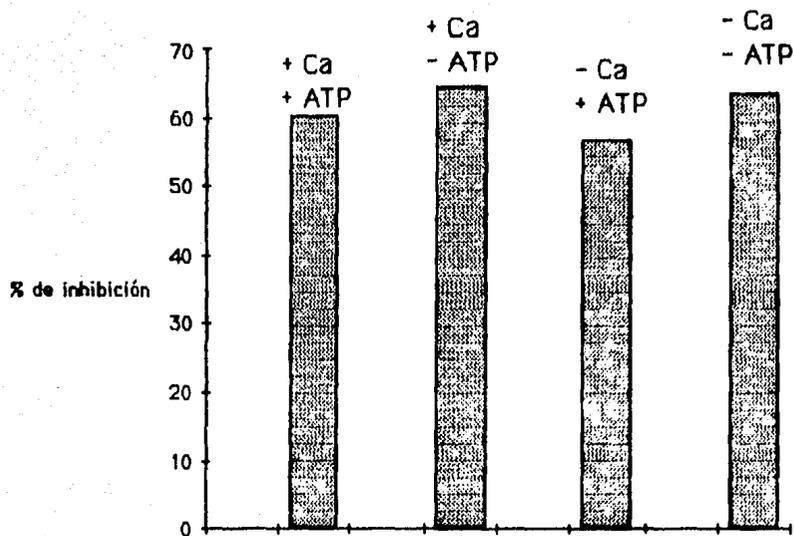


Fig 11 Efecto de la variación del Ca y ATP en la preincubación sobre la actividad inhibitoria del extracto crudo en la Fof I de *Rhodospirillum rubrum*

Las condiciones experimentales fueron las mismas del experimento anterior con la diferencia de que el catión utilizado fue el Ca debido a que la Fof I de la bacteria es dependiente de éste. Se utilizaron 35 µg de Fof I con una actividad específica de 5 µmoles Pi/mg prot/hr y 500 µg de extracto de inhibidor.

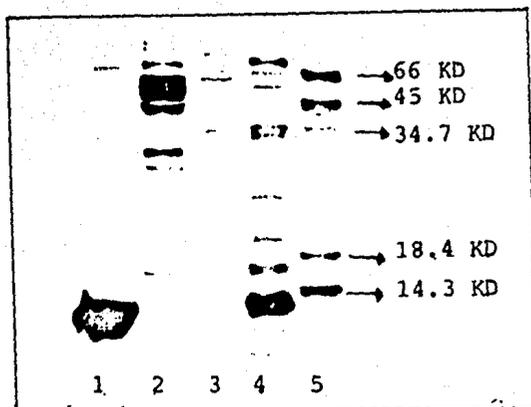


Fig 12 Electroforésis en placa gel de acrilamida

En el carril 1 se corrió proteína inhibidora de ATPasa de mitocondria de corazón de res ($10 \mu\text{g}$), en el 2 F_1 de mitocondria de corazón de res ($10 \mu\text{g}$), en el 3 F_0F_1 de Rhodospirillum rubrum ($10 \mu\text{g}$) y en el 4 extracto de inhibidor ($10 \mu\text{g}$). En el carril 5 se corrieron marcadores de pesos moleculares: albúmina de bovino, ovoalbúmina, pepsina, β -lactoglobulina y lisozima. Las condiciones experimentales son las descritas en métodos.

3.7 Efecto del inhibidor natural de la H⁺ATPasa de mitocondria de corazón de res sobre la actividad hidrolítica de la FoF₁ de *Rhodospirillum rubrum*.

Una vez conocida la interacción de nuestro extracto de inhibidor con la F₁ de mitocondria de corazón de res, se realizaron experimentos para determinar si su proteína inhibidora tiene algún efecto sobre la FoF₁ de *Rhodospirillum rubrum* :

µg. de FoF ₁	µg. de Inhibidor de mitocondria	% de Inhibición
34.7	1.4	100.0

Tabla 3. Efecto de la proteína inhibidora de mitocondria sobre la FoF₁ de *Rhodospirillum rubrum* cuya actividad específica fue de 4.1 µmoles Pi/mg prot/hr. Las condiciones experimentales son descritas en métodos.

Como puede apreciarse, el efecto inhibitorio de la proteína inhibidora es total, además de que la concentración usada de ésta es muy pequeña en comparación con las cantidades requeridas de extracto de inhibidor. Lo anterior se debe al alto grado de pureza de la proteína inhibidora mitocondrial, mientras que el extracto de inhibidor se encuentra contaminado por muchas otras proteínas (figura 12).

3.8 Eliminación del TCA como posible artefacto en la actividad inhibitoria.

En algunos métodos de purificación de proteínas inhibitorias (44,35) se usa al TCA para precipitar; a pesar de que el pH del precipitado es neutralizado, podría pensarse que el efecto inhibitorio sea provocado por el TCA. Para descartar dicha posibilidad se realizaron experimentos en los que se diálizó el extracto de inhibidor, se le pasó por una columna de Sephadex G-50 y se determinó el efecto del TCA neutralizado sobre la actividad hidrolítica de la F₁ de mitocondria de corazón de res:

3.8.1 Diálisis del extracto de inhibidor

Para eliminar el posible TCA del extracto de inhibidor se dializó en una membrana de 6,000-8,000 PM contra Tris-HCl 10 mM y contra KCl 1 M. Llevada a cabo la diálisis se probó su efecto inhibitorio sobre la F_1 de mitocondria de corazón de res; los resultados se expresan en la figura 13.

Los experimentos indican que el extracto de inhibidor dializado contra Tris-HCl 10 mM pierde su actividad inhibitoria, pero que no la pierde al ser dializado contra KCl 1 M. Se sabe que la proteína inhibitoria de la H^+ ATPase de mitocondria de corazón de res forma agregados al encontrarse en medios con bajas concentraciones de sales, perdiendo su capacidad inhibitoria; dicha agregación se elimina al aumentar la concentración de las sales (79). Este fenómeno explica claramente por qué el extracto de inhibidor pierde su actividad inhibitoria al ser dializado contra Tris-HCl 10 mM, ya que este amortiguador contiene una concentración baja de sales. También se concluye de estos experimentos que el TCA no interviene en el proceso inhibitorio.

El extracto de inhibidor dializado contra KCl 1 M se preincubó con cantidades descendientes de F_0F_1 de *Rhodospirillum rubrum* para determinar su actividad sobre la H^+ ATPase homóloga. Como se aprecia en los resultados (figura 14), la actividad inhibitoria del extracto de inhibidor dializado no se ve afecto.

3.8.2 Paso del extracto de inhibidor por una columna de Sephadex 6-50

Otra manera con la que se eliminó el posible TCA contenido en el extracto de inhibidor fue pasar el extracto por una columna de Sephadex 6-50 fino. Las fracciones se recolectaron a partir de 3 ml antes de salir la muestra. Se obtuvieron 2 fracciones, la primera de ellas con 3.5 mg prot/ml y la segunda con 1.7 mg prot/ml. Estas fracciones se usaron para determinar su efecto inhibitorio sobre la actividad hidrolítica de la F_1 de mitocondria de corazón de res; los resultados se muestran en la figura 15.

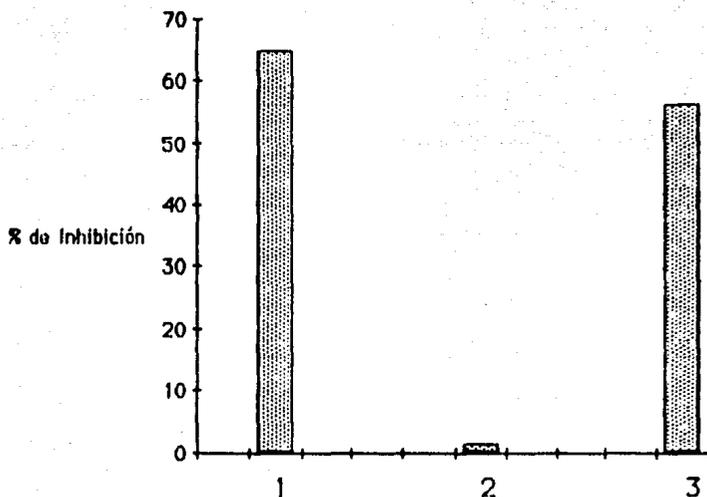


Fig 13 Efecto inhibitorio, de diferentes extractos, sobre la F1 de mitocondria de corazón de res.

Las condiciones experimentales son las presentadas en métodos. En la columna 1 se usó extracto de inhibidor sin dializar, en la 2 se dializó en Tris 10 mM pH. 7.5 y en la columna 3 se dializó en KCl 1M. La diálisis se llevó a cabo durante 12 hrs en un litro. Se utilizaron 300 μ g de extracto de inhibidor y 2 μ g de F1 de mitocondria de corazón de res con una actividad específica de 8.3 μ molas Pi/mg prot/min.

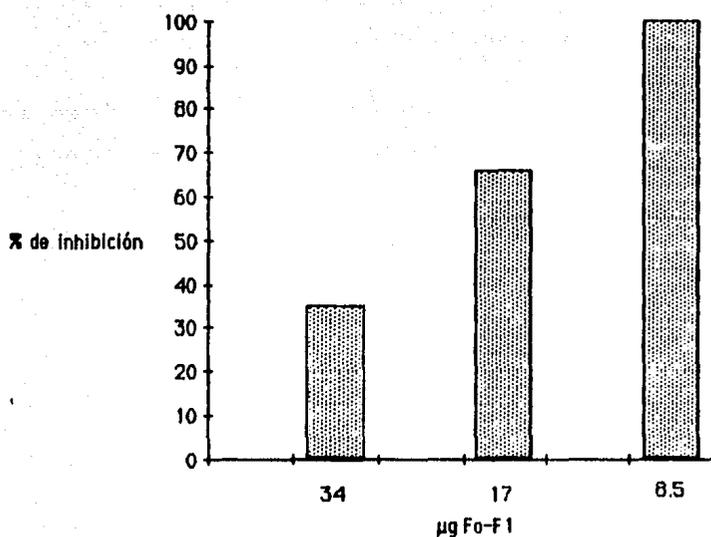


Fig 14 Efecto del extracto de inhibidor, dializado contra KCl 1 M, sobre cantidades descendentes de FoF1 de *Rhodospirillum rubrum*

Las condiciones experimentales son las descritas en métodos. Se utilizaron cantidades variables de FoF1 con una actividad específica de 4.1 $\mu\text{mol Pi/mg prot/hr}$ y 710 μg de extracto de inhibidor.

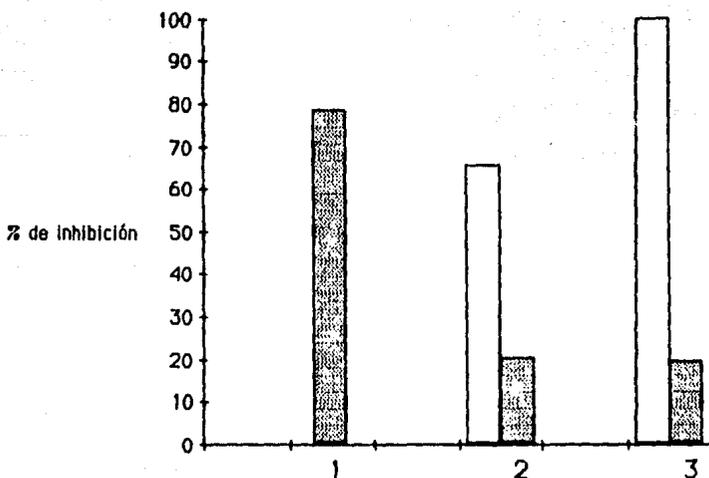


Fig 15 Efecto de las fracciones obtenidas, de extracto de inhibidor, de la columna de Sephadex G-50 sobre la actividad hidrolítica de la F1 de mitocondria de corazón de res.

La columna de Sephadex G-50 (1.5 x 20 cm) fue equilibrada con Tris HCl 10 mM pH 7.0. La columna 1 muestra la inhibición provocada por el extracto crudo (900 μ g), la columna 2 corresponde a la primera fracción obtenida (280 μ g) y la columna 3 a la segunda fracción (140 μ g). Las barras claras son extrapolaciones al porcentaje de inhibición respecto a la cantidad de proteína de la primera columna. Se usaron 2 μ g de F1 con una actividad específica de 1 μ molas Pi/mg prot/min. Las condiciones experimentales de la preincubación e incubación son referidas en métodos.

Al pasar el extracto de inhibidor por la columna de Sephadex G-50 se pierde parte del efecto inhibitorio; sin embargo, las fracciones obtenidas de la columna tienen muy poca proteína respecto al extracto original. Si se eliminara el efecto de dilución de proteína, entonces la actividad inhibitoria inicial se recuperaría, sobre todo en la segunda fracción (la cual, probablemente, contiene más proteína inhibitoria).

Otra explicación de la pérdida de la actividad inhibitoria es la propuesta por Klein y col (79), quienes encontraron que la proteína inhibitoria de la H^+ ATPasa de mitocondria de corazón de res forma agregados al pasarla por una columna de Sephadex G-100, perdiendo así su actividad inhibitoria.

3.8.3 Efecto del TCA neutralizado sobre la actividad hidrolítica de la F_1 de mitocondria de corazón de res.

Para llevar a cabo este ensayo, se utilizaron concentraciones mayores de TCA a la calculada en el extracto de inhibidor, asumiéndose que el botón obtenido después de la precipitación fuera totalmente TCA (ver la sección 2.2). Esas concentraciones de TCA neutralizado fueron añadidas al medio de preincubación, seguido de la incubación para iniciar la reacción de hidrólisis de la F_1 de mitocondria de corazón de res (figura 16).

Como se aprecia en los resultados, el TCA neutralizado no inhibe la actividad hidrolítica de la F_1 de mitocondria; incluso se observa una activación que no podemos explicar. Sin embargo, lo importante para el propósito de esta investigación fue demostrar que el TCA no tiene efecto inhibitorio.

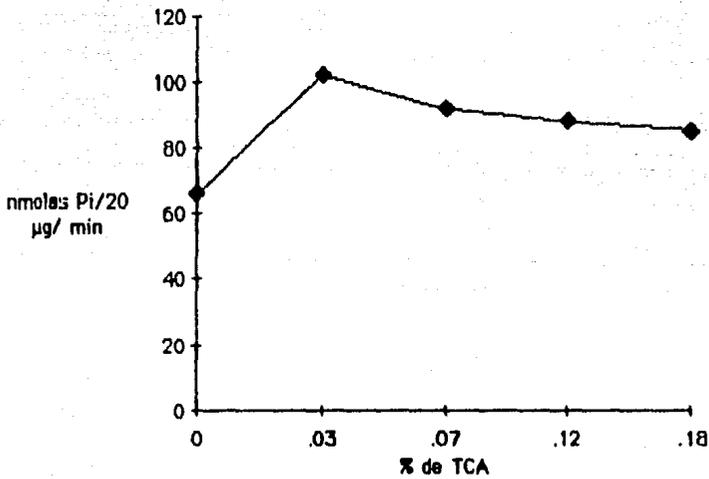


Fig 16 Efecto del TCA sobre la actividad hidrolítica de la F1 de mitocondria de corazón de res.

La F1 fue preincubada en un medio que contenía Tris-mes 150 mM pH 6.8, ATP 2 mM pH 7.4, MgCl 0.4 mM y concentraciones variables de TCA indicadas en la gráfica. El resto de las condiciones son las referidas en métodos. Se usaron 2 µg de F1 con una actividad específica de 3.3 µmolas Pi/mg prot/min.

4 Discusión

Con base en los resultados anteriores, es válido proponer que en el extracto crudo de inhibidor se encuentra la proteína inhibidora de la H⁺ATPasa de *Rhodospirillum rubrum*; sin embargo, los resultados no serán totalmente definitivos hasta obtener la proteína inhibidora pura para lograr una caracterización más fina de ésta.

La continuación del presente trabajo deberá avocarse a la purificación de dicha proteína a partir del extracto crudo de inhibidor mediante técnicas bioquímicas convencionales, o mediante una columna de afinidad, dado que, al parecer, los anticuerpos contra la proteína inhibidora de la H⁺ATPasa de mitocondria de corazón de res reconocen al extracto de inhibidor de *Rhodospirillum rubrum* (datos no presentados en este trabajo).

Otra posibilidad más en cuanto a la purificación de la proteína inhibidora es la de seguir el método de Klein y col (79), quienes, con base en la propiedad de la proteína inhibidora de la H⁺ATPasa de mitocondria de formar agregados, la han purificado a partir de partículas submitocondriales mediante una columna de Sephadex G-100 y precipitación con TCA.

Si bien uno de los problemas principales del trabajo fue que la FoF₁ de *Rhodospirillum rubrum* tiene una actividad específica muy baja, esto mismo fue lo que motivó el interés de la presente investigación: mostrar la existencia de la proteína inhibidora de la FoF₁ de *Rhodospirillum rubrum*.

En este trabajo se determinó que el pH óptimo de interacción entre el extracto de inhibidor y la F₁ mitocondrial es de 8.0. Si este pH óptimo es el mismo para la interacción con la FoF₁ homóloga podría pensarse en una purificación de la FoF₁ de *Rhodospirillum rubrum* a pH ácido para facilitar la liberación del inhibidor, dado que éste interacciona mejor a pH básico, y así resolver el problema de obtener una enzima más activa.

En general, el extracto de inhibidor presenta características comunes a otras proteínas inhibidoras; sin embargo, presenta otras no muy comunes como el hecho de que su actividad

inhibitoria no es afectada por la tripsina cuando actúa sobre la F₁ homóloga, mientras que sí la afecta al actuar sobre la F₁ mitocondrial. Otra característica, considerada por primera vez, es el hecho, muy probable, de que una proteína inhibidora de procarionte inhiba la actividad hidrolítica de una F₁ de eucarionte.

Finalmente, cabe decir que este trabajo es sólo parte de una gama de posibilidades de conocer más a fondo los mecanismos de regulación de la H⁺ATPasa de *Rhodospirillum rubrum*.

5 Conclusiones

- 1 Mediante un método de purificación basado en un tratamiento con calor y precipitación con TCA se obtuvo un extracto crudo de inhibidor.
- 2 El uso del TCA durante la obtención del extracto crudo de inhibidor no interfiere en el efecto inhibitorio.
- 3 El extracto de inhibidor disminuye considerablemente la actividad hidrolítica de su ATPasa homóloga.
- 4 El extracto de inhibidor de la H^+ ATPasa de *Rhodospirillum rubrum* inhibe la F_1 de mitocondria de corazón de res.
- 5 La proteína inhibidora de mitocondria de corazón de res inhibe la actividad hidrolítica de la ATPasa de *Rhodospirillum rubrum*.
- 6 La interacción proteína inhibidora- F_1 de mitocondria de corazón de res es dependiente de una preincubación con ATP y Mg^{++} , mientras que no es requisito para interaccionar con su ATPasa homóloga.
- 7 La tripsina disminuye el efecto del extracto de inhibidor sobre la F_1 de mitocondria de corazón de res, pero no lo disminuye cuando actúa sobre la ATPasa de *Rhodospirillum rubrum*.
- 8 El extracto de inhibidor contiene varias proteínas pero se observa, en el gel, una banda muy concentrada la cual podría corresponder a la proteína inhibidora puesto que tiene un R_f muy similar al de la proteína inhibidora de mitocondria de corazón de res.
- 9 Aparentemente este extracto de inhibidor tiene características un poco diferentes a las convencionales.

6 Referencias

- 1.-Baccarini-Melandri, A. y Gest, H.(1970), *J. Biol. Chem*, 245, 1224-1226.
- 2.-Van Niel, C.B.(1935), *Harbor Simo. Quant Biol*, 3, 138-150.
- 3.- Clayton y Sistrom , (1978), *The Photosynthetic Bacteria*, 1ed., Plenum Press
New York, 3-59 p.p.
- 4.- French, C.S. (1938), *Science*, 88, 60-62.
- 5.- Slater, E. C. (1977), *Ann. Rev. Biochem.* , 46, 955-1026.
- 6.- Boyer, P. D. (1977), *Ann. Rev. Biochem.* , 46, 955-1026.
- 7.- Boyer, P. D. (1965), *Oxidases and Related Redox Systems*, Ed. T. E. King, H.
S. Mason, M. Morrison, 2: 994-1008, New York: Wiley
- 8.- Lumry, R. (1963), *Photosynthesis Mechanisms of Green Plants*, 625-634
Pub. No 1145, Washington D. C., *Nat. Acad. Sci.*
- 9.- Mitchel, P. (1961), *Nature*, 191, 144-148.
- 10.- Mitchel, P. (1977), *Ann. Rev. Biochem.*, 46, 996-1004.
- 11.- Dawas, A. E. (1986), *Microbial Energetics*, 1 ed., Blackie Ed., New York,
60-63 p.p.
- 12.-Komai, H; Hunter, D. R; Southard, J. H; Haworth, R. A. y Green, D.R. (1976), *Biochem.*
Biophys. Res. Commun., 69, 695-704.
- 13.- Ort, D.R; Dille, R. A. y Good, N. E. (1976), *Biochem. Biophys. Acta* 449
108-124.
- 14.- Harold, F. M. (1972), *Bacteriological Rev.*, 36, 172-230.
- 15.- Amzel, L.M; y Pedersen, P. L. (1981), *Annu. Rev. Biochem.* , 52, 801-824.
- 16.- Celis, H. (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 92, 26-30.
- 17.-Futai, M. y Kanazawa, H. (1983), *Microbiol. Rev*, 47, 285-312.
- 18.-Fisher, R. R. y Guillery, R. S. (1969), *FEBS Lett*, 3, 27.

- 19.- Gromet-Elhanan, Z. (1974), *J. Biol. Chem.*, 249, 2522.
- 20.-Philosoph, S., Binderi, a y Gromet-Elhanan, Z. (1977), *J. Biol. Chem.*, 252, 8747-8752.
- 21.- Baccarini-Melandri, A. y Melandri, B. A. (1971), *Methods Enzimology*, 23, 556-561.
- 22.- Webster, G. D; Edwards, P. A. y Jackson, J. B. (1977), *FEBS Lett.*, 76, 29-35.
- 23.- Webster, G. D. y Jackson, J. B. (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, 503, 135-154.
- 24.- Reed, D. W. y Raveed, D. (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, 282,79.
- 25.- Schneider, E., Muller, H. W; Rittinghaus, K; Thiele, V; Schwulera, V y Dose, K.
(1979), *J.Biochem.*, 97,511-517.
- 26.-Oren, R. y Gromet-Elhanan, Z. (1979), *Bichim. Biophys. Acta*, 548, 106-118.
- 27.- Bose, S. K. y Gest, H. (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, 96, 159.
- 28.- Horio, T; Nishikawa, K. y Horioti, Y. (1971), *Methods Enzimology*, 23, 650-654.
- 29.- Oren, R. y Gromet- Elhanan. (1977), *Bionergetics of Membranes*. L. Parcker et. al.
ed. North. Holland Biomedical Press, 495-500 p.p.
- 30.- Hans, W. M; Manfred, S; Erwin, S; y Klaus, D. (1979), *Biochim. Biophys.*
Acta, 545, 77-85.
- 31.- Melandri, B. A. y Baccarini-Melandri, A. (1976). *J. Bioenerg.*, 8, 109-119
- 32.- Pullman, M. E; y Monroy, G.C. (1963), *J. Biol. Chem.*, 238, 3762-3769.
- 33.- Nelson, N; Nelson, H; y Racker, E. (1972), *J. Biol. Chem.*, 247, 7657-7662.
- 34.- Niewenhuis, F. J. R. M; Van De Drif, J. A. M; Voel, A. B. y Van Dam, K. (1974),
Biochim. Biophys. Acta, 368, 461-463.
- 35.- Dreyfus, G. y Setre, M. (1984), *Arch. Biochem. Biophys*, 229, 212-219.
- 36.- Schwerzmann, K. y Pedersen, P. L. (1986), *Biochem. Biophys. Arch.* , 250, 1-18.
- 37.- Pedersen, P. L., Schwerzmann, K. y Citrón, M. (1981), *Curr. Top. Bioenerg.*
11, 149-199.
- 38.- Asami, K; Juntti, K. y Ernster, L. (1970), *Bichim. Biophys. Acta*, 205, 307-311.
- 39.- Harris, D., A. (1984), in H^+ ATPsynthase: Structure, Funcion, Regulation,
Papa, S; Altendorf, K; Ernster, L; y Packer, I. eds., 387-395 p.p. Ed.

Adriatica, Bari.

- 40.- Frangione, B; Rosenwasser, E; Penefsky, H. S; y Pullman, M. E. (1981),
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 7403-7407.
- 41.- Matsubara, H; Hase, T; Hashimoto, T; y Tagawa, K. (1981), J. Biochem.,
90, 1159-1165.
- 42.- Smith, J. B; y Sternweis, P. C. (1977), Biochem., 16, 306-311.
- 43.- Schwerzmann, K; Hüllihen, J; y Pedersen, P. L. (1982), J. Biol. Chem.,
257, 9555-9560.
- 44.- Satre, M; De Jerphannion, M. B; Huet, J; y Vignais, P. V. (1975), Biochim.
Biophys. Acta, 387, 241-255.
- 45.- Hashimoto, T; Nagawa, Y; y Tagawa, K. (1981), J. Biochem., 90, 1151-
1157.
- 46.- Klein, G; Satre, M; Dianoux, A. C; y Vignais, P. V. (1980), J. Biochem, 19,
2919-2925.
- 47.- Wong, S; Galante, Y. M; y Hefefi, Y. (1982), Biochem., 21, 5781-5786.
- 48.- Hortman, L. L; y Recker, E. (1970), J. Biol. Chem., 245, 1336-1344.
- 49.- Hashimoto, T; Yoshida, Y; y Tagawa, K. (1983), J. Biochem., 94, 715-720.
- 50.- Citrón, N. M; Hüllihen, J; Schwerzmann, K. y Pedersen, P. L. (1982),
Biochem., 21, 1878-1885.
- 51.- Panchenko, M. V; y Vinogradov, A. D. (1985), FEBS lett., 184, 226-236.
- 52.- Bruni, A; Pilotti, A; Palatini, P; Dabbeni Sala, F; y Bigon, E. (1979),
Biochim. Biophys. Acta, 545, 404-414.
- 53.- Bruni, A; Frigeri, L; y Bigon, E. (1977), Biochim. Biophys. Acta, 462,
323-332.
- 54.- Gómez Fernandez, J. C; y Harris, D. A. (1978), J. Biochem., 276, 967-975.
- 55.- Galante, Y. M; Wong, S; y Hefefi, Y. (1981), J. Biochem., 20, 2671-2678.
- 56.- Van De Stadt, R. J; y Van Dam, K. (1974), Biochim. Biophys. Acta, 347,

240-252.

- 57.- Van De Stadt, R.J; De Boer, B. L.; y Van Dam, K. (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, 292, 338-349.
- 58.- Tuena de Gómez- Puyou, M; Muller, U; Dreyfus, G; Ayala, G; Y Gómez-Puyou, A. (1983), *J. Biol. Chem.* , 258, 13680-13684.
- 59.- Klein, G; Cunardy, J; y Vignais, P. V. (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, 636, 185-192.
- 60.- Harris, D. A. y Crofts, A. R. (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, 562, 87-102.
- 61.- Lowe, P. N. y Beechey, R. B. (1981), *Biochem. J.* , 200, 655-661.
- 62.- Harris, D. A; Von Tscharner, V; y Radda, G. K. (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, 548, 72-84.
- 63.- Harris, D. A; Radda, G. K; y Slater, E. C. (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, 459, 560-572.
- 64.- Chang, T. M; y Penefsky, H. S. (1973), *J. Biol. Chem.* , 248, 2746-2754.
- 65.- Hengartner, R; y Ort, O. R. (1985), *Eur. J. Biochem.* , 149, 503-510.
- 66.- Tuena de Gómez-Puyou, M; Nordenbrand, K; Muller, U; Gómez-Puyou, A; y Ernster, L. (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, 592, 385-395.
- 67.- Romero, I. (1982) Sobre la posible existencia del inhibidor natural de la H^+ ATPasa de la bacteria *Rhodospirillum rubrum*. Tesis biólogo, Facultad de Ciencias, UNAM México, D. F. 73 p.p.
- 68.- Cohen- Bazire, G; Siström, W. M; y Steiner, R. Y. (1957), *J. Cell. Comp. Physiol.* 49: 29.
- 69.- Hutner, S. H. (1950), *J. Gen. Microbiol.*, 4: 286-293.
- 70.- Kanner, I. B; Serrano, R; Kendrach, M. A; y Racker, E. (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , 69, 1050-1056.
- 71.- Tuena, M.; y Gómez-Puyou, A. (1977), *Arch. Biochem. Biophys.* , 182, 82-86.
- 72.- Lowry, O. H; Rosebrough, N. S; Farr, A. L; y Randal, R. J. (1951), *J. Biol.*

- Chem. , 193, 265-275.
- 73.- Chen, P. S. Toribara, T. Y y Warner, H. (1956), Anal. Chem, 28, 1756.
- 74.- Sumner, J. B. (1944). Science, 100, 413-415.
- 75.- Chase, T. y Shaw, E. (1980), Methods in Enzymatic Analysis. Vol. V.
- 76.- Von Jagow. (1987). Anal. Biochem, 166, 368-379.
- 77.- Audinet, Dianoux, y Vignais. (1986), Biochem. Biophys. Research.
Commun. , 137, 364-371.
- 78.- Ebner, E. y Mair, K. L. (1972), J. Biol. Chem, 252, 671-676.
- 79.- Klein, G; Satre, M; Zaccai, G. y Vignais, P. (1982), Biochim. Biophys.
Acta, 681, 226-232.