

03081
13
2 ej

81

MODULACION POR NUCLEOTIDOS Y POR EL INHIBIDOR NATURAL
DE LA ATPasa MITOCONDRIAL

Tesis que para obtener el título de
Doctor en Investigación Biomédica Básica
presenta

Nora Cecilia Vázquez Laslop

Enero, 1990

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE GENERAL

I. INTRODUCCION

1. GENERALIDADES	1
2. ESTRUCTURA DE LA H ⁺ -ATP SINTETASA	4
a) Subunidades de F ₀	8
b) Subunidades del cuello	12
c) Algunos modelos para la conducción de H ⁺ a través del canal F ₀	13
d) Subunidades de F ₁	14
3. RELACIONES ESTRUCTURA-FUNCION EN LA H ⁺ -ATP SINTETASA	19
a) La ATP sintasa tiene una estructura asimétrica	19
b) Los sitios donde la ATP sintasa une nucleótidos y otros ligandos	22
c) Mecanismos propuestos para explicar las reacciones catalizadas por la H ⁺ -ATP sintasa	26
4. REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE LA H ⁺ -ATP SINTETASA	31
a) Los nucleótidos como moduladores de la ATP sintasa	32
b) El inhibidor natural de la ATPasa como factor regulador	36
5. LA AUROVERTINA EN EL ESTUDIO DE LA ATP SINTETASA	41
II. OBJETIVO	46
III. MATERIALES Y METODOS	
PREPARACIONES BIOLÓGICAS	49
1. AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS DE CORAZON DE RES	49
2. OBTENCION DE LA F ₁ -ATPasa MITOCONDRIAL	50
a) Partículas Submitocondriales de EDTA	50
b) Purificación de la F ₁ -ATPasa	51
3. OBTENCION DEL COMPLEJO F ₁ -PROTEINA INHIBIDORA (F ₁ -I)	52
a) Preparación de Partículas Submitocondriales de Mg-ATP	53
b) Purificación del complejo F ₁ -I	53

4. OBTENCION DE AUROVERTINA	55
a) Cultivo del hongo <u>Calcarisporium arbuscula</u>	55
b) Obtención de extracto de <u>Calcarisporium arbuscula</u>	55
c) Aislamiento de aurovertina	56
PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	57
1. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINA	
a) Método del biuret	57
b) Método de Lowry modificado	57
2. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE ATPasa	
a) Método de Fiske y SubbaRow	58
b) Método espectrofotométrico	59
c) Cuantificación de $^{32}\text{P}_i$ liberado	60
d) Estimulación de la actividad de ATPasa del complejo $\text{F}_1\text{-I}$	62
3. INTERACCION DE LA AUROVERTINA CON LA F_1 Y CON EL COMPLEJO $\text{F}_1\text{-I}$	
a) Filtración-centrifugación de F_1 y de $\text{F}_1\text{-I}$ en columnas de Sephadex G-50	62
b) Efecto de la aurovertina sobre la actividad de la ATPasa	63
c) Determinación de la fluorescencia del complejo $\text{F}_1\text{-aurovertina}$	64
4. OTROS PROCEDIMIENTOS	
a) Determinación de la concentración de nucleótidos en solución	64
IV. RESULTADOS	
PARTE I. CAMBIOS CONFORMACIONALES DEL COMPLEJO $\text{F}_1\text{-AUROVERTINA}$ DURANTE LA CATALISIS MULTISITIO Y UNISITIO	66
PARTE II. INTERACCION DE LA AUROVERTINA CON EL COMPLEJO $\text{F}_1\text{-I}$	82
V. DISCUSION	95
VI. CONCLUSIONES	111
VII. PERSPECTIVAS	112
VII. REFERENCIAS	114
VIII. APENDICE	125

INDICE DE TABLAS

I. INTRODUCCION

Tabla I. Pesos moleculares de las principales subunidades de F_0	9
Tabla II. Pesos moleculares de las subunidades que componen a la F_1 -ATPasa	14
Tabla III. Comparación de la región homóloga rica en glicina de varias proteínas con capacidad para unir nucleótidos	16
Tabla IV. Marcaje de la F_1 con diversos reactivos químicos	24

IV. RESULTADOS

TABLA I. Actividad hidrolítica del complejo F_1 -aurovertina	66
TABLA II. Efecto de distintas concentraciones de ATP sobre la fluorescencia del complejo F_1 -aurovertina	67
TABLA III. Recuperación del apagamiento de fluorescencia del complejo F_1 -aurovertina inducido por ATP en presencia de diferentes concentraciones de EDTA	69
TABLA IV. Hidrólisis de ATP del complejo F_1 -aurovertina en presencia de EDTA	70
TABLA V. Actividad de ATPasa del complejo F_1 -I preincubado en presencia o en ausencia de Aurovertina	82

INDICE DE FIGURAS

I. INTRODUCCION

- Fig. I. Estructura del complejo F_0F_1 de E. coli. 5
- Fig. II. Modelos propuestos para Adenilato Cinasa y para la Subunidad β de la F_1 17
- Fig. III. Arreglo de las Subunidades de la F_1 21

III. MATERIALES Y METODOS

- Fig. IV. Espectros de Excitación y de Emisión de la Aurovertina 65

IV. RESULTADOS

- FIG. 1 Cambio de Fluorescencia inducido por el ATP del Complejo F_1 -Aurovertina 68
- FIG. 2 Efecto del Mg^{2+} sobre el Cambio de Fluorescencia, inducido por el ATP, del Complejo F_1 -Aurovertina, en presencia de EDTA 71
- FIG. 3 ATP consumido por la Actividad Hidrolítica del Complejo F_1 -Aurovertina 72
- FIG. 4 Fluorescencia del Complejo F_1 -Aurovertina inducida por el ATP. Efecto de la Adición de Sistema Regenerador de ATP 74
- FIG. 5 Cambio de Fluorescencia del Complejo F_1 -Aurovertina inducido por AMP-PNP 75
- FIG. 6 Cambio de Fluorescencia inducido por ATP sobre Partículas Submitocondriales Preincubadas con Aurovertina, Inhibidas o no con Oligomicina 76
- FIG. 7 Correlación de la Actividad Hidrolítica del Complejo F_1 -Aurovertina con el Cambio de Fluorescencia inducido por ATP en Condiciones de Unisitio 78
- FIG. 8 Cambios de Fluorescencia del Complejo F_1 -Aurovertina inducidos por ITP y por IDP 80
- FIG. 9 Cambios de Fluorescencia del Complejo F_1 -Aurovertina inducidos por Nucleótidos bajo Condiciones de Multisitio o Unisitio 81

FIG. 10 Efecto de la Aurovertina sobre la Actividad de ATPasa de la F_1 y del Complejo F_1 -I	83
FIG. 11 Inhibición por Aurovertina del Complejo F_1 -I previamente liberado de la Acción del Inhibidor Endógeno	85
FIG. 12 Efecto de la Aurovertina sobre el Complejo F_1 -I durante su incubación en el Medio de Activación	86
FIG. 13 Aurovertina sobre el Complejo F_1 -I Hidrolítico	87
FIG. 14 Hidrólisis de ATP en Condiciones de Unisitio del Complejo F_1 -I preincubado o no con Aurovertina	89
FIG. 15 Efecto de la Aurovertina sobre el Complejo F_1 -I o la F_1 Catalizando la Hidrólisis de ATP Unisitio	90
FIG. 16 Hidrólisis Multisitio del Complejo F_1 -I preincubado con 1 mol de ATP/ 3 moles de Enzima, en Ausencia o en Presencia de Aurovertina	92
FIG. 17 Porcentaje de [γ - 32 P]ATP consumido por la Actividad de ATPasa del Complejo F_1 -I, con y sin Aurovertina, con ATP en Concentraciones Subestequiométricas y Saturantes	94

I. INTRODUCCION

1. GENERALIDADES

Una capacidad inherente a todos los seres vivos es el obtener energía a partir de fuentes externas. Con esta idea central podemos decir que la Bioenergética trata de entender cómo la energía de estas fuentes externas se convierte en formas utilizables y cómo los seres vivos pueden realizar diversos tipos de trabajos haciendo uso de esta energía. Siendo estas sus preguntas, muchas de las respuestas se han tenido que buscar en las llamadas membranas transductoras de energía que son, precisamente, competentes en la interconversión de la energía química contenida en los sustratos respiratorios, en el adenosíntrifosfato (ATP) o en la luz, y en la energía eléctrica u osmótica contenida en los gradientes transmembranales (Harold, 1986; Skulachev, 1988; Vázquez-Laslop y Dreyfus, 1989). Para entender cómo la energía proporcionada por sustratos oxidables (respiración) o por la luz (fotosíntesis) se puede utilizar para formar la molécula de ATP y quedar ahí almacenada, Mitchell, en 1961, formuló su conocida Teoría Quimiosmótica. En ésta se propone que una bomba primaria, constituida por las enzimas de la cadena de transporte de electrones, respiratoria o fotosintética, acopla el paso de electrones o de fotones a una translocación de protones (H^+) a través de las membranas transductoras de energía; el resultado es la generación de un gradiente electroquímico de H^+ ($\Delta\mu_{H^+}$). Una segunda bomba

transloca a estos H^+ en sentido inverso de la bomba primaria, y aprovechando la energía del paso de los H^+ , se sintetiza enzimáticamente el ATP (Kagawa, 1984; Harold, 1986; Skulachev, 1988). La enzima que lleva a cabo esta importante reacción es la ATP sintetasa. Originalmente, la teoría quimiosmótica se planteó para explicar el acoplamiento de energía que debe ocurrir entre la cadena de transporte de electrones y la ATP sintasa. Hoy se sabe que el $\Delta_p H^+$ es el intermediario energético de procesos celulares muy variados, tales como la formación de gradientes de diversos iones (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}), la síntesis de pirofosfato, la generación de calor, etc. (Skulachev, 1984 y 1988, para revisiones).

La importancia de la existencia del $\Delta_p H^+$ explica el porqué de la amplia distribución de las membranas transductoras de energía: la membrana interna de la mitocondria, la membrana plasmática de las bacterias, la membrana de los cromatóforos bacterianos, la membrana tilacoidal de los cloroplastos. Más recientemente, se pueden agregar a esta lista la membrana de las arqueobacterias (Lübben et al., 1987; Dharmavaran y Konisky, 1989), muchas de las membranas no mitocondriales de los eucariontes, como lisosomas, aparato de Golgi, vesículas de clatrina, etc. (ver como ej., Arai et al., 1987; Moriyama y Nelson, 1988; Südhof et al., 1989) y vacuolas de plantas y hongos (p. ej., Manolson et al., 1985; Bowman et al., 1989). De hecho, de la clasificación de membranas relacionadas con las conversiones de energía sólo se pueden excluir con seguridad a las envolturas externas de las mitocondrias, los cloroplastos y

las bacterias y a la membrana de los peroxisomas (Skulachev, 1988). En el aparato de Golgi se tienen evidencias de la existencia de una ATPasa (Zhang y Schneider, 1983; Barr et al., 1984) y, por tanto, las membranas relacionadas con el mismo (núcleo y retículo endoplásmico) podrían también contener a esta enzima. La universalidad de las membranas transductoras de energía asegura el interés y la importancia del estudio de las proteínas que en ellas se encuentran, una de las cuales es la H^+ -ATP sintetasa.

La H^+ -ATP sintetasa también se conoce como complejo F_0F_1 o, menos correctamente, como H^+ -ATPasa. Es una de las llamadas F-ATPasas, según una reciente clasificación, para distinguirla de las enzimas de la membrana plasmática o de la vacuolar (P-ATPasas y V-ATPasas, respectivamente) (Nelson y Taiz, 1989). Las P-ATPasas o enzimas del tipo E_1-E_2 son aquellas que como parte de su ciclo catalítico, incluyen a un intermediario fosforilado de la enzima. La más conocida de ellas es la Na^+/K^+ -ATPasa de membranas plasmáticas de animales, o la Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplásmico. Son enzimas relativamente sencillas en su estructura, ya que poseen una sola subunidad de unos 100 kDa, siendo probablemente un dímero la unidad funcional. Las V-ATPasas o de tipo vacuolar son propias de las membranas internas (no mitocondriales) de los eucariontes. Son enzimas de unos 500 kDa, con dos porciones principales: una integral a la membrana y otra periférica que contiene el (o los) sitio(s) activo(s). Ambas generan gradientes de pH y eléctricos a

través de las membranas, utilizando la hidrólisis del ATP como la generadora de energía. Finalmente, las F-ATPasas o de tipo F_0F_1 son las que se encuentran en las membranas plasmáticas de eubacterias, en la membrana interna mitocondrial y en la membrana tilacoïdal de los cloroplastos. Como las anteriores, tienen la capacidad de hidrolizar ATP y generar gradientes transmembranales. Sin embargo, su papel principal está en funcionar en el sentido inverso: sintetizar ATP utilizando el gradiente transmembranal de protones ($\Delta\mu H^+$) creado por las reacciones de óxido-reducción de la cadenas de transporte de electrones respiratorias o fotosintéticas. Vista globalmente, su estructura es muy similar a la de las V-ATPasas: un canal por donde pasan los protones y un sector soluble donde se encuentran los sitios catalíticos. De hecho, en los últimos años se han ido estableciendo interesantes relaciones evolutivas entre las V-ATPasas y las F-ATPasas (Nelson y Taiz, 1989; Gogarten et al., 1989).

2. ESTRUCTURA DE LA H^+ -ATP SINTASA

El complejo F_0F_1 , como se ha mencionado, está formado por dos estructuras principales, una de naturaleza hidrofílica o F_1 , cuyas subunidades son α , β , γ , δ y ϵ (con posibles estequiometrías de 3:3:1:1:1), la otra de naturaleza hidrofóbica o F_0 compuesta principalmente de las subunidades a, b y c (probablemente 1a: 2 b: 10 c) (para revisiones ver Senior, 1988; Vázquez-Laslop y Dreyfus, 1989; Futai et al.,

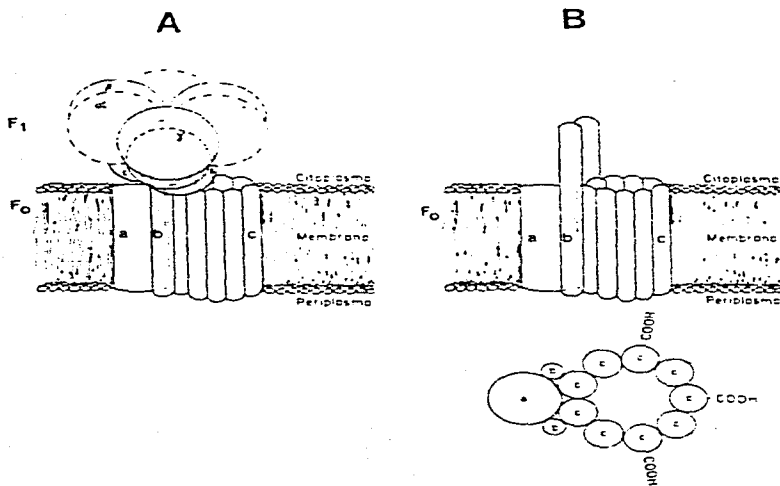


FIG. 1 Representación de la Estructura de la ATP sintetasa de E.coli. A-Esquema de todo el complejo F₀F₁ y su ubicación en la membrana plasmática. B-Arreglo de las subunidades a, b y c del sector F₀; parte superior, vista lateral; parte inferior, vista desde arriba. Los grupos carboxilos indicados corresponden al residuo de Asp-61, donde se une el DCCD. (Tomado de Schneider y Altendorf, 1987).

1989) (Fig. 1). Ambas estructuras se pueden separar una de otra por sonicación, en el caso de las mitocondrias, o por disminución de la fuerza iónica del medio, en el caso de Escherichia coli, lo cual ha facilitado relativamente el estudio de este complejo. Una vez que se disocia del sector membranal, la porción F_1 se torna ineficiente para sintetizar ATP y muy activa para hidrolizarlo, teniendo un número de recambio de 600 s^{-1} (Kagawa, 1984). Por su parte, F_0 con la F_1 dislocada se convierte en un canal pasivo de protones. Así, las muchas subunidades, unas 18, que componen a la H^+ -ATP sintasa mitocondrial se pueden dividir en aquéllas involucradas con la translocación de protones (F_0), las que ayudan en el acoplamiento entre F_1 y F_0 (cuello) y las relacionadas más directamente con la síntesis y la hidrólisis del ATP (F_1) (Ysern et al., 1988).

El operón que codifica para todo el complejo F_0F_1 se denomina operón unc, estando el de E. coli clonado y totalmente secuenciado; de otros organismos se conoce la secuencia de varios de los genes relacionados (Futai y Kanazawa, 1983; Futai et al., 1987; Futai et al., 1989). Los genes estructurales que codifican para las subunidades de F_0F_1 son, en orden secuencial, uncB (a), uncE (c), uncF (b), uncH (ε), uncA (α), uncG (γ), uncD (δ) y uncC (e). Dentro del mismo operón se encuentra uncI, pero de éste se desconoce su función (Futai et al., 1989). Dado que existe un solo tipo de gene para cada subunidad y de varias de ellas existe más de una copia por mol de enzima, la estequiometría parece estar regulada a nivel de traducción (Futai y Kanazawa, 1983).

En el caso de los eucariontes, un punto de importancia es que algunas de las subunidades de F_0F_1 están codificadas en los genomas de los organelos. Por ejemplo, el DNA mitocondrial de la levadura contiene los genes para las subunidades 9 (que corresponde a la subunidad c de E. coli o de mamífero) (gene oli1), 8 (aap1) y 6 (corresponde a la subunidad a) (oli2). El DNA mitocondrial de mamífero tiene los genes para la subunidad 6 y para la A6L (subunidad 8 de la levadura) (Futai et al., 1989). Así, la funcionalidad de los genomas de organelos en la codificación de la H^+ -ATP sintasa se ha utilizado para el planteamiento de hipótesis acerca del origen de los eucariontes.

En relación con el origen bigenómico de algunas subunidades, está la pregunta de la importación de las proteínas codificadas por el genoma nuclear hacia el interior de los organelos. Algunas de ellas se traducen como precursores con presecuencias amino-terminales y así se dirigen hacia el organelo (Schatz y Butow, 1983). En general, el proceso de la importación requiere (Hartl et al., 1989, como revisión): i) nucleósidos trifosfato que mantienen una conformación estable del precursor (Pelham, 1986); ii) la llamada proteína general de inserción (GIP), que se encuentra en la membrana externa mitocondrial; iii) la existencia de $\Delta\psi$ para la interacción inicial del precursor con la membrana interna. Algunas subunidades, como la c de bovino y de humano, tienen dos distintos precursores, productos de dos genes y con expresiones a diferentes niveles en varios

tejidos (Dyer et al., 1989). De la subunidad α también se han caracterizado diferentes isoformas en corazón y en hígado de bovino y humano (Walker et al., 1989). La regulación de la síntesis de F_0F_1 en diferentes sistemas seguramente será tema de futuros trabajos.

a) Subunidades de F_0 .

Como F_0 es una proteína integral de la membrana, es necesario usar agentes caotrópicos o detergentes para solubilizarla y purificarla. Por esta razón, para evitar artificios, es necesario que una vez purificado F_0 se pueda reconstituir en una vesícula de fosfolípidos sellada, que pueda translocar H^+ de un lado a otro de la membrana y que, además, esta translocación se pueda acoplar a la actividad enzimática de la F_1 (Schneider y Altendorf, 1987).

En *E. coli*, F_0 está formado por 3 tipos de subunidades llamadas a, b y c. En la mitocondria, el número de subunidades es mayor (ver mas adelante), pero de las que más se conoce desde el punto de vista bioquímico y de la biología molecular es de a, b y c. Los pesos moleculares de estas 3 subunidades se encuentran en la Tabla I. La estequiometría que se ha determinado es de 1 subunidad a, 2 subunidades b y 10 ± 1 subunidades c, utilizando células de *E. coli* crecidas en presencia de $[^{14}C]$ glucosa o $[^{35}S]$ sulfato y contando la radioactividad incorporada en cada subunidad

después de separarlas en geles de poliacrilamida-SDS (Foster y Fillingame, 1982).

Tabla I. Pesos Moleculares de las Principales Subunidades de F_0

	Peso molecular de la subunidad		
	a	b	c
<i>E. coli</i> ¹	30 276	17 265	8 288
Mitocondria (corazón de res) ²	24 816	*	7 402
Cloroplasto ¹	18 000	16 000	8 000

* Todavía no identificada (ver texto)

¹ Schneider y Altendorf, 1987

² Senior, 1988

La subunidad a, a veces también llamada subunidad 6, no guarda mucha homología entre las especies de donde se ha obtenido, aunque sus patrones de hidropatía son similares (Futai et al., 1989). Los residuos más conservados están en la región carboxilo terminal, que es polar y que parecen ser el punto de contacto con las subunidades de F_1 (Eya et al., 1988). Se conoce su secuencia de aminoácidos y de ella se deduce que puede tener 7 sectores hidrofóbicos transmembranales en forma de α -hélices (Hoppe et al., 1983). No se sabe con certeza si la subunidad a está o no involucrada en el paso de los H^+ , pero, por ejemplo, si se cambian aminoácidos específicos de esta subunidad en la F_0 de *E. coli*, se observa una translocación de H^+ disminuida aunque el acoplamiento entre F_0 y F_1 es normal (Futai et al., 1989).

De la subunidad b descrita para F_0 de *E. coli* no se sabe si existe una proteína análoga en la mitocondria. Por su

estructura primaria se sabe que tiene 2 regiones distintas: la cercana al amino terminal es hidrofóbica y el extremo carboxilo terminal es hidrofílico. Se ha propuesto que el dominio hidrofóbico es esencial en la conducción de H^+ y que la región carboxilo terminal lo es para la unión con la F_1 . Este modelo se basa principalmente en datos obtenidos con enzimas proteolíticas (Hoppe et al., 1983), con marcadores hidrofóbicos fotorreactivos (Schneider y Altendorf, 1985) y con mutaciones de aminoácidos específicos (Takeyama et al., 1988; Futai et al., 1989). Aris y Simoni (1983), utilizando reactivos entrecruzadores, sugirieron la posibilidad de que exista una interacción física entre la subunidad b y la subunidad β de la F_1 . Con este tipo de estudios se han llegado a proponer modelos del complejo F_0F_1 como el que se muestra en la Fig. IA.

La subunidad c es la más hidrofóbica de todas las que componen a F_0 , teniendo la estructura llamada de horquilla: dos segmentos que atraviesan la membrana conectados por un asa hidrofílica (Schneider y Altendorf, 1987; Futai et al., 1989). La evidencia inmunológica y genética apunta a que esta asa hace contacto con la F_1 (Schneider y Altendorf, 1987). Una de las características más conocida de esta subunidad es que en su residuo de Asp-61 une el reactivo dicitclohexilcarbodiimida (DCCD), unión que inhibe casi en su totalidad el paso de los H^+ (Sebald y Hoppe, 1981). Es interesante notar que esta subunidad es de carácter oligomérico y que la unión de solamente 1 molécula de DCCD en

una de las subunidades c es suficiente para impedir la conducción de H^+ . Consistente con este dato está el hecho de que la mutación de la subunidad c en la posición 61 (Asp \rightarrow Glí o Asn) en F_0 de E. coli tiene el mismo efecto que el DCCD. Además es el residuo 61 el único de carácter polar altamente conservado en las porciones transmembranales de la subunidad c. De aquí se concluye la importancia esencial del residuo 61 y la manera cooperativa con la que funciona el oligómero formado por las subunidades c (Senior, 1988) (Fig. 1B).

Además de a, b y c existen en el sector F_0 mitocondrial subunidades adicionales. Una de ellas es un proteolípido codificado por un gene en Saccharomyces cerevisiae denominado aapl; se ha encontrado una región homóloga en las mitocondrias de mamíferos (A6L) (Schneider y Altendorf, 1987) cuya función aún se desconoce. El factor B (F_B), con un peso molecular de 11-15 000, se piensa que está involucrado en la transferencia de energía entre F_0 y F_1 (Schneider y Altendorf, 1987). También se han reportado otras proteínas como posibles componentes integrales del canal F_0 ; sin embargo, muchas de ellas no se encuentran en todas las preparaciones de F_0 o existen muchas discrepancias en cuanto a sus propiedades (Schneider y Altendorf, 1987).

b) Subunidades del cuello

Quizás la diferencia que más resalta entre los complejos F_0F_1 bacteriano y mitocondrial es la existencia en este último de subunidades especiales que ayudan al acoplamiento entre el sector hidrofílico y el membranal. Así, el cuello del complejo mitocondrial está formado principalmente por la subunidad denominada OSCP (proteína que confiere sensibilidad a la oligomicina) y por la subunidad F_6 .

OSCP tiene un peso molecular de 20 967 daltones. Se conoce toda su secuencia de aminoácidos y ésta tiene una alta similitud con la subunidad ϵ de la F_1 y con la subunidad b de E. coli, por lo que se piensa que pueden tener una función parecida (Grinkevich et al., 1984). Experimentos que apoyan la idea de que OSCP sirve para unir F_0 con F_1 son aquéllos donde se tripsinizan pequeños segmentos de las subunidades α y β de F_1 y con ello se pierden los puntos de contacto entre OSCP y F_1 (Dupuis y Vignais, 1987). Es interesante que las mutaciones en levaduras que confieren resistencia a la oligomicina se encuentran en las subunidades a y c de F_0 (Senior, 1988).

La subunidad 6 de levaduras es codificada por el gene *oli2* y también se ha encontrado en los genes mitocondriales de mamíferos (Schneider y Altendorf, 1987). No se sabe qué tan necesario es este factor para la unión de la F_1 a la membrana, pero se ha reconocido que se requiere para restaurar algunas de las actividades enzimáticas del complejo

F₀F₁. En un reciente trabajo, Joshi y Pringle (1989) apoyan la propuesta de que tanto F₆ como OSCP se encuentran en la región del cuello e indicaron que ninguna de las dos subunidades se requiere para la translocación pasiva de los H⁺ a través de F₀, aunque sí para las reacciones en los sitios catalíticos.

c) Algunos modelos para la conducción de H⁺ a través del canal F₀

Las evidencias experimentales parecen indicar que para la translocación de H⁺ a través de F₀ se requiere de la presencia de los tres tipos de subunidades, a, b y c (Schneider y Altendorf, 1987; Senior, 1988; Futai et al., 1989). Se debe tomar en consideración que F₀ es un canal altamente selectivo para los H⁺, así que se ha especulado sobre la existencia de una red de puentes de hidrógeno transmembranal que conduce a los H⁺ (Nagle y Nagle, 1983) o de grupos que se asocian a los H⁺ que pueden, alternadamente, presentarse hacia el interior con altos pK_a y hacia afuera con bajos pK_a (Senior, 1988). Basándose en el movimiento de los flagelos, Cox y colaboradores (1986) han propuesto una hipótesis donde las subunidades a y b de F₀ y α , β y ϵ de F₁ pueden rotar e ir estableciendo interacciones con el oligómero formado por las subunidades c (ver la Fig. 1), en particular entre la hélice 4 de la subunidad a y el Asp-61 de la subunidad c. Tales interacciones permiten cambios conformacionales que se pueden traducir en la síntesis del

ATP. No obstante, aún faltan evidencias experimentales de que el sector F_0 rote. Más adelante se comentarán experimentos donde se muestra que modificaciones específicas del canal F_0 afectan características intrínsecas de los sitios catalíticos en F_1 .

d) Subunidades de F_1

La porción soluble de la H^+ -ATP sintasa tiene 5 tipos de subunidades, α , β , γ , δ y ϵ con una relación molar probable de 3:3:1:1:1. Los pesos moleculares para la F_1 mitocondrial y de *E. coli* se presentan en la Tabla II.

Tabla II. Pesos Moleculares de las Subunidades que Componen a la F_1 -ATPasa¹

	<u><i>E. coli</i></u> Mitocondria ²	
Peso molecular total	381 000	371 000
Subunidad		
α	55 200	55 164
β	50 155	51 595
γ	31 428	30 141
δ /OSCP ³	19 238	20 967
ϵ / δ ³	14 920	15 065
ϵ ³		5 652

¹ Datos tomados de Senior, 1988.

² Pesos moleculares para la F_1 de mitocondrias de corazón de res.

³ La mayor parte de los autores concuerdan con que la δ bacteriana equivale a la OSCP mitocondrial; la δ mitocondrial es contraparte de la subunidad ϵ bacteriana; en cambio, la ϵ de la mitocondria no tiene subunidad equivalente en la F_1 de *E. coli*

Para poder conocer la función de cada una de las subunidades de la F_1 se han utilizado los experimentos de reconstitución, sobre todo en la enzima bacteriana donde se pueden separar una de otra todas las subunidades, para

después determinar qué clase de complejo es capaz de realizar actividades catalíticas. Aún cuando las subunidades δ y ϵ estén ausentes, el complejo $\alpha\beta\gamma$ puede llevar a cabo la hidrólisis del ATP (Dunn y Futai, 1980). La subunidad β aislada obtenida de la bacteria Rhodospirillum rubrum, se ha encontrado que puede tener actividad hidrolítica. Sin embargo, esta actividad es solamente del 0.1% con respecto a la de la enzima intacta, a pesar de que la K_m para el ATP en la β es 2 órdenes de magnitud menor que en la F_1 . Tal parece que esto se debe a que el ATP en la subunidad aislada se libera a una velocidad muy alta (Harris et al., 1985). Frash y colaboradores (1989) aislaron recientemente la subunidad β de la F_1 de cloroplastos de espinaca. En este caso, la subunidad β puede hidrolizar el Mg-ATP a velocidades comparables a las de la F_1 completa, pero no así cuando se trata de Ca-ATP que, en la F_1 nativa sí constituye un buen sustrato. Lo que revelan estos experimentos es la importancia que tienen las interacciones entre subunidades para que la enzima pueda realizar su actividad catalítica.

Además de la subunidad β , la otra subunidad de la F_1 que puede unir nucleótidos es la α . Así, como el número de cada una de estas subunidades es de 3 por molécula de enzima, resulta que existen por lo menos 6 sitios de unión para nucleótidos en la F_1 (Cross, 1988) (se hablará de ellos mas adelante). Es notable que en la subunidad β exista una región rica en glicina de gran similitud en muchas de las proteínas que pueden unir nucleótidos (Futai et al., 1989; Hsu et al., 1987; Garboczi, et al., 1988; Mueller, 1989) (Tabla III).

Tabla III. Comparación de la Región Homóloga Rica en Glicina entre Varias Proteínas con Capacidad para Unir Nucleótidos¹

F ₁ de levadura (subunidad ξ)	G G A G ψ G K T
F ₁ de bovino (subunidad ξ)	G G A G ψ G K T
F ₁ de <i>E. coli</i> (subunidad α)	G D R G T G K T
Adenilato cinasa	G G P G S G K G
EF-Tu	G H V D H G K T
Proteínas G	ψ
Proteína G de levadura	G A G E S G K S
Transducina	G A G E S G K S
Proteínas cinasas Ser-Thr	ψ
TPK ₁ , TPK ₂ , TPK ₃ ²	G T G S F G R V
PKC- α , β , γ ³	G K G S F G K V
Proteínas cinasas de Tyr	ψ
INS-R ⁴	G Q G S F G M V
PDGF-R ⁵	G S G A F G Q V

Las abreviaturas de los aminoácidos son: A; alanina; C, cisteína; D, ácido aspártico; E, ácido glutámico; F, fenilalanina; G, glicina; H, histidina; K; lisina; M, metionina; P, prolina; Q, glutamina; R, arginina; S, serina; T, treonina; V, valina; X, aminoácido cualquiera.

¹ Datos tomados de Mueller, 1989 y de Hsu et al., 1987.

² Proteínas cinasas dependientes de AMPc de levadura

³ Formas α , β y γ de la proteína cinasa C

⁴ Receptor de insulina humano

⁵ Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas

Teniendo en cuenta la secuencia primaria de esta región homóloga, se ha predicho el sentido y el plegamiento de la estructura secundaria, un asa flexible de estructuras β - α - β enrolladas siempre hacia el lado derecho, conocida como el plegamiento de Rossman (Rossman y Argos, 1981). De esta región de la adenilato cinasa existen estudios¹ estructurales con rayos X (Pai et al., 1977) y con NMR de alta resolución (Fry et al., 1985), así que se conoce su estructura tridimensional (Fig. IIA). Basándose en ²ella, Garboczi y colaboradores (1988) propusieron un modelo similar para la subunidad β de la F₁ de hígado de rata (Fig. IIB). Por otra

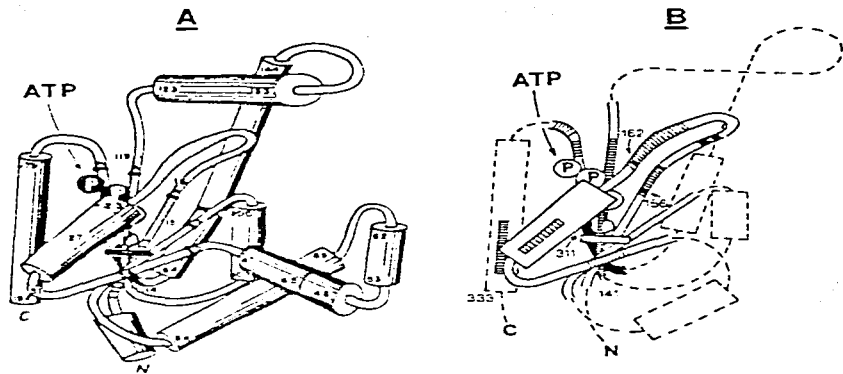


FIG. II Modelo propuesto para el Dominio de Unión de Nucleótidos de la Adenilato Kinasa (A) y de la Subunidad F_1 de hígado de rata (B). El ATP está representado en su sitio de unión como una barra horizontal y los grupos fosfato marcados con una "P". Las líneas " " en B marcan los residuos homólogos con la adenilato cinasa; el segmento ■ es una región de homología con las P-ATPasas. (Tomado de Garboczi et al., 1988).

parte, pero en el mismo sentido, se sabe que una pequeña secuencia de aminoácidos de las P- y de las F-ATPasas, precisamente la que contiene el sitio de unión para nucleótidos, posee homologías significativas. Dentro de la subunidad β de la F_1 existe un residuo de lisina muy conservado, capaz de unir azido-ATP. Llama la atención que el residuo de ácido aspártico que en el caso de las P-ATPasas es el que se fosforila, está reemplazado por una treonina en la subunidad β (Pedersen y Carafoli, 1987, para revisión).

La subunidad γ de diversas especies tiene solamente 33 residuos idénticos; la región carboxilo terminal en 8 especies está altamente conservada, por lo que se le ha sugerido un papel importante en la catálisis y en el ensamblaje del complejo (Futai et al., 1989). En la Tabla II se mencionó que la subunidad δ de bacterias corresponde a OSCP de mitocondrias y que la subunidad ϵ mitocondrial equivale a la ϵ de bacterias (Senior, 1988; Futai et al., 1989). En cuanto a su función, se sabe que la presencia de δ y ϵ es un requisito para que la porción F_1 pueda reconstituirse con las subunidades membranales (Amzel y Pedersen, 1983; Senior, 1985).

El llamado inhibidor natural de la H^+ -ATPasa es una característica distintiva de la enzima mitocondrial (Schwerzmann y Pedersen, 1986). En levadura, este péptido se une directamente a una de las subunidades β y su interacción es estabilizada por dos proteínas, una de 9 kDa y otra de 15 kDa (Yoshida et al., 1984). Es interesante que la subunidad ϵ

de E. coli tiene la capacidad de inhibir la actividad de ATPasa de la F₁ bacteriana (Dreyfus y Satre, 1984), lo cual concuerda con la existencia de homología entre la proteína inhibidora y esta subunidad (Yoshida et al., 1984). Algunos de los papeles funcionales que se han propuesto para el inhibidor natural se discutirán en una sección posterior.

3. RELACIONES ESTRUCTURA-FUNCION EN LA H⁺-ATP SINTASA

Ya se ha mencionado que la estequiometría más aceptada para la F₁-ATPasa es de 3 α :3 β :1 γ :1 δ :1 ϵ y para el canal F₀ (de E. coli) de 1a:2b:10+1 c. Esto indica una probable asimetría intrínseca de la molécula, tanto en el sector soluble como en el membranal. Las cadenas de γ , δ y c no poseen secuencias repetidas internas, por lo que las subunidades α y β no pueden estar rodeadas por ambientes idénticos (Ysern et al., 1988). Las interacciones que se establecen entre la H⁺-ATPasa y varios ligandos como el inhibidor natural, los nucleótidos o ciertos reactivos químicos específicos (DCCD, NBD-Cl, aurovertina, etc.) revelan que la asimetría intrínseca estructural tiene consecuencias sobre el funcionamiento de la enzima. El punto es contestar qué tanto esta asimetría estructural y funcional está involucrada en los mecanismos catalíticos y/o de regulación de la ATP sintasa.

a) La ATP sintasa tiene una estructura asimétrica.

En 1982 Amzel y colaboradores (Amzel et al., 1982) reportaron un estudio de difracción de rayos x, con una

resolución de 9\AA , de cristales de la F_1 mitocondrial. Encontraron que la molécula posee dos regiones con un arreglo hexagonal u octaédrico distorsionado y que ninguna de estas regiones forma trímeros simétricos en el complejo. Su conclusión principal es que las subunidades idénticas no se comportan igual en el complejo debido a que la unión de las subunidades unicopia alteran sus propiedades selectivamente y de manera no equivalente. Concuerdan con este arreglo asimétrico de la F_1 muchos estudios de microscopía electrónica y procesamiento de imágenes (Tsuprun et al., 1984, 1987, 1989; Boekema, 1988; Boekema et al., 1986, 1988; Gogol et al., 1989a y b). Boekema y colaboradores (1988) observaron para la F_1 de cloroplasto un arreglo hexagonal, con las subunidades α y β acomodadas de manera alternada. En una masa central hay una estructura en forma de "v" colocada asimétricamente, constituida probablemente por las subunidades γ y ϵ ; una segunda masa central más pequeña, también desplazada, quizás corresponde a la subunidad δ (Fig. III). El arreglo alternado de las subunidades α y β alrededor de la estructura de la F_1 de E. coli se ha confirmado con el uso del fragmento Fab de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la subunidad α (Gogol et al., 1989b).

También de la porción membranal de F_0F_1 se han hecho estudios de microscopía electrónica. Para la F_1 de E. coli se determinó que la porción periférica está unida a F_0 por un angosto tallo de unos 4.5 nm de longitud (Gogol et al., 1987). La longitud de F_0 mitocondrial se calculó de 8.9 nm y, si se supone para una bicapa de fosfolípidos un grosor de

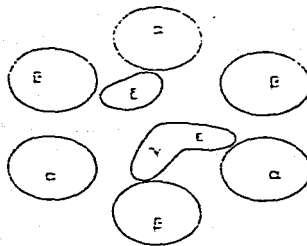


FIG. 111 Arreglo de las Subunidades del Sector F₁ de Cloroplasto. El modelo deriva de proyecciones moleculares de microscopía electrónica de muestras de la enzima procesadas con tinción negativa. (Tomado de Boekema et al., 1988).

5 nm resulta que gran parte del canal se encuentra fuera de la membrana; el diámetro calculado, 10-12 nm, es probablemente menor ya que hay que considerar que esta proteína puede tener unidas moléculas del detergente que se utiliza para su aislamiento (Boekema, 1988). Un hecho notable es que los componentes de F_0 también aportan elementos asimétricos para la enzima. En el complejo F_0F_1 de mitocondrias de corazón de res y de la bacteria Micrococcus lysodeiicticus se encontró que el canal está unido a dos masas adyacentes de proteína de la F_1 , y se sugirió que esta unión asimétrica se puede deber a la no equivalencia de las subunidades mayores (Tsuprun, et al. 1987). A la fecha, de ninguno de estos datos se puede concluir que las imágenes obtenidas existan también en el complejo F_0F_1 in vivo. No obstante, las evidencias de asimetría estructural son consistentes con aquéllas de carácter funcional. A estas últimas se hará referencia en la siguiente sección.

b) Los sitios donde la ATP sintasa une nucleótidos y otros ligandos

Los seis sitios de unión para nucleótidos que se han detectado en la F_1 se clasifican de acuerdo a su capacidad para recambiar con los nucleótidos del medio. Tres recambian rápidamente mientras ocurre la hidrólisis de Mg-ATP, por lo que se consideran como los sitios catalíticos potenciales; los otros tres prácticamente no intercambian sus nucleótidos con los del medio aún después de varios ciclos catalíticos

(Senior, 1988; Cross, 1986, como revisiones; Cross y Nalin, 1982; Issartel, et al., 1986; van Dongen y Berden, 1987, como ej.). De los sitios no catalíticos aunque se desconoce su función, es probable que jueguen un papel estructural o regulador.

Varias evidencias apuntan a que los nucleótidos no recambiables tienen sus sitios de unión en las subunidades α , mientras que los recambiables se encuentran en las subunidades β . Para llegar a estas sugerencias se han utilizado compuestos análogos de los nucleótidos de adenina, que teniendo modificaciones químicas específicas que los hacen, p. ej., radioactivos o fluorescentes, permiten seguir su marca unida a la enzima o liberada al medio ($[^3\text{H}]\text{AMPPNP}$, $\text{TNP}-[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, $\epsilon\text{-ADP}$ ó $\epsilon\text{-ATP}$, etc.). De gran utilidad han sido los análogos de nucleótidos fotoactivables, es decir, aquéllos que después de su exposición a la luz establecen una interacción covalente con su sitio de unión (3'-arilazido ADP o ATP, 8-azido ATP). Se encuentran también los inhibidores específicos de la F_1 , sobre todo los que se ligan a ella cerca del sitio activo (DCCD, NBD, aurovertina) (Vignais y Lunardi, 1985). En la Tabla IV se muestran algunos ejemplos de reactivos que se unen a la subunidad β de la F_1 ; se conoce incluso el residuo de aminoácido al que se ligan. Como puede observarse, todos estos reactivos se unen preferentemente a las subunidades β , lo que lleva a pensar que el sitio catalítico está localizado en estas subunidades. Ningún reactivo es específico para las subunidades α , pero se ha mostrado que parte significativa de marca radioactiva está

muchas veces asociada a estas subunidades. Varios autores han sugerido, entonces, que el sitio catalítico se encuentra en alguno de los puntos de contacto entre las subunidades α y β (Williams y Coleman, 1982; Kironde y Cross, 1987; Senior, 1988).

Tabla IV. Marcaje de la F_1 con Diversos Reactivos Químicos.

Análogo ¹	Residuo marcado ²	Referencias
FSBA	Tyr-368 δ	Bullough y Allison, 1986;
	His-427	Cross et al., 1987
FSBI	Tyr-345	Cross et al., 1987
2-azido-ATP	Tyr-368 δ	
	Tyr-345	Wise et al., 1987
8-azido-ATP	Lys-301	Hollemans, et al., 1983
DCCD	Glu-192	Esch, et al., 1981
Nbf-Cl	Tyr-311 δ	
	Lys-162	Andrews et al., 1984
Aurovertina	Arg-398	Lee et al., 1989

¹ Las abreviaturas utilizadas son: FSBA y FSBI, p-(fluorosulfonil)benzoil derivados de adenosina e inosina, respectivamente; DCCD, diciclohexilcarbodiimida; Nbf-Cl, 4-cloro-7-nitrobenzofurazano.

² La numeración de los aminoácidos corresponde a la subunidad β de la F_1 de corazón de bovino, a excepción del señalado para la aurovertina, determinado en la F_1 de E. coli.

Como se ha mencionado, las tres copias de las subunidades β están codificadas por un solo gene (Futai et al., 1989), pero aunque sus estructuras primarias son idénticas, no necesariamente son equivalentes entre sí, es decir, pueden tener un comportamiento heterogéneo durante los ciclos catalíticos que lleva a cabo la F_1 o reaccionar de manera distinta ante diversos agentes (Tommasino y Capaldi, 1985; Stan Lotter y Bragg, 1986; Kironde y Cross, 1987; Bullough et al., 1987; Beltrán et al., 1988; Bragg y Hou,

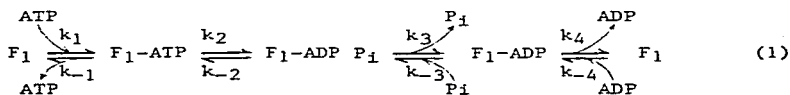
1989). Así, la subunidad β que se puede entrecruzar con la subunidad ϵ , en la F_1 de E. coli, es incapaz de reaccionar con el DCCD (Tommasino y Capaldi, 1985) y una tercera β (es decir, ni la que se entrecruza con la subunidad ϵ , ni la que reacciona con el DCCD) es la que puede ligar al Nbf-Cl (Stan Lotter y Bragg, 1986). Sobre la misma línea, se ha mostrado que la subunidad β de la F_1 mitocondrial que tiene unida a la proteína inhibidora endógena, muestra una reactividad muy baja hacia el DCCD; esta subunidad β es, entonces, intrínsecamente diferente de las otras dos (Beltrán et al., 1988).

Por su parte, Kironde y Cross (1987) encontraron que uno de los tres sitios no catalíticos de la F_1 mitocondrial, puede recambiar rápidamente sus nucleótidos con los del medio en presencia de EDTA, capacidad que retiene aún después de que la enzima realiza unos mil ciclos catalíticos. La interpretación que dan los autores a lo anterior es que la asimetría de los sitios es permanente y que los sitios no catalíticos atraviesan por estados no equivalentes durante la hidrólisis de ATP en la F_1 soluble. Sabiendo que potencialmente la F_1 puede tener más de un sitio catalítico, se ha propuesto que en las reacciones catalíticas realizadas por esta enzima está involucrado un mecanismo cooperativo (ver la siguiente sección). De acuerdo con Bullough y colaboradores (1987), el ATP que se une a un primer sitio catalítico se hidroliza muy lentamente aún cuando una segunda o tercera molécula de sustrato ocupan los otros sitios catalíticos y se procesan a velocidades altas. Esto

significa, según este grupo, que el primer sitio catalítico no contribuye con la hidrólisis del ATP en estado estacionario e implica que los sitios de este tipo son funcionalmente heterogéneos (sin embargo, ver más adelante).

c) Mecanismos propuestos para explicar las reacciones catalizadas por la H⁺-ATP sintasa

La reacción reversible catalizada por la H⁺-ATPasa (ATP sintasa) incluye un mínimo de tres pasos que son, en el sentido de la síntesis, la unión del ADP y el fosfato inorgánico (P_i), la conversión del ADP y del P_i unidos en ATP y la liberación del producto ATP hacia el medio:



Se conocen las constantes de velocidad y de equilibrio para la F₁ aislada de mitocondrias de corazón de res (Grubmeyer et al., 1982):

Constantes de velocidad

$$k_1 = 6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_{-1} = 7 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$$

$$k_2 = 12 \text{ s}^{-1}$$

$$k_{-2} = 24 \text{ s}^{-1}$$

$$k_3 = 3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$$

$$k_{-3} = 5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_4 = 4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$

$$k_{-4} = 1.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

Constantes de equilibrio

$$K_1 = 10^{12} \text{ M}^{-1}$$

$$K_2 = 0.5$$

$$K_3 = 6 \times 10^{-4} \text{ M}$$

$$K_4 = 3 \times 10^{-7} \text{ M}$$

Conociendo estos valores, varios puntos se deben hacer resaltar. Uno de ellos es que el ATP que se une al primer sitio catalítico lo hace con una constante de asociación muy alta (10^{12} M^{-1}). Otro es que ya unido, se establece un equilibrio entre el sustrato unido y los productos de hidrólisis formados, de tal suerte que la K_2 tiene un valor cercano a 1. El significado que esto tiene para el mecanismo de reacción de la enzima es de gran relevancia, ya que implica que el cambio de energía libre en el paso catalítico es prácticamente de cero (Grubmeyer et al., 1982). En este mismo sentido, otros autores han establecido que, mientras los reactivos permanezcan unidos a la F_1 , la reacción $\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{ADP} + \text{P}_i$, es completamente reversible e insensible a protonóforos (Cross, 1981; Senior y Wise, 1983; Senior, 1988). Consistente con esto, en varios laboratorios se ha logrado la síntesis neta del ATP unido a la F_1 soluble, sin que haya aporte alguno de energía (Sakamoto y Tonomura, 1983; Yoshida, 1983; Gómez-Puyou et al., 1986). Si las reacciones de hidrólisis y síntesis del ATP están en equilibrio en el microambiente del sitio catalítico de la enzima, ¿para qué se requiere entonces la energía proporcionada por el $\Delta \mu_{\text{H}^+}$? Tomando en consideración la alta afinidad con la que el ATP se encuentra unido a la enzima, se ha sugerido que la energía se requiere para que el producto se libere al medio (Boyer et al., 1973; Grubmeyer et al., 1982).

Los valores de las constantes para la Reacción (1) solamente son válidos cuando un solo sitio catalítico está

ocupado por sustrato. Experimentalmente esto se logra utilizando un exceso en la concentración de enzima con respecto a la concentración de ATP. En estas condiciones la velocidad de hidrólisis es muy baja ($k_4 = 4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) (Grubmeyer et al., 1982). Al agregar un exceso de ATP se saturan 2 ó los 3 sitios catalíticos (Cross, 1988) y la v_{max} de hidrólisis adquiere un valor de aproximadamente 10^2 s^{-1} . Este aumento de 1 millón de veces en la velocidad de hidrólisis implica que la F_1 presenta una fuerte cooperatividad positiva entre sus sitios catalíticos (Cross et al., 1982; Cross, 1988; Senior, 1988). No es así para la unión del sustrato: la primera molécula de ATP se une, como se había mencionado, con una K_D de 10^{-12} M , en tanto que la segunda lo hace con una K_D de $3 \times 10^{-5} \text{ M}$; es decir, la unión del sustrato a la F_1 presenta una cooperatividad negativa (Cross et al., 1982).

Con objeto de resumir lo anterior, se puede decir que para la síntesis del ATP catalizada por la H^+ -ATP sintetasa, el ADP y el P_i se unen con alta afinidad en el primer sitio catalítico; como el ATP que se forma reversiblemente en tal sitio está fuertemente unido se requiere para su liberación, primero, de la energía del $\Delta\mu H^+$ y, segundo, de la unión de ADP y P_i en un segundo sitio catalítico. La manera como el $\Delta\mu H^+$ participa en el paso que requiere de energía es, de acuerdo con Boyer, provocando un cambio conformacional que permite que el sitio catalítico pase de una forma de alta afinidad por el ATP a una de baja afinidad (revisado en

Senior y Wise, 1983; Cross, 1988; Senior, 1988). Este mecanismo se conoce como indirecto, en virtud de que los protones del gradiente provocan cambios "a distancia" en los sitios catalíticos. En contraste, existe el mecanismo directo, expuesto por Mitchell (1974): la proposición consiste en que los H^+ que pasan por el canal F_0 interaccionan a nivel molecular con los sustratos, incidiendo con los átomos de oxígeno del P_i , originando una especie altamente reactiva que se une con el ADP y, en consecuencia, formando el producto ATP. Quizás la objeción principal para el mecanismo directo es que, según lo discutido previamente, el paso catalítico para la síntesis del ATP no requiere de energía y la presencia de protones no modifica la constante de equilibrio de la reacción (Grubmeyer et al., 1982; Senior, 1988).

Muchas preguntas quedan por contestar acerca del mecanismo catalítico de la H^+ -ATP sintasa. Una de ellas es cuántos sitios catalíticos funcionan durante la hidrólisis o la síntesis del ATP. Existen grupos que apoyan cada una de las posibilidades: uno, dos o tres sitios catalíticos funcionales (revisados en Cross, 1988). En especial, el grupo de Wang apoya la existencia de un solo sitio catalítico funcional en una subunidad llamada β ' para distinguirla de las subunidades β '', para las que se supone un papel regulador pero con actividad catalítica latente (Wang, 1988). El tipo de experimentos que apoyan este modelo se ejemplifica con el siguiente: se mostró en la Tabla IV que el Nbf-C1 al unirse a una sola subunidad β inhibe prácticamente al 100% la

actividad hidrolítica. El tratamiento con LiCl provoca el rearrreglo de las subunidades de la F_1 y, por tanto, el cambio de interacciones entre subunidades cercanas. Según Wang, el tratamiento con LiCl de una F_1 modificada con Nbf-Cl podría provocar la reactivación de la enzima, ya que la subunidad ϵ -Nbf podría reasociarse en el lugar de una de las subunidades ϵ' latentes, en tanto que la ϵ no modificada podría pasar a ocupar la posición de ϵ' catalítica. La recuperación de la actividad efectivamente ocurre con este tratamiento (Wang, 1985).

Reactivos como el DCCD (Tabla IV) reaccionan sólo con 2 de las 3 subunidades ϵ . por lo que el grupo de Allison propone que solamente 2 de estas subunidades son funcionales (Yoshida et al., 1982). Además, estos autores sugieren que el sitio donde se une el ATP con mayor afinidad no es un sitio catalítico normal, ya que no contribuye con la hidrólisis en estado estacionario y que, por tanto, los sitio de las subunidades ϵ actúan de manera independiente (Bullough et al., 1987) (ver la p. 25).

El fenómeno de que la unión de ADP y P_i en un sitio catalítico promueva la liberación de producto en un sitio adyacente, implica la existencia de sitios que interactúan (ver arriba). Este ha sido uno de los argumentos principales de aquéllos grupos que apoyan la existencia de dos o más sitios catalíticos alternantes en la F_1 . Esta enzima puede llevar a cabo la hidrólisis del ATP en uno, dos o los tres sitios catalíticos simultáneamente (Cross et al., 1982). Además, en contraste con lo encontrado por Bullough y

colaboradores (1987), Penefsky (1988) observó que la hidrólisis del ATP unido en el sitio catalítico de alta afinidad alcanza valores cercanos a la v_{max} cuando se añade ATP en exceso y, más aún, parece hidrolizarse antes que el sustrato agregado para disparar la hidrólisis multisitio. Así, para Penefsky, el sitio de alta afinidad es un sitio catalítico normal y, por lo tanto, la enzima puede tener 3 sitios catalíticos funcionales.

4. REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE LA H^+ -ATP SINTETASA

Varios factores pueden regular las reacciones catalíticas de la H^+ -ATP sintetasa. Algunos de ellos son el propio $\Delta p, H^+$ (Biaudet y Haraux, 1987; Guffanti y Krulwich, 1988; Brown, 1989), los nucleótidos (Matsuno-Yagi y Hatefi, 1988; Zhou, et al., 1988; Martins et al., 1988), ciertos cationes divalentes como el Mg^{2+} o el Ca^{2+} (Edwards y Jackson, 1976; Gómez-Puyou et al., 1983, Dreyfus, 1985; Montero-Lomelf et al., 1989), el inhibidor natural (Schwartzmann y Pedersen, 1956, como revisión; Tuena de Gómez-Puyou et al., 1983; Guerrieri et al., 1987; Milgrom, 1989), los fosfolípidos (Pitotti et al., 1980; Laird et al., 1986; Dabbeni-Sala et al., 1989) e, inclusive, interacciones establecidas entre las subunidades del complejo (Penefsky, 1985; Vázquez-Laslop y Dreyfus, 1986; Gautheron y Godinot, 1988; Dreyfus et al., 1988; Al-Shawi et al., 1989). Todos estos factores deben actuar de manera concertada para que la reacción reversible de la ATP sintetasa esté desplazada hacia la formación del ATP.

a) Los nucleótidos como moduladores de la ATP sintasa.

Desde hace tiempo, se sabe que las gráficas de Lineweaver-Burk obtenidas al medir velocidad de hidrólisis de ATP son curvas. En cambio, si el sustrato es GTP o ITP entonces la relación es lineal. De aquí se sugirió que los nucleótidos de adenina se unen a sitios catalíticos pero también a sitios reguladores, en tanto que los nucleótidos de hipoxantina o de guanina se unen solamente a sitios catalíticos (Ebel y Lardy, 1975; Schuster et al., 1975).

El ADP es un inhibidor competitivo de la actividad de ATPasa de la F_1 (Hammes y Hilborn, 1971), aunque está lejos de ser una inhibición clásica por producto. En el grupo de Vinogradov, se ha observado una inhibición por ADP lenta y reversible que puede interferir con las características de la hidrólisis del ATP en estado estacionario. Estos autores proponen la existencia de dos formas de complejo F_1 -ADP que se pueden interconvertir lentamente durante la hidrólisis del ATP, siendo una de ellas inactiva mientras tiene lugar esta reacción, pero no necesariamente durante la síntesis del ATP (Vasilyeva et al., 1982). Otros autores han sugerido la existencia de diferentes tipos de sitios para el ADP. Se ha observado que al preincubar a la F_1 con bajas concentraciones de ADP ($K_{0.5} = 14 \mu M$), existe una inhibición histerética de la hidrólisis de Mg-ATP; la adición del sustrato no libera al ADP que se unió a la enzima durante la preincubación, lo que indica que el ADP y el Mg-ATP están unidos en sitios diferentes (Di Pietro et al., 1980). Además, utilizando arilazido- γ -alanil-ADP (NAP_3 -ADP), un análogo fotoactivable, se

mostró que el ADP responsable de la inhibición histerética, se encuentra en una subunidad f y, por esta razón, se sugiere que una de las tres subunidades f tiene un sitio regulador y son las otras dos las que contienen sitios catalíticos (Fellous et al., 1984). Como se había mencionado, Kironde y Cross (1986) determinaron que en la F_1 carente de nucleótidos débilmente unidos, existen nucleótidos endógenos; dos se encuentran en sitios no recambiables y uno en un sitio recambiable. El sitio no recambiable vacante se llena rápidamente después de incubarse con ADP o durante la hidrólisis del ATP. Este sitio no catalítico vacante es específico para nucleótidos de adenina y no intercambia su contenido con los nucleótidos del medio. De hecho, los autores proponen que éste podría ser el mismo sitio "histerético" o "regulador" estudiado por el grupo de Gautheron (Di Pietro et al., 1980; Fellous et al., 1984). La actividad de ATPasa determinada en partículas submitocondriales disminuye, en condiciones previas al estado estacionario y en estado estacionario, cuando se une 1 mol de ADP/ mol de F_1 membranaral en un sitio de alta afinidad ($K_{0.5} = 10 \mu M$). En concordancia con los trabajos anteriores (Di Pietro et al., 1980; Vasilyeva et al., 1982; Kironde y Cross, 1986), este ADP ligado en un sitio inhibitorio permanece unido aún después de miles de ciclos de hidrólisis, lo que indica que no se trata de un sitio catalítico (Martins et al., 1988).

Es posible que las modalidades cinéticas que describen

Matsuno-Yagi y Hatefi (1986) para la ATP sintasa actuando durante la fosforilación oxidativa, se deban a cambios en la ocupación de los sitios no catalíticos por nucleótidos de adenina. Una de ellas se caracteriza por tener una K_m baja para ADP ($6-10 \mu M$) y una capacidad limitada para la síntesis del ATP ($v_{max} = 500 \text{ nmol ATP min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$); la otra modalidad cinética de la enzima presenta una K_m^{ADP} alta ($50-100 \mu M$) y una mayor velocidad para sintetizar ATP ($v_{max} = 1800 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$). Aparentemente, estas modalidades se presentan dependiendo del sustrato respiratorio que se esté utilizando, NADH o succinato, respectivamente, es decir, de la velocidad de producción de energía en relación con el número de ATP sintasas funcionales (cuando se usa NADH funcionan 3 sitios de acoplamiento y, en el caso del succinato, son solamente 2 los sitios de acoplamiento activos).

Es necesario hacer notar que, tanto en el trabajo de Martins y colaboradores (1988), como en el de Matsuno-Yagi y Hatefi (1986) se están describiendo fenómenos que se presentan en la ATP sintasa membranar, en partículas submitocondriales, a diferencia de la mayoría de los trabajos comentados anteriormente, donde se utiliza a la porción F_1 soluble. El hecho de que se describan sitios reguladores en el complejo F_0F_1 , revela que la presencia del canal para H^+ puede no alterar las características cinéticas primordiales de la F_1 pero, al mismo tiempo, no excluye que el sector membranar pueda aportar otros niveles de regulación en la enzima.

Para determinar si el comportamiento cinético del complejo F_0F_1 es comparable al del sector F_1 , se calcularon las constantes de velocidad y de afinidad para la reacción de hidrólisis de ATP en partículas submitocondriales. Así, en la F_1 membranaral existe el sitio de alta afinidad ($K_D = 10^{12} M^{-1}$) detectado en la forma soluble y además, los valores de las constantes de velocidad son en todo comparables en las dos formas de la enzima (Penefsky, 1985). Es muy interesante que el DCCD y la oligomicina unidos en las subunidades membranarales del complejo F_0F_1 , a una distancia aproximada de 2 nm de los sitios catalíticos, disminuyan la afinidad de la enzima por el ATP. Penefsky sugiere como explicación a este fenómeno que la unión del DCCD provoca un cambio conformacional en la subunidad c y que este cambio se transmite hasta las subunidades donde se encuentran los sitios catalíticos. Esta proposición se ve apoyada con el trabajo reportado por Matsuno-Yagi y colaboradores (1985), donde observan que el DCCD y la oligomicina evitan que se presente el cambio de fluorescencia que induce el ATP en el complejo aurovertina- F_1 membranaral. La aurovertina interacciona directamente con las subunidades de la enzima y por ello, esto es una evidencia más de que modificaciones ocurridas en el canal F_0 repercuten en la porción catalítica del complejo. (De la aurovertina como monitor de cambios conformacionales en la F_1 se hablará en la sección siguiente). Aún más, los fosfolípidos, que sólo tienen contacto con el sector membranaral, pueden modificar la K_m por

el ATP en el complejo F_0F_1 reconstituido en liposomas (Laird et al., 1986), o bien, alterar las actividades en el sentido de la síntesis de ATP (recambio P_i -ATP) dependiendo del tipo de fosfolípidos que interaccionan con el canal (Dabbeni-Sala et al., 1989).

b) El inhibidor natural de la ATPasa como factor regulador.

Hace ya 26 años, Pullman y Monroy (1963) supusieron que las mitocondrias contenían alguna sustancia que inhibía la actividad hidrolítica de la F_1 sin afectar su capacidad de acoplar el transporte de electrones de la cadena respiratoria con la síntesis del ATP (la llamada capacidad de acoplamiento; de hecho, el nombre de F_1 , o factor de acoplamiento 1, proviene de esta capacidad). Tal suposición estaba basada en la gran estimulación de la actividad hidrolítica que se observa durante la purificación de la F_1 , activación que no es paralela a un incremento en su capacidad de acoplamiento. Encontraron que durante la purificación de la F_1 , al calentar, alcalinizar o aumentar la fuerza iónica, se libera un péptido de bajo peso molecular (10.5 kDa) el cual, al reconstituirlo con la enzima, incrementa la estabilidad al frío de la F_1 soluble e inhibe su actividad de ATPasa. Por esto último lo llamaron inhibidor natural de la ATPasa. Es importante mencionar que desde entonces, Pullman y Monroy propusieron que el complejo F_1 -péptido inhibidor podía representar la forma funcional de la F_1 . Para reconstituir al inhibidor en la F_1 , es necesaria la presencia de Mg-ATP; aún

así, el péptido se disocia fácilmente bajo las condiciones previamente mencionadas. En presencia de dos factores proteicos, llamados proteínas de 15 y de 9 KDa, el complejo F_0F_1 -inhibidor se vuelve muy estable, a pesar de la ausencia de ATP y Mg^{2+} . Solamente 1 mol de inhibidor se une por mol de F_1 (Klein et al., 1980) o de F_0F_1 (Wong et al., 1982), lo que quiere decir que una de las subunidades β tiene mayor afinidad que las otras dos por este péptido. Como se ha comentado, este fenómeno se ha tomado como una de las evidencias de la asimetría intrínseca de la ATP sintetasa.

La cuestión central relativa al inhibidor natural de la F_1 es conocer cuál es su función durante el ciclo catalítico de la enzima. Cuando el inhibidor está presente, la fosforilación oxidativa en estado estacionario que se lleva a cabo en partículas submitocondriales, tiene una fase de retardo que no se observa en partículas carentes de la proteína inhibidora (Gómez-Puyou et al., 1979; Harris et al., 1979). Se ha probado que la existencia de gradientes electroquímicos impuestos en partículas submitocondriales, inducen un cambio en la posición de la proteína inhibidora en relación con la F_1 , teniendo como resultado la aparición de actividad catalítica de la enzima (Dreyfus et al., 1981). Aunque no modifica la velocidad de la fosforilación oxidativa en estado estacionario, la existencia de la fase de retardo indica que el péptido inhibidor no solamente ejerce un efecto en el sentido de la hidrólisis del ATP. La reacción de recambio P_i -ATP se considera una reacción parcial de la síntesis del ATP, ya que consiste de todos los pasos de esta

reacción, incluyendo los pasos en dirección de la hidrólisis, con excepción de la liberación del producto ATP unido a la F_1 (ver la Reacción 1, en la pág. 26, para mayor claridad); el paso limitante de la reacción es la liberación del ADP. La reacción de recambio P_i -ATP es menos sensible que la hidrólisis a la acción del inhibidor. Se ha propuesto que la proteína inhibidora ejerce su efecto a nivel de la liberación del producto ADP (Tuena de Gómez-Puyou et al., 1983).

Además de que controla actividades catalíticas, el inhibidor natural puede estar involucrado en la translocación de protones a través de la ATP sintasa. Las partículas submitocondriales tratadas con urea pierden al sector F_1 ; cuando éste se reconstituye en las partículas carentes de F_1 , es posible recuperar la actividad hidrolítica sensible a la oligomicina y bloquear el paso pasivo de los H^+ . Si además se reconstituye al inhibidor, entonces disminuye la actividad de ATPasa y también se deprime la conductividad de los H^+ (Guerrieri et al., 1987).

Se ha mostrado que otra de las propiedades de la proteína inhibidora es disminuir el recambio de los nucleótidos unidos a la F_1 con los del medio (Klein et al., 1981). Utilizando una F_1 con un bajo contenido de nucleótidos (0.7 mol/mol de F_1) se observó que bajo la influencia del inhibidor hay 5 moles de nucleótidos unidos/mol de F_1 , uno de los cuales es un nucleótido trifosfato. La capacidad de recambio de los nucleótidos difosfato está muy disminuida en la F_1 con el inhibidor reconstituido (Di Pietro et al.,

1988). En apoyo a lo anterior, en el mismo grupo de Gautheron determinaron que, durante la hidrólisis de ATP, los nucleótidos permanecen unidos a la enzima mientras la acción de la proteína inhibidora permanece, es decir, los nucleótidos unidos siguen siendo más de 4. En contraste, cuando el inhibidor está ausente, hay un rápido recambio de la mayor parte de los nucleótidos, independientemente de que exista actividad hidrolítica o no (Penin et al., 1988).

Se infiere de lo discutido anteriormente que la inhibición producida por este péptido es de tipo no competitiva (Klein y Vignais, 1983). Para que la unión del inhibidor en la F_1 produzca un complejo F_1 -inhibidor de baja actividad hidrolítica, es requisito la preincubación con Mg-ATP, de tal manera que la F_1 realiza varios ciclos catalíticos para unirse con el inhibidor. Es probable que los productos de la hidrólisis, ADP, P_i o H^+ , induzcan una forma especial de la F_1 o de la proteína inhibidora para formar el complejo enzima-inhibidor (Schwermann y Pedersen, 1986, como revisión). Tanto la preincubación con Mg-ATP como la determinación de la actividad hidrolítica, se han realizado en los diversos trabajos con concentraciones saturantes de sustrato, y por ello no hay duda acerca de que el inhibidor natural afecta la hidrólisis multisítio. Fue hasta muy recientemente que Kalashnikova y colaboradores (1988) se hicieron la pregunta de si la proteína inhibidora afecta de algún modo a la hidrólisis realizada en un solo sitio catalítico. Al utilizar ATP en una concentración de 100 μ M, se obtenía una inhibición del 85% de la actividad hidrolítica

al adicionar a la proteína inhibidora, inhibición que se mantenía aún a concentraciones subestequiométricas de ATP (condiciones de uni-sitio). Determinaron que durante la hidrólisis de [^{14}C]ATP en estado estacionario, la F_1 une 1.2 moles de [^{14}C]nucleótidos de adenina/mol de enzima. En cambio, cuando se determinan los [^{14}C]nucleótidos unidos en una F_1 con el inhibidor reconstituido se observó que este complejo era prácticamente incapaz de unir nucleótidos en el sitio catalítico. Con estos resultados concluyeron que la F_1 con su inhibidor natural es inactiva durante la catálisis multi- y uni-sitio.

Son numerosos los resultados experimentales que sugieren que el inhibidor natural reconstituido y el endógeno no necesariamente interaccionan de la misma manera con la F_1 (Warshaw et al., 1968; Galante et al., 1981; Valdés y Dreyfus, 1987) y, por lo tanto, pueden tener diferentes efectos sobre las funciones de la F_1 . Una de las evidencias más recientes es la de Valdés y Dreyfus (1987), quienes encontraron que los patrones de inmunoprecipitación con anticuerpos anti- F_1 de la enzima membranal (en partículas submitocondriales) con inhibidor reconstituido o con inhibidor endógeno son bastante distintos. La diferencia no es solamente estructural, ya que también tiene consecuencias sobre las actividades catalíticas. Mientras que los anticuerpos estimulan la actividad hidrolítica de partículas submitocondriales con inhibidor endógeno, disminuyen la misma actividad en partículas con el inhibidor reconstituido. Para

la reacción de recambio P_i -ATP, se observa el efecto opuesto. Esto sugiere que la F_1 puede establecer interacciones distintas con su inhibidor natural y que esto puede tener consecuencias a nivel estructural y a nivel funcional.

Es necesario enfatizar que la mayor parte de los estudios sobre el inhibidor natural de la ATPasa, se ha realizado en preparaciones con el inhibidor exógeno reconstituido en la F_1 soluble o membranal. De hecho, la única preparación de F_1 soluble en donde se ha cuidado el contenido de inhibidor endógeno, es la reportada por Adolfsen et al. (1975). El complejo F_1 con su inhibidor endógeno (F_1 -I) tiene el 1% de la actividad de ATPasa de la F_1 sin inhibidor, razón por la que se le llama F_1 latente. La simple incubación de esta preparación a 60°C libera la acción de la proteína inhibidora y entonces se obtiene una F_1 con alta actividad de hidrólisis. La F_1 latente se parece más a las enzimas que se obtienen de bacterias y cloroplastos en cuanto a que éstas también son ATPasas con bajas actividades hidrolíticas, estimulables por diversos agentes (Pick y Bassilian, 1982; Dreyfus y Satre, 1984; Lotscher et al., 1984; Norling, 1986; Montero-Lomeli y Dreyfus, 1987). Estudiar propiedades del complejo F_1 -I puede dar información novedosa acerca de la H^+ -ATPasa en su estado nativo.

5. LA AUROVERTINA EN EL ESTUDIO DE LA ATP SINTASA

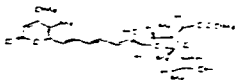
Las aurovertinas son antibióticos producidos por el hongo Calcarisporium arbuscula e introducidos por Lardy y

colaboradores (1964) en el estudio de la fosforilación oxidativa. La única proteína con la que interaccionan estos compuestos es la ATP sintasa (Chang y Penefsky, 1974). En consecuencia, inhiben todas las reacciones relacionadas con esta enzima: la fosforilación oxidativa, la reacción de recambio P_i -ATP y la hidrólisis de ATP tanto en la F_1 membranal como en la soluble (Lardy y Lin, 1969). Una de las propiedades de la aurovertina que más se ha utilizado, es su capacidad de formar un complejo fluorescente con la ATP sintasa; la aurovertina no unida prácticamente no exhibe fluorescencia, ni en agua, ni en solventes orgánicos (Lardy y Lin, 1969; Chang y Penefsky, 1973; Dunn y Futai, 1980; Satre et al., 1980). Lo más notable del complejo aurovertina- F_1 es que la intensidad de fluorescencia se ve modificada cuando se adicionan ligandos de la F_1 : ADP, ATP, Mg^{2+} y P_i , principalmente. El primero, al menos en la F_1 soluble, aumenta la intensidad de la fluorescencia, y los 3 últimos provocan un apagamiento; estos fenómenos se han interpretado como pruebas de cambios conformacionales de la F_1 inducidos por ligandos (Chang y Penefsky, 1973 y 1974; Layton et al., 1973; Satre et al., 1980; Issartel et al., 1983a y b; Lunardi et al., 1986).

Se han utilizado muchos otros métodos para demostrar que los nucleótidos provocan cambios conformacionales en la ATP sintasa. Por ejemplo, en la subunidad α de la F_1 de E. coli, el ATP unido hace que aumente su volumen parcial específico y también su coeficiente de sedimentación (Dunn, 1980); por otro lado, la sensibilidad a la tripsina de la

subunidad α es distinta a la del complejo α -ATP (Senda et al., 1983). En la F_1 de la bacteria termofílica PS3 se detectaron, por difracción circular, sitios de alta y baja afinidad para nucleótidos en las subunidades α y β , respectivamente (Ohta et al., 1980). Con otras pruebas fluorescentes, como el 8-anilino-naftaleno-1-sulfonato (ANS), se ha observado apagamiento de la fluorescencia inducido por ATP en el complejo F_1 -ANS y subunidad β -ANS (Hirano et al., 1984).

El extracto del hongo Calcarisporium arbuscula tiene una mezcla de aurovertinas, designadas como A, B, C, D y E, pero la que se utilizó desde los primeros estudios fue la aurovertina D, que es la que muestra mayor potencia para inhibir a la F_1 (Linnet y Beechey, 1979; Linnet et al., 1983). Tiene un peso molecular de 476.5 y su fórmula es:



Uno de los principales problemas para el uso de la aurovertina fue la determinación de su coeficiente de absorción. Cuando el grupo de Vignais (Issartel et al., 1983 a y b) obtuvo aurovertina D químicamente marcada con ¹⁴C se pudo determinar, por un lado, que su coeficiente de extinción es de $36\ 100\ M^{-1}\ cm^{-1}$ a 368 nm, y por otro lado, que cada F_1 contiene 3 sitios de unión para la aurovertina. Uno de ellos es de alta afinidad ($K_D = 0.2-0.3\ \mu M$) y los otros dos de menor afinidad ($K_D = 3-5\ \mu M$). La aurovertina también puede unirse a la subunidad β aislada de mitocondrias de corazón, con una $K_D = 1.1-1.3\ \mu M$ y con una estequiometría de

prácticamente 1 mol de aurovertina/ mol de subunidad ρ . Este dato, junto con el de que son 3 los sitios para unir aurovertina en la F_1 , es uno de los que se han aprovechado para concluir que la F_1 tiene 3 subunidades ρ (Issartel et al., 1983b).

Utilizando la F_1 de una cepa mutante de E. coli resistente a aurovertina (Satre et al., 1980), se identificó al residuo de arginina 398 como parte del sitio de unión para este compuesto (Lee et al., 1989). Los autores concluyen que este residuo no pertenece al dominio de unión para nucleótidos, ya que se ha sugerido que éste se encuentra entre los residuos 140-335 (Senior, 1988; Futai et al., 1989), lo cual es consistente con el hecho de que la aurovertina es un inhibidor no competitivo (Issartel et al., 1983a; Lunardi et al., 1986).

La aurovertina también se ha probado en sistemas con el inhibidor natural de la ATPasa (Van de Stadt y Van Dam, 1974; Chang y Penefsky, 1974; Harris et al., 1979; Lowe and Beechey, 1981; Issartel et al., 1983) o se ha estudiado su relación con la subunidad ρ de la F_1 de E. coli (Dunn et al., 1987). Si la aurovertina se prueba sobre partículas submitocondriales con inhibidor endógeno, preincubadas con algún sustrato oxidable, se estimula la actividad de ATPasa. La aurovertina unida en partículas sin inhibidor, evita que el inhibidor exógeno se puede reconstituir. Además, la fluorescencia de la aurovertina unida en partículas con inhibidor es mucho menor que la observada cuando el inhibidor

natural no está presente (Van de Stadt y Van Dam, 1974). Que la presencia del inhibidor natural disminuye la afinidad de la F_1 por la aurovertina fue confirmado por Chang y Penefsky (1974), quienes observaron que a medida que va disminuyendo la actividad de ATPasa de partículas submitocondriales o de la F_1 soluble por la adición de inhibidor purificado, se va perdiendo de manera paralela la respuesta de fluorescencia del complejo F_1 -aurovertina. Cuando se tiene un 90% de inhibición por el inhibidor natural, la respuesta de la fluorescencia es de un 50% de la original. Issartel y colaboradores (1983) encontraron resultados similares con respecto a la inhibición por el inhibidor natural y la fluorescencia relativa del complejo F_1 -aurovertina. Además, determinaron que en una F_1 con inhibidor reconstituido sigue habiendo 3 sitios de unión para la aurovertina, pero se pierde el sitio de alta afinidad, teniendo entonces los 3 sitios una $K_D = 2-3 \mu M$. De modo interesante, en la F_1 de E. coli que carece de la subunidad γ , la aurovertina se puede unir con una $K_D = 0.1 \mu M$, sin importar la presencia de nucleótidos. En cambio, con la subunidad reconstituida la K_D por aurovertina sigue siendo baja en presencia de nucleótidos, pero cuando no hay ADP o ATP la afinidad disminuye por más de 1 orden de magnitud ($K_D = 3 \mu M$) (Dunn et al., 1987). Se debe tener presente, nuevamente, que estos datos se han obtenido con sistemas reconstituidos y que, de acuerdo con lo discutido en la sección anterior, el complejo de la F_1 con su inhibidor endógeno, podría tener un comportamiento distinto.

II. OBJETIVOS

El trabajo estará dividido en dos partes, cada una con sus objetivos, estrechamente relacionados.

1. Es claro que no todos los nucleótidos que se ligan a la ATP sintasa tienen una función catalítica. Todavía hoy existe discusión acerca del papel de los nucleótidos que no participan directamente como sustratos. Para ellos se ha propuesto una función estructural, o bien, una función reguladora. Sobre ésta última, es para el ADP de quien más definitivamente se han encontrado sitios reguladores, que se hacen evidentes durante la hidrólisis activa (Di Pietro et al., 1980; Vasilyeva et al., 1982; Kironde y Cross, 1986; Martins et al., 1986).

De acuerdo con el "mecanismo de cambio de unión" propuesto por Boyer (como revisiones, Cross, 1988; Senior, 1988) para explicar la síntesis del ATP catalizada por la H^+ -ATP sintasa, la unión de un ligando puede provocar un cambio en la conformación de la enzima y, por la transmisión de este cambio a través de las interacciones entre subunidades, afectar la unión de otro nucleótido previamente unido. Así, la unión de un nucleótido de función reguladora o la interacción con uno involucrado directamente en la catálisis, podrían inducir diferentes estados de la F_1 , traducidos probablemente como conformaciones distinguibles.

La aurovertina se ha utilizado como monitor de cambios conformacionales de la ATP sintasa. Los trabajos reportados

se han concretado a diferenciar conformaciones inducidas por el ATP, el ADP y otros nucleótidos, o por cationes como el Mg^{2+} , que se detectan por cambios en la intensidad de fluorescencia del complejo F_1 -aurovertina (Chang y Penefsky, 1973 y 1974; Satre et al., 1980; Issartel et al., 1983a y b). Sin embargo, no es claro si en los sistemas utilizados el complejo enzima-inhibidor puede llevar a cabo la hidrólisis del ATP y si esta posible hidrólisis contribuye a los cambios de fluorescencia.

El objetivo de esta primera parte es detectar distintos estados de la F_1 -ATPasa mitocondrial durante la hidrólisis del ATP. Mientras la hidrólisis ocurre, el contenido de nucleótidos de la enzima está variando, y como precisamente el ATP y el ADP tienen consecuencias opuestas sobre la fluorescencia del complejo F_1 -aurovertina, tal sistema resulta ideal para distinguir cambios dinámicos de la F_1 trabajando. Para diseccionar cambios directamente provocados por nucleótidos ligados en sitios catalíticos, se pueden aprovechar las condiciones de catálisis uni-sitio, bajo las cuales se trabaja con los nucleótidos unidos en el sitio de alta afinidad (Grubmeyer et al., 1982; Bullough et al., 1967; Penefsky, 1968).

2. El inhibidor natural de la H^+ -ATPasa es un modulador de muchas de las actividades realizadas por esta enzima (Schwermann y Pedersen, 1986, como revisión): la fase inicial de la fosforilación oxidativa, la hidrólisis del ATP, la conducción de H^+ a través del canal F_0 y el recambio de los nucleótidos unidos con los del medio. El inhibidor tiene

influencia sobre los sitios reguladores que se han propuesto para el ADP (Di Pietro et al., 1986; Penin et al., 1988), pero aún no es claro si tiene efectos directos sobre lo que ocurre en los sitios catalíticos, sobre todo porque, según lo reportado por Kalashnikova y colaboradores (1988), el complejo F_1 -inhibidor no lleva a cabo la hidrólisis unisitio, ni la multisitio. Si esto es así, la actividad registrada para esta preparación se remite a la catálisis realizada por la F_1 contaminante, sin inhibidor. No obstante, de acuerdo a lo que se discutió en "Introducción", el complejo F_1 con su inhibidor endógeno (F_1 -I) puede tener un comportamiento distinto al del complejo reconstituido, y de aquí la necesidad de insistir sobre las propiedades de la F_1 latente bajo condiciones de hidrólisis unisitio y multisitio.

Por otra parte, sobre la misma línea planteada en el "Objetivo 1", el inhibidor endógeno puede tener una interacción distinguible con la F_1 -ATPasa en reposo o con aquella que está hidrolizando activamente. Si esto se debe a diferentes conformaciones de la enzima, nuevamente la aurovertina se puede utilizar para detectarlas. Concretamente, lo que se pretende en la segunda parte del trabajo es:

- a) Estudiar el efecto de la aurovertina sobre el complejo F_1 -inhibidor endógeno, bajo condiciones de hidrólisis o en ausencia de ellas.
- b) Determinar si existe una influencia directa del inhibidor natural, unido en su sitio nativo, sobre los nucleótidos en los sitios catalíticos de la ATP sintasa.

III. MATERIALES Y METODOS

PREPARACIONES BIOLÓGICAS

1. AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS DE CORAZÓN DE RES

Se parte de corazones de vaca frescos obtenidos del rastro. Se siguió el método de Löw y Vallin (1963). Todo el procedimiento se realiza a 4°C. Se elimina el tejido conjuntivo y la grasa y se muele la carne. A cada 400 g de carne molida se añaden 1.2 l de un amortiguador de sacarosa 0.25 M, EDTA 0.015 M y Tris-Cl 0.005 M, pH 7.4. Utilizando una solución saturada de Tris se ajusta el pH de la suspensión a 8.0 y se homogeneiza en períodos de 5 s durante 1 min en una licuadora comercial Waring. Se reajusta el pH a 8.0 con Tris saturado.

El homogeneizado se centrifuga a 3,000 rpm durante 10 min, en un rotor Sorvall GSS. El sobrenadante se filtra a través de 2 capas de gasa y se vuelve a centrifugar, esta vez a 10,000 rpm, 10 min, en un rotor Sorvall GSA. Se elimina el sobrenadante; la pastilla precipitada se resuspende en amortiguador de sacarosa 0.25 M, Tris-Cl 0.005 M, pH 7.4, y se homogeneiza por medio de un Potter; se vuelve a centrifugar a 10,000 rpm, 10 min. Se separan las dos fracciones de precipitado, la superior o mitocondrias ligeras y la inferior o mitocondrias pesadas. Con la solución de sacarosa 0.25 M, Tris 0.005 M, pH 7.4, se ajusta la concentración de proteína a 60 mg/ml aproximadamente. Las mitocondrias se almacenan a -70 °C.

2. OBTENCION DE LA F₁-ATPasa MITOCONDRIAL.

Partiendo de partículas submitocondriales de EDTA (Knowles y Penefsky, 1972) se solubiliza, entre otras proteínas, a la F₁-ATPasa, que se purifica mediante una cromatografía de afinidad (Tuena de Gómez-Puyou y Gómez-Puyou, 1977).

a) Partículas Submitocondriales de EDTA(Knowles y Penefsky, 1972).

Si se inicia esta preparación con 2-2.5 g de mitocondrias se obtienen aproximadamente 600 mg de partículas y unos 10-15 mg de F₁-ATPasa. Las mitocondrias (ligeras o pesadas) se llevan a una concentración de 20 mg de proteína/ml en un medio de sacarosa 0.25 M, EDTA 0.002 M (pH 7.4), ajustándose el pH hasta 8.7 con una solución saturada de Tris. Se sonica en alícuotas de 50 ml durante 5 períodos de 45 s y 15 s de descanso, en un sonicador Branson 250. La temperatura se mantiene alrededor de 10°C con un baño de agua y hielo. Se centrifuga a 15,000 rpm durante 15 min en un rotor Sorvall SS34.

La pastilla precipitada se descarta y el sobrenadante se centrifuga a 160,000 x g, 45 min a 4°C. La pastilla se resuspende con sacarosa 0.25 M hasta un volumen similar al inicial y se centrifuga bajo las mismas condiciones anteriores. Finalmente, el precipitado se resuspende en un pequeño volumen de sacarosa 0.25 M, para que la concentración de proteína sea mayor a 30 mg/ml. La actividad de ATPasa debe

estar alrededor de $2.5 \mu \text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Se almacenan en nitrógeno líquido.

b) Purificación de la F_1 -ATPasa (Knowles y Penefsky, 1972; Túena de Gómez-Puyou y Gómez-Puyou, 1977).

La concentración de la partículas de EDTA se lleva a 30 mg de proteína/ml en un medio de sacarosa 0.1 M, ATP 0.004 M y EDTA 0.002 M (pH 7.4) (medio de ATP). Usando una solución de NH_4OH 1 N, se ajusta el pH a 9.2. Se sonica durante períodos de 2 min y 1 min de descanso, 5 veces, cuidando de mantener la temperatura entre 35 y 40°C. A partir de este momento, el resto de los pasos se realiza a temperatura ambiente.

Se centrifuga a 160,000 x g durante 60 min. El pH del sobrenadante se lleva a 5.4 con ácido acético 3 N e inmediatamente se centrifuga a 15,000 rpm en un rotor Sorvall SS34. Se decanta el sobrenadante y se reajusta el pH a 8.0 con Tris saturado. Es importante que el procedimiento descrito en los 4 renglones anteriores se lleve a cabo en 5 min.

En este sobrenadante se encuentra la porción soluble F_1 de la ATPasa y para purificarla se aprovecha su afinidad por el hexilamonio, análogo estructural de la octilguanidina, un inhibidor reversible por KCl de esta enzima. Así, el sobrenadante se pasa por una columna (1.5 x 10 cm) de Sefarosa-hexilamonio (Pharmacia), previamente equilibrada con medio de ATP (sacarosa 0.1 M, ATP 0.004 M, EDTA 0.002 M, pH 8.0), con un flujo de 1 ml/2.5 min,

colectando fracciones de 6 ml. Se lava con 60 ml de medio de ATP y se eluye con este mismo medio pero con KCl 1 M; en este paso se colectan fracciones de 3 ml. Típicamente, la actividad de ATPasa se obtiene entre las fracciones 5 y 6. Dichas fracciones se precipitan por separado con un volumen de una solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7.4 y se dejan incubando en hielo durante 30 min, luego de los cuales se centrifugan a 15, 000 rpm, 15 min a 4°C. El precipitado se resuspende, a temperatura ambiente, con un mínimo volumen de medio de ATP y posteriormente se agrega el mismo volumen de sulfato de amonio saturado. La F_1 -ATPasa así resuspendida se guarda a 4°C. Su actividad hidrolítica óptima es mayor a las $90 \mu\text{mol de ATP min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

3. OBTENCION DEL COMPLEJO F_1 -PROTEINA INHIBIDORA (F_1 -I).

En su estado nativo la ATP sintasa de la mitocondria se encuentra asociada con la proteína inhibidora. De aquí la importancia de obtener este complejo y estudiarlo. Para su purificación se utilizan, con modificaciones, los métodos reportados por Adelfsen et al. (1975) y por Tuena de Gómez-Puyou y Gómez-Puyou (1977). Se preparan partículas submitocondriales de Mg-ATP , cuya principal característica es tener un alto contenido de la proteína inhibidora; a partir de ellas se solubiliza el complejo F_1 -I y se purifica, con algunos cambios, mediante la cromatografía de afinidad descrita para la F_1 .

a) Preparación de Partículas Submitocondriales de Mg-ATP.

Se llevan las mitocondrias (ligeras o pesadas) a 10 mg de proteína/ml con un medio que contiene sacarosa 0.25 M, ATP 0.006 M y acetato de magnesio 0.006 M. El pH se ajusta a 6.9 con una solución concentrada de NaOH. La sonicación y las centrifugaciones posteriores se realizan de la misma manera como se describió para las partículas de EDTA. La actividad de ATPasa de las partículas de Mg-ATP debe ser menor a $1 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Los rendimientos de proteína son similares a los mencionados para la F₁.

b) Purificación del complejo F₁-I.

A 600 mg de partículas de Mg-ATP se les ajusta el volumen a 50 ml con un medio de Mes-Tris 0.02 M (pH 6.8), sacarosa 0.25 M, KCl 0.2 M. Se centrifuga 45 min a 160,000 x g, 4°C. El sobrenadante se descarta y la pastilla se resuspende con 50 ml de sacarosa 0.25 M. Se sonica durante 2 min y 1 min de reposo, 10 veces; es muy importante mantener la temperatura a $20 \pm 5^\circ\text{C}$ con un baño de agua y hielo. Se agrega 1 ml de Mes-Tris 0.5 M (pH 6.8) y se centrifuga como se describió anteriormente. El sobrenadante se guarda en hielo, añadiendo ADP para obtener 0.1 mM final y la pastilla se vuelve a sonicar y a centrifugar. Se agrega ADP (0.1 mM), se juntan ambos sobrenadantes y se centrifugan a 160,000 x g, 4°C, durante 90 min. Con este sobrenadante se lleva a cabo la cromatografía en Sefarosa-hexilamonio.

La columna (2 x 4 cm) debe encontrarse equilibrada con medio de ADP (sacarosa 0.25 M, Mes-Tris 0.02 M y ADP 0.01M, pH 6.8). El sobrenadante anterior se pasa con un flujo de 1 ml/ 1.1 min, colectando fracciones de 6 ml. Se lava con 100 ml de medio de ADP (1 ml/ 0.5 min) y se eluye con este mismo medio pero añadiendo KCl 0.5 M (1 ml/ 1.1 min) y colectando fracciones de 1 ml. Se juntan las fracciones con proteína y actividad de ATPasa y se agregan 313 mg de sulfato de amonio sólido/ ml de solución. Se incuba 30 min en hielo, se centrifuga a 15, 000 rpm, 15 min y la pastilla se resuspende con un volumen mínimo de sacarosa 0.25 M, Mes-Tris 0.02 M y ADP 0.1 mM. El complejo F₁-I se guarda en alícuotas de unos 10 l a -70°C. Su actividad de ATPasa debe encontrarse alrededor de 1 mol min⁻¹ mg⁻¹.

4. OBTENCION DE LA AUROVERTINA

La aurovertina es un antibiótico producido por el hongo Calcarisporium arbuscula. Para su aislamiento se extrae con solventes orgánicos tanto el medio de cultivo como el micelio del hongo. Posteriormente los componentes del extracto se separan por cromatografía en capa fina y se separa la banda correspondiente a la aurovertina.

a) Cultivo del hongo Calcarisporium arbuscula (Linnett y Beechey, 1979).

Se utilizó el organismo C. arbuscula (NRRL 3705) obtenido de USDA ARS Culture Collection. Se crece en frascos que contienen medio de Ushinsky:

glicerol	40.0 ml
lactato de amonio	10.0 g
NaCl	5.0 g
ácido aspártico	4.0 g
K ₂ HPO ₄	2.5 g
MgSO ₄	0.4 g
CaCl ₂	0.1 g

Se disuelve en 1 l de agua destilada y se ajusta el pH a 7.0

Los frascos inoculados se mantienen a 26°C en la oscuridad. Aproximadamente en 10 ó 20 días el micelio ha cubierto la superficie del medio y tanto el micelio como el medio han adquirido un color amarillo.

b) Obtención de extracto de Calcarisporium arbuscula.

Todo el procedimiento se realiza con luz verde o tenue. A 25 ml del medio de cultivo, incluyendo el micelio, se agregan 5 volúmenes de acetona y se agita vigorosamente

durante 1 ó 2 h. Se pasa a través de un filtro de vidrio y el material insoluble se vuelve a extraer con acetona (unos 50 ml). Se juntan los extractos de acetona (x ml), se les adiciona agua destilada (x/2 ml) y se extrae 3 veces con cloroformo (x/2 ml) utilizando un embudo de separación. Se combinan los extractos de cloroformo y se secan agregando $MgSO_4$ o $MnSO_4$. El extracto seco se filtra, se evapora el cloroformo en un rotavapor y se almacena a $-70^{\circ}C$ protegido de la luz.

c) Aislamiento de la aurovertina.

El extracto cloroformico descrito en el párrafo anterior se aplica a placas de sílica-gel de 2 mm de espesor con indicador fluorescente 60 F₂₅₄ (Merck 5717) y se corre con una mezcla de cloroformo-acetona (4:1). Las bandas se observan con luz ultravioleta de 360 nm y se separa la zona con R_f entre 0.26 y 0.56, correspondiente a las bandas de aurovertina B y D primordialmente. La elución se realiza con unos 100 ml de metanol, pasando a través de un filtro de vidrio, evaporando en un rotavapor y, finalmente, con una corriente de N_2 , dejando un volumen mínimo. Se determina la concentración sabiendo que E_{368} de una solución 1 M es de 36, 100 (Issartel et al., 1963).

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

1. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINA.

a) Método del biuret (Gornall et al., 1949).

Este método se utilizó, con modificaciones para proteínas membranales, para cuantificar la proteína de las suspensiones de mitocondrias y partículas submitocondriales. A una fracción que contenga de 0.1-2.0 mg de proteína se le agregan 0.8 ml de agua, 0.2 ml de desoxicolato de sodio al 2% y 2.0 ml del reactivo de biuret (1.5 g de CuSO_4 y 6.0 g de tartrato de Na y K se llevan a 500 ml con agua; se agregan 300 ml de NaOH al 10% y se afora a 1 l. Toda la solución se hace con agua destilada y hervida). Se agita e incuba durante 15 min y se lee a 540 nm contra un tubo blanco sin proteína. Para la curva estándar se usa albúmina de bovino; 1 mg de albúmina en el ensayo produce una absorbancia de 0.085.

b) Método de Lowry modificado (Markwell et al., 1978).

Se usó para medir la proteína de las soluciones de F_1 y del complejo F_1 -1. El volumen de una fracción que contenga entre 1 y 100 μg de proteína se completa a 1 ml con agua y se le añaden 3 ml de solución C (ver abajo). Después de agitar y de incubar durante 10 min a temperatura ambiente se agregan, al mismo tiempo que se agita, 0.3 ml de solución D (ver abajo). Luego de 45 min a temperatura ambiente se lee, contra un tubo blanco sin proteína, a 660 nm. La curva estándar se

hace con albúmina de bovino; en el ensayo, 10 μ g de albúmina tienen una absorbencia de 0.05. Las soluciones utilizadas son:

- Solución A: Na_2CO_3 al 2%, NaOH al 0.4%, tartrato de Na_2 al 0.16% y SDS al 1 %
- Solución B: $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ al 4%
- Solución C: 100 volúmenes de solución A/ 1 volumen de solución B
- Solución D: 1 volumen de reactivo de Folin-Ciocalteu/ 1 volumen de H_2O .

Las soluciones C y D deben utilizarse recién preparadas.

2. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE ATPasa

La actividad para hidrolizar el ATP de la F_1 en las diferentes preparaciones se cuantificó por 3 diferentes métodos, según la sensibilidad requerida.

a) Método de Fiske y Subbárow (1925).

Una muestra de proteína (30 μ g de partículas submitocondriales, 1 μ g de F_1 ó 5-30 μ g de complejo F_1 -1) se lleva a un volumen de 0.1 ml con sacarosa 0.25 M, Tris-Cl 0.005 M, pH 7.4. Se añaden 0.25 ml de un medio de reacción que contiene: Tris- SO_4 0.1 M, pH 7.8, ATP 4.2 mM (3 mM final), MgCl_2 7 mM (5 mM final), fosfoenolpiruvato 5.6 mM (4 mM final) y 3.65 U de piruvato cinasa/ ml. Se incuba a 30°C (5-10 min para las partículas submitocondriales y para F_1 -I y de 0.5-1 min para la F_1) y se detiene la reacción por la adición de 0.1 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 30%,

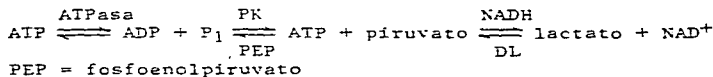
dejando los tubos en hielo. Paralelamente, 0.1 ml de la enzima en sacarosa se agregan directamente en 0.1 ml de TCA, antes de añadir el medio de reacción (blancos con TCA). Se centrifuga durante 5 min en una centrifuga clínica y del sobrenadante se toman 0.2 ml que se agregan a 0.8 ml de agua. A esta mezcla se añaden 0.25 ml de una solución de molibdato (a 800 ml de agua destilada se agregan lentamente, en frío, 111 ml de H₂SO₄ 36 N y, posteriormente, 50 g de molibdato de amonio; el volumen se completa a 1 l con agua) y 0.25 ml de una solución de Elon (Kodak) (10 g de sulfato de elon y 30 g de metabisulfito de Na se aforan a 1 l con agua). Luego de 15 min de incubación a temperatura ambiente, se leen las muestras a 660 nm contra un tubo blanco (1 ml de agua, 0.25 ml de molibdato y 0.25 ml de Elon). La curva estándar se hace a partir de una solución 2.5 mM de H₃PO₄, de la cual 250 nmolas producen una absorbencia de 0.34. Para calcular la actividad de ATPasa se aplica la fórmula:

$$\text{Actividad } (\mu\text{mol/mg}) = (\text{D.O. muestra} - \text{D.O. blanco con TCA}) \times \frac{[\text{vol de reacción (0.45 ml)} / \text{vol sobrenadante (0.20 ml)}] \times [250 \text{ nmolas P}_1 / \text{D.O. 660 nm (0.34)}]}{\times 1 / \text{proteína } (\mu\text{g})}$$

Se puede dividir entre el tiempo de reacción a 30°C para obtener la actividad en $\mu\text{mol/min/mg}$.

b) Método espectrofotométrico (Pullman et al., 1960).

Este método se basa en el acoplamiento de las actividades enzimáticas de la ATPasa, de la piruvato cinasa (PK) y de la deshidrogenasa láctica (DL):



Se cuantifica la pendiente de desaparición del NADH sabiendo que el E_{340} es de $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

La muestra de ATPasa se agrega en 2 ml de un medio de reacción, cuya absorbencia se ha ajustado previamente a 1.0 y que contiene: 2 ml de sacarosa 50 mM/ Tris 50 mM (pH 8.0)/ KCl 30 mM/ MgCl_2 3 mM, ATP 3 mM, fosfoenolpiruvato 1.5 mM, 5.5 U de piruvato cinasa, 30 U de deshidrogenasa láctica y 0.207 mM de NADH. La actividad de ATPasa se calcula de acuerdo con:

$$\text{Actividad} = \frac{\text{D.O.} \times 2 \text{ ml}}{6.22 \times 1 \text{ min} \times \text{proteína (mg)}} \text{ (}\mu\text{mol/min/mg)}$$

c) Cuantificación de $^{32}\text{P}_i$ liberado (De Meis et al. 1983).

Se determina la cantidad de $^{32}\text{P}_i$ liberado a partir de una alícuota de [γ - ^{32}P]ATP presente en el medio de reacción. Para marcar el ATP en el fosfato gamma con $^{32}\text{P}_i$ se lleva a cabo el siguiente procedimiento (Clynn y Chappell, 1964):

Cinco mCi de $^{32}\text{P}_i$ se dejan reaccionar durante 60 min a 26°C con una mezcla de reacción que contiene Tris-Cl 50 mM (pH 8.1), MgCl_2 6 mM, cisteína 2 mM, 3-fosfoglicerato 1 mM, ATP 5 mM, NADH 0.4 mM, EGTA-K 1 mM, 0.1 ml de -mercaptoetanol, 200 μg de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y 140 μg de 3-P-gliceratocinasa. Después de incubado se añaden 50 ml de etanol y se lava el frasco o tubo de reacción con 10 ml de etanol al 17% (v/v). Se liofiliza hasta casi secar y se pasa por una columna (3.5 x 0.5 cm) con 1 g de resina AG 1x8 (BioRad). Se carga la columna después de

filtrar el líquido a través de papel Whatman 1, lavándolo con 10 ml de agua y se eluye con 40 ml de NH_4Cl 20 mM en HCl 0.02 N para eliminar el AMP, el ADP y el P_i . Posteriormente, se lava con agua para deshacerse del NH_4^+ y finalmente el $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ se eluye con HCl 0.25 N. Los 15-17 ml que se obtienen se colectan en hielo y el pH se ajusta a 6.8 con unos 3-3.4 ml de una solución de Tris 1 M.

Para medir el $^{32}\text{P}_i$ producto de la actividad de ATPasa de la F_1 o del complejo $\text{F}_1\text{-I}$ se toma una alícuota de 0.3-0.5 ml (según los experimentos que se describirán más adelante) y se la añaden 0.3 ml de acetona, 0.5 ml de reactivo de molibdato (descrito anteriormente en el Método de Fiske-SubbaRow) y 1.0 ml de acetato de butilo. Los tubos "blanco" contienen lo mismo que los problema, sólo que sin añadir proteína. Se mezcla en un agitador Vortex durante 1 min, se centrifuga en una centrífuga clínica durante 30 s. En la fase orgánica (superior) se encuentra el complejo fosfomolibdato y de ella se toma una muestra de 0.5-1.0 ml que se coloca en un papel filtro (3.0 x 9.0 cm); se deja secar y se coloca en viales que contienen la mezcla de centelleo de Bray (5.5 g de 2, 5-Difeniloxazol (PPO) y 0.125 g de 1,4-Bis (5-feniloxazol-2-il)benceno (POPOP) en 1 l de tolueno). La radioactividad se determina en un contador de centelleo Beckman LS 100C. La actividad de ATPasa se calcula de la siguiente manera:

Actividad (nmolas P_i /mg proteína) = (cpm problema - cpm "blanco") x [(vol. reacción/ vol. sobrenadante) x (vol. total fase orgánica/ vol. muestra en papel filtro) x (1/Actividad Específica $^{32}\text{P}_i$ en el medio de reacción) x (1/proteína (mg))]

d) Estimulación de la actividad de ATPasa del complejo F₁-I.

Es posible liberar a la F₁ de la acción de la proteína inhibidora, incubando al complejo en un medio con ATP, en ausencia de magnesio y a una temperatura de 50°C (Adolfson et al., 1975; Feinstein y Moudrianakis, 1964). El resultado es una estimulación de su actividad de ATPasa y representa un criterio que indica que la baja actividad hidrolítica de la F₁-latente se debe a su interacción con la proteína inhibidora.

El medio de activación contiene Tris-Ac 0.05 M, ATP 0.01 M, EDTA 1.3 mM y sacarosa 0.25 M. Cuando la temperatura es de 50°C se agrega F₁-I para obtener una concentración de 0.02 mg/ml. A diferentes tiempos (de 0.5 a 60 min) se toman alícuotas de 0.24 ml que se colocan en tubos que contienen 0.01 ml de MgCl₂ 0.125 M (concentración final, 5 mM). La reacción de hidrólisis que así se inicia se incuba a 30 °C y se detiene por la adición de 0.1 ml de ácido tricloroacético al 30%. Para cada diferente tiempo de incubación en el medio de activación se toma una alícuota que directamente se añade en 0.1 ml de ácido tricloroacético. La absorbencia de éstas se descuenta de las obtenidas en los tiempos correspondientes, midiendo la actividad de ATPasa por el método de Fiske y SubbaRow (ver arriba).

3. INTERACCION DE LA AUROVERTINA CON LA F₁ Y CON EL COMPLEJO F₁-I.

a) Filtración-Centrifugación de F₁ y de F₁-I en columnas de columnas de Sephadex G-50.

Para los experimentos que se describen a continuación se eliminaron los nucleótidos recambiables de la F_1 y del complejo F_1 -I por centrifugación rápida de la enzima en columnas de 1 ml con Sephadex G-50 fino (Penefsky, 1977). La resina estaba equilibrada con sacarosa 0.15 M, Tris 0.01 M (pH 7.4), glicerol al 7.5% (v/v) (STG). Una alícuota concentrada de enzima (15-30 mg/ml), cuyo volumen no debe sobrepasar los 50 μ l, se aplicó en la columna e inmediatamente se centrifugó, recibiendo en un tubo de ensaye. Lo anterior se realiza a temperatura ambiente si la enzima es F_1 o a 4°C si es F_1 -I.

b) Efecto de la aurovertina sobre la actividad de la ATPasa.

La aurovertina posee 3 sitios de unión en la F_1 , 1 por cada subunidad ; 1 de ellos es de alta afinidad ($K_D = 1 \mu$ M) y dos tienen menor afinidad ($K_D = 4-6 \mu$ M) (Issartel et al., 1983). Para asegurarse de la ocupación de estos tres sitios, se hicieron curvas temporales y curvas de concentración de aurovertina con la F_1 . El medio de incubación utilizado fue STG, con objeto de hacer comparables los experimentos donde se determinó la actividad de ATPasa con aquéllos donde se midió la fluorescencia (ver más adelante). La solución de aurovertina en metanol se adicionó en 0.1 ml del medio STG, cuidando de no sobrepasar del 5% de metanol en el medio, para evitar efecto del solvente sobre la ATPasa. No obstante, se hicieron los controles adecuados con las cantidades equivalentes de metanol. Se agregaron 1-2 μ g de F_1 ó 15-30 μ g de F_1 -I y se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad.

El efecto máximo de la aurovertina sobre la actividad de ATPasa se presentó a las 1.5 ó 2 horas de incubación. Después de este tiempo se agregó el medio de reacción y se determinó la actividad de ATPasa como se indicó anteriormente.

c) Determinación de la fluorescencia del complejo F₁-aurovertina.

La aurovertina es un compuesto que posee una fluorescencia basal que aumenta cuando se encuentra unida a la F₁ (Chang y Penefsky, 1973). La fluorescencia se siguió usando un fluorómetro Aminco SLM. Las longitudes de onda de excitación y de emisión fueron 385 y 475 nm, respectivamente, de acuerdo con los espectros de excitación y de emisión que se presentan en la Fig. IV. Después de incubar a la aurovertina con la F₁, según se describió en la sección anterior, se agregó el complejo F₁-aurovertina en una cubeta con 2 ml de SIG. Las concentraciones de F₁ y de aurovertina en la cubeta fueron 50 y 200 nM, respectivamente. Tanto la fluorescencia como la actividad de ATPasa de esta preparación fue estable cuando menos durante 10 h. En presencia del glicerol la fluorescencia de F₁-aurovertina aumenta en un 20%.

4. OTROS PROCEDIMIENTOS

a) Determinación de la concentración de los nucleótidos en solución.

Para determinar las concentraciones de las soluciones de ATP y de ADP se utilizó un $E_{259} = 15.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Grubmeyer et al., 1982).

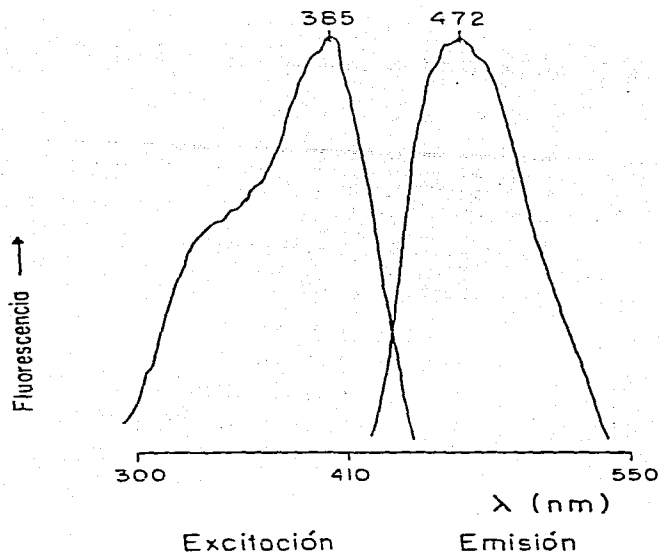


FIG. IV. Espectros de Excitación y de Emisión de la Aurovertina. Los espectros se hicieron utilizando aurovertina 1 μM en sacarosa 0.15 M, Tris 0.01 M (pH 7.5) y glicerol al 7.5% (v/v). La longitud de onda de emisión para el espectro de excitación fue de 470 nm y la longitud de onda de excitación para el de emisión fue de 385 nm.

IV. RESULTADOS

PARTE I. CAMBIOS CONFORMACIONALES DEL COMPLEJO F₁-AUROVERTINA DURANTE LA CATALISIS UNISITIO Y MULTISITIO.

En los estudios realizados sobre los cambios de fluorescencia del complejo F₁-aurovertina provocados por la adición del ATP, no es claro si bajo las condiciones experimentales puede o no llevarse a cabo la hidrólisis de este sustrato, y si la presencia de productos de esta actividad contribuye o no a los cambios de fluorescencia registrados (Chang y Penefsky, 1973, 1974; Satre et al., 1980; Issartel et al., 1983a y b; Lunardi et al., 1986). Por esta razón se hizo un curso temporal de la actividad de hidrólisis de ATP del complejo F₁-aurovertina que, según se muestra en la Tabla I, es capaz de catalizar esta reacción aunque a bajas velocidades.

TABLA I

Actividad hidrolítica del complejo F₁-aurovertina.

El complejo F₁-aurovertina se preparó según se describe en "Procedimientos Experimentales". La concentración de ATP en el medio fue de 1.5 mM, sin Mg²⁺ añadido. A los tiempos señalados se tomaron alícuotas de 0.2 ml que contenían 2 µg de enzima; se agregaron 0.05 ml de ICA al 90% para parar la reacción y se cuantificó la cantidad de ³²P_i liberado al medio, como se describe en "Procedimientos Experimentales".

Tiempo min	Actividad Hidrolítica µmol/ mg
0.17	0.60
1.0	0.88
3.0	1.49
10.0	2.33

Al agregar ATP 1.5 mM al complejo F_1 -aurovertina se puede observar, de acuerdo a lo que ya se había reportado, que existe un apagamiento de la fluorescencia (Fig. 1A); sin embargo, si la cantidad de ATP adicionada se disminuye hasta 0.03 mM, entonces se observa un apagamiento seguido de una recuperación de la intensidad de fluorescencia, sobrepasando el nivel original (Fig. 1B). Tanto el tiempo de apagamiento de la fluorescencia como la velocidad de la regeneración de la intensidad son dependientes de la concentración de ATP que genera el cambio (Tabla II).

TABLA II

Efecto de distintas concentraciones de ATP sobre la fluorescencia del complejo F_1 -aurovertina

En todos los casos se mantuvo constante la concentración de F_1 en 50 nM. Se determinó el tiempo transcurrido para obtener el nivel mínimo de fluorescencia (tiempo de apagamiento de fluorescencia) provocado por la adición de ATP en las concentraciones indicadas. También se midió la pendiente máxima del trazo durante la regeneración de la intensidad de fluorescencia (velocidad de regeneración). Las condiciones para determinar la fluorescencia se describieron en "Procedimientos Experimentales".

ATP mM	Tiempo de Apagamiento s	Velocidad de Regeneración $\mu F/s^a$
0.50	80.	ND ^b
0.20	53	ND
0.10	35	0.05
0.08	26	0.08
0.06	25	0.16
0.04	21	0.25
0.02	18	0.50

^a pendiente de la recuperación de la fluorescencia
^b No determinada

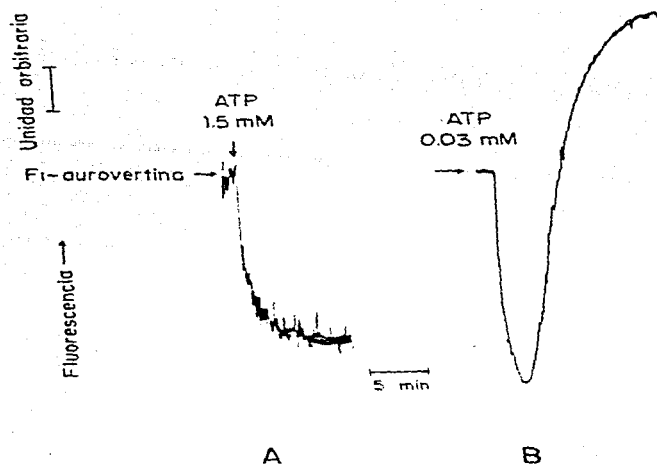


FIG. 1. Cambio de Fluorescencia inducido por el ATP del Complejo F_1 -Aurovertina. Después de que se estabilizó la fluorescencia del complejo F_1 -aurovertina (50 nM de F_1 y 100 nM de aurovertina), en las condiciones indicadas en "Procedimientos Experimentales", se añadió ATP 1.5 mM (A) e 0.03 mM (B), según se señala con las flechas.

Si en el medio se agrega EDTA, entonces la velocidad de regeneración de la fluorescencia después del apagamiento inducido por ATP, disminuye considerablemente (Tabla III) y, de manera paralela, la actividad hidrolítica del complejo F₁-aurovertina en presencia de EDTA 0.05 mM es 20 veces menor a la del complejo sin EDTA (Tabla IV; comparar con Tabla I):

TABLA III

Recuperación del apagamiento de fluorescencia del complejo F₁-aurovertina inducido por ATP, en presencia de diferentes concentraciones de EDTA.

La concentración de F₁ en la cubeta era de 50 nM. El apagamiento de la fluorescencia se indujo por la adición de ATP 0.03 mM. Se determinó la pendiente del trazo cuando la intensidad de fluorescencia empezó a aumentar.

EDTA	Velocidad de regeneración
mM	ΔF/ min
0.0	5.8
0.010	4.0
0.015	3.8
0.020	1.5
0.025	0.9

TABLA IV

Hidrólisis de ATP del complejo F₁-aurovertina
en presencia de EDTA

El experimento se hizo del mismo modo como se describió en la Tabla I, sólo que agregando, donde se indica, EDTA 0.05 mM

Tiempo min	Actividad hidrolítica μ mol/ mg	
	ATP 0.03 mM EDTA 0.0 mM	ATP 0.03 mM EDTA 0.05 mM
0.17	0.32	0.02
1.0	0.84	0.04
3.0	1.16	0.11
10.0	1.21	0.43

En la Figura 2 se muestra que el Mg²⁺ es capaz de revertir el efecto del EDTA sobre la recuperación de la fluorescencia. Es decir, la adición de MgCl₂ 0.06 mM en un medio con EDTA 0.05 mM permite la recuperación de la fluorescencia de un trazo cuya intensidad había disminuido por la adición de ATP 0.03 mM.

La Figura 3 resume todas las condiciones presentadas hasta el momento y muestra la cantidad porcentual de ATP que permanece en el medio después de que, a diferentes tiempos, el complejo F₁-aurovertina ha consumido parte del sustrato. Cuando la concentración inicial de ATP es 1.5 mM, todavía a los 10 min existe un 98% de la cantidad inicial de ATP en el medio. En cambio, cuando la concentración de ATP es de 0.03 mM, en prácticamente 1 min de reacción ya se ha consumido el 50% del ATP. Con esta misma concentración de nucleótido, pero

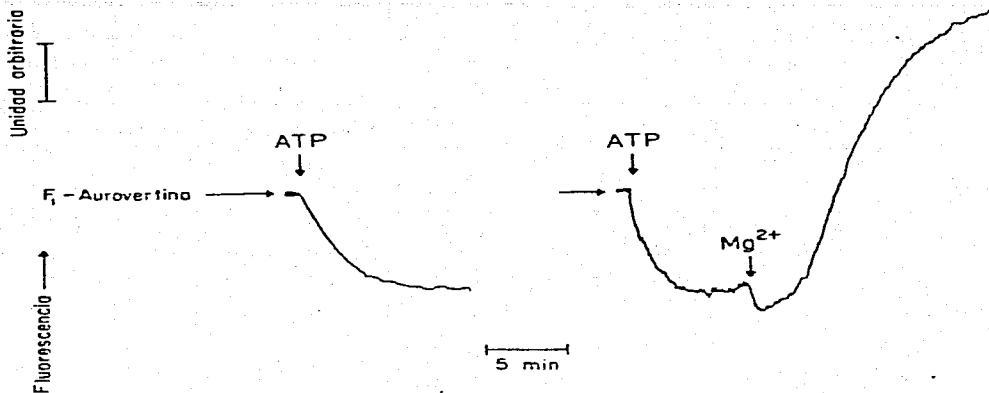


FIG. 2. Efecto del Mg^{2+} sobre el Cambio de Fluorescencia, inducido por el ATP, del Complejo F₁-Aurovertina, en presencia de EDTA. Se añadió ATP 0.03 mM donde lo indican las flechas, en un medio (STG) que contenía EDTA 0.05 mM (trazo de la izquierda); en el trazo de la derecha se agregó $MgCl_2$ 0.06 mM donde se señala.

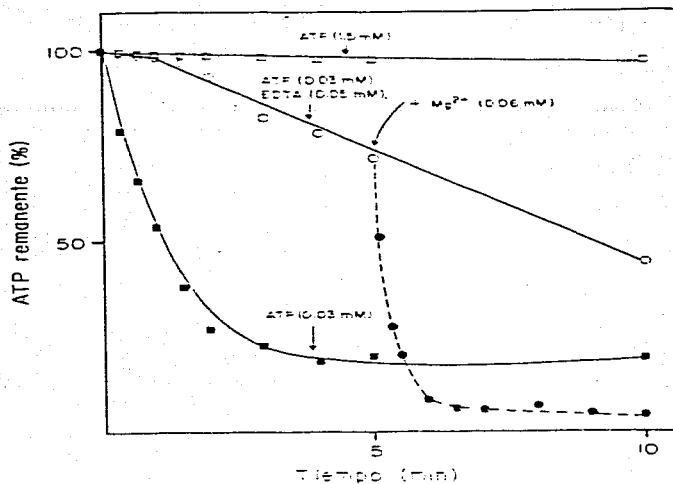


FIG. 3. ATP consumido por la Actividad Hidrolítica del Complejo F₁-ATPase. F₁-ATPase (50 μM de F₁ y 100 μM de ATPase) se añadió a SIG y se fueron tomando alícuotas de 0.2 ml en los tiempos indicados. El ³²P_i liberado se cuantificó como se describe en "Procedimientos Experimentales". Las concentraciones de ATP usadas fueron de 1.5 μM (○—○) y de 0.03 μM (■—■). En —●—●— había ATP 0.03 μM y EDTA 0.05 μM y en —○—○— se realizó en estas mismas condiciones; la flecha indica la adición de MgCl₂ 0.06 μM al medio.

en presencia de EDTA 0.05 mM, todavía queda el 44% del ATP original después de 10 min. En esta última condición, la adición de $MgCl_2$ 0.06 mM permite el rápido consumo del ATP.

Los resultados anteriores sugieren que el ATP puede inducir un apagamiento de la fluorescencia del complejo F_1 -aurovertina y una posterior regeneración, siempre y cuando el ATP se pueda hidrolizar y, además, la cantidad presente sea limitada y se consuma en el tiempo durante el cual se registra el trazo. Mientras haya ATP en el medio, el aumento de fluorescencia no se observa. Así, en presencia de fosfoenolpiruvato y piruvato cinasa el ADP producido durante la hidrólisis es regenerado nuevamente hacia ATP, evitando la recuperación de la fluorescencia (Fig. 4). Si el nucleótido inductor del apagamiento de la fluorescencia es un sustrato no hidrolizable, como por ejemplo el AMP-PNP, el aumento de la intensidad de la fluorescencia no se registra (Fig. 5), a pesar de que la concentración de AMP-PNP utilizada fue de 0.01 mM. Si se evita la hidrólisis del ATP, tampoco hay regeneración del trazo de fluorescencia. De hecho, el complejo aurovertina- F_1 membranal, utilizando partículas submitocondriales, responde al ATP 0.03 mM de manera muy similar a como lo hace la F_1 -aurovertina en solución (Fig. 6, trazo de la izquierda). Si las partículas se preincuban con un inhibidor del canal de H^+ como la oligomicina, el ATP provoca el apagamiento de la fluorescencia pero ya no existe la recuperación (Fig. 6, trazo de la derecha). Es necesario aclarar que, en este caso, la regeneración de la intensidad de fluorescencia no llega a rebasar el nivel original,

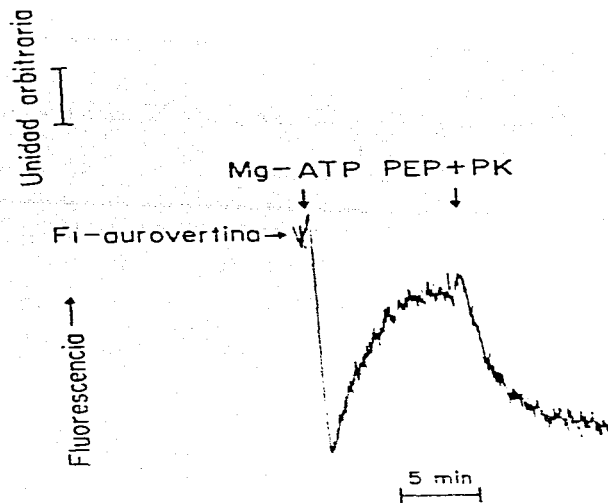


FIG. 4. Fluorescencia del Complejo Fi-Aurovertina inducida por el ATP. Efecto de la Adición de Sistema Regenerador de ATP. Se añadió Mg-ATP 0.03 mM al complejo Fi-aurovertina y una vez que el tazo se regeneró, se agregó fosfoenilpiruvato (PEP) (10 µg) y piruvato cinasa (PK) (1.5 U). El resto de las condiciones están descritas en "Procedimientos Experimentales".

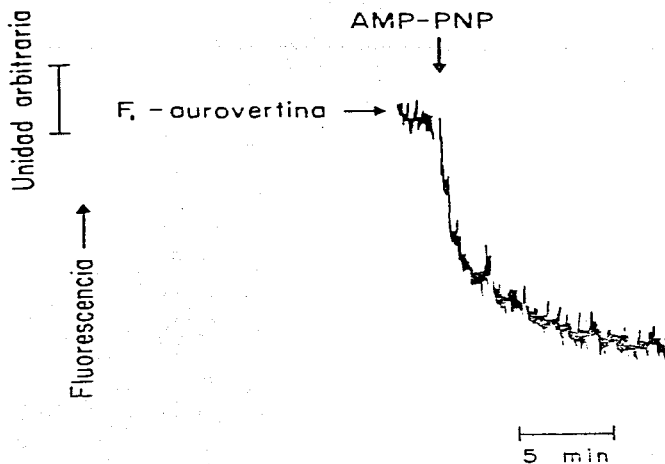


FIG. 5. Cambio de Fluorescencia del Complejo F_1 -Aurovertina inducido por AMP-PNP. El experimento se realizó igual que como se describió en el pie de la Fig. 1, sólo que en lugar de ATP se agregó AMP-PNP 0.01 mM.

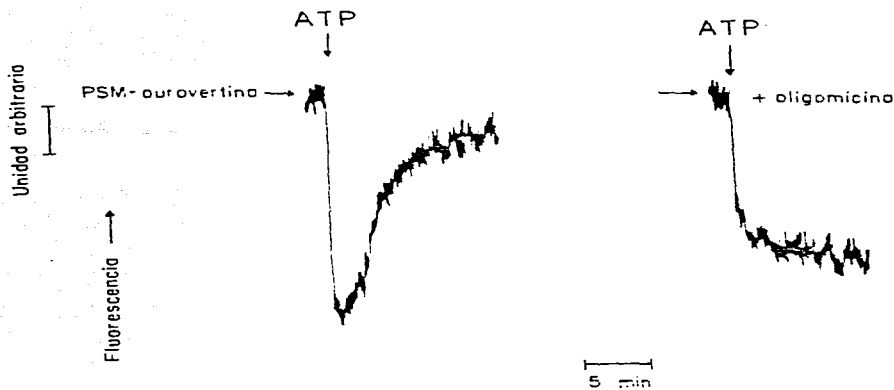


FIG. 6. Cambio de Fluorescencia inducido por ATP sobre Partículas Submitocondriales preincubadas con Aurovertina, Inhibidas o no con Oligomicina. Cuatrocientos μg de partículas submitocondriales (PSM) de Mg-ATP (ver "Preparaciones biológicas") se preincubaron con aurovertina (200 nM final). El resto de las condiciones se describieron en "Procedimientos Experimentales". Donde se indica, se agregó ATP 0.05 nM. En el trazo de la derecha, las PSM se habían incubado durante 30 min. antes de agregarlas a la cúbeta, con 5 μg de oligomicina. La actividad hidrolítica del complejo PSM-aurovertina era de $0.11 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$; después de la incubación con oligomicina la actividad era de $0.015 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$.

probablemente porque los nucleótidos recambiables presentes en las partículas no fueron removidos por filtración a través de Sephadex G-50.

Con los experimentos anteriores no se puede descartar la posibilidad de que los cambios de fluorescencia observados se deban a los nucleótidos que llenan sitios reguladores, o bien, a los que se encuentran en sitios catalíticos, a pesar de que el complejo F₁-aurovertina está hidrolizando el ATP. Si se determina la fluorescencia en condiciones en que se lleve a cabo la hidrólisis del ATP en un solo sitio catalítico, se observa el trazo de la Figura 7 (ver también la Figura 9B) que se puede correlacionar con el consumo temporal de ATP (moles)/ mol de enzima. De esta manera se puede concluir que tanto durante la hidrólisis de ATP multisitio como en la unisitio existe un apagamiento y una posterior regeneración de la fluorescencia del complejo F₁-aurovertina, estando entonces los sitios catalíticos involucrados en tales cambios.

Los experimentos descritos sugieren que la recuperación de la fluorescencia se puede deber ya sea al consumo de ATP, o bien, a la aparición de ADP unido en la enzima como producto de la hidrólisis, en uno o más de los sitios catalíticos. De hecho, la presencia de un sistema regenerador de ATP evita la acumulación de ADP en el medio (Fig. 4); la adición de AMP-PNP permite que exista apagamiento de la fluorescencia porque éste se une en el mismo tipo de sitios donde se liga el ATP, teniendo en cuenta que es un inhibidor competitivo clásico, pero en este caso,

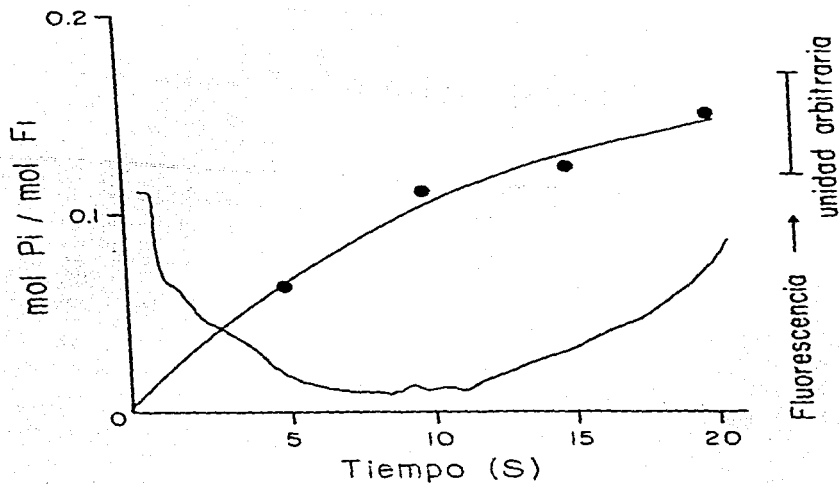


FIG. 7. Correlación de la Actividad Microquímica del Complejo F₁-Aurovertina con el Cambio de Fluorescencia Inducido por ATP en Condiciones de Unisítio. Al complejo F₁-aurovertina (255 nM de F₁ y 1.7 nM de aurovertina) se añadió 1.0 μM ATP 181 nM y se fueron tomando alifotas de 0.4 μs para medir el "flujo" liberado (ver "Procedimientos Experimentales"), en los tiempos indicados (●→). El cambio de fluorescencia inducido por el ATP (trazo continuo) se midió en idénticas condiciones que las descritas para la actividad, sólo que se utilizó ATP sin marca radiactiva.

no existe ADP producto de la hidrólisis (Fig. 5). Lo mismo pasa con el complejo aurovertina-F₁ membranal inhibido con oligomicina (Fig. 6): prácticamente no hay ADP producto de la hidrólisis y no se observa el aumento en la fluorescencia. El ITP es un sustrato que se puede hidrolizar tan eficientemente como el ATP pero, a diferencia del ADP, el IDP tiene una afinidad muy baja por la F₁ (Schuster et al., 1976), de tal manera que el complejo F₁-IDP es muy inestable. Al agregar ITP al complejo F₁-aurovertina observamos el mismo tipo de trazo que para el ATP: apagamiento y posterior recuperación de la fluorescencia. No obstante, no se rebasa el nivel original (Fig. 8), aunque el IDP per se provoca un leve aumento en la fluorescencia. Esto sugiere, que parte de la regeneración de la fluorescencia se debe al ADP unido a la F₁.

Se sabe que el ADP provoca un aumento en la intensidad de fluorescencia del complejo F₁-aurovertina (Chang y Penefsky, 1973). El ADP 0.03 mM induce un aumento similar en magnitud al provocado por la hidrólisis del ATP 0.03 mM (Fig. 9A); sin embargo, el ADP adicionado en concentraciones subestequiométricas (185 nM de ADP/ 585 nM de F₁) provoca un aumento mucho menor que el inducido por la misma concentración de ATP, hidrolizado en un solo sitio catalítico (Fig. 9B). Esto sugiere que el ADP producto de la hidrólisis que ocurre en el primer sitio catalítico, provoca un estado de la enzima distinto al alcanzado por la unión de ADP proveniente del medio. La porción del trazo correspondiente al apagamiento provocado por el ATP 185 nM no

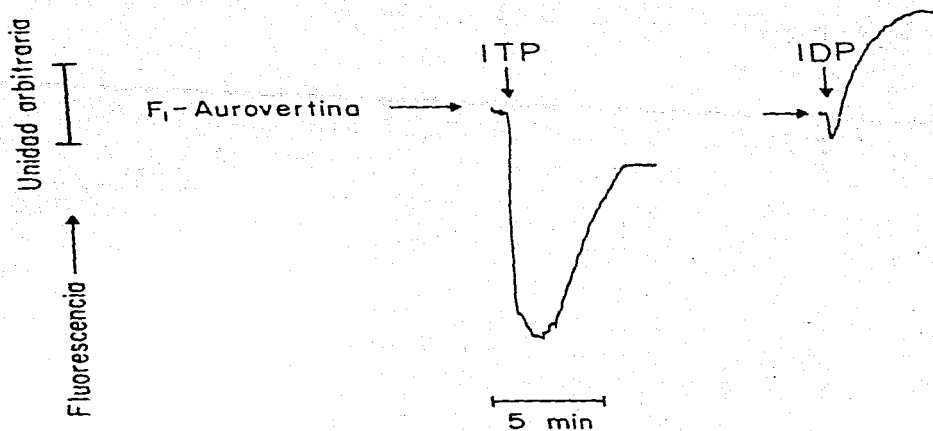


FIG. 8. Cambios de fluorescencia del Complejo F₁-Aurovertina inducidos por ITP y por IDP. Las condiciones experimentales se describieron en el pie de la Fig. 1. Donde se indica, se agregó ITP o IDP (0.03 mM en ambos casos).

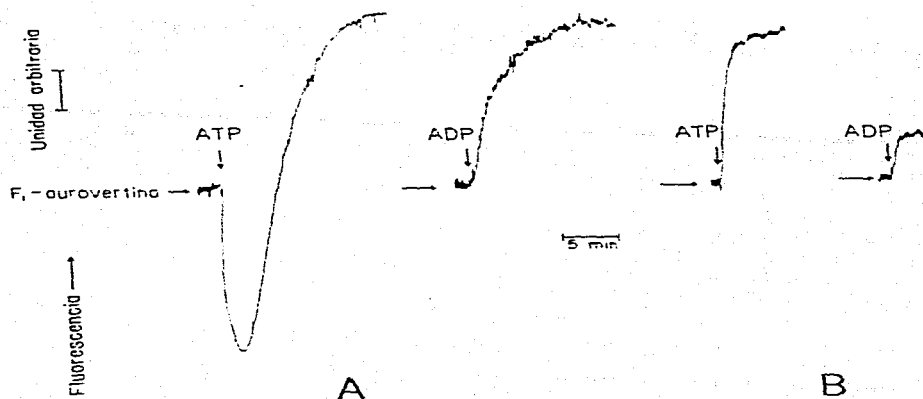


FIG. 9. Cambios de Fluorescencia del Complejo F₁-Aurovertina inducidos por Nucleótidos bajo Condiciones de Catálisis Multisubstrato Inhibido. Se agregó ATP o ADP donde las flechas lo señalan. En A había F₁ 50 nM y aurovertina 100 nM y la concentración de los nucleótidos añadidos fue de 0.03 mM. En B la concentración de nucleótidos fue de 185 nM, la de F₁ de 555 nM y la de aurovertina de 1.75 nM. Las demás condiciones se describieron en "Procedimientos Experimentales".

se alcanza a observar debido a la escala de tiempo utilizada (comparar con la Fig. 7).

PARTE II. INTERACCION DE LA AUROVERTINA CON EL COMPLEJO F₁-I

La aurovertina es un inhibidor no competitivo de las F₁-ATPasas (Lunardi et al., 1986). La curva de inhibición que se obtiene después de incubar a la F₁ con distintas concentraciones de aurovertina se muestra en la Fig. 10A. Al contrario de lo que se observa con la F₁, el efecto de la aurovertina sobre el complejo F₁ con su inhibidor endógeno (F₁-I) es de estimulación de su actividad hidrolítica (Fig. 10B). En la Tabla V se muestra el curso temporal de la actividad de ATPasa del complejo F₁-I preincubado o no con aurovertina. La estimulación por aurovertina se puede observar desde los primeros tiempos de la determinación de la actividad.

TAOLA V

Actividad de ATPasa del Complejo F₁-I preincubado en presencia o ausencia de Aurovertina.

El complejo F₁-I (1.4 μg) se preincubó en 0.1 ml de STG con aurovertina 4 M (3 μl de una solución madre 125 M) o con 3 μl de metanol. Luego de 2 h, se determinó a 30 °C, en los tiempos indicados, la actividad hidrolítica por liberación de ³²P_i a partir de una alfucota de ³²P-ATP, según se describe en "Procedimientos Experimentales".

Tiempo min	Actividad de ATPasa	
	F ₁ -I	F ₁ -I-aurovertina
		μmol/wg
0.5	0.2	3.6
1.0	0.4	7.1
5.0	2.8	30.9
10.0	6.4	46.4
20.0	15.4	56.0
30.0	20.5	67.1

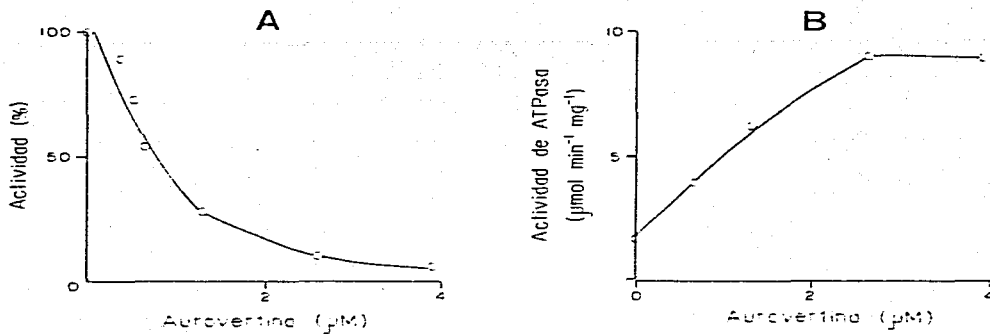


FIG. 10. Efecto de la Aurovertina sobre la Actividad de ATPasa de la F₁F₀ del Corriente F₁. 1 µg de F₁ 6 30 µg de F₁-1 se incubaron con las concentraciones de aurovertina que se indican, en 0.1 ml de STG. Después de 1 h se midió la actividad de ATPasa espectrofotométricamente (Ver "Procedimientos Experimentales"). A, F₁ 6; B, F₁-1. El 100% de la actividad de la F₁-ATPasa corresponde a 60 µmol min⁻¹ mg⁻¹.

Para determinar si la presencia del inhibidor endógeno tiene relación con el efecto activador de la aurovertina sobre la hidrólisis del complejo F_1-I , se liberó la acción del inhibidor incubando a la enzima con ATP 10 mM, sin Mg^{2+} y a 50°C (Adolfson et al., 1975). En estas condiciones, la actividad basal de F_1-I , que es de aproximadamente 1 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, aumenta hasta unas 60-80 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Así estimulado, el complejo F_1-I es inhibible por aurovertina, de manera dependiente de la concentración (Fig. 11). Si la aurovertina se encuentra presente en el medio de activación, entonces se puede observar la transición del efecto de la aurovertina sobre el complejo F_1-I : cuando la actividad de la enzima todavía no es muy alta, la aurovertina sigue teniendo un efecto estimulador, pero el complejo va siendo inhibible por la misma a medida que su actividad se incrementa como resultado de la presencia del ATP y la temperatura alta (Fig. 12 y su recuadro).

Los resultados anteriores muestran que la presencia de ATP no hidrolizable (es decir, en ausencia de Mg^{2+}) no altera el hecho de que la aurovertina pueda estimular la hidrólisis del complejo F_1-I , como se observa en los primeros 3 min del experimento de la Fig. 12. En contraste, si la aurovertina interacciona directamente con la enzima que está hidrolizando ATP, entonces es capaz de inhibir en un 30% esta actividad de ATPasa de F_1-I , inhibición que permanece por un período de cuando menos 1 h (Fig. 13). Así, el efecto de la

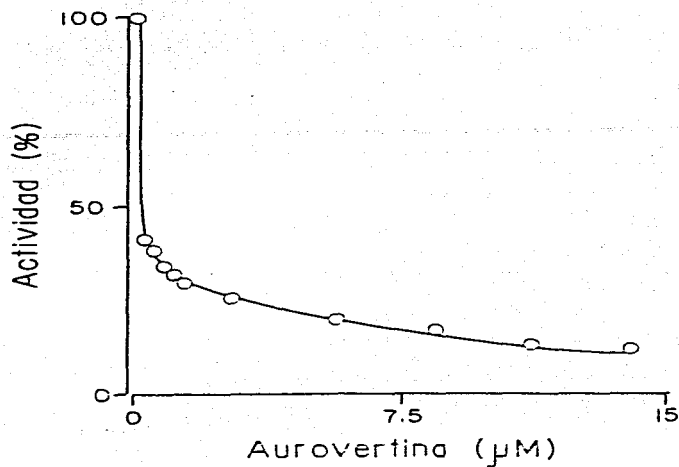


FIG. 11. Inhibición por Aurovertina del Complejo F₁-1
previamente liberado de la Acción del Inhibidor
Endógeno. La actividad de A-Fasa del complejo F₁-1
que existía previamente desde la Vista 80: 501
µM-1 µM (ver texto y "Ficha de datos
Experimentales"). Posteriormente se adicionaron
alícuotas de 0.1 µl donde se agregó
aurovertina en las concentraciones indicadas y se
midió la actividad igual que en la Fig. 10. La
cantidad de F₁-1 utilizada por punto fue de 4 µg.

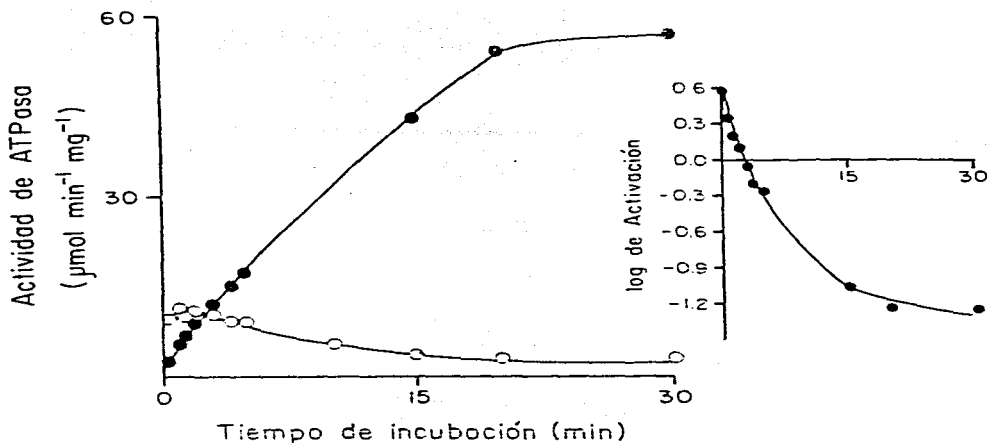


FIG. 12. Efecto de la Auriverdina sobre el Couplado F₁F₂ durante su incubación en el Medio de Activación. 40 μg de F₁F₂ se incubaron en el medio de activación, descrito en "Procedimientos Experimentales", y se tomaron alícuotas de 0.5 ml para medir la actividad por el método de Fiske y Subbarow (1945) (●—●). En otro tubo había auriverdina en el medio de activación a una concentración de 1 M. La relación entre la actividad de ATPasa de F₁F₂ + auriverdina / F₁F₂ en los distintos tiempos de incubación en el tubo de activación, está graficada en el recuadro como el logaritmo de dicha relación (log de Activación).

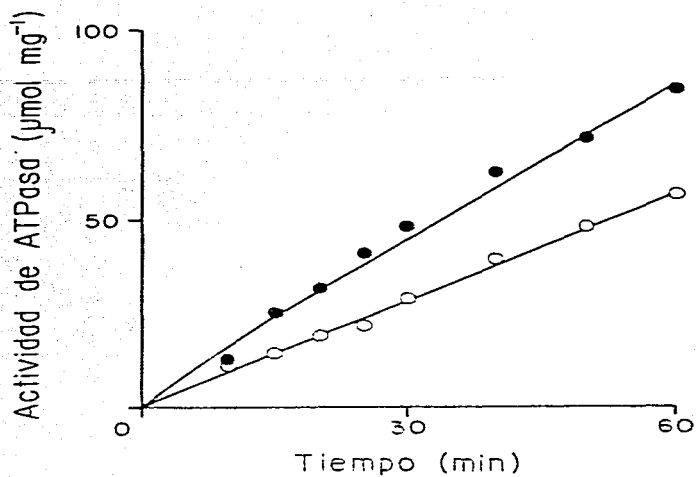


FIG. 13. Efecto de la Autoveritina sobre el Complejo F₁F₀ Hidrolítico. Se determinó la actividad de ATPasa del complejo y en los tiempos señalados, cuantificando el ³²P liberado, como se describe en "Procedimientos Experimentales" (●—●). En la curva ○—○ se añadió autoveritina 4 µM en el medio de reacción.

aurovertina sobre el mismo complejo depende del estado de la enzima: estimula la actividad de F_1 -I en reposo pero inhibe al F_1 -I que está hidrolizando. De aquí surge la pregunta de si el efecto inhibitor de la aurovertina sobre el complejo F_1 -I activo, está relacionado con la presencia de nucleótidos, ATP o ADP, en los sitios catalíticos de la enzima. Por esta razón, se realizó el experimento de la Fig. 14, para determinar, primero, si el complejo F_1 -I es capaz de llevar a cabo la hidrólisis del ATP en un sólo sitio catalítico y, segundo, para saber si bajo estas condiciones el complejo F_1 -I preincubado con aurovertina tiene actividad de ATPasa. Es claro que la F_1 con su inhibidor endógeno presenta actividad de ATPasa en un sitio catalítico. Su velocidad es menor con respecto a la de la F_1 , cuando menos durante los primeros 60 s, pero en ambos casos se llegan a liberar entre 0.16 y 0.18 moles de P_i / mol de enzima, a los 30 s aproximadamente en el caso de la F_1 y poco después de los 60 s de reacción para el caso de la F_1 -I (no se muestra). El complejo F_1 -I-aurovertina (o—o, en la Fig. 14) presenta, en este sentido, un comportamiento en todo comparable al de F_1 -I.

En contraste, en un medio que contenía aurovertina y ATP en proporción de 1 mol de sustrato/ 3 moles de enzima, se agregó F_1 -I; bajo estas condiciones se obtiene una inhibición por aurovertina del 95-98% de la actividad hidrolítica del complejo F_1 -I (Fig. 15A). De modo interesante, la aurovertina presenta un efecto inhibitor sobre la F_1 (sin inhibidor endógeno) hidrolizando en condiciones de unisito, aunque con

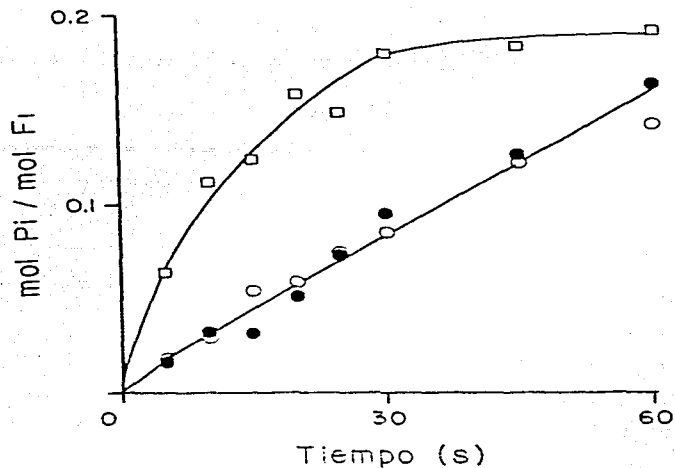


FIG. 14. Hidrólisis de ATP en Condiciones de Unión del Complejo F₁-F₁ preincubado o no con Autovinina. La concentración de enzima (F₁ o F₁-F₁) fue de 500 nM y la de [³²P]ATP, de 100 nM. A los diferentes tiempos se fueron tomando alícuotas de 0.2 ml para cuantificar el ³²P_i liberado (ver "Procedimientos Experimentales"). □—□, F₁-F₁; ●—●, F₁-F₁; ○—○, F₁-F₁ preincubado con autovinina 2 μM.

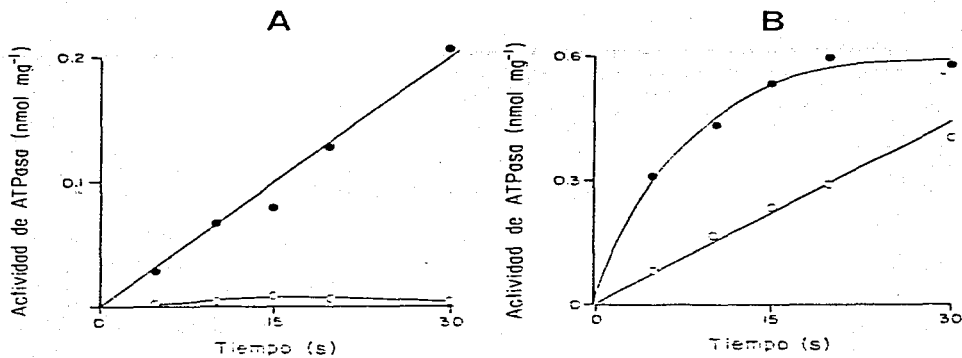


FIG. 15. Efecto de la Aurovertina sobre el Complejo F_1F_0 o la F_1 , catalizando la Hidrolisis de ATP Uniditico. Se usaron F_1F_0 o F_1 a $6.0 \mu\text{M}$ y ATP a 1.0 mM . La actividad se determino como se indica en el texto de la Tab. 10. La reaccion se inicio agregando la enzima (F_1F_0 en A o F_1 en B), en presencia o ausencia de aurovertina.

menor potencia en relación con la inhibición observada para F_1-I (Fig. 15B). Nuevamente, el efecto de la aurovertina sobre la enzima en reposo y sobre la que está trabajando es perfectamente distinguible.

El hecho de que el complejo F_1-I se preincuba con aurovertina en condiciones en que lleve a cabo la hidrólisis con 1 mol de ATP/ 3 moles de enzima (condiciones de la Fig. 15A), no impide que la F_1-I con aurovertina tenga una mayor velocidad de hidrólisis de ATP multisitio que la F_1-I preincubada de modo similar pero sin aurovertina (Fig. 16). Es decir, a pesar de que la hidrólisis unisitio es prácticamente inexistente en la F_1-I con aurovertina (Fig. 15A), al agregar ATP en concentraciones saturantes (3 mM) permite que haya una estimulación de la actividad de ATPasa multisitio.

Una característica de la hidrólisis del ATP en un sitio catalítico realizada por la F_1 es que después de 1 min de incubación, 45% del ^{32}P añadido inicialmente se libera como $^{32}P_i$ al filtrar a la enzima a través de una columna de Sephadex G-50, y que los niveles de $^{32}P_i$ unido permanecen prácticamente sin cambio alguno entre los 10 y los 150 s de incubación (Grubmeyer et al., 1982; Bullough et al., 1987). Para la F_1 -aurovertina, encontramos que aproximadamente un 45% del [^{32}P]ATP ya se ha consumido después de 1 min de incubación y que entre los 5 y los 10 min este valor no rebasa el 55%. Si después de esta incubación se agrega ATP, sin marca radioactiva, suficiente para saturar a todos los sitios catalíticos, entonces prácticamente se consume todo el

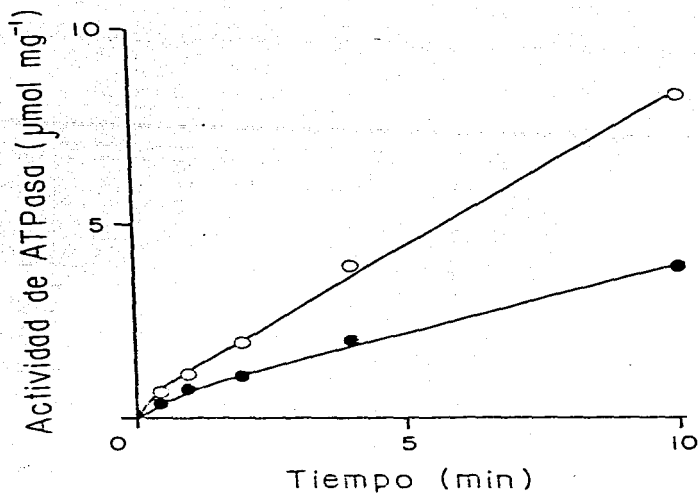


FIG. 16. Hidrólisis Multisubstrato del Complejo F₁F₀ preincubado con 1 µmol de bTP / 1 µmoles de Enzima en Ausencia o en Presencia de Acetovartina. Al medio 500 se le agregó ATP 100 µM sin (●—●) o con (○—○) acetovartina 1 µM; se añadió F₁F₀ suficiente para obtener una concentración de 0.1 µM, se incubó durante 10 min a temperatura después se agregó Mg-ATP 3 µM para iniciar la reacción de hidrólisis, en los tiempos indicados, por interacción de bTP₁ (descrita en "Procedimientos Experimentales").

[γ -³²P]ATP añadido inicialmente (recuadro de la Fig. 17).

Para el complejo F₁-I el consumo de [γ -³²P]ATP es también del 55% entre los 5 y los 10 min de incubación bajo condiciones de hidrólisis unisítio, en tanto que para la F₁-I con aurovertina agregada sobre el complejo catalíticamente activo (condiciones descritas en el experimento de la Fig. 15), a los 10 min sólo se ha consumido un 13% del [γ -³²P]ATP. Ni en F₁-I ni en el complejo F₁-I con aurovertina, la adición de ATP 3 mM altera de manera importante los valores de ³²P consumido durante la hidrólisis unisítio (Fig. 17).

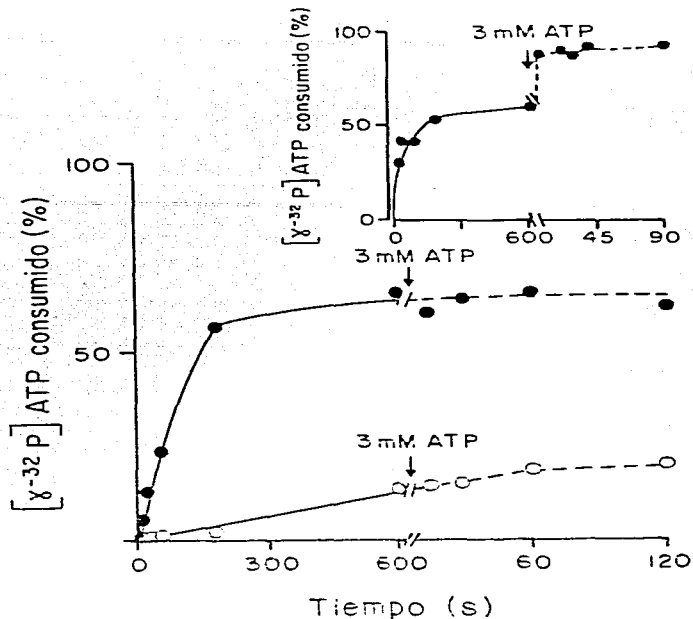


FIG. 17. Porcentaje de $[\gamma-^{32}\text{P}]$ ATP consumido por la Actividad de ATPasa del Complejo F_1F_0 con y sin Aurintrina, con ATP en Concentraciones Subestequiométricas y Saturantes. La concentración de aurintrina en \circ — \circ fue de $1 \mu\text{M}$ y la de $[\gamma-^{32}\text{P}]$ ATP de 100 nM ; la reacción se inició agregando F_1F_0 a una concentración de $0.9 \mu\text{M}$. En \bullet — \bullet no había aurintrina. En el recuadro se muestra el mismo experimento anterior, sólo que utilizando F_1 con aurintrina.

V. DISCUSION

El complejo F₁-aurovertina puede catalizar la hidrólisis del ATP

La aurovertina es un potente inhibidor de la reacción catalizada por la ATP sintasa, tanto en su sentido sintético como en el hidrolítico (Lardy et al., 1964; Lardy y Lin, 1969; Chang y Penefsky, 1974; Issartel et al., 1983a y b). Muchos autores han mostrado que el complejo F₁-aurovertina es capaz de unir nucleótidos y cationes y, además, de cambiar de conformación en respuesta a tal interacción. Los cambios de conformación se infieren a partir de las variaciones en la intensidad de fluorescencia: apagamiento cuando une ATP o Mg²⁺ y aumento cuando lo que une es ADP. Las distintas conformaciones podrían resultar del tipo de nucleótido unido en un mismo sitio, o de que los diferentes nucleótidos ocupan sitios distintos. En trabajos anteriores, los ensayos de fluorescencia se han realizado en medios que contienen concentraciones relativamente altas (0.2-2 mM) de EDTA (Chang y Penefsky, 1973; Satre et al., 1980; Lunardi et al., 1986; Issartel et al., 1987), condiciones en las cuales, si el complejo F₁-aurovertina lleva a cabo alguna actividad enzimática, ésta es extremadamente lenta. De hecho, en la Tabla IV se pueden comparar las actividades de ATPasa del complejo F₁-aurovertina en ausencia o en presencia de EDTA 0.05 mM (la inhibición por EDTA es del 95% luego de 1 min de reacción y del 65% a los 10 min), y en la Figura 3 se observa que el ATP que se consume después de 1 min en presencia de

EDTA (ATP 0.03 mM, EDTA 0.05 mM), no es ni siquiera del 1%. Esto sugiere que la inhibición se debe a la cantidad limitada de sustrato Mg-ATP para el complejo F_1 -aurovertina. Bajo las condiciones experimentales probadas en este trabajo, es decir, incubando al antibiótico con la enzima durante 2 h, la inhibición de la actividad hidrolítica es de un 98%, siendo posible que la actividad remanente se deba al complejo F_1 -aurovertina o, alternativamente, a que el 2% de las enzimas resistentes a la aurovertina sean las responsables de la actividad determinada. Sin embargo, ésta última posibilidad no se ve apoyada por el paralelismo que existe entre los datos de la actividad hidrolítica y los trazos de fluorescencia, que sólo se deben al complejo F_1 -aurovertina.

Así, las respuestas de fluorescencia registradas para el complejo F_1 -aurovertina apoyan que la hidrólisis determinada se debe a la actividad de ATPasa del mismo. En presencia de Mg^{2+} y concentraciones bajas de ATP (0.03 mM), una vez que se adiciona ATP al medio, existe un apagamiento de la fluorescencia, de acuerdo con lo observado por otros autores (Chang y Panafsky, 1973; Satre et al., 1980), pero tal apagamiento está seguido por una regeneración de la intensidad. La velocidad de la regeneración es mayor conforme disminuye la concentración del ATP en el medio (Tabla II). Asimismo, existe una relación paralela entre la disminución de la velocidad de hidrólisis, la menor pendiente en la recuperación del trazo de fluorescencia y el aumento de las concentraciones de EDTA en el medio (Tabla III). Otros datos aportan evidencia de que mientras pueda ocurrir la hidrólisis

del ATP, se observa el aumento de fluorescencia después del apagamiento inducido por el ATP. La adición de Mg^{2+} excedente a la concentración de EDTA, provoca, por un lado, que se presente el aumento de la fluorescencia en un trazo donde el ATP había provocado el apagamiento (Fig. 2) y, por otro lado pero de manera paralela, que la concentración inicial de ATP disminuya bruscamente por aumentar la velocidad de hidrólisis (Fig. 3, líneas $o \rightarrow o \rightarrow e \rightarrow e$). Si la hidrólisis no se presenta, tampoco se observa la regeneración de la fluorescencia: si en lugar de ATP el apagamiento se induce con AMP-PNP (nucleótido que se une a la F_1 con muy alta afinidad, $K_d = 0.33$ M, pero que no se puede hidrolizar (Penefsky, 1974; Melnick et al., 1975)) (Fig. 5) o si se inhibe al complejo F_0F_1 -aurovertina con oligomicina (Fig. 6). De esta manera, se propone que el complejo F_1 -aurovertina es capaz de tener actividad de ATPasa y, además, de cambiar de conformación mientras realiza esta reacción.

Los cambios de fluorescencia del complejo F_1 -aurovertina bajo condiciones de hidrólisis están relacionados con la ocupación del sitio de alta afinidad para el ATP

Cuando se usan concentraciones saturantes de nucleótidos, éstos pueden ocupar diferentes tipos de sitios (Cross, 1988, como revisión). Si se utiliza la proporción de 1 mol de ATP/ 3 moles de F_1 , entonces el ATP unido está solamente ocupando un sitio catalítico y se hidroliza con una velocidad 10^4 - 10^6 veces menor que en condiciones de

hidrólisis multisitio (Grubmeyer et al., 1982; Cross et al., 1982; Wise et al., 1984; Tommasino y Capaldi, 1985; Montero-Lomelf y Dreyfus, 1987). El apagamiento de la fluorescencia del complejo F_1 -aurovertina inducido por ATP y su subsecuente regeneración, se observan cuando existen las condiciones para que se realice la hidrólisis unisitio; el trazo de fluorescencia y el curso temporal de la actividad, se pueden correlacionar (Fig. 7). Es interesante que el complejo F_1 -aurovertina y la F_1 hidrolizan ATP, en condiciones de unisitio, a velocidades muy similares: 0.59 (dato derivado de la Fig. 7) y 0.75 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (no se muestra), respectivamente. De otros inhibidores que se unen en las subunidades se ha determinado su efecto sobre la catálisis unisitio. Por ejemplo, 1 mol de DCCD que se une a un residuo de ácido glutámico de la subunidad β de la F_1 de *E. coli*, es suficiente para obtener un 95% de inhibición de la ATPasa multisitio (Satre et al., 1979; Tommasino y Capaldi, 1985). No sucede así con la actividad en un solo sitio catalítico; aún cuando se unen 2 moles de DCCD/mol de F_1 , la inhibición de la velocidad inicial es solamente del 75%. Así, se sugiere que el DCCD afecta a los sitios catalíticos, pero que su efecto inhibitor se debe principalmente a que la cooperatividad entre las subunidades desaparece (Tommasino y Capaldi, 1985). No obstante, el ATP del medio todavía puede promover la liberación del producto [^3H]ADP unido fuertemente en un sitio catalítico, aún cuando la F_1 se encuentre modificada con DCCD o con NBD-Cl, lo cual es evidencia de que aún existe cooperatividad en la enzima modificada (Kandpal et

al., 1985). Lunardi y colaboradores (1986) sugirieron que el complejo F_1 -aurovertina carece de mecanismos cooperativos, ya que las gráficas de Scatchard obtenidas para la unión del ADP y el ATP en la F_1 de ser curvilíneas, pasan a ser rectas cuando la aurovertina está presente. Sin embargo, el hecho de que la actividad hidrolítica de este complejo sea de $0.59 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ bajo condiciones de unisitio, y 10^3 veces mayor cuando la concentración de ATP es saturante ($880 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, ver la Tabla I), revela que algo de cooperatividad debe existir en la F_1 modificada con aurovertina.

La relación entre cambios de fluorescencia y presencia de ligandos en el sitio catalítico de una ATPasa se demostró recientemente en la Ca^{2+} -ATPasa de retículo sarcoplásmico de músculo esquelético de conejo marcada con un reactivo fluorescente, N-todoacetil-N'-(β -sulfo-1-naftil)etilendiamina (EDANS). Suzuki y colaboradores (1989) mostraron que la fluorescencia aumenta cuando se une Ca^{2+} a los sitios de alta afinidad, y disminuye cuando el ATP se une al sitio catalítico. Del ciclo catalítico de esta enzima, se sabe que una vez que une Ca^{2+} , se puede fosforilar por el ATP para dar un intermediario EP sensible al ADP. Posteriormente, se convierte a un estado EP insensible al ADP para finalmente hidrolizarse y formar E y P_i . Siguiendo el ciclo catalítico por la fluorescencia del EDANS, el apagamiento de la misma por ATP permanece estable mientras existe la forma EP sensible al ADP; cuando se convierte a EP insensible al ADP

se observa una disminución leve de la intensidad y, finalmente, regresa al nivel original cuando se hidroliza el intermediario fosforilado. El paralelismo entre los cambios de fluorescencia y el ciclo catalítico de la Ca^{2+} -ATPasa parece estar apoyado por el hecho de que la Cys-674 donde se une el EDANS, se encuentra en el mismo fragmento triptico que la Lys-515 involucrada en la unión del ATP al sitio catalítico (ver las refs. citadas por Suzuki et al., 1989; Pedersen y Carafoli, 1987). Los autores proponen que los cambios conformacionales que ocurren en el sitio catalítico cuando se une el ATP, se pueden transmitir a la vecindad inmediata donde se encuentra el EDANS, afectando su movilidad y de ahí, su intensidad de fluorescencia. Un argumento similar se podría utilizar para explicar que la unión de ATP en el o los sitios catalíticos de la F_1 podrían modificar la fluorescencia de la subunidad unida. ya que Lee y colaboradores (1989) determinaron que su sitio de unión, en la enzima de E. coli, se encuentra en el residuo de Arg-398, cercano al dominio donde se sugiere que se unen los nucleótidos en la subunidad β , entre los residuos 140 y 335 aproximadamente (Senior, 1988). En el caso de la Ca^{2+} -ATPasa, la regeneración de la fluorescencia, después de la adición de ATP, se debe a la hidrólisis del intermediario fosforilado. Para el ciclo catalítico de la F_1 -ATPasa, no se ha reportado intermediario fosforilado alguno (Nagawa, 1984; Senior, 1988; Futai y Kanazawa, 1989), así que el aumento de la intensidad de fluorescencia que sigue del apagamiento provocado por el ATP, debe tener otra explicación.

Los cambios de fluorescencia del complejo F₁-aurovertina están relacionados con la presencia de ADP como producto de la hidrólisis del ATP

La velocidad a la cual el ATP es hidrolizado por el complejo F₁-aurovertina no está relacionada con el apagamiento y la recuperación de la fluorescencia. El apagamiento de la fluorescencia permanece si se hidroliza ATP 1.5 mM (Fig. 1A), si hay un sistema regenerador de ATP (Fig. 4) o si el ATP se hidroliza a velocidades muy bajas por la presencia de EDTA (Tabla IV) o de oligomicina (Fig. 6). Una explicación alternativa para la recuperación de la fluorescencia sería la aparición de ADP resultante de la actividad hidrolítica. Sin embargo, a partir de los datos de la Figura 3, se puede calcular que cuando el complejo F₁-aurovertina hidroliza una concentración inicial de 1.5 mM de ATP, a los 10 min existe una concentración de ADP de 0.03 mM, y, aún así, no se observa recuperación alguna; en cambio, si inicialmente se añade ATP 0.03 mM, antes de los dos minutos y cuando la concentración de ADP es de apenas 1.5 μM, se inicia el aumento de la intensidad de fluorescencia (Fig. 1). Esto indica que tal regeneración no depende de las concentraciones absolutas de ADP en el medio, aunque su presencia como producto de la hidrólisis, sí es una condición necesaria para que este fenómeno se presente. De hecho, la duración del estado de apagamiento de la fluorescencia resultante de la adición de ATP, está en función de la existencia de ADP como

producto de la hidrólisis. Aún cuando exista AMP-PNP en los sitios catalíticos de la F_1 no hay recuperación del apagamiento (Fig. 5). Si el ADP unido en la F_1 se remueve utilizando piruvato cinasa y fosfoenolpiruvato, entonces el apagamiento de la fluorescencia se puede volver a inducir (Fig. 4). Si en lugar de ATP se añade ITP como sustrato, se obtiene un apagamiento y una regeneración de la fluorescencia, aunque la recuperación no alcanza siquiera el nivel original (Fig. 8, trazo de la izquierda). Esto puede explicarse si se toma en cuenta que a pesar de que el ITP es tan buen sustrato como el ATP, en cuanto a la velocidad con la que son hidrolizados (Harris et al., 1981), el IDP se une a la F_1 con una constante de afinidad muy baja (Schuster et al., 1976); consistente con lo anterior, el IDP ocasiona un aumento en la fluorescencia menor al obtenido con una concentración similar de ADP (comparar el trazo de la derecha de la Fig. 8 con el trazo correspondiente de la Fig. 9A).

Por otra parte, varios autores han propuesto que los nucleótidos de adenina pueden unirse a sitios catalíticos y a sitios reguladores presentes en la F_1 , en tanto que los nucleótidos de guanina y de hipoxantina interactúan solamente con sitios catalíticos (Ebel y Lardy, 1975; Schuster et al., 1975; Di Pietro et al., 1980 y 1981). Así, el aumento de la intensidad de fluorescencia registrado para el complejo F_1 -aurovertina hidrolítico podría estar relacionado con la presencia de ADP en un sitio regulador, sitio cuya existencia ha sido sugerida por varios grupos (Di Pietro et al., 1980; Fellous et al., 1984; Vasilyeva et al.,

1982; Kironde y Cross, 1986; Martins et al., 1988). Una de las características más notables de este sitio es que, aún después de varios ciclos de hidrólisis, el ADP ahí unido no es recambiado con los nucleótidos del medio (Di Pietro et al., 1980; Kironde y Cross, 1986; Martins et al., 1988). En apoyo a que la recuperación del apagamiento de la fluorescencia es independiente de las concentraciones absolutas de ADP derivadas de la hidrólisis, está el experimento de la Figura 9. En él se muestra que la adición de ADP en concentraciones saturantes (0.03 mM) mejora la fluorescencia al mismo nivel que el trazo regenerado resultante de la adición y la hidrólisis de una cantidad comparable de ATP. Lo notable es que se obtiene este mismo nivel de intensidad cuando se hidroliza ATP en un solo sitio catalítico, aún cuando la máxima concentración de ADP alcanzada bajo estas condiciones sea de solamente 165 nM, en el supuesto de que se consuma todo el ATP inicial. Más aún, una concentración subestequiométrica de ADP provoca un aumento muy pobre de la fluorescencia (Fig. 9B, trazo de la derecha). Esto lleva a proponer que el ADP proveniente de la hidrólisis queda ligado a un sitio física o conformacionalmente distinto del que interacciona con el ADP proveniente del medio. Si este sitio está relacionado con aquél que se ha propuesto de función reguladora, la conformación que produce en la enzima se puede diseccionar cuando se prueban condiciones en las que trabaja un solo sitio catalítico.

La actividad hidrolítica del complejo F₁-aurovertina supone cambios conformacionales dentro de una sola subunidad β

Lunardi y colaboradores (1986) mostraron que en 1 mol de subunidad β purificada a partir de la F₁ mitocondrial, se puede unir 1 mol de aurovertina. En el complejo subunidad β - aurovertina, tanto el ATP como el ADP producen un aumento de la fluorescencia. Por la diferencia del efecto del ATP, que en la F₁-aurovertina induce un apagamiento, propusieron que el estado integrado de la subunidad β en la estructura oligomérica de la F₁ modifica su reactividad con la aurovertina y con los nucleótidos. Los datos del presente trabajo apoyan esta proposición, ya que los cambios de fluorescencia observados en condiciones de hidrólisis unisítio presentan el apagamiento y la regeneración que se observan para la hidrólisis multisítio. Esto indica que una sola subunidad β integrada en la F₁ puede presentar conformaciones similares a las de la enzima completa. Este cambio conformacional de la subunidad β modificada con aurovertina podría transmitirse dentro y fuera del dominio que contiene al nucleótido y ser importante para la catálisis cooperativa.

La aurovertina estimula la actividad hidrolítica de ATP del complejo F₁-I

De manera dependiente de la concentración de aurovertina, la actividad de ATPasa de la F₁ latente (F₁-I) se incrementa de 1-2 μ mol min⁻¹ mg⁻¹ hasta unas 8-10 μ mol min⁻¹ mg⁻¹, cuando la concentración del antibiótico es de 4

μM (Fig. 10). El incremento en la concentración de ADP o de F_1 como productos de la hidrólisis podría estar involucrado en este efecto de estimulación; sin embargo, parece poco probable, ya que la activación de la ATPasa en presencia de aurovertina es evidente en una curva temporal, desde los 30 s hasta los 30 min (Tabla V).

Los trabajos donde se ha probado el efecto de la aurovertina sobre sistemas que contienen al inhibidor natural, han llevado a sugerir que la aurovertina libera a la proteína inhibidora hacia el medio (Van de Stadt y Van Dam, 1974; Harris et al., 1979). No obstante, es posible que la aurovertina y el inhibidor natural puedan coexistir en las subunidades β , si se toman en consideración los datos obtenidos por Issartel y colaboradores (1983b). Ellos determinaron que a pesar de la presencia del inhibidor, en la F_1 siguen existiendo 3 sitios de unión para la aurovertina, aunque el sitio de alta afinidad ($K_D = 0.1-0.3 \mu\text{M}$) desaparece y adquiere el carácter de baja afinidad de los otros dos ($K_D = 3-5 \mu\text{M}$). De aquí, se puede proponer que la aurovertina y el inhibidor natural interactúan en sitios diferentes de la subunidad β de la F_1 y, por lo tanto, es posible la existencia del complejo F_1 -I-aurovertina.

Varios de los resultados obtenidos en el presente estudio apoyan la propuesta anterior, es decir, indican que la aurovertina no libera al inhibidor natural endógeno del complejo F_1 -I hacia el medio. La aurovertina puede inhibir a la F_1 latente, cuando ésta es hidrolíticamente activa. Si se

trata de hidrólisis en condiciones de multisitio, la inhibición es de un 30%, aproximadamente (Fig. 13); cuando la F_1 -I trabaja bajo condiciones de unisitio, entonces la inhibición llega a ser del 98% (Fig. 15A) y así se mantiene cuando menos por 10 min (Fig. 17). En este último caso, es evidente que la presencia del inhibidor natural es necesaria para obtener la inactivación casi total por aurovertina de la actividad en un solo sitio catalítico. Cuando la aurovertina se prueba directamente sobre la F_1 hidrolítica pero sin inhibidor, la actividad unisitio está disminuida pero existe (Fig. 15B). Otra evidencia más se muestra en el experimento de la Fig. 16. A pesar de que el complejo F_1 -I está preincubado durante 10 min con aurovertina, en las condiciones bajo las cuales la hidrólisis unisitio no ocurre (aurovertina sobre F_1 -I en condiciones de hidrólisis), al agregar ATP en concentraciones saturantes no sólo es posible determinar la hidrólisis multisitio, sino que ésta se encuentra estimulada cuando la aurovertina está presente.

Tal parece, entonces, que la aurovertina no libera a la proteína inhibidora endógena de su sitio de interacción con la F_1 . Su efecto estimulador, sin embargo, sí depende de que el inhibidor se encuentre en su sitio nativo en la F_1 . Conforme aumenta la actividad hidrolítica del complejo F_1 -I por incubarlo a 50°C en presencia de ATP + EDTA, condiciones que liberan la acción de la proteína inhibidora (Adolfson et al., 1975; Feinstein y Moudrianakis, 1984), la aurovertina va adquiriendo su propiedad de inhibir a la F_1 -ATPasa (Figs. 11 y 12). Es posible que la aurovertina que se une en la

subunidad que contiene al inhibidor natural, modifique la interacción de este péptido con la enzima, dando como resultado una conformación hidrolíticamente más activa. Esto sería similar a lo propuesto por el grupo de Gómez-Puyou (Gómez-Puyou et al., 1979; Dreyfus et al., 1981). En los tiempos iniciales de la actividad fosforilante de las partículas que poseen al inhibidor natural, existe una fase de retardo y, más adelante, la velocidad en el estado estacionario es la misma en partículas con o sin proteína inhibidora. Según los autores, la fase de retardo es un período en el que está cambiando la interacción del inhibidor con la enzima y, una vez alcanzada una forma especial, se presenta la actividad catalítica. Quizás la autovertina minutina esta forma especial de F_1-I , capaz de realizar actividades enzimáticas.

El complejo F_1-I puede llevar a cabo la hidrólisis en un solo sitio catalítico

Una pregunta interesante concerniente al mecanismo catalítico de la F_1 es si el inhibidor natural, además de disminuir la hidrólisis multisitio, es capaz de alterar la reacción realizada en un solo sitio catalítico. Si bien la velocidad de hidrólisis con concentraciones subestequiométricas de ATP del complejo F_1-I es menor que la de la F_1 , ambas formas de la enzima liberan alrededor de 0.2 moles de P_i / mol de enzima (Fig. 14). Este resultado contrasta con lo reportado por Kalashnikova y colaboradores

(1988), quienes utilizando F_1 reconstituida con inhibidor exógeno mostraron que en tal preparación no existía unión de [^{14}C]nucleótidos en el sitio catalítico cuando se incubaba en presencia de [^{14}C]ATP. Ellos explican que el complejo F_1 -I es inactivo durante la hidrólisis multi- y uni-sitio. Ya se había propuesto que el inhibidor natural, durante la hidrólisis cooperativa, disminuye la liberación del producto ADP (Schwartzmann y Pedersen, 1986, como revisión; Tuena de Gómez Puyou, 1983); a la luz de sus resultados, Kalashnikova et al. (1988), sugieren que en F_1 -I el paso de la promoción de la catálisis después de que se une ATP en un segundo sitio catalítico, está muy disminuido o es inexistente. La actividad residual observada, entonces, resultaría de la moléculas de F_1 que no contienen al inhibidor. De hecho, tal consideración también podría ser válida para los resultados de la Fig. 17 y ayudaría a explicar la falta de promoción del consumo de [^{32}P]ATP luego de agregar concentraciones saturantes de sustrato. Sin embargo, si esto fuera así, sería difícil explicar porqué la F_1 no hidroliza todo el ATP que tiene disponible cuando menos durante 10 min. Además, que la sucrovertina tenga efectos sobre la F_1 y el complejo F_1 -I tan claramente distinguibles con concentraciones saturantes (Fig. 10) o limitantes de ATP (Fig. 15), sugiere que el complejo nativo puede ser catalíticamente activo.

La posible contradicción de las conclusiones de Kalashnikova et al. (1988) y lo aquí presentado, se puede explicar si se toma en cuenta que la inhibición de la F_1 -ATPasa por el inhibidor exógeno requiere de una incubación

con sustrato hidrolizable; si algún nucleótido queda atrapado en un sitio de la enzima como resultado de esta incubación, el complejo podría perder su capacidad para recambiar este nucleótido con los del medio. Esto sería consistente con lo reportado por el grupo de Gautheron acerca de que el inhibidor disminuye la capacidad de la F_1 para intercambiar nucleótidos (Di Pietro et al., 1988; Penin et al., 1988).

De modo interesante, luego de incubar al complejo F_1 -I bajo condiciones de hidrólisis unisítio, la adición de Mg-ATP en exceso aumenta la velocidad de la reacción cuando menos en tres órdenes de magnitud (de $0.3 \text{ nmol min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ a aproximadamente $1 \mu\text{mol min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$) (Figs. 15A y 16). No obstante, un 40% del PDP inicial presente para la hidrólisis unisítio no se libera al medio en respuesta a la adición de ATP saturante, como ocurre con la F_1 (Fig. 17 y su recuadro). Nuevamente, la prueba de que este fenómeno ocurre en el complejo F_1 -I es que el efecto de la aurovertina sobre tal complejo es muy distinto del obtenido con la F_1 : i) la hidrólisis unisítio es prácticamente inexistente cuando la aurovertina se adiciona al complejo F_1 -I activo (Fig. 15) y no hay consumo de $[\text{PDP}]\text{ATP}$ en el sitio catalítico (Fig. 17); no se puede descartar la posibilidad de que bajo tal condición no ocurra siquiera la unión del ATP; ii) a pesar de lo anterior, la hidrólisis multisítio determinada después de incubar con cantidades subestequiométricas de ATP y con aurovertina, está estimulada con respecto al control sin aurovertina (Fig. 16), lo cual sugiere que la hidrólisis

cooperativa puede ocurrir aún cuando uno de los sitios catalíticos está bloqueado, por la presencia del inhibidor natural y la aurovertina. Tal conclusión es similar a la alcanzada por la determinación de los efectos que tiene la subunidad ϵ sobre las propiedades de la F_1 de E. coli en condiciones de catálisis unisítio (Dunn et al., 1987). Esta subunidad, que funcionalmente se ha equiparado con el inhibidor mitocondrial (Dreyfus y Satre, 1984; Yoshida et al., 1984), evita la liberación del producto durante este tipo de hidrólisis. Dunn y colaboradores (1987) sugieren que la subunidad ϵ puede impedir un cambio conformacional requerido para la liberación del producto. Que la aurovertina induzca comportamientos distintos en la F_1 y en F_1 -I en cuanto a la liberación del nucleótido del sitio de alta afinidad, apoya la existencia de estas distintas conformaciones, resultantes de la presencia del inhibidor natural de la ATPasa.

Finalmente, el hecho de que el sitio de alta afinidad, en presencia del inhibidor, pueda realizar la hidrólisis unisítio pero que no haya promoción de la liberación del nucleótido así unido por la adición de ATP en exceso, puede ser ejemplo de transición de un sitio catalítico a uno regulador. Si es así, es probable que no todas las subunidades ϵ sean catalíticamente activas durante la hidrólisis cooperativa. El nucleótido (ADP o ATP) que queda unido como consecuencia de la hidrólisis en el sitio de alta afinidad, podría tener un papel modulador de la enzima catalizando la hidrólisis o la síntesis del ATP.

VI. CONCLUSIONES

Los puntos que de manera más importante se resaltan en este trabajo son los siguientes:

- El ADP que proviene del medio que se une a la F_1 y aquél que se genera como producto de la hidrólisis, provocan distintos estados de la enzima. Es posible que ocupen el mismo sitio pero que provoquen distintas conformaciones o, alternativamente, pueden ocupar sitios diferentes.
- Los cambios conformacionales registrados para una sola subunidad β ligada a la aurovertina, pueden transmitirse al resto de la F_1 y regular la catálisis en más de un sitio catalítico.
- El complejo F_1-1 es capaz de realizar la hidrólisis del ATP en sus dos modalidades: multisitio y unisitio.
- El inhibidor natural modifica la velocidad de hidrólisis y de recambio de los nucleótidos unidos en el sitio de alta afinidad para los nucleótidos.
- En presencia del inhibidor natural endógeno, el sitio de alta afinidad puede catalizar la hidrólisis del ATP, pero la unión subsecuente de ATP a un segundo o tercer sitio catalítico no promueve la liberación del nucleótido (sustrato no hidrolizado o producto no liberado) del primer sitio. Así, se propone que por lo menos una de las subunidades β no es catalítica durante la hidrólisis cooperativa.

VII. PERSPECTIVAS

El complejo F_1 con su inhibidor natural endógeno puede catalizar la hidrólisis multisitio y, probablemente, la unisitio. De modo interesante, el ATP que se une en el primer sitio catalítico aparentemente ya no participa de manera activa en la hidrólisis cooperativa, o cuando menos, su recambio con el medio se vuelve extremadamente lento. Este fenómeno no ocurre en la F_1 que no tiene unido al inhibidor natural, con lo que podemos concluir que tal inhibidor tiene una influencia directa sobre los nucleótidos que están en los sitios catalíticos de la ATPasa mitocondrial. De aquí, se pueden plantear las siguientes preguntas:

1. Si el complejo F_0F_1 -inhibidor natural en partículas submitocondriales puede realizar la hidrólisis unisitio y la multisitio. Esto es importante, ya que la forma de la enzima que funciona in vivo es la membranaral.
2. Se sabe que cuando se impone un potencial a través de la membrana, el inhibidor natural se mueve de su sitio de interacción con la F_1 (Göman-Puyou et al., 1979; Harris et al., 1979), teniendo como resultado la aparición de actividad catalítica de la enzima (Dreyfus et al., 1981). Se desconoce si en tal fenómeno participan nucleótidos unidos en sitios reguladores y/o catalíticos. Utilizando las condiciones de hidrólisis unisitios en partículas submitocondriales se puede hacer esta distinción y, así,

conocer la influencia del potencial transmembranal sobre los sitios catalíticos de la ATPasa nativa.

3. El uso de partículas submitocondriales nos permite estudiar también las reacciones en el sentido de la síntesis del ATP. Hasta ahora se desconoce el papel del inhibidor endógeno sobre el sustrato ADP unido en un sitio catalítico, menos aún, luego de la imposición de un potencial transmembranal. De aquí la importancia de estudiar la síntesis del ATP en condiciones de catálisis unisito en partículas submitocondriales con el inhibidor endógeno.

VIII. REFERENCIAS

- Adolfson, R., Mac Clung, J. A., and Moudrianakis, E. N. 1975. *Biochemistry* 14: 1727-1735.
- Al-Shawi, M. K., Parsonage, D., and Senior, A. E. 1989. *J. Biol. Chem.* 264: 15376-15383.
- Amzel, L. M., and Pedersen, P. L. 1983. *Annu. Rev. Biochem.* 52: 801-824.
- Andrews, W. W., Hill, F. C., and Allison, W. S. 1984. *J. Biol. Chem.* 259: 14378-14382.
- Arai, H., Berne, M., Terres, G., Terres, H., Puopolo, K., and Forgac, M. 1987. *Biochemistry* 26: 6632-6638.
- Aris, J. P., and Simoni, R. D. 1983. *J. Biol. Chem.* 258: 14599-14609.
- Barr, R., Safranski, K., Sun, I. L., Crane, F. L., Morre, D. J. 1984. *J. Biol. Chem.* 259: 14064-14067.
- Beltrán, C., Gómez-Puyou, A., and Tuena de Gómez-Puyou, M. 1988. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 152: 867-873.
- Bizardet, P., and Keraux, F. 1987. *Biochim. Biophys. Acta* 893: 544-556.
- Boekema, E. J. 1986. *Z. Naturforsch.* 43c: 219-225.
- Boekema, E. J., Berden, J. A., and van Heel, M. G. 1986. *Biochim. Biophys. Acta* 851: 353-360.
- Boekema, E. J., van Heel, M., and Graber, P. 1988. *Biochim. Biophys. Acta* 953: 365-371.
- Bowman, E. J., Eschida, W. J., Harris, T., and Bowman, E. J. 1989. *J. Biol. Chem.* 264: 15606-15612.
- Boyer, P. D., Cross, F. L., and Mosen, W. 1973. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 70: 2837-2839.
- Bragg, P. D., and Hou, C. 1989. *Biochim. Biophys. Acta* 974: 24-29.
- Brown, G. C. 1989. *J. Biol. Chem.* 264: 14704-14709.
- Bullough, D. A., and Allison, W. S. 1986. *J. Biol. Chem.* 261: 14171-14177.
- Bullough, D. A., Verburg, J. G., Yoshida, M., and Allison, W. S. 1987. *J. Biol. Chem.* 262: 11675-11683.

- Cox, G. B., Fimmel, A. L., Gibson, F., and Hatch, L. 1986. *Biochim. Biophys. Acta* 849: 62-69.
- Cross, R. L. 1981. *Annu. Rev. Biochem.* 50: 681-714.
- Cross, R. L. 1988. *J. Bioenerg. Biomembr.* 20: 295-405.
- Cross, R. L., Grubmeyer, C., and Penefsky, H.S. 1982. *J. Biol. Chem.* 257: 12101-12105.
- Cross, R. L., and Nalin, C. M. 1982. *J. Biol. Chem.* 257: 2874-2881.
- Cross, R. L., Cunningham, D., Miller, C. G., Xue, Z., Zhou, J.-M., and Boyer, P. D. 1987. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 84: 5715-5719.
- Chang, T. and Penefsky, H. S. 1973. *J. Biol. Chem.* 248: 2746-2754.
- Chang, T. and Penefsky, H. S. 1974. *J. Biol. Chem.* 249: 1090-1098.
- Dabbeni-Sala, F., Vézquez-Laslop, N., Fachinetti, A., Devars, S., and Dreyfus, G. 1989. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 158: 1913-1920.
- de Meis, L., Tuena de Gómez-Puyou, M., and Gómez-Puyou, A. 1983. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 111: 274-279.
- Dharmavaran, R. M. and Kamisky, J. 1989. *J. Biol. Chem.* 264: 14055-14059.
- Di Pietro, A., Penin, F., Godinot, C., and Gautheron, D. C. 1980. *Biochemistry* 19: 5671-5675.
- Di Pietro, A., Godinot, C., and Gautheron, D. C. 1981. *Biochemistry* 20: 6312-6316.
- Di Pietro, A., Fellous, G., Godinot, C., and Gautheron, D. C. 1986. *Biochim. Biophys. Acta* 851: 283-294.
- Di Pietro, A., Penin, F., Julliard, J. H., Godinot, C., and Gautheron, D. C. 1988. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 152: 1319-1325.
- Dreyfus, G., Gómez-Puyou, A., and Tuena de Gómez-Puyou, M. 1981. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 100: 400-406.
- Dreyfus, G., and Satre, M. 1984. *Arch. Biochem. Biophys.* 229: 212-219.
- Dreyfus, G. 1985. *J. Biol. Chem.* 260: 12112-12117.

- Dreyfus, G., Guimaraes-Mota, H., and Silva, J. L. 1988. *Biochemistry* 27: 6704-6710.
- Dunn, S. D. 1980. *J. Biol. Chem.* 255: 11857-11860.
- Dunn, S. D., and Futai, M. 1980. *J. Biol. Chem.* 255: 113-118.
- Dunn, S. D., Zadorozny, V. D., Tozer, R. G., and Orr, L. E. 1987. *J. Biol. Chem.* 262: 4488-4493.
- Dupuis, A., and Vignais, P. V. 1987. *Biochemistry* 26: 410-418.
- Dyer, M. R., Gay, N. J., and Walker, J. E. 1989. *Biochem. J.* 260: 249-258.
- Esch, F. S., Bohlen, P., Otsuka, A. S., Yoshida, M., and Allison, W. S. 1981. *J. Biol. Chem.* 256: 9084-9089.
- Ebel, R. E., and Lardy, H. A. 1975. *J. Biol. Chem.* 250: 191-196.
- Edwards, P. A., and Jackson, J. B. 1976. *Eur. J. Biochem.* 62: 7-14.
- Eya, S., Noumi, T., Maeda, M., Futai, M. 1988. *J. Biol. Chem.* 263: 10056-10062.
- Feinstein, D. L., and Moudrianakis, E. N. 1984. *J. Biol. Chem.* 259: 4030-4036.
- Fellous, G., Godinot, C., Esaubichon, W., Di Pietro, A., and Gautheron, D. 1984. *Biochemistry* 23: 5294-5299.
- Fiske, C. A. and Subbarow, Y. 1925. *J. Biol. Chem.* 177: 751-766.
- Foster, D. L., and Fillingame, R. H. 1982. *J. Biol. Chem.* 257: 2009-2015.
- Frasch, W. D., Green, J., Caguiat, J., and Medjia, A. 1989. *J. Biol. Chem.* 264: 5064-5069.
- Fry, D. C., Kuby, S. A., and Mildvan, A. S. 1985. *Biochemistry* 24: 4680-4694 citado en Garbocki et al., 1988.
- Futai, M., Kanazawa, H. 1983. *Microbiol. Rev.* 47: 285-312.
- Futai, M., Noumi, T., Miki, J., and Maeda, M. 1987. *Chemica Scripta* 27B: 89-96, en "Membrane Proteins: Structure, Function, Assembly. J. Rydstrom (ed.). The Royal Swedish Academy of Sciences. Cambridge University Press.

- Futai, M., Noumi, T., and Maeda, M. 1989. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 111-136.
- Galante, Y. M., Wong, S. Y., and Hatefi, Y. 1981. *Biochemistry* 20: 2671-2678.
- Garboczi, D. N., Fox, A. H., Gerring, S. L., and Pedersen, P. L. 1988. *Biochemistry* 27: 553-560.
- Gautheron, D. C., and Godinot, C. 1988. *J. Bioenerg. Biomembr.* 20: 451-468.
- Glynn, I. M. and Chappell, J. B. 1964. *Biochem. J.* 90: 147-149.
- Gogarten, J. P., Kibak, H., Dittrich, P., Taiz, L., Bowman, E. J., Bowman, B. J., Manolson, M. F., Poole, R. J., Date, T., Oshima, T., Konishi, J., Denda, T., and Yoshida, M. 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 6661-6665.
- Gogol, E. P., Lücken, U., and Capaldi, R. A. 1987. *FEBS Lett.* 219: 274-278.
- Gogol, E. P., Lücken, U., Berk, T., and Capaldi, R. A. 1989a. *Biochemistry* 28: 4709-4716.
- Gogol, E. P., Aggeler, R., Sagermann, M., and Capaldi, R. A. 1989b. *Biochemistry* 28: 4717-4724.
- Gómez-Puyou, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., and de Meis, L. 1986. *Eur. J. Biochem.* 159: 133-140.
- Gómez-Puyou, A., Ayala, G., Muller, U., and Tuena de Gómez-Puyou, M. 1983. *J. Biol. Chem.* 258: 13673-13679.
- Gornall, A. G., Bardawill, C. J., and David, M. M. 1949. *J. Biol. Chem.* 177: 751-766.
- Grinkevich, V., Aldanova, N., Kostetsky, P., Trubetskaya, O., Medjanov, N., Hundal, T., and Ernster, L. 1984. p. 155-162 en *H⁺-ATPase (ATP Synthase): Structure, Function, Biogenesis. The F₀F₁ Complex of Coupling Membranes.* S. Papa, K. Altendorf, L. Ernster, and L. Packer (ed.). ICSU Press, Adriatica Editrice, Bari, Italy.
- Grubmeyer, C., Cross, R. L., and Penefsky, H. S. 1982. *J. Biol. Chem.* 257: 12092-12100.
- Guerrieri, F., Scarf, R., Zanotti, F., Che, Y. W., and Papa, S. 1987. *FEBS Lett.* 213: 67-72.
- Guffanti, A. A., and Krulwich, T. A. 1988. *J. Biol. Chem.* 263: 14748-14752.

- Hammes, G. G., and Hilborn, D. A. 1971. *Biochim. Biophys. Acta* 233: 580-590.
- Harold, F. M. 1986. *The Vital Force: A Study of Bionenergetics*. W. H. Freeman. 577 p. New York.
- Harris, D. A., von Tscharner, V., and Radda, G. K. 1979. *Biochim. Biophys. Acta* 548: 72-84.
- Harris, D. A., Dall-Larsen, I., and Klungsoyr, L. 1981. *Biochim. Biophys. Acta* 635: 412-428.
- Harris, D. A., Boork, J., and Baltscheffsky, M. 1985. *Biochemistry* 24: 3876-3883.
- Hartl, F.-U., Pfanner, N., Nicholson, D. W., and Neupert, W. 1989. *Biochim. Biophys. Acta* 988: 1-45.
- Hashimoto, T., Yoshida, Y., and Tagawa, K. 1984. *J. Biochem.* 95: 131-136.
- Hirano, M., Takeda, K., Kanazawa, and Futai, M. 1984. *Biochemistry* 23: 1652-1656.
- Hollemans, M., Runswick, M. J., Fearnley, I. M., and Walker, J. E. 1983. *J. Biol. Chem.* 258: 9307-9313.
- Hoppe, J., Friedl, P., Schairer, H. U., Sebald, W., von Meyenburg, K., and Jørgensen, B. B. 1983. *EMBO J.* 2: 105-110.
- Hoppe, J., Gatti, D., Weber, H., and Sebald, W. 1986. *Eur. J. Biochem.* 155: 259-264.
- Hsu, S.-Y., Nomi, T., Takeyama, M., Maeda, M., Ishibashi, S., and Futai, M. 1987. *FEBS Lett.* 218: 222-226.
- Issartel, J.-P., Klein, G., Sattre, M., and Vignais, P. V. 1983a. *Biochemistry* 22: 3485-3492.
- Issartel, J.-P., Klein, G., Sattre, M., and Vignais, P. V. 1983b. *Biochemistry* 22: 3492-3497.
- Issartel, J.-P., Lunardi, J., and Vignais, P. V. 1986. *J. Biol. Chem.* 261: 895-901.
- Issartel, J.-P., Favre-Bulle, O., Lunardi, J., and Vignais, P. V. 1987. *J. Biol. Chem.* 262: 13538-13544.
- Joshi, S., and Pringle, M. J. 1989. *J. Biol. Chem.* 264: 15548-15551.
- Kagawa, Y. 1984. Proton Motive ATP Synthesis, p. 149-186 en "Bioenergetics". L. Ernster (ed.) Elsevier Science Publishers.

- Kalashnikova, T. Y., Milgrom, Y. M., and Postanogova, N. V. 1988. FEBS Lett. 230: 163-166.
- Kandpal, R. P., Melese, T., Stroop, S. D., and Boyer, P. D. 1985. J. Biol. Chem. 260: 5542-5547.
- Kironde, F. A. S., and Cross, R. L. 1986. J. Biol. Chem. 261: 12544-12549.
- Kironde, F. A. S., and Cross, R. L. 1987. J. Biol. Chem. 262: 3488-3495.
- Klein, G., and Vignais, P. V. 1983. J. Bioenerg. Biomembr. 15: 347-362.
- Klein, G., Satre, M., Dianoux, A. C., and Vignais, P. V. 1980. Biochemistry 19: 2919-2925.
- Klein, G., Lunardi, J., Vignais, P. V. 1981. Biochim. Biophys. Acta 636: 185-192.
- Knowles, A. F. and Penefsky, H. S. 1972. J. Biol. Chem. 247: 6617-6623.
- Laird, D. M. Wallace Parce, J., Montgomery, R. I., and Cunningham, C. C. 1986. J. Biol. Chem. 261: 14851-14856.
- Lardy, H. A., Lin, C.-H. C. 1969 en Inhibitors, Tools for Cell Research. Buecher, T. p. 279-281. Springer-Verlag, N. Y., citado en Chang y Penefsky, 1973.
- Lardy, H. A., Connelly, J. L., and Johnson, D. 1964. Biochemistry 3: 1961-1968, citado en Chang y Penefsky, 1974.
- Layton, D., Azzi, A., and Graziottti, P. 1973. FEBS Lett. 36: 87-92.
- Lee, R. S.-F., Pagan, J., Satre, M., Vignais, P. V., and Senior, A. E. 1989. FEBS Lett. 253: 269-272.
- Linnett, P. E. and Beechey, R. B. 1979. Meth. in Enzymol. 55: 472-485.
- Linnett, P. E., Mulheirn, L. J., and Beechey, R. B. 1983. J. Bioenerg. Biomembr. 15: 81-91.
- Lötscher, H.-R., de Jong, C., and Capaldi, R. A. 1984. Biochemistry 23: 4140-4143.
- Low, H. and Vallin, I. 1963. Biochim. Biophys. Acta 69: 361-374.
- Lowe, P. N., and Beechey, R. B. 1981. Biochem. J. 200: 655-661.

- Lübben, M., Lünsdorf, H., and Schafer, G. 1987. Eur. J. Biochem. 167: 211-219.
- Lunardi, J., Klein, G., and Vignais, P. V. 1986. J. Biol. Chem. 261: 5350-5354.
- Martins, O.B., Tuena de Gómez-Puyou, M., and Gómez-Puyou, A. 1988. Biochemistry 27: 7552-7558.
- Matsuno-Yagi, A., and Hatefi, Y. 1986. J. Biol. Chem. 261: 14031-14038.
- Matsuno-Yagi, A., and Hatefi, Y. 1988. J. Bioenerg. Biomembr. 20: 481-502.
- Matsuno-Yagi, A., Yagi, T., and Hatefi, Y. 1985. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 1589-1593.
- Manolson, M. F., Rea, P. A., and Poole, R. J. 1985. J. Biol. Chem. 260: 12273-12279.
- Martins, O. B., Tuena de Gómez-Puyou, M., and Gómez-Puyou, A. 1988. Biochemistry 27: 7552-7558.
- Melnick, R. L., Tavares de Sousa, J., Maguire, J., and Packer, L. 1975. Arch. Biochem. Biophys. 166: 139-144.
- Milgrom, Y. M. 1989. FEBS Lett. 246: 202-206.
- Mitchell, P. 1974. FEBS Lett. 43: 189-194.
- Montero-Lomelf, M., and Dreyfus, G. 1987. Arch. Biochem. Biophys. 257: 345-351.
- Montero-Lomelf, M., Martins, O. B., and Dreyfus, G. 1989. J. Biol. Chem. 264: 21014-21017.
- Moriyama, Y. and Nelson, N. 1988. J. Biol. Chem. 263: 8511-8517.
- Mueller, D. M. 1989. J. Biol. Chem. 264: 16552-16556.
- Nagle, J. F., and Tristram-Nagle, S. 1983. J. Membr. Biol. 74: 1-14.
- Nelson, N., and Taiz, L. 1989. Trends Biochem. Sci. 14: 113-116.
- Norling, B. 1986. Biochim. Biophys. Res. Comm. 136: 899-905.
- Ohta, S., Tsuboi, M., Oshima, T., Yoshida, M., and Kagawa, Y. 1980. J. Biochem. (Tokyo) 87: 1609-1617, citado en Hirano et al., 1984.

- Pai, E. F., Sachsenheimer, W., Schirmer, R. H., and Schultz, G. E. 1977. *J. Mol. Biol.* 114: 37-45, citado en Garboczi et al., 1988.
- Pedersen, P. L., and Carafoli, E. 1987. *Trends Biochem. Sci.* 12: 186-189.
- Pelham, H. R. B. 1986. *Cell* 46: 959-961.
- Penefsky, H. S. 1974. *J. Biol. Chem.* 249: 3579-3585.
- Penefsky, H. S. 1977. *J. Biol. Chem.* 252: 2891-2899.
- Penefsky, H. S. 1985. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 1589-1593.
- Penefsky, H. S. 1988 *J. Biol. Chem.* 263: 6020-6022.
- Penin, F., Di Pietro, A., Godinet, C., and Gautheron, D. C. 1988. *Biochemistry* 27: 8969-8974.
- Pick, U., and Bassilian, S. 1982. *Biochemistry* 21: 6144-6152.
- Pitotti, A., Dabbeni-Sala, F., and Eruni, A. 1980 *Biochim. Biophys. Acta* 600: 79-90.
- Pullman, M. E., and Monroy, G. S. 1963. *J. Biol. Chem.* 238: 3762-3769.
- Pullman, M. E., Penefsky, H. S., Datta, A., and Racker, E. 1960. *J. Biol. Chem.* 235: 3322-3329.
- Rossman, M. G., and Argos, P. 1981. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 497-532.
- Sakamoto, J., and Tomamura, Y. 1983. *J. Biochem. (Tokyo)* 93: 1601-1614, citado en Tuena de Ofner Puyou et al., 1988.
- Satre, M., Lunardi, J., Pougeois, R., and Vignais, P. V. 1979. *Biochemistry* 18: 3134-3140.
- Satre, M., Bof, M., and Vignais, P. V. 1980. *J. Bacteriol.* 142: 768-777.
- Schatz, G., and Butow, R. A. 1983. *Cell* 32: 316-318.
- Schneider, E., and Altendorf, K. 1985. *Eur. J. Biochem.* 153: 105-109.
- Schneider, E., and Altendorf, K. 1987. *Microbiol. Rev.* 51: 477-497.

- Schuster, S. M., Ebel, R. E., and Lardy, H. A. 1975. J. Biol. Chem. 250: 7848-7853.
- Schuster, S. M., Gertschen, R. J., and Lardy, H. A. 1976. J. Biol. Chem. 251: 6705-6710.
- Schwerzmann, K., and Pedersen, P. L. 1986. Arch. Biochem. Biophys. 250: 1-18.
- Sebald, W., and Hoppe, J. 1981. Curr. Top. Bioenerg. 12: 1-64.
- Senda, M., Kanazawa, H., Tsuchiya, T., and Futai, M. 1983. Arch. Biochem. Biophys. 220: 398-404.
- Senior, A. E. 1985. Curr. Top. Bioenerg. 23: 135-151.
- Senior, A. E. 1988. Physiol. Rev. 69: 177-231
- Senior, A. E. and Wise, J. G. 1983. J. Membr. Biol. 73: 105-124.
- Skulachev, V. P. 1984. Trends Biochem. Sci. April: 182-185.
- Skulachev, V. P. 1988. Membrane Bioenergetics. p. 1-18 y 157-186. Springer-Verlag. Germany.
- Stan Letter, H., and Bragg, P. D. 1986. Arch. Biochem. Biophys. 246: 116-120.
- Südhof, T. C., Fried, V. A., Stone, D. E., Johnston, P. A., and Xie, X.-S. 1989. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 86: 6067-6071.
- Tommasino, M., and Capaldi, R. A. 1985. Biochemistry 24: 3972-3976.
- Tsuprun, V. L., Mesyanchinova, I. V., Kozlov, I. A., and Orlova, E. V. 1984. FEBS Lett. 167: 188-190.
- Tsuprun, V. L., Mesyanchinova, I. V., Milgrom, Y. M., and Kalashnikova, I. Y. 1987. Biochim. Biophys. Acta 892: 130-137.
- Tsuprun, V. L., Orlova, E. V., and Mesyanchinova, I. V. 1989. FEBS Lett. 244: 279-282.
- Tuena de Gómez-Puyou, M., and Gómez-Puyou, A. 1977. Arch. Biochem. Biophys. 182: 82-86.
- Tuena de Gómez-Puyou, M., Muller, U., Dreyfus, G., Ayala, Gómez-Puyou, A. 1983. J. Biol. Chem. 258: 13680-13684.

- Tuena de Gómez-Puyou, M., Martins, O. B., and Gómez-Puyou, A. 1988. *Biochem. Cell. Biol.* 66: 677-682.
- Valdés, A. M., and Dreyfus, G. 1987. *Biochem. Int.* 15: 459-466.
- van de Stadt, R. J., and Van Dam, K. 1974. *Biochim. Biophys. Acta* 347: 240-252.
- van Dongen, M. B. M., and Berden, J. A. 1987. *Biochim. Biophys. Acta* 893: 22-32.
- Vasilyeva, E. A., Minkov, I. B., Fitin, A. F., and Vinogradov, A. D. 1982. *Biochem. J.* 202: 9-14.
- Vázquez-Laslop, N., and Dreyfus, G. 1986. *J. Biol. Chem.* 261: 7807-7810.
- Vázquez-Laslop, N., and Dreyfus, G. 1989. *Ciencia* 40: 147-155.
- Vignais, P. V., and Lunardi, J. 1985. *Annu. Rev. Biochem.* 54: 977-1014.
- Walker, J. E., Powell, S. J., Viñas, O., and Runswick, J. 1989. *Biochemistry* 28: 4702-4708.
- Wang, J. H. 1965. *J. Biol. Chem.* 260: 1374-1377.
- Wang, J. H. 1988. *J. Bioenerg. Biomemb.* 20: 407-421.
- Warshaw, J. E., Lam, K. W., Nagy, B., and Sanadi, D. R. 1968. *Arch. Biochem. Biophys.* 123: 385-396.
- Williams, N., and Coleman, P. S. 1982. *J. Biol. Chem.* 257: 2834-2841.
- Wise, J. G., Latchney, L. R., Ferguson, A. M., and Senior, A. E. 1984. *Biochemistry* 23: 1426-1432.
- Wise, J. G., and Senior, A. E. 1985. *Biochemistry* 24: 6949-6954.
- Wong, S.-Y., Galante, Y. M., and Hafezi, Y. 1982. *Biochemistry* 21: 5781-5786.
- Yoshida, M. 1983. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 114: 907-912.
- Yoshida, M., Allison, W. S., Esch, F. S., and Futai, M. 1982. *J. Biol. Chem.* 257: 10033-10037.
- Yoshida, Y., Wakabayashi, S., Matsubara, H., Hashimoto, T., and Tagawa, K. 1984. *FEBS Lett.* 170: 135-138.

- Ysern, X., Amzel, L. M., and Pedersen, P. L. 1988. J. Bioenerg. Biomembr. 20: 423-449.
- Zhang, F., Schneider, D. L. 1983. Biochim. Biophys. Res. Comm. 114: 620-625.
- Zhou, J.-M., Xue, Z., Du, Z., Melese, T., and Boyer, P.D. 1988. Biochemistry 27: 5129-5135.

IX. APENDICE

La Parte I de la sección de "Resultados" se publicó en The Journal of Biological Chemistry, vol. 264 (29): 17064-17068, 1989. Se incluye una copia del mismo.

El manuscrito de la Parte II de la sección de "Resultados" se encuentra en preparación.

Se anexan también copias de trabajos elaborados durante el período del doctorado, cuyas citas son:

- Dabbeni-Sala, F., Vázquez-Laslop, N., Fachinetti, A., Devars, S., and Dreyfus, G. 1989. Biochim. Biophys. Res. Comm. 158: 1012-1020.
- Vázquez-Laslop, N., and Dreyfus, G. 1989. Ciencia 40: 147-155.

MODULATION OF MITOCHONDRIAL F_0F_1 CATALYSIS BY BOUNDARY AND
BULK PHASE PHOSPHOLIPIDS

Federica Dabbeni-Sala¹, Nora Vázquez-Laslop², Antonella Fachinetti¹,
Silvia Devars² and Georges Dreyfus²

¹ Dipartimento di Farmacologia dell'Università di Padova, Italy

² Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular,
UNAM, Ap. Postal 70-243, 04510, México D.F., México

Received December 22, 1988

The importance of boundary and bulk phase phospholipids was studied on a mitochondrial ATPase complex isolated by AH-Sepharose chromatography as described by Dreyfus et al (1984, Anal. Biochem. 142, 215-220), this preparation was devoid of the adenine nucleotide carrier. The presence of isoelectric or acidic phospholipids during the purification in the column allows the exchange of tightly bound phospholipids up to 95%. ATP hydrolysis and oligomycin sensitivity were slightly affected by the nature of boundary and bulk phase phospholipids, while F_1 -ATP exchange was highly inhibited.

The mitochondrial F_0F_1 synthase is the terminal enzyme of the respiratory chain and it is composed of a membrane bound portion (F_0) and a water soluble sector (F_1) (for review see ref.1). This complex enzyme catalyses the synthesis of ATP coupled to proton electrochemical gradients. The catalytic activity of the enzyme is regulated by the inhibitor protein (2) by bound adenine nucleotides (3) as well as by subunit-subunit interactions (4). The ATP synthase requires a lipid environment in order to catalyze synthetic and hydrolytic activities. Many studies have been carried out on the importance of the polar head charge and on the degree of saturation of the hydrophobic fatty acid chain on the catalytic activities of the mitochondrial F_0F_1 complex (5-8). However the molecular mechanism of interaction of acidic or isoelectric phospholipids with the ATP synthase is still controversial.

In addition it has been demonstrated that the adenine nucleotide carrier, which copurifies with the ATP synthase isolated by the method of Serrano et al

(5), influences greatly ATPase reactivation of hydrolysis by isoelectric phospholipids (7,10,19). It has also been shown that isolation procedures using different detergents renders delipidated enzymes with residual phospholipids that vary in quantity and quality (10).

To further investigate the role of boundary as well as the bulk phase phospholipids, on the catalytic activities of the mitochondrial ATP synthase, we have used a preparation which is obtained by solubilization with Lauryldimethylamine oxide (LDAO) and AH-Sepharose chromatography (11). This procedure allows the exchange of boundary phospholipids and renders an ATP synthase preparation devoid of the adenine nucleotide carrier.

MATERIALS AND METHODS

Materials

AH-Sepharose was purchased from Pharmacia Fine Chemicals. Phospholipids were obtained from SIGMA or prepared as previously described (12). LDAO was from Onix Corporation, Division of Millmaster (Jersey City, N.J.). $^{32}\text{P}_i$ was purchased from New England Nuclear and purified as described (13). All other reagents were of analytical grade.

Isolation of F_0F_1 ATPase

F_0F_1 -ATPase was purified from Mg-ATP submitochondrial particles (14) in the presence of 7.5 mM LDAO, 75 mM sucrose, 1 mM EDTA, 0.4 mM ATP, 5 mM Tris-Cl, pH 7.5 as described previously (11). The supernatant containing solubilized ATPase was passed through AH-Sepharose column equilibrated with 20 mM Tris-Cl, pH 7.5, 2 mM EDTA, 10 mM Mg-chloride in the presence or in the absence of sonicated phospholipids (3 mg/ml): asolectin (aso) or egg-phosphatidylcholine (PC). The column was washed with 80 ml of the same buffer. The enzyme was eluted by the addition of 1 M KCl in the same buffer and 3 ml fractions were collected. Fractions obtained were tested for ATPase activity and oligomycin sensitivity and precipitated with 50% saturated ammonium sulfate pH 7.5.

Enzymatic Activity

One milligram of the isolated ATPase complex was dialyzed overnight against 20 mM Tris-Cl, pH 7.5, 250 mM sucrose, 0.5 mM MgSO_4 , 0.5 mM EDTA, 0.2 mM DTT. The samples were tested for ATPase and P_i -ATP exchange activities. ATPase activity was determined spectrophotometrically as described previously (17) in the presence or in the absence of oligomycin (5 μg). P_i -ATP exchange was tested after 40 min of incubation at 37°C of 30 μg of protein in 0.6 ml containing 250 mM sucrose, 50 mM Tris-acetate, pH 7.8, 2 mM H_3PO_4 , pH 7.5, 5 mM ADP, 10 mM MgSO_4 , 3 mM ATP and 2.3×10^5 cpm $^{32}\text{P}_i$. The reaction was stopped by the addition of 0.2 ml of 30% trichloroacetic acid. After centrifugation, for 5 min in a clinical centrifuge, 0.6 ml of the supernatant was removed and treated as in ref. (13) to determine the amount of esterified $^{32}\text{P}_i$.

Analysis of residual phospholipids

1-2 mg of delipidated ATPase complex was extracted with chloroform:methanol and washed with CaCl_2 (as described in ref. 10). Quantitative and qualitative estimations were performed as described (15) using bidimensional thin-layer chromatography on silica gel 60 precoated plates (Merck).

Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Polyacrylamide gradient gels 13-19% containing a linear sucrose gradient 0-24% were performed as previously described (16), the gels were loaded with 100 μg samples. After staining with Coomassie-blue the gel patterns were recorded by scanning at 570nm with double-beam Shimadzu CS-930 type scanner.

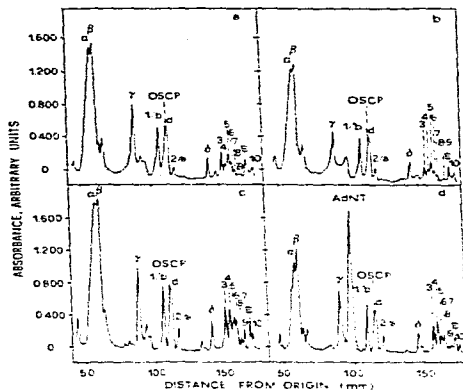
Analytical procedures

Protein was determined in the submitochondrial particles as in (18) while that of F_0F_1 preparation was made according to Lowry (19).

RESULTS

Figure 1 (a, b) shows the electrophoretic pattern of the mitochondrial F_0F_1 complex isolated in the presence of either asolectin or egg-phosphatidylcholine respectively. It can be observed that independently of the phospholipid used the patterns are identical. On the other hand, the integrity of the ATPase complex is lost when the enzyme is isolated only in the presence of detergent (data not shown). It should be noted that the composition of the ATPase complex, isolated by the use of the Sepharose-4B chromatography, is very similar to the one described by Galante et al (18) (Fig. 1c). Whereas it markedly differs from that of Serrano et al (9) which contains considerable amounts of the adenine nucleotide carrier (Fig. 1d).

When the ATPase complex is isolated in the absence of phospholipids, ATPase activity and oligomycin sensitivity are severely diminished (0.55 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, 13% respectively). On the other hand, preparations isolated in the presence of either asolectin or egg-phosphatidylcholine show ATPase activity and oligomycin sensitivity (data not shown). We have analyzed the phospholipid composition of the F_0F_1 complex isolated in the absence or presence of either acidic or isoelectric phospholipids and compared it to the composition of submitochondrial particles (Table I). It can be observed that, when the enzyme is isolated in the absence of phospholipids, the total amount of phospholipids



AdN1: adenine nucleotide carrier

Figure 1. Densitometric traces of the ATPase complex: (a) F₀F₁ isolated by the method described by Dreyfus et al (11) in the presence of asolectin (b) same procedure in the presence of egg-phosphatidylcholine, (c) F₀F₁ complex prepared by Galante et al (18); d) F₀F₁ complex prepared as described by Serrano et al (9).

TABLE 1. PHOSPHOLIPID COMPOSITION OF THE MITOCHONDRIAL F₀F₁ ATP-Synthase

TOTAL EXTRACTED	PC	PE	DPG	Other Phospholipids
PLS* (nmol/mg)	nmol/mg %	nmol/mg %	nmol/mg %	nmol/mg %
SMP (440-470)	462 221 48	136 29	92 20	a13 3
Whitour PLS (76-172)	157 71 45	52 33	23 15	a12 8
Asolectin (136-165)	146 67 46	50 34	6 4	b23 16
Egg-PC (140-225)	180 172 95	5 5	3 2	- -

The isolation of the ATPase complex was performed in the absence of phospholipids during AH-Sepharose chromatography or in the presence of asolectin or egg-phosphatidylcholine. The estimation of residual phospholipids was carried out as indicated in Materials and Methods. Other phospholipids a) phosphatidylserine, b) phosphatidylinositol.

*The phospholipid content is expressed as nmoles of Pi/mg protein.

decreases, whereas the relative overall composition remains similar to that of submitochondrial particles. In the case of a preparation obtained in the presence of aolectin the relative lipid composition remains very similar to that of submitochondrial particles. Nevertheless the ATPase complex is delipidated, given that the total phospholipid contents diminishes to less than 50%. Although it should be noted that there is a loss in cardiolipin and an enrichment in phosphatidylinositol. Interestingly when the ATPase complex is isolated in the presence of phosphatidylcholine, 95% of the boundary phospholipids is phosphatidylcholine. Therefore the isolation procedure employed allows an effective exchange of tightly bound phospholipids.

Finally we have explored the effect of acidic and isoelectric phospholipids on the hydrolytic and synthetic activities of the reconstituted ATP synthase. Table II shows that ATP hydrolysis is present independently of the phospholipid used for isolation or reconstitution. Interestingly ATPase activity is inhibited by more than 50% when aolectin is used during isolation and egg-phosphatidylcholine in the reconstitution. Accordingly oligomycin sensitivity decreases to 20% under these conditions.

On the other hand P_i -ATP exchange is maximal (66 nmol mg^{-1}) in a preparation isolated in the presence of aolectin and reconstituted with the same phospholipid. If isolation is carried out with egg-phosphatidylcholine and

TABLE II. EFFECT OF ACIDIC AND ISOELECTRIC PHOSPHOLIPIDS IN ATP HYDROLYSIS AND ATP- P_i EXCHANGE ACTIVITIES

Phospholipid present in		ATPase Activity ^a	Oligomycin	P_i -ATP Exchange ^a
Euate	Reconstituted ATPase complex	(μ mol min^{-1} mg^{-1})	Sensitivity (%)	(nmol P_i mg^{-1})
Asolectin	Asolectin	1.9	54	66
Egg-PC	Egg-PC	1.4	41	1.7
Asolectin	Egg-PC	0.8	20	4.7
Egg-PC	Asolectin	1.9	39	22.6

a) Enzymatic activity was measured after cholate dialysis as described in Materials and Methods.

reconstituted with asolectin, the exchange activity drops to 22 nmol mg^{-1} and it is almost inexistent when reconstitution is performed in liposomes of egg-phosphatidylcholine.

DISCUSSION

The F_0F_1 -ATP synthase preparation used in the present study is devoid of the adenine nucleotide carrier. This is of importance given that it has been demonstrated that the adenine nucleotide carrier, when it copurifies with the ATP synthase, interferes with the reconstitution of the complex in isoelectric liposomes (10). This was further confirmed by means of photolabelling experiments where it was shown that subunits 1 and 2 of the F_0 portion are not labelled with azido-phosphatidylcholine, when the adenine nucleotide carrier is present (16).

Moreover the preparation procedure allows the control of boundary phospholipids and the study of the effect of the polar head. When the enzyme is isolated in the absence of phospholipids the integrity of the complex is lost. This protective effect of the phospholipids on the ATP synthase is difficult to ascertain at present. As shown in this work, when the purified ATP synthase contains negatively charged phospholipids it inserts correctly into negatively charged asolectin liposomes. Consequently ATPase and P_i -ATP exchange activities as well as oligomycin sensitivity are preserved. On the contrary, if the ATP synthase is surrounded by negatively charged phospholipids it does not insert correctly into isoelectric egg phosphatidylcholine liposomes. The hydrolytic activity, P_i -ATP exchange and oligomycin sensitivity are diminished. This is in agreement with a previous study (7) where the adenine nucleotide carrier-free Complex V, also surrounded by negatively charged phospholipids is not easily inserted in liposomes formed with egg-phosphatidylcholine, nevertheless it reconstitutes readily into negatively charged liposomes. If the boundary phospholipids are isoelectric (Egg-PC) the ATP synthase is reconstituted by cholate dialysis into both negative and isoelectric liposomes. Under these conditions ATPase activity and oligomycin sensitivity are preserved. Interestingly the P_i -ATP exchange rate is significantly lower in

liposomes of asolectin that contain an ATPase complex with isoelectric boundary lipids suggesting that the native structure of the ATP synthase is possibly altered. From the above results we can suggest that both, boundary and bulk phase phospholipids, are important in supporting catalytic activity of the ATP synthase.

In contrast to P_i -ATP exchange, ATP hydrolysis is less sensitive to the composition i.e. net charge of the liposomes. On the contrary, P_i -ATP exchange is highly sensitive to bulk phase liposome composition, in fact exchange activity was never observed in the presence of isoelectric egg phosphatidylcholine liposomes. This is in agreement with the findings of Kagawa et al. (5) which used a preparation that contained the adenine nucleotide carrier. In fact they were unable to observe P_i -ATP exchange in the presence of phosphatidylcholine alone. Hence this parameter seems to be independent of the presence of the adenine nucleotide carrier. Studies on the importance of other classes of boundary acidic phospholipids as phosphatidylserine, cardiolipin or phosphatidylethanolamine are at present in progress. On the other hand the determination of the electrochemical potential generated in the reconstituted proteoliposomes will also be assessed.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Grants from The Third World Academy of Sciences (BC 88-23) and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México). We greatly acknowledge Dr. Armando Gómez Fuyou for his encouragement during this study.

REFERENCES

1. Senior, A.E. (1988) *Phys. Rev.* 68, 177-231.
2. Schwerzman, K. and Pedersen, P.L. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* 250, 1-16.
3. Kironde, F.A. and Cross, R.L. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 12544-12549.
4. Vázquez-Laslop, N., and Dreyfus, G. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 7807-7810.
5. Kagawa, Y., Kandrach, A., and Racker, E. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 676-684.
6. Bruni, A., van Dijk, P. W. M., and de Gier, J. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 406, 315-328.
7. Dabbeni-Sala, F., and Palatini, P. (1985) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 133, 807-813.
8. Laird, D. M., Parce, J. W., Montgomery, R., and Cunningham, C. C. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 14851-14856.

9. Serrano, R., Kanner, B. I., and Racker, E. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 2453-2461.
10. Dabbeni-Sala, F., Pitotti, A., and Bruni, A. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 637, 400-407.
11. Dreyfus, G., Celis, H., and Ramirez, J. (1984) *Anal. Biochem.* 142, 215-220.
12. White, B. J., Tipton, C. L., and Dressel, M. (1974) *J. Chem. Educ.* 51, 133-137.
13. de Meis, L., Tuena de Gómez-Puyou, M., and Gómez-Puyou, A. (1983) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 111, 274-279.
14. Lee, C.P., Ernster, L. (1967) *Meth. Enzymol.* 10, 543-548.
15. Rouser, G., Yamamoto, A., and Fleisher, S. (1970) *Lipids* 5, 494-496.
16. Montecucco, C., Dabbeni-Sala, F., Friedl, P., and Galante, Y.M. (1983) *Eur. J. Biochem.* 132, 189-194.
17. Pullman, M.E., Penefsky, H. S., Datta, A. and Racker, E. (1960) *J. Biol. Chem.* 253, 3322-3329.
18. Gornall, A.G., Bradwill, C.J. and David, M.M. (1949) *J. Biol. Chem.* 177, 751-766.
19. Markwell, M.A.K., Haas, S.M., Bieber, L.L. and Tolbert, N.E. (1978) *Anal. Biochem.* 87, 206-210.

La síntesis de adenosintrifosfato

Nora Vázquez Laslop

y

Georges Dreyfus

RESUMEN

El adenosintrifosfato (ATP) es una molécula central en el metabolismo celular. Su papel es acoplar reacciones que requieren energía a su reacción de hidrólisis que es exergónica, desplazando entonces el equilibrio de la reacción metabólica hacia una dirección determinada. Es por esta razón que gran parte de la investigación en bioenergética se ha dedicado a comprender el mecanismo por el cual se sintetiza el ATP. La energía necesaria para la formación del ATP proviene, de acuerdo con la teoría quimiosmótica, del gradiente de protones que se forma a uno y a otro lado de las membranas transductoras de energía, como consecuencia de la actividad de las enzimas de la cadena de transporte de electrones y, en parte, es consumido por la ATP sintasa. Esta última es una enzima membranar cuya compleja estructura, al parecer, es la mínima necesaria para realizar sus funciones catalíticas y para que pueda ser regulada. Hasta ahora, no se ha establecido en forma definitiva de qué manera está acoplado el paso de los protones a través de la porción membranar de la ATP sintasa con la formación del ATP en los sitios catalíticos de la enzima. Todavía se discute cuál o cuáles de los pasos de la síntesis de este compuesto requieren energía. El gradiente de protones transmembranar es uno de los varios factores reguladores de la ATP sintasa. Otros factores que modular su actividad son: los nucleótidos, algunos cationes, los fosfolípidos membranarales y las interacciones que se establecen entre las subunidades de la proteína.

Recibido el 12 de diciembre de 1988.

Aceptado en forma revisada el 9 de febrero de 1989.

M en C Nora Vázquez Laslop. Recibió el título de bióloga de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México y cursó la maestría en investigación biomédica básica también en la UNAM. Actualmente se encuentra en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, cursando el último año del doctorado en el área de bioquímica en estudios sobre la regulación de la catálisis en la ATP sintasa mitocondrial.

El Dr. Georges Dreyfus obtuvo el título de médico cirujano en la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, el grado de maestro y el de doctor en investigación biomédica básica (bioquímica) también en la UNAM. Realizó su estancia posdoctoral en el Departamento de Investigación Fundamental del Centro de Estudios Nucleares de Grenoble, con el Prof. Pierre V. Vignais. Actualmente es investigador en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM e Investigador Nacional. Su área de interés es la relación estructural-función en las ATP sintetasas mitocondrial y bacteriana.

I. ENERGÍA PARA LOS SERES VIVOS

Los seres vivos deben realizar trabajo químico sin cesar para mantenerse alejados del equilibrio termodinámico. Por esta razón los organismos requieren una corriente continua de materia y de energía para subsistir. Del medio físico se podrían sustraer varias formas de energía, sin embargo, solamente dos tienen importancia como fuente primaria de energía biológica: algunas transformaciones inorgánicas y la luz solar. Como ejemplo de quienes aprovechan la primera, se encuentran las bacterias que oxidan al ácido sulfhídrico o al ion ferroso, o las que reducen el CO₂ a metano. Los ejemplos de los que utilizan la luz solar como fuente de energía son todos los organismos fotosintéticos, desde las bacterias y las algas hasta las plantas superiores.

La pregunta central de la bioenergética es de qué manera se lleva a cabo el acoplamiento entre las fuentes de energía y su utilización en todas las actividades biológicas. Dicho de otra manera, cómo los procesos exergónicos que tienden hacia el equilibrio pueden acoplarse a los procesos endergónicos asociados con la vida para que ésta se mantenga alejada del mismo.

Aunque Lohman había descubierto el ATP desde 1929, su importancia como almacén de energía bioquímicamente útil no se reconoció sino hasta finales de la década de los treinta, al encontrar que varias reacciones del metabolismo intermediario estaban acopladas a la síntesis del ATP. En 1941 Fritz Lipmann describió la importancia que tienen los grupos fosfato de "alta energía" en diversos procesos celulares. De hecho, todos los sistemas de conservación de energía biológica tienen como característica su capacidad para

transferir energía de diversas fuentes a la energía química almacenada en la molécula del ATP.

El ATP provee energía para una gran diversidad de reacciones químicas, como la síntesis de macromoléculas a partir de sus correspondientes unidades monoméricas o la síntesis de compuestos activados. El acoplamiento enzimático con la hidrólisis del ATP muchas veces desplaza el equilibrio de una reacción hacia una dirección específica. Numerosas vías metabólicas, como la biosíntesis y la β -oxidación de ácidos grasos, la degradación de la glucosa, la síntesis de urea y la síntesis de nucleótidos, requieren ATP. La contracción muscular, el movimiento de cilios y flagelos, la bioluminiscencia, la generación de corriente eléctrica y el transporte activo de muchas sustancias a través de membranas utilizan al ATP como fuente de energía.

La función del ATP en estas reacciones es que al acoplar el proceso exergónico de su conversión en ADP y fosfato permite que se lleven a cabo los procesos endergónicos del metabolismo. Para decirlo de otra manera, la participación de la pareja ATP/ADP en un paso metabólico desplaza el equilibrio de la reacción hacia un sentido determinado, sin necesidad de alterar las concentraciones de reactantes o de productos. Así, dentro de la célula se puede mantener el nivel de metabolitos en concentraciones fisiológicamente eficientes.

Gran parte de la investigación en bioenergética está enfocada a estudiar los mecanismos celulares que permiten a los sistemas vivos aprovechar la energía disponible de las transformaciones químicas o de la absorción de luz para sintetizar el ATP (Broda, 1978; Jones, 1981; Nicholls, 1982 y 1984; Tzagoloff, 1983; Harold, 1986). Existen dos clases de procesos por los cuales puede producirse esta molécula: las reacciones de enzimas solubles que involucran la fosforilación de compuestos (fosforilación en el nivel de sustrato) y la fosforilación asociada con las enzimas membranales de la cadena de transporte de electrones de organismos respiratorios (fosforilación oxidativa) o de organismos fotosintéticos (fotofosforilación). Como vías capaces de producir ATP, la fosforilación oxidativa y la fotofosforilación son, desde el punto de vista energético, mucho más eficientes que las fosforilaciones en el nivel de sustrato, como por ejemplo las que ocurren en la glucólisis o en el ciclo de Krebs (Harold, 1986).

En 1939, Kálcckar mostró que la síntesis del

ATP en organismos aeróbicos era dependiente del consumo de oxígeno. A partir de entonces se han hecho esfuerzos por conocer la forma en que las cadenas de transporte de electrones respiratoria y fotosintética proporcionan la energía requerida para la síntesis del ATP (Tzagoloff, 1983).

II. TEORÍA QUIMIOSMÓTICA

En 1961, Peter Mitchell formuló la teoría quimiosmótica que plantea que la conversión de energía proporcionada por sustratos oxidables (respiración) o por la luz (fotosíntesis) en energía almacenada como ATP requiere de un bombeo de protones (H^+) a través de las membranas llamadas transformadoras de energía, por el hecho de que en ellas se encuentran todas las enzimas necesarias para la cadena de transporte de electrones y para la formación del ATP. Tales membranas son: la membrana plasmática de las bacterias respiratorias y fotosintéticas, la membrana tilacoidal de los cloroplastos y la membrana interna de las mitocondrias. Este conjunto de enzimas puede verse como una pareja de bombas: una transloca H^+ hacia un lado de la membrana y la otra bombea los H^+ provenientes de la primera en el sentido inverso. De este bombeo de H^+ derivaría, según esta teoría, la energía para formar el ATP a partir del ADP y del fosfato inorgánico (P_i) (Nicholls, 1982 y 1984) (véase la Fig 1).

Para las mitocondrias y para las bacterias aeróbicas la bomba primaria es la cadena respiratoria que transfiere electrones desde un sustrato donador (como el NADH o el succinato) hasta un aceptor (generalmente el

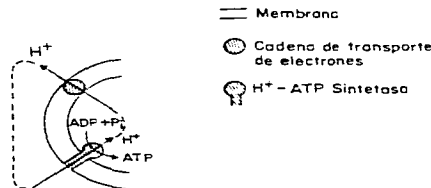


Figura 1. Translocación de protones a través de una membrana transformadora de energía. La cadena de transporte de electrones bombea H^+ hacia un lado de la membrana. El bombeo de H^+ en el sentido inverso, a través de la H^+ -ATPasa, cierra el circuito. La energía que deriva de esta translocación de H^+ se utiliza para la síntesis del ATP (Nicholls, 1982).

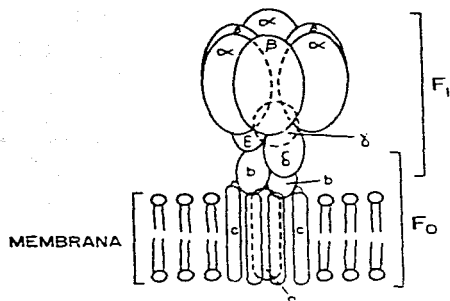


Figura 2. Modelo de la estructura del complejo F_0F_1 de *E. coli* (tomado de Futai y Kanazawa, 1983)

H^+ (Amzel y Pedersen, 1983; Kagawa, 1984) (véase la Fig 2). Recientemente con estudios de microscopía electrónica, se mostró que F_0 tiene una longitud de 8.9 nm. Se sabe que una bicapa de fosfolípidos tiene unos 5 nm de espesor, lo que quiere decir que gran parte del canal se encuentra fuera de la membrana. Se ha calculado que su diámetro es de 10 a 12 nm, aunque muy probablemente es menor ya que puede tener unidas moléculas del detergente que se utiliza para su purificación (Boekema, 1988).

Para el caso del complejo F_0F_1 mitocondrial, entre estos dos sectores existen algunas subunidades que se conocen como factores del cuello, entre las que se encuentran el factor B , el factor 6 y la proteína que confiere la sensibilidad al antibiótico oligomicina (OSCP). Estos factores del cuello forman un puente estructural entre las porciones F_0 y F_1 y es posible que intervengan en el acoplamiento entre el paso de los H^+ a través del canal F_0 y la síntesis o la hidrólisis del ATP en la F_1 (Amzel y Pedersen, 1983; Kagawa, 1984).

Es interesante resaltar varios puntos acerca de la estructura de la F_0F_1 -ATPasa. El hecho de que el gen para F_0F_1 se encuentre altamente conservado en la naturaleza explica los varios niveles de homología en esta enzima. Un primer nivel de homología es el que se encuentra entre las subunidades de especies evolutivamente distantes; por ejemplo, la secuencia de la subunidad α de especies muy diversas presenta más de un 60% de homología y en la secuencia de la subunidad β la

homología es aún mayor (Ysern y col, 1988). Las subunidades c de varias especies examinadas presentan dos secuencias hidrofóbicas conectadas por una región polar media. Otro nivel de homología es el que existe entre las subunidades relacionadas del complejo por tener funciones o propiedades similares. Por ejemplo, la semejanza entre las subunidades α y β , que son las dos únicas subunidades de la enzima que tienen capacidad para unir nucleótidos, o bien, la subunidad ϵ de la F_1 mitocondrial que es homóloga a la subunidad c de *Escherichia coli*. Finalmente, también se ha mostrado que existe homología entre las subunidades α y β de la F_1 y varias enzimas y proteínas que pueden unir nucleótidos, como la RNA; sintetasa, la RNA polimerasa, la Ca^{2+} -ATPasa, el translocador ATP/ADP, la adenilatoquinas, la fosfofructocinasa y la miosina (Kagawa, 1984).

Varias evidencias sobre la estructura de F_0F_1 -ATPasa señalan la naturaleza asimétrica del complejo. Se sabe por microscopía electrónica que la porción F_1 tiene un arreglo hexagonal, con las subunidades α y β acomodadas en forma alternada. En una masa central se observa una estructura en forma de 'V' colocada asimétricamente, constituida probablemente por las subunidades γ y ϵ . Existe una segunda masa central más pequeña, también desplazada, que quizás corresponde a la subunidad δ (Boyer, 1987; Boekema y col, 1988) (véase la Fig 3). Actualmente existe discusión acerca de la no equivalencia de las tres subunidades α y de las tres β ya que, al parecer, no interaccionan de la misma manera con las subunidades pequeñas o con las subunidades del canal. El hecho de que el inhibidor natural de la ATPasa se asocie con sólo una de las subunidades β , apoya también la no equivalencia entre estas subunidades. Si esta asimetría en la estructura de la enzima es relevante o no para el mecanismo catalítico de la hidrólisis y la síntesis del ATP, es una pregunta por contestarse (Boyer, 1987).

IV. PROPOSICIONES ACERCA DEL MECANISMO CATALÍTICO DE LA SÍNTESIS DEL ATP

El mecanismo de síntesis del ATP por la F_0F_1 -ATPasa no incluye la existencia de un intermediario fosforilado de la enzima, como ocurre con otras ATPasa, como la ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico o la ATPasa de Na^+ - K^+ de la membrana

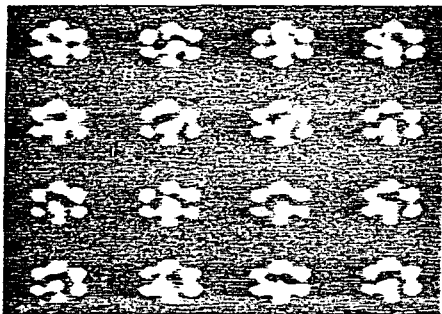


Figura 3. Proyecciones moleculares procesadas de micrografías electrónicas del sector F_1 de la ATP sintasa de cloroplastos de espinaca (tomadas de Boyer y col. 1987).

plasmática de células animales, siendo entonces el gradiente de protones $\Delta\mu H^+$ el "intermediario de alta energía" para esta reacción. Así bien, aunque aún se discute la estequiometría H^+/ATP , es bien sabido que la síntesis o la hidrólisis del ATP catalizada por la F_0F_1 -ATPasa está acoplada con la translocación de H^+ a través de la membrana. Por tanto, todo mecanismo que se proponga acerca del funcionamiento de

esta enzima debe contemplar este fenómeno quimiosmótico (Boyer, 1987).

Existen, entonces, dos tipos de modelos que tratan de explicar cómo funciona el complejo F_0F_1 -ATPasa. Los que se conocen como de acoplamiento directo, sugieren que los H^+ que son translocados a través de F_0 intervienen directamente en las reacciones que ocurren en los sitios catalíticos de la F_1 , es decir, que el acoplamiento ocurre directamente por interacciones moleculares entre los H^+ y los sustratos. El ADP y el P_i se unen al sitio catalítico de la subunidad β , perdiendo uno y dos H^+ , respectivamente, que se liberan hacia la matriz, en el caso de la mitocondria. Estos sustratos quedan unidos con una orientación específica, de tal suerte que los H^+ provenientes del canal F_0 inciden sobre los átomos de oxígeno del P_i , originando una especie altamente reactiva que se une directamente con el ADP y se forma el producto ATP. Este mecanismo predice la estequiometría específica de tres H^+ liberados por cada ATP producido (Mitchell, 1974; Scarborough, 1986; Boyer, 1987) (véase Fig 4a).

El otro grupo de modelos, los conocidos como de acoplamiento indirecto, sostienen que la energía del gradiente de H^+ utilizada para formar ATP tiene como intermediarios ciertos cambios conformacionales en F_0F_1 , es decir, proponen que el $\Delta\mu H^+$ tiene un efecto "a distancia" sobre los sitios catalíticos de la F_1 . El papel de los H^+ de acuerdo con

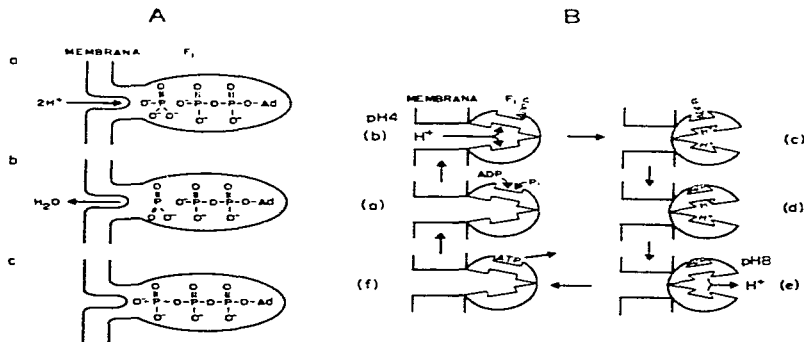


Figura 4. Modelos para la síntesis del ATP por la H^+ -ATP sintasa. a) Modelo de acoplamiento directo; b) Modelo de acoplamiento indirecto (Nicholls, 1982).

este mecanismo, es producir distintos estados conformacionales en los sitios catalíticos que difieren principalmente en sus afinidades por los reactivos o por los productos. Experimentalmente se sabe que el ATP formado en uno de los sitios catalíticos no se libera sino hasta que se une ADP en un segundo sitio. Esto sugiere la siguiente secuencia cíclica: en un primer estado el ADP y el P_i se encuentran unidos débilmente en el sitio catalítico de una subunidad β ; los H^+ provenientes de F_0 provocan un cambio conformacional que, a su vez, produce un aumento en la afinidad por los sustratos en este mismo sitio y así activados, se combinan para formar ATP que queda unido fuertemente. Paralelamente, el ATP producido en otra subunidad β debilita su unión y se libera, mientras que otro de los sitios queda activado para unir más sustrato. El mecanismo sugerido por este modelo no predice ninguna estequiometría específica de los H^+ necesarios para la formación de una molécula de ATP (Boyer, 1975 y 1987; Scarborough, 1986) (véase Fig 4b).

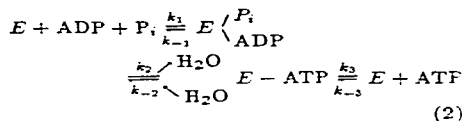
A pesar de que son escuelas claramente divididas, quizás los mecanismos de acoplamiento directo no excluyen la existencia de cambios conformacionales y, por otra parte, las evidencias sobre la existencia de cambios conformacionales no necesariamente apoyan los mecanismos de acoplamiento indirecto (Scarborough, 1986).

La mayor parte de los estudios sobre la catálisis de la F_0F_1 -ATPasa se han realizado en formas solubles de la enzima que, como hemos mencionado, en tal estado se comporta como un ATPasa. Así, de los datos que se conocen de la hidrólisis se ha podido obtener información muy valiosa sobre los pasos de la síntesis del ATP en la enzima membranaral (Grubmeyer y col, 1982).

La F_1 tiene dos clases de sitios para unir nucleótidos, tres de ellos pueden intercambiar fácilmente los nucleótidos con los que se encuentren en el medio. Esta característica sugiere que estos son los sitios catalíticos. El otro tipo de sitios, de los que también existen tres, no pueden recambiar los nucleótidos con los del medio y se piensa que su función es estructural o reguladora. Aunque todavía quedan ciertas dudas, se acepta que los sitios catalíticos se encuentran en la subunidades β (también se sugiere que se podrían encontrar en las interfaces α - β), un sitio en cada subunidad (Grubmeyer y col, 1982; Amzel y Pedersen, 1983).

La formación del ATP incluye un esquema

mínimo de tres pasos que se describen con la siguiente ecuación:



es decir, estos pasos son la unión del ADP y el P_i , la conversión del ADP y del P_i unidos a ATP y la liberación del ATP. Alguno o todos estos pasos deben estar acoplados al gradiente de protones existente a través de la membrana. El papel de la energía proveniente de este gradiente debe ser alterar los valores de las constantes de velocidad, de tal suerte que el aparente equilibrio, $(k_1 k_2 k_3) / (k_{-1} k_{-2} k_{-3})$, está desplazado de 10^{-6} , en la reacción de hidrólisis, a 1 en la catálisis de la síntesis del ATP (Boyer y col, 1982).

Para la reacción de hidrólisis, el valor que se ha calculado para la constante de afinidad por el ATP en uno de los tres sitios catalíticos es $10^{12} M^{-1}$. Después de que se une el ATP a un primer sitio con tan alta afinidad se establece un rápido equilibrio entre éste y sus productos hidrolíticos, ADP y P_i , unidos todavía al sitio catalítico. La constante de equilibrio de este paso es cercana a 1, lo que sugiere que para el paso catalítico el cambio de energía libre es 0 (Grubmeyer y col, 1982). Estas observaciones son relevantes para la síntesis del ATP ya que, en los laboratorios de varios autores se ha logrado la síntesis neta de ATP unido a la F_1 sin que exista un $\Delta\mu H^+$ (véase como ejemplo Gómez-Puyou y col, 1986). Este hecho, junto con la alta afinidad que muestra el sitio catalítico por el ATP, han llevado a proponer que no es la formación del enlace anhidrido entre el ADP y el P_i el paso que requiere la energía del gradiente de H^+ , sino que durante la liberación del ATP formado en los sitios catalíticos de la F_1 , ocurren las transformaciones energéticas (Grubmeyer y col, 1982; Boyer y col, 1982).

Como ya se había mencionado, muchas evidencias indican que la F_0F_1 -ATPasa es una enzima asimétrica. Existen varios agentes como el 4-cloro-7-nitrobenzofurazano (Nbf-Cl), la dicitlohexilcarbodiimida (DCCD), o el propio péptido inhibidor natural de la F_1 mitocondrial, que con unirse a una sola de las tres subunidades β inhiben la catálisis de la enzima. Estos hechos apoyan la idea de la

existencia de cooperatividad entre las subunidades catalíticas de la F_1 (Cross, 1981). Más aún, se ha determinado que la velocidad de la hidrólisis del ATP en un solo sitio catalítico es muy baja, pero que cuando se une un sustrato en los sitios restantes, la velocidad aumenta 10^6 veces (Cross y col, 1982). A pesar de que estos hechos apoyan la acción concertada de las subunidades β durante la catálisis, existen sugerencias acerca de que estas tres subunidades podrían funcionar independientemente, o bien dos de ellas ser independientes de una tercera (Soong y Wang, 1984). Éste, aún es un tema de discusión.

V. FACTORES REGULADORES DE LA CATÁLISIS EN EL COMPLEJO F_0F_1 -ATPASA

La reacción catalizada por la H^+ -ATPasa es reversible. ¿Qué estrategias ayudan a determinar la direccionalidad de este proceso? Existen factores muy diversos que se han propuesto como reguladores de la actividad del complejo F_0F_1 , para que la actividad hidrolítica esté inhibida cuando haya requerimientos fisiológicos de ATP o para que pueda comportarse como una ATPasa al ocurrir procesos que demandan la hidrólisis de este compuesto (Schwermann y Pedersen, 1986). Mencionaremos algunos de los factores mejor estudiados.

El propio gradiente de H^+ es uno de los principales mecanismos de control en la ATP sintetasa acoplada a una membrana. De la ecuación (1), es claro que el $\Delta\mu_{H^+}$ debe tener un valor constante, por lo que el $\Delta\psi$ y el ΔpH son valores complementarios, aunque variables según el sistema y las condiciones. Por ejemplo, recientemente se ha mostrado que puede lograrse la síntesis del ATP en la enzima membranaral con un solo pulso de voltaje, que induce un $\Delta\psi$ de magnitud y duración controladas, como única fuente de energía. Esta síntesis es sensible a los mismos inhibidores y agentes que afectan a la fosforilación oxidativa (Knox y Tsong, 1984). También, desde el trabajo clásico de Jagendorf y Uribe (Jagendorf y Uribe, 1966), se ha logrado en varios sistemas la formación de ATP con un gradiente artificial de pH. Este tipo de estudios demuestran que la síntesis del ATP depende del $\Delta\mu_{H^+}$ y que puede ser independiente del funcionamiento de la cadena de transporte de electrones, y están encaminados a esclarecer el papel del ΔpH y del $\Delta\psi$ en la fosforilación oxidativa.

Otro factor importante regulador en la catálisis de la F_1 lo constituyen los nucleótidos que se encuentran unidos a ésta. Las subunidades α y β poseen distintas afinidades para la unión de los nucleótidos: dependiendo de éstas, el ADP y el ATP pueden estar fuerte o débilmente unidos y, según las condiciones, pueden encontrarse en sitios catalíticos o no catalíticos. Cuando el ADP fuertemente unido se libera de su sitio de unión, aumenta paralelamente la actividad de ATPasa; se considera que este ADP está ligado a un sitio de control distinto del sitio catalítico (Boyer y col, 1982), pero también se ha sugerido que el ADP puede ejercer su papel regulador desde el mismo sitio donde ocurre la reacción (Martins y col, 1988).

La proteína inhibidora natural asociada a algunas F_0F_1 -ATPAsas, como la mitocondrial, tiene la propiedad de disminuir la actividad hidrolítica de esta enzima, ya que incrementa el tiempo de liberación del ADP que se encuentra en el sitio catalítico como producto de la hidrólisis. Esta proteína no afecta la velocidad en el estado estacionario de la síntesis del ATP, pero sí provoca una fase de retardo en la velocidad inicial. Así, al tener un efecto en ambos sentidos de la reacción, se ha considerado que estos inhibidores son factores esenciales en la regulación de la enzima (Schwermann y Pedersen, 1986).

Las interacciones que se establecen entre las subunidades de la F_0F_1 -ATPasa pueden modular la catálisis del complejo. Por ejemplo, se han hecho experimentos de disociación de las subunidades de la F_1 : las subunidades α y β solas o asociadas son incapaces de realizar actividad hidrolítica. Al reconstruirse ϵ o ϵ se recupera esta función (Yoshida, 1984). Esto sugiere que se requiere de una estructura mínima para que el complejo sea funcional y, por otra parte, este tipo de experimentos ayudan a deducir el papel que tiene cada una de las subunidades en el complejo enzimático. También las subunidades del canal de H^+ tienen influencia sobre las reacciones del sector catalítico. El reactivo dicitlohexilcarbodiimida (DCCD) se une a un solo residuo de ácido glutámico de la subunidad c de F_0 y esto basta para bloquear el paso de los H^+ y la actividad de la ATPasa de la F_1 asociada. Se ha demostrado que este inhibidor del canal disminuye la afinidad por el ATP en el sitio catalítico, lo que sugiere que la actividad de la F_1 podría estar regulada por cambios conformacionales transmitidos por

interacción entre subunidades, aunque sean de sectores distintos (Penefsky, 1985).

En el mismo sentido, es un hecho conocido que del complejo F_0F_1 solamente el sector F_0 tiene contacto con los fosfolípidos de la membrana. Así que, al purificarlo y reconstituirlo en vesículas de fosfolípidos (liposomas) de diferente naturaleza, cualquier cambio en las actividades enzimáticas o en las afinidades por sustratos dependientes de la composición de estos liposomas, se debe a que las alteraciones que ocurren en el sector membranal pueden tener influencia sobre los eventos catalíticos y sobre los cambios conformacionales que ocurren en la porción F_1 (véase como ejemplo Laird y col. 1986; Dabbeni-Sala y col. 1989).

Los trabajos de nuestro laboratorio se encaminan a estudiar ciertas modificaciones en la estructura de la H^+ -ATPasa que se reflejan en alteraciones durante la catálisis, para deducir posibles papeles reguladores de porciones específicas de la enzima sobre sus propias funciones. Para este propósito hemos utilizado distintos enfoques:

— El uso de detergentes sobre distintas preparaciones de la H^+ -ATPasa mitocondrial y bacteriana que modifican su actividad para hidrolizar el ATP. El detergente lauril dimetilamino óxido (LDAO) tiene la propiedad de estimular la actividad hidrolítica de la ATPasa mitocondrial, siempre y cuando la proteína inhibidora y/o el canal F_0 se encuentren unidos a la porción F_1 de la enzima. Es bien conocido que la proteína inhibidora es uno de los principales factores reguladores de la ATPasa de la mitocondria, provocando una disminución en la actividad hidrolítica; el hecho de que el LDAO estimule la actividad hidrolítica de la F_1 asociada a esta proteína, puede explicarse con un cambio en la interacción entre la F_1 y el inhibidor. Quizás el punto que atrae más la atención es que el detergente, aun en ausencia del inhibidor natural, estimula al complejo F_0F_1 membranal, lo que sugiere que por la asociación del canal y la porción catalítica se ponen de manifiesto otras interacciones entre subunidades que no existen en la F_1 aislada (Vázquez-Laslop y Dreyfus, 1986).

El LDAO también es capaz de estimular la actividad de la H^+ -ATPasa de la bacteria fotosintética *Rhodospirillum rubrum* (Montero-Lomeli y Dreyfus, 1987). Una propiedad de esta ATPasa es que mientras está asociada a la membrana su actividad depende

de la presencia del Mg^{2+} y al encontrarse como una enzima soluble su actividad es dependiente del Ca^{2+} . El LDAO modifica muy ligeramente esta última actividad, pero en contraste, tiene un marcado efecto sobre la hidrólisis de ATP dependiente del Mg^{2+} . Se ha reportado que el Mg^{2+} es un factor regulador importante de esta enzima y se ha sugerido que el magnesio unido a la F_1 estabiliza la estructura de la proteína (Senior, 1979). Un dato interesante obtenido en este laboratorio es que el LDAO puede aumentar en un orden de magnitud la hidrólisis del ATP presente en uno solo de los sitios catalíticos. Hemos mencionado que la F_1 cuenta con tres copias de la subunidad β y que, por lo tanto, posee tres sitios catalíticos. El hecho de que el LDAO incremente la velocidad de la catálisis en uno solo de estos sitios indica que se está perdiendo el control de la única subunidad β que funciona bajo estas condiciones. En este trabajo se sugirió que el detergente podía alterar interacciones entre subunidades que dependen de la presencia del Mg^{2+} unido y que, por esta razón, estimula la velocidad de la catálisis en un solo sitio. De acuerdo con otros autores (Senior, 1979; Norling, 1986), la enzima podría tener una conformación "compacta" de actividad catalítica baja y una actividad alta, la conformación "flexible" que se manifiesta en presencia del detergente y, quizás, en el complejo F_0F_1 membranal bajo ciertas condiciones fisiológicas.

— El uso de anticuerpos dirigidos contra las subunidades α y β de la F_1 mitocondrial ha mostrado diferencias importantes entre la asociación de la proteína inhibidora unida naturalmente al complejo y el inhibidor reconstituido *in vitro*. Estos anticuerpos precipitan de manera diferente al complejo F_0F_1 membranal con inhibidor endógeno o adicionado. Esto implica que la F_1 asociada de manera natural con su inhibidor es estructuralmente distinta a la enzima asociada con inhibidor exógeno. Estas diferencias también son evidentes en la enzima catalíticamente activa, ya que los anticuerpos estimulan la hidrólisis del ATP en la enzima membranal con inhibidor endógeno pero inhiben la misma en el F_0F_1 con inhibidor reconstituido. Además, se observa el efecto opuesto al probar los anticuerpos en reacciones que van en el sentido sintético (actividad de recambio ATP-P_i). Nuevamente, en este trabajo se resalta la importancia de la interacción entre subunidades sobre la regulación de la función

del complejo F_0F_1 -ATPasa (Valdés y Dreyfus, 1987).

El efecto de la presión hidrostática sobre las proteínas oligoméricas parece ser el mejor medio que proporciona información sobre las interacciones proteína-proteína sin alterar la estructura terciaria de las cadenas polipeptídicas. La presión hidrostática inactiva de manera irreversible a la F_1 -ATPasa mitocondrial, pero si está en un medio que contiene glicerol o se encuentra asociada a la porción membranar se protege de dicha inactivación (Dreyfus y col, 1988).

En resumen, las interacciones entre subunidades representan probablemente un factor de regulación en la catálisis de la H^+ -ATP sintasa. Es posible que las interacciones proteína-proteína sean un fenómeno generalizado en cuanto a mecanismos de regulación en las proteínas multiméricas.

AGRADECIMIENTOS

Los trabajos de nuestro laboratorio han sido apoyados parcialmente por Conacyt y por la *Third World Academy of Sciences* (BC 88-23)

REFERENCIAS

- Amzel, L. y PL Pedersen, *Ann Rev Biochem* (1983) 52, 801-824.
- Boekema, EJ, *Z Naturforsch* (1988) 43c, 219-225.
- Boekema, EJ, M van Heel y P Gräter, *Biochem Biophys Acta* (1988) 933, 365-371.
- Boyer, PD, *FEBS Lett* (1975) 58, 1-6.
- Boyer, PD, *Biochemistry* (1987) 26, 8503-8507.
- Boyer, PD, WE Kohlbrenner, DE McIntosh, LT Smith y CC O'Neal, *Ann NY Acad Sci* (1982) 402, 65-81.
- Broda, E, *The Evolution of the Bioenergetic Processes* (Pergamon Press, Nueva York, 1978) 1-9.
- Cross, RL, C Grubmeyer y HS Penelsky, *J Biol Chem* (1982) 257, 12101-12105.
- Cross, RL, C Grubmeyer y HS Penelsky, *J Biol Chem* (1982) 257, 12101-12105.
- Datben-Sala, F, N Vázquez-Laslop, A Fecchinetti, S Devaris y G Dreyfus, *Biochem Biophys Res Commun* (1989) 158, 1013-1020.
- Dreyfus, G, H Guimaráes-Motta y LJ Silva, *Biochemistry* (1988) 27, 6704-6710.
- Futai, M y H Kanazawa, *Microbiol Rev* (1983) 47, 285-312.
- Gómez-Puyou, A, M Tuena de Gómez-Puyou y L de Meis, *Eur J Biochem* (1983) 129, 133-136.
- Grubmeyer, D, RL Cross y HS Penelsky, *J Biol Chem* (1982) 257, 12092-12100.
- Harold, FM, *The Vital Force, A Study of Bioenergetics* (WH Freeman, Nueva York, 1986) 577.
- Jagendorf, AT y E Uribe, *Proc Natl Acad Sci USA* (1966) 55, 170-177.
- Jones, CW, *Biological Energy Conservation* (Chapman and Hall LTD, Nueva York, 1981) 7-17.
- Kapra, Y, "Proton Motive ATP Synthesis", *Bioenergetics*, Ernster (Ed) (Elsevier Science Publishers, 1984) 149-186.
- Kna, BE, y TY Tsong, *J Biol Chem* (1984) 259, 4757-4763.
- Laird, DM, JW Parce, R1 Montgomery y CC Cunningham, *J Biol Chem* (1986) 261, 14851-14856.
- Martins, OB, A Gómez-Puyou, M Tuena de Gómez Puyou, *Biochem Chem* (1988) 29, 111-117.
- Mitchell, P, *FEBS Lett* (1974) 43, 189-194.
- Montero-Lomeli, M, y G Dreyfus, *Arch Biochem Biophys* (1987) 257, 345-351.
- Nicholls, DG, *Bioenergetics* (Academic Press, Nueva York, 1982) 1-22.
- Nicholls, DG, "Mechanisms of Energy Transduction" *Bioenergetics*, Ernster (Ed) (Elsevier Science Publishers, 1984) 29-48.
- Nurling, B, *EBEC Short Rep* (1986) 4, 206.
- Penelky, HS, *Proc Natl Acad Sci USA* (1986) 83, 3688-3692.
- Scarborough, GA, *Proc Natl Acad Sci USA* (1986) 83, 3688-3692.
- Schwerzmann, K, y PL Pedersen, *Arch Biochem Biophys* (1986) 250, 1-18.
- Senior, AE, *J Biol Chem* (1979) 254, 11319-11322.
- Song, KS, JH Wang, *Biochemistry* (1984) 23, 136-141.
- Tzagoulis, A, *Mitochondria* (Plenum Press, Nueva York, 1983) 1-14.
- Valdés, AM, y G Dreyfus, *Biochem Int* (1986) 15, 459-466.
- Vázquez-Laslop, N, y G Dreyfus, *J Biol Chem* (1986) 261, 7807-7810.
- Yoshida, M, "H⁺-ATPasa (ATP Synthase): Structure, Function", *Bioenergetics*, S Papa (Ed) (ICSU Adriatic Editrice, Bari, 1984) 147-153.
- Ysern, X, LM Amzel y PL Pedersen, *J Bioenergy Biomembr* (1988) 20, 423-449.

ABSTRACT

Cell metabolism is mediated in general by adenosine triphosphate (ATP). Therefore ATP couples energy requiring reactions to the hydrolysis of its gamma-phosphate which is highly exergonic. A central problem in bioenergetics is the chemiosmotic mechanism of ATP synthesis by the ATP-synthase. This chemiosmotic theory suggests that a proton gradient across the energy-transducing membranes is used for ATP synthesis. The proton potential is the product of the electron-transport chain activity and is consumed in part by the energy requiring ATP synthesis mediated by the ATP synthase. This complex membrane-bound enzyme contains at least ten subunits which are necessary for a possible rotative catalytic mechanism and for its regulation. Coupling between the protons across the ATP synthase-membrane sector and their catalytic sites is a matter of discussion until now. Moreover, it is not known which are the energy-requiring steps during the ATP synthesis. There are many possible contributors for the regulation of the ATP-synthase, that is membrane-proton gradient, enzyme-bound nucleotides and cations, membrane phospholipids and subunit-subunit interactions in the protein.