

03062

2

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
SECRETARÍA DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

2 of.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO
DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR

EFFECTO DE LOS PIRIDIN NUCLEOTIDOS SOBRE LA HIDROLISIS Y LA
SINTESIS DE ATP EN F_1 MITOCONDRIAL PARTICULADA Y SOLUBLE

TESIS QUE PARA LA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN INVESTIGACION
BIOMÉDICA BÁSICA.
(BIOQUÍMICA)

PRESENTA

QFB. VÍCTOR MANUEL BAIZABAL AGUIRRE

CIUDAD UNIVERSITARIA, MÉXICO, D.F., 1990.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

RESUMEN	1
1. INTRODUCCI6N	2
1.1. Composici6n y estructura de la ATP Sintasa mitocondrial.	5
1.2. Mecanismo de hidr6lisis y sntesis de ATP.	8
1.3. Regulaci6n de la ATP sintasa mitocondrial.	15
1.4. Estructura del sitio catalitico.	17
1.5. Objetivos del trabajo.	21
2. MATERIALES Y M6TODOS.	
2.1. PREPARACI6N DEL MATERIAL BIOL6GICO.	
2.1.1. Aislamiento de mitocondrias.	23
2.1.2. Obtenci6n de particulas sub- mitocondriales Mg-ATP.	24
2.1.3. Obtenci6n de particulas sub- mitocondriales EDTA.	25
2.1.4. Purificaci6n de la F ₁ mitocondrial.	26
2.2. T6CNICAS.	
2.2.1. Cuantificaci6n del ATP formado durante la sntesis de ATP.	28
2.2.2. Medici6n del fosfato liberado durante la hidr6lisis de [$\gamma^{32}P$]-ATP.	29
2.2.3. Cuantificaci6n de proteina.	
2.2.3.1. M6todo de Lowry.	29
2.2.3.2. M6todo de Bradford.	30
2.2.3.2. M6todo de Biuret.	30
3. RESULTADOS.	
3.1. Efecto de los piridin nucle6tidos sobre la hidr6lisis de ATP en F ₁ soluble y particulada.	32
3.2. Efecto de los piridin nucle6tidos sobre la sntesis de ATP.	38
3.3. Efecto de los piridin nucle6tidos y sus componentes moleculares sobre la sntesis de ATP.	43
4. DISCUSI6N.	46
5. REFERENCIAS.	52

6. ADDENDUM. Detección de ADP presente en preparaciones de NADH.

6.1. Introducción.	59
6.2. Resultados.	60
6.3. Conclusión.	71
6.4. Referencias.	71

INDICE DE ESQUEMAS, FIGURAS Y TABLAS.

A) ESQUEMAS.

1. Diagrama general de la energética de una célula.	3
2. Estructura de la F_1F_0 ATP sintasa mitocondrial.	9
3. Mecanismo catalítico cíclico en la F_1	14
4. Modelos de los sitios de unión del MgATP en la ADK, en la subunidad β de la ESCHERICHIA COLI F_1 -ATPasa y en la F_1 -ATPasa mitocondrial.	20
5. Modelo de la entrada y acoplamiento del NADH en el sitio catalítico de la F_1	51

B) FIGURAS.

1. Efecto del NADH sobre la hidrólisis de ATP en partículas submitocondriales Mg-ATP.	34
2. Efecto de diferentes concentraciones de piridín nucleótidos sobre la hidrólisis de ATP en partículas submitocondriales Mg-ATP.	35
3. Efecto de los piridín nucleótidos sobre la hidrólisis de ATP en F_1 soluble.	36
4. Efecto de diferentes concentraciones de piridín nucleótidos sobre la hidrólisis de ATP en F_1 soluble.	37
5. Efecto del NADH sobre la síntesis de ATP.	40
6. Efecto de concentraciones variables de ADP y Pi sobre el grado de inhibición de la síntesis de ATP por NADH.	41
7. Efecto de diferentes concentraciones de NADH sobre la síntesis de ATP.	42
8. Trazo de HPLC del NADH contaminado por ADP.	70

C) TABLAS.

1. Inhibición de la síntesis de ATP por los piridín nucleótidos y sus partes.	44
2. Desplazamiento de [³ H]AdN enlazado a F ₁ -psm-MgATP por piridín nucleótidos. .	65
3. Desplazamiento de [³ H]AdN unido a F ₁ -psm-MgATP por diferentes lotes de NADH.	66
4. Desplazamiento de [³ H]AdN por NADH tratado con LDH/piruvato.. . . .	67
5. Desplazamiento de [³ H]AdN por NADH tratado con PMS.	68
6. Desplazamiento de [³ H]AdN por ADP-ribosa.	68
7. Detección del ADP presente en NADH por fosforilación oxidativa.	69

LISTA DE ABREVIATURAS.

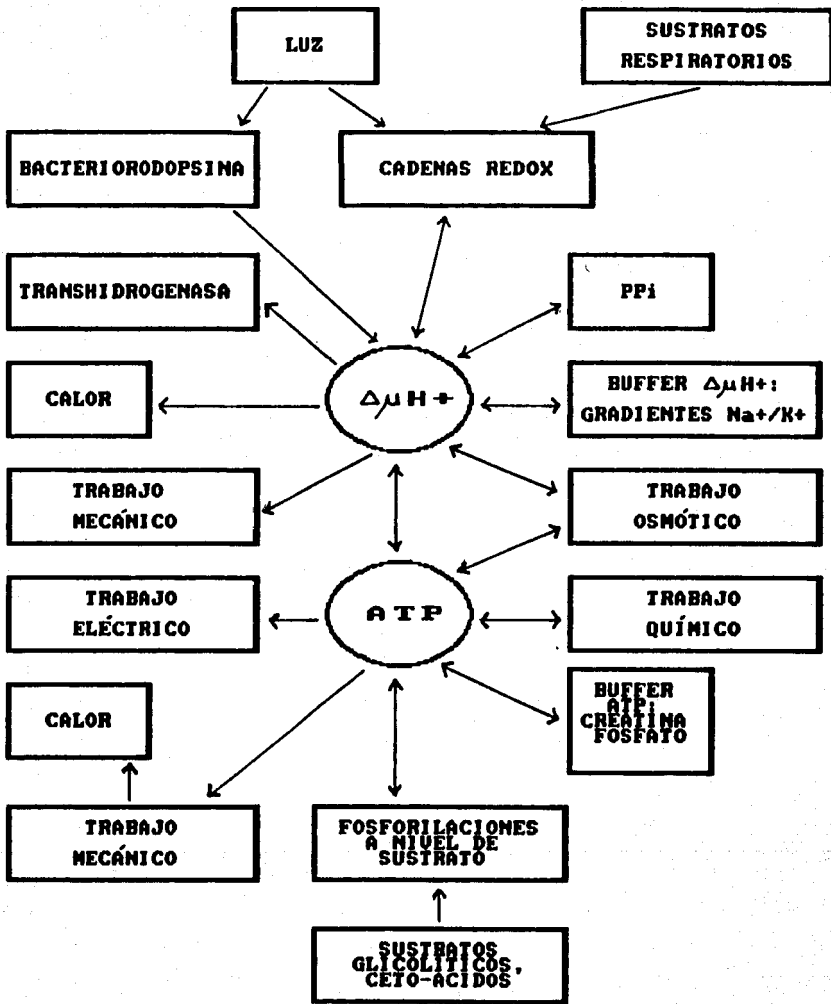
ADK	Adenilato-cinasa.
AdN	Adenín nucleótido.
ADP-Ribosa	Adenosín(5')difosfo(5)- β -D-ribosa.
AMPPNP	Adenilil- β , γ -imidodifosfato.
cpm	cuentas por minuto.
FCCP	Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenil hidrazona.
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión.
NMN	Nicotinamida-Mononucleótido.
PMS	Metasulfato de fenazina.
psm	partículas submitocondriales.

RESUMEN.

En este trabajo se estudió el efecto del NADH, NADPH, NAD^+ y NADP^+ sobre la síntesis de ATP que acompaña la oxidación del succinato en partículas submitocondriales MgATP. Se investigó también el efecto de estos piridín nucleótidos sobre la hidrólisis de ATP en partículas de corazón de bovino y la F_1 soluble. Todos los piridín nucleótidos inhibieron la hidrólisis competitivamente cuando la concentración de $\text{Mg-}[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ se varió de 0.1 mM a 3 mM. En ausencia de piridín nucleótidos, se determinó una K_m de 150 μM y 360 μM para las partículas submitocondriales y F_1 soluble, respectivamente. Cuando se examinó la acción inhibitoria de concentraciones crecientes de piridín nucleótidos (0.5 mM-5 mM) sobre la hidrólisis de ATP a una concentración constante de MgATP de 100 μM , el NADH, NADPH y NADP^+ a una concentración de 5 mM inhibieron en un grado similar la actividad hidrolítica: aproximadamente en un 50%. El NAD^+ fue menos efectivo. La síntesis de ATP, teniendo como sustrato oxidable al succinato, se inhibió por el NADH de forma competitiva con respecto al ADP. El NADPH, NADP^+ y NAD^+ afectaron la síntesis de ATP en grado menor. Concentraciones crecientes de fosfato inorgánico (0.1 mM-10 mM) a concentraciones constantes de ADP (10 μM , 50 μM y 500 μM) disminuyeron el grado de inhibición sobre la síntesis de ATP ejercido por el NADH. A medida que la concentración de ADP se incrementó, se requirió una menor concentración de fosfato para revertir la inhibición por NADH. Con el fin de reconocer en que magnitud las diferentes partes de la molécula de NADH afectaban la síntesis, se probaron los compuestos siguientes: nicotinamida, nicotinamida-mononucleótido (NMN), adenosin(5')difosfo(5)- β -D-ribosa (ADP-ribosa), NAD^+ , NADP^+ y NADPH. El efecto de estas moléculas sobre la síntesis de ATP se comparó con el efecto del NADH en una condición en que este último inhibió la síntesis un 50% (ADP 50 μM y P_i 0.5 mM). El orden de inhibición obtenido por estos compuestos fue: $\text{NADH} > \text{ADP-ribosa} > \text{NAD}^+ > \text{NADPH} > \text{NADP}^+ > \text{NMN} > \text{Nicotinamida}$.

INTRODUCCION.

Los mecanismos de transformación de energía en los sistemas biológicos, presentan un enorme grado de complejidad cuando se les intenta entender a nivel molecular. El proceso de transducción de energía que se desarrolla en la membrana interna mitocondrial, en la membrana tilacoidal de cloroplastos y cianobacterias y en la membrana plasmática de bacterias aeróbicas, es particularmente intrincado debido a que intervienen conjuntos de enzimas multisubunitarias cuyas funciones pueden dividirse principalmente en dos: a) Transferencia de electrones a lo largo de una cadena hasta un aceptor final. Este fenómeno da como resultado una separación de cargas en la membrana con la generación de un gradiente electroquímico de protones ($\Delta\mu\text{H}^+$) y b) Utilización de este gradiente para la síntesis de ATP y para el mantenimiento de diversas funciones esenciales de los seres vivos (1). El esquema 1 ilustra el papel central del $\Delta\mu\text{H}^+$ en los procesos bioenergéticos. De acuerdo al esquema, la energía de la luz o de los sustratos respiratorios se puede utilizar por las enzimas de las cadenas redox respiratoria o fotosintética y en el caso de las halobacterias, por la bacteriorrodopsina para formar el $\Delta\mu\text{H}^+$. Este gradiente electroquímico mantiene diferentes tipos de trabajo en la membrana, siendo la síntesis de ATP la función más importante. En ciertas bacterias se forma un $\Delta\mu\text{Na}^+$ en lugar del $\Delta\mu\text{H}^+$ a expensas de la energía liberada por la respiración o por la descarboxilación no oxidativa de algunos ácidos orgánicos (2). Así pues, el $\Delta\mu\text{Na}^+$ se utiliza en estos organismos para mantener el trabajo mecánico, químico u



ESQUEMA 1. Diagrama general de la energética de una célula. Obsérvese que el $\Delta\mu H^+$ tiene un papel central en los procesos de membrana que requieren o consumen energía, (tomado de O. P. Skulachev, 1988 In Membrane Bioenergetics, pp. 7 Springer-Verlag).

osmótico. El patrón más complicado de transducción de energía se encuentra en las células animales, donde existen tres formas diferentes de energía: i) Un $\Delta\mu\text{H}^+$ en mitocondrias y membranas celulares; ii) En algunos casos un $\Delta\mu\text{Na}^+$ para las membranas celulares externas y iii) ATP para los procesos celulares membranales y no membranales.

Actualmente se acepta que en las mitocondrias las reacciones proveedoras de energía y las consumidoras se encuentran interconectadas por medio del $\Delta\mu\text{H}^+$ (3-5). Uno de los múltiples procesos consumidores de la energía del gradiente es el de la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (Pi). Los sistemas moleculares encargados de tal función son las denominadas ATP sintasas (referidas también como protón-ATPasas, H^+ -ATPasas, complejo V o simplemente $\text{F}_0\text{-F}_1$), que junto con las proteínas del sistema de transporte electrónico constituyen las unidades responsables de las reacciones de fotofosforilación y fosforilación oxidativa. Las funciones de la ATP sintasa podrían resumirse de la manera siguiente (revisadas en 6): 1) La TRANSLOCACIÓN, que consiste en permitir el paso de protones por la bicapa lipídica a través del sector F_0 embebido en la membrana; 2) El ACOPLAMIENTO, que es el proceso por el cual los protones llegan hasta el sector F_1 en una forma útil, de tal manera que la energía almacenada en el $\Delta\mu\text{H}^+$ produce concentraciones elevadas de ATP y 3) La CATALISIS, es decir, la formación de ATP en el sector F_1 a partir de los sustratos ADP y Pi. En ausencia del gradiente electroquímico de protones, las ATP sintasas hidrolizan ATP. Este proceso está íntimamente ligado a la expulsión vectorial de H^+ . Debido a esta característica, las

ATP sintasas pueden clasificarse dentro de las ATPasas cuya función escalar catalítica (síntesis o hidrólisis de ATP) está mecanísticamente acoplada a la translocación vectorial transmembranal de cationes, tales como H^+ , K^+ , Na^+ y Ca^{2+} . Sin embargo, la complejidad estructural de las ATP sintasas/ H^+ -ATPasas es mucho mayor comparada con las ATPasas translocadoras de cationes (7,8).

Considerando tal complejidad, tanto en estructura como en función, los resultados que se detallan en esta investigación serán mejor entendidos si se abordan los tópicos que a continuación se mencionan: a) composición, estructura y mecanismo catalítico de la ATP sintasa mitocondrial; b) factores reguladores y c) estructura del sitio catalítico. Se pretende con ello delinear una imagen general de la enzima. En la última parte de esta sección introductoria se puntualizarán los objetivos correspondientes al presente trabajo.

1.1. COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA DE LA ATP SINTASA MITOCONDRIAL.

La ATP sintasa mitocondrial está formada por un sector membranal conocido como F_0 , embebido en la membrana y relacionado con la función de translocar H^+ hasta el sector F_1 donde se efectúa la hidrólisis y la síntesis de ATP.

Se han estudiado extensamente las características del sector F_1 mitocondrial (muy similar en todas las ATP sintasas de diversos organismos) como son la masa molecular, la estequiometría subunitaria, la secuencia de aminoácidos y el enlazamiento sustrato/producto (ver revisiones, 6,7 y 9). El peso

molecular del complejo F_1 es de aproximadamente 347 KDa (10), aunque se han descrito valores entre 360 y 380 KDa (ver 8). El sector F_1 mitocondrial está constituido de cinco subunidades diferentes designadas α , β , γ , δ , y ϵ con la estequiometría establecida $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$. Esta estequiometría se derivó principalmente de los experimentos de marcaje de grupos sulfhidrilos (11) y de marcaje por afinidad y recuperación de subunidades purificadas (12); el resultado del empleo de otras técnicas, tales como ultracentrifugación, marcaje covalente e incorporación de radiactividad en las subunidades i.e. cuando se cultivan bacterias y levaduras en medios que contienen ^{35}S -sulfato o ^{14}C -glucosa sirvieron de base para la estequiometría señalada. Finalmente, Dunn & Heppel (13) y Dunn (14) al resumir los datos de reconstitución y enlazamiento con subunidades aisladas, definieron que cada una de las subunidades menores ($\gamma\delta$ y ϵ) están presentes a razón de una copia por sector F_1 . Los pesos moleculares para cada una de las subunidades de la ATP sintasa mitocondrial determinados son: α , 54,000; β , 50,000; γ , 31,000; δ , 19,000 y ϵ , 15,000.

Se ha identificado la secuencia completa de aminoácidos (por análisis del DNA) de la porción F_1 de Rhodospseudomonas blastica (15), Rhodospirillum rubrum (16), Escherichia coli (17-19) y la cianobacteria Synechococcus 6301 (20); la estructura primaria de las subunidades de la F_1 de corazón de bovino se determinó por secuenciamiento de aminoácidos (21).

El sector F_1 se puede separar fácilmente de la membrana y purificarse como una proteína soluble en agua, alcanzando un alto grado de homogeneidad (10,22) y exhibiendo una actividad

hidrolítica con un número de recambio de aproximadamente 600 s⁻¹ (7). La hidrólisis de ATP por F₁ soluble es la función que más se ha estudiado, aunque han aparecido reportes en los que se señala que la F₁ soluble es capaz también de llevar a cabo la síntesis de ATP fuertemente unido a la enzima (23-27); se ha demostrado también la síntesis de ATP en psm desacopladas preparadas a partir de membranas tilacoidales (28,29).

El sector Fo de Escherichia coli está constituido por tres subunidades denominadas a, b y c (30,31), con una estequiometría de a₁ b₂ c₆₋₁₀. A la proteína c también se le ha llamado proteolípido enlazador de dicitohexilcarbodiimida (DCCD) [31], y se acepta que esta es la subunidad responsable de formar la ruta o "canal" por el cual los H⁺ fluyen hasta la porción F₁. Sin embargo, se ha demostrado por estudios genéticos (33), que las subunidades a y b son necesarias para llevar a cabo la función de translocación. En lo que concierne a la porción Fo de la ATP sintasa mitocondrial, se sabe que está formada de varias subunidades cuya estequiometría aún no se define.

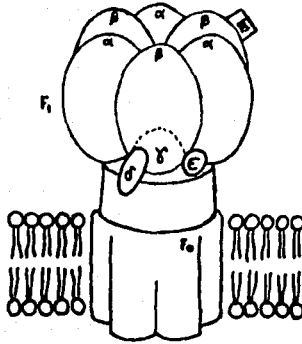
Cuando se analiza la estructura de la ATP sintasa mitocondrial y se le compara con sus análogos procarióticos, se observa que las primeras poseen proteínas adicionales. Se ha propuesto que algunas de ellas tienen la función de unir correctamente el sector F₁ con el Fo. Estas subunidades son: la proteína que confiere sensibilidad a la oligomicina (OSCP) [34], el polipéptido F₆ (35) y el Factor B (36,37). Ninguna de ellas presenta actividad catalítica, pero es muy probable que afecten tanto la catálisis en F₁ como la conducción de H⁺ en Fo. Además de estas proteínas, la ATP sintasa mitocondrial contiene otra

proteína de bajo peso molecular denominada Proteína-Inhibidora natural de la ATPasa, descubierta por Pullman y Monroy (38). Como su nombre lo indica, este péptido inhibe la hidrólisis de ATP cuando está unido a F_1 y también se ha detectado que inhibe la fase inicial pero no la de estado-estable durante la síntesis de ATP (39-41, para una revisión ver, 42). El esquema 2 muestra a la ATP sintasa mitocondrial.

Finalmente, cabe mencionar que se han obtenido preparaciones altamente purificadas de ATP sintasa de hígado de rata con 9-10 polipéptidos (43), de mamíferos y hongos con 11-12 polipéptidos (44-47) y de corazón de bovino con 14 polipéptidos (48). En resumen, el número mínimo más probable de subunidades en las ATP sintasas de mamíferos oscila entre 12 y 14, lo que las cataloga como una de las enzimas más complejas en estructura y por lo tanto en función identificadas en los sistemas biológicos.

1.2. MECANISMO DE HIDRÓLISIS Y SÍNTESIS DE ATP.

Sería prácticamente imposible entender cómo el sector F_1 trabaja catalizando la hidrólisis y la síntesis de ATP sin conocer el arreglo espacial de las diferentes subunidades presentes en esta porción. De los estudios de microscopía electrónica y difracción de rayos X se han derivado algunos modelos que tratan de explicar la organización tridimensional del sector F_1 (49-53, para una revisión ver, 5). El modelo de Amzel y col. (53) obtenido por patrones de difracción de rayos X a partir de cristales de F_1 de hígado de rata (54) a una resolución de



ESQUEMA 3. ESTRUCTURA DE LA F₁F₀ ATP SINTASA MITOCONDRIAL. La porción F₁ está constituida principalmente de las subunidades α, β y γ. La subunidad γ parece estar implicada en la conducción de H⁺, mientras que las subunidades δ y ε en la conexión del sector F₁ con el F₀. La composición de F₀, con sus proteínas integrales de membrana, es particularmente incierta. PI: Proteína Inhibidora. (Tomado de F. M. Harold. 1986, THE VITAL FORCE. In Mitochondria and Oxidative Phosphorylation. Freeman & Co., New York., con algunas modificaciones).

9 Å, es ilustrativo. Este modelo sugiere un eje doble de simetría con seis áreas de densidad electrónica arregladas en forma de un hexágono distorsionado o de un octaedro colapsado. Cada área contiene la suficiente densidad para acomodar al menos una subunidad α o β . Debido a la falta de densidad electrónica en el centro de la molécula, los autores sugieren que la organización subunitaria es notablemente asimétrica. Con los procedimientos de microscopía electrónica empleados por Tiedge y col. (49) y Boekema y col. (51), se dedujo una estructura algo diferente. Estos investigadores proponen que las subunidades α y β de la F_1 configuran un hexágono distorsionado que semeja la forma de silla del ciclohexano con una masa central en el interior del hexágono. La masa central parece estar situada asimétricamente y probablemente representa a las subunidades menores (γ y/o δ y/o ϵ). Recientemente, Lünsdorf y col. (55) y Tiedge y col. (56) utilizaron anticuerpos monoclonales dirigidos contra la subunidad α y examinaron estas preparaciones por microscopía electrónica. La conclusión de estos trabajos es que en la F_1 existe un arreglo simétrico triple de estas subunidades.

Todos estos resultados, considerados junto con los de estequiometría y enlazamiento de ligandos, han dado lugar a dos conclusiones importantes: a) La F_1 contiene tres pares $\alpha\beta$ y al menos uno de ellos es de mayor tamaño que los otros dos (57,58) y b) Las subunidades menores posiblemente estén unidas a uno de los tres pares $\alpha\beta$, confiriéndole a este par un medio ambiente único relativo a los otros dos (asimetría intrínseca) [53,57]. Este segundo punto, como se verá más adelante, tiene implicaciones en lo que respecta al funcionamiento alternado de los sitios

catalíticos en la F_1 .

El número máximo de sitios de enlazamiento de nucleótidos, determinado en F_1 mitocondrial de corazón de bovino, es de seis (59,60). De estos seis sitios, tres tienen una velocidad de recambio alta con nucleótidos del medio, mientras que los tres restantes presentan una velocidad de recambio muy baja durante la hidrólisis de MgATP (59,61). En base a este criterio se ha considerado a los primeros como sitios catalíticos y a los segundos como no-catalíticos. El sitio catalítico está localizado dentro de la subunidad β (62), aunque se ha sugerido la presencia de un sitio de unión de nucleótido en la interfase entre las subunidades α y β (63-65). Estudios hechos por Khananshvilil & Gromet-Elhanan (66), demuestran que la subunidad β aislada de Rhodospirillum rubrum enlaza un nucleótido (66) y que además es capaz de hidrolizar ATP.

Una vez definida la ubicación del sitio catalítico en la subunidad β y la probable interacción de las diferentes subunidades en el complejo F_1 , se puede comenzar a estudiar el mecanismo de hidrólisis y síntesis de ATP en la ATP sintasa mitocondrial. Esta enzima, a diferencia de otras ATPasas translocadoras de iones (Na^+/K^+ ATPasa, Ca^{2+} ATPasa, etc), aparentemente no involucra un intermediario covalente fosfo-proteína durante la hidrólisis de ATP, sino que la reacción procede (en un solo paso) por desplazamiento directo, con inversión de los oxígenos del fósforo- γ , dando lugar a la generación de los productos ADP y P_i a partir de ATP y H_2O (67). Este resultado obtenido por Webb y col. (67) en 1980 ya había sido predicho por Boyer en el año de 1973 (68,69). Del análisis

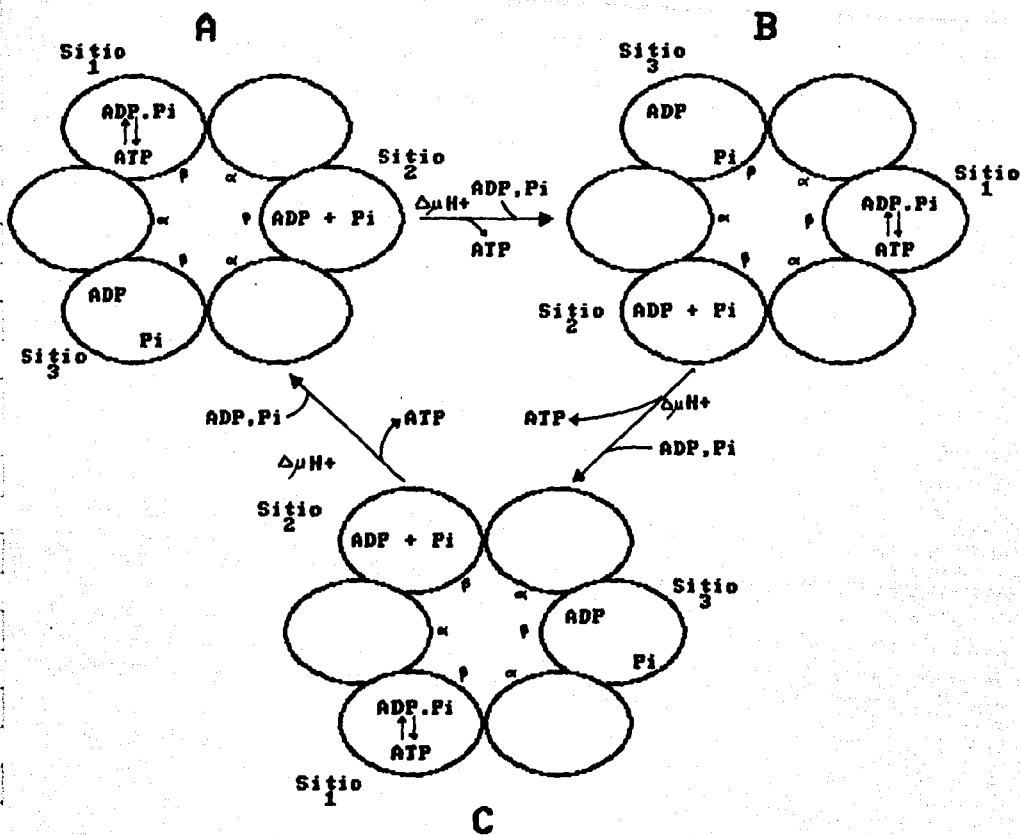
de la reacción de intercambio entre el oxígeno del agua y el oxígeno del fosfato, catalizado por partículas submitocondriales, los trabajos de Boyer y col. (68,69) sugirieron dos aspectos importantes del mecanismo catalítico: 1) la formación de ATP enlazado a la enzima a partir de ADP y Pi unidos no requiere energía y 2) la unión del sustrato a la enzima es un proceso dependiente de energía. Los resultados de estos experimentos con partículas fueron posteriormente confirmados por el mismo grupo en la F_1 soluble (70).

Con base en los resultados obtenidos, Boyer propuso el mecanismo de "cambios de afinidad por unión de sustrato y producto" (revisado en 71) para explicar que la síntesis de ATP unido a la enzima, a partir de los sustratos ADP y Pi enlazados a F_1 , es un proceso reversible a bajas concentraciones de ADP y Pi, mientras que a elevadas concentraciones de estos últimos, la reacción procedía en la dirección de síntesis de ATP. Esto significó para Boyer que los pasos dependientes de energía en la fosforilación oxidativa eran la unión de sustratos y la liberación de productos. Consistente con la idea propuesta por Boyer, se ha demostrado que la F_1 soluble es capaz de sintetizar ATP unido a la enzima a partir de ADP y Pi enlazados a F_1 (23,25,26,28).

Los estudios cinéticos llevados a cabo por Penefsky y col. (72-77) en F_1 de mitocondrias de corazón de bovino se pueden resumir en dos puntos 1) la reacción de hidrólisis de ATP en F_1 soluble o en la F_1 unida a la membrana es esencialmente la misma y 2) la catálisis ocurre a través de una serie de etapas y muestra una fuerte cooperatividad positiva entre al menos dos

(75), y tal vez tres sitios catalíticos (72,78). Con estos trabajos se dedujo que la cooperatividad entre tres o dos sitios catalíticos era esencial para el mecanismo de cambio de afinidad por enlazamiento (70). El esquema 3 ilustra el mecanismo cíclico en el que intervienen tres sitios catalíticos.

Al considerar la catálisis cooperativa en la F_1 , Gresser y col. (78) sugirió un mecanismo catalítico que involucra la rotación de un centro formado por las subunidades menores γ , δ y ϵ , al cual denominó "catálisis rotacional". Tal mecanismo propone que en un momento dado cada subunidad β es "etiquetada" por las subunidades menores ($\gamma\delta\epsilon$) y la capacita para sintetizar (o hidrolizar) ATP a partir de ADP y P_i , con una constante de equilibrio cercana a la unidad. El gradiente electroquímico de protones libera al ATP unido a la primera subunidad β , mientras que el ADP y P_i del medio se enlazan a una segunda β . La síntesis de ATP ocurre en esta segunda β sólo después de ser "etiquetada" por las subunidades pequeñas y el ATP se libera nuevamente por acción del gradiente electroquímico. Simultáneamente, el ADP y P_i se unen a la tercera subunidad β . Las subunidades menores "etiquetan" a esta tercera β , se sintetiza ATP y éste se libera por acción del gradiente electroquímico, comenzando un nuevo ciclo de rotación. Este modelo se ha sometido a prueba, en experimentos donde se ha entrecruzado a la subunidad δ u otra subunidad menor con la subunidad α y/o β (79,80). Sin embargo, no hay evidencia definitiva que indique una rotación de las subunidades β y/o $\gamma\delta\epsilon$ durante la catálisis.



ESQUEMA 3. Síntesis de ATP; mecanismo cíclico en tres sitios catalíticos activos en F_1 . A: el sitio 1 es de alta afinidad y lleva a cabo la síntesis reversible de ATP a partir de ADP + Pi fuertemente unidos. El sitio 2 es un sitio catalítico de afinidad intermedia, el cual debe estar ocupado por ADP + Pi y el sitio 3 es un sitio catalítico relajado. La energía del gradiente de protones causa cambios sincronizados de afinidad por enlazamiento en cada sitio, dando lugar al estado B y subsecuentemente al C (tomado de Senior, A. E. 1988 *Physiol.Rev.* 68: 177).

Con respecto al mecanismo propuesto por Boyer (ver, 71), otros autores, principalmente Wang y col. (81,82) han sugerido que las tres subunidades β son permanentemente no equivalentes y han delineado un modelo en el que una subunidad β funciona como subunidad catalítica mientras que las dos restantes tienen un papel regulador. Siguiendo con esta línea, Bullough et al (83) y Yohda & Yoshida (84) presentaron evidencia que indica que una de las tres subunidades β hidroliza ATP a baja velocidad ("catálisis unisítio"), pero que la velocidad de catálisis en esta subunidad no se incrementa por la unión de ATP a otra subunidad β . La función de esta "subunidad β especial" sería, de acuerdo a su modelo, "preparar" a las otras dos subunidades β para que efectuaran catálisis multisítio, en la cuál, intervendrían solamente dos subunidades β . Es evidente que existe debate en lo que respecta al mecanismo catalítico y que éste sólo se aclarará mediante el empleo de otras técnicas.

1.3. REGULACION DE LA ATP SINTASA MITOCONDRIAL.

La ATP sintasa es una enzima que funciona en forma reversible, catalizando tanto la síntesis como la hidrólisis de ATP. La dirección de la reacción está determinada por el valor del $\Delta\mu\text{H}^+$. Existe cierta evidencia en favor de una activación directa de la F_1 por $\Delta\mu\text{H}^+$. Feldman & Sigman (29), encontraron que la K_m para P_i durante la síntesis de ATP disminuye considerablemente en presencia del potencial. Es interesante también el hallazgo de que al establecerse el gradiente de protones la afinidad de la enzima por el ADP y P_i aumenta

significativamente (85,86). Recientemente, Matsuno-Yagi & Hatefi (87), han señalado que la reacción de síntesis de ATP involucra un mínimo de dos modalidades cinéticas, un modo de Km baja y otro con Km alta. Estos autores explican que el sistema parece funcionar económicamente (modo 1: Km baja, Vmax baja) cuando el valor del cociente $\Delta\mu\text{H}^+$ /ATPsintasas funcionales es bajo (suplemento energético escaso); estas restricciones cinéticas (modo 2: Km alta, Vmax alta) se relajan cuando el cociente $\Delta\mu\text{H}^+$ /ATPsintasas funcionales se eleva (suplemento energético abundante). Este desplazamiento entre dos modalidades cinéticas pudiera ser fisiológicamente importante en la regulación de las velocidades de síntesis de ATP dependiendo de la cantidad de sustrato respiratorio disponible.

Otro factor importante en la regulación de la ATP sintasa mitocondrial es el que concierne a la función que ejerce la proteína inhibidora, péptido de bajo peso molecular aislado de mitocondrias de corazón de bovino por Pullman & Monroy (38) como un inhibidor efectivo de la hidrólisis de ATP. Esta proteína ha sido objeto de intensos estudios y actualmente ya se conoce su secuencia de aminoácidos (93-95), su unión a la subunidad β de F_1 (96) y su desplazamiento del sitio inhibitorio en condiciones que favorecen la síntesis de ATP (cuando el valor de $\Delta\mu\text{H}^+$ es alto) [97,98]. El resultado de estos y muchos otros estudios sobre la proteína inhibidora mitocondrial han sugerido que este péptido es un regulador fisiológico de la hidrólisis de ATP bajo condiciones donde el $\Delta\mu\text{H}^+$ a través de la membrana interna mitocondrial es bajo. Diferentes proteínas con características

similares a ésta se han aislado de otras membranas transductoras de energía (88-92).

Además de la proteína inhibidora, la actividad catalítica de la F_1 también se controla por otros factores. Uno muy importante es el ADP. Se ha demostrado que la unión de un ADP a F_1 es suficiente para promover la inhibición de la hidrólisis (99-102).

El estado actual del conocimiento de los factores que intervienen en la regulación de la ATP sintasa mitocondrial indica que la actividad hidrolítica de esta enzima se regula principalmente por: I) el potencial electroquímico de protones; II) el péptido inhibidor; III) ADP y/o ADP, Pi y H^+ ; IV) cationes divalentes y tal vez V) el estado redox de los grupos -SH en F_1 . Hasta el momento, no es posible configurar un modelo en el cual se considere la interrelación de todos estos factores.

1.4. ESTRUCTURA DEL SITIO CATALITICO.

Hace apenas unos años, en 1986, se propuso un modelo de la región de unión de MgATP en la adenilato cinasa (ADK) [103,104]. El grupo de Fry et al (103,105), basándose en estudios de resonancia magnética nuclear y de rayos X en la ADK, identificó en el sitio de enlazamiento de nucleótido a tres segmentos (denominados 1, 2 y 3) cuyas secuencias son homólogas a ciertas regiones de las subunidades β de F_1 , al factor de elongación EF-Tu, a la proteína ras-p21 y a la enzima fosfofructoquinasa. Por cristalografía de rayos X se ha determinado que todas estas moléculas forman elementos estructurales que sugieren dominios de

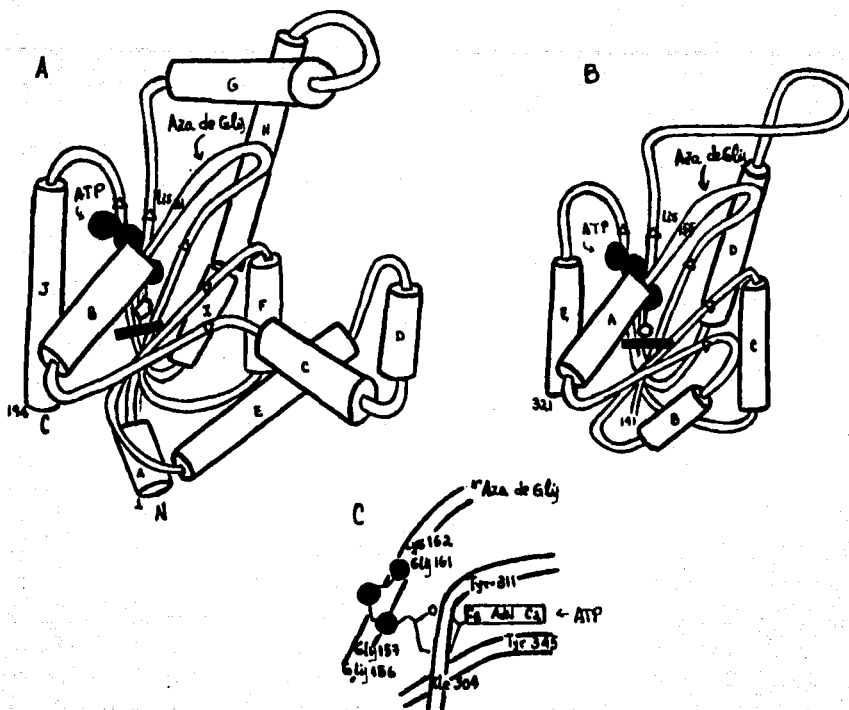
unión a nucleótidos (103,106,107). El modelo de Fry y col. (103) supone que los papeles mecanísticos asignados a estos segmentos en la ADK se pueden aplicar a la ATP sintasa mitocondrial.

El segmento 1 tiene la función más compleja, en cuanto al papel que desempeña en la unión del sustrato al sitio. Este segmento, situado a la mitad de una hendidura, forma un aza flexible rica en glicina y terminada en un residuo de Lis-21 en la ADK y Lis o Arg en otras proteínas. Según el modelo en la ADK, la Lis-21 se ubica cerca del grupo α -fosfato (105) o γ -fosfato (108) del MgATP. El aza completa, solamente hace contacto con el MgATP por medio de su Lis-21, la cual podría corresponder a la Lis-155 de β -EF₁ y a la Lis-162 de la subunidad β en la ATP sintasa mitocondrial identificada por fotomarcaje de afinidad (111). Esta Lis-162 está situada en o cerca del sitio de unión del P_i y cerca del grupo γ -fosfato del ATP. Es decir, de acuerdo a Garin y col. (111) y Bullough y col. (112) el sitio de unión del fosfato en la subunidad β de la F₁ mitocondrial contiene al menos un residuo de Lis, lo que significa que está cargado positivamente. En la función de este segmento muy probablemente interviene su capacidad de experimentar cambios conformacionales en respuesta a la interacción con el sustrato o a una interacción con otra proteína o dominio. Una evidencia fuerte de que esta aza sufre cambios de conformación, es que se han visto dos formas cristalinas (A y B) de la ADK que se diferencian principalmente en la posición espacial que adopta el segmento 1 (109). Este cambio conformacional en el segmento 1 da lugar a tres funciones

importantes: 1) control en la accesibilidad del sustrato al sitio de unión; 2) modificación de las afinidades del sitio de enlazamiento (este concepto podría explicar la afinidad extremadamente alta [$10^{-12}M$] del sitio catalítico en la ATP sintasa que lleva a cabo catálisis unisítio a bajas concentraciones de MgATP [104]) y 3) reordenamiento de los grupos catalíticos hacia el centro de reacción, una vez que el sustrato se ha unido.

Por otro lado, el segmento 2 forma una cripta hidrofóbica, en la cual se sitúa el fragmento adenina-ribosa del MgATP, mientras que el segmento 3 flanquea a la cadena trifosfato del MgATP, siendo probablemente este el lugar de anclaje del Mg^{2+} .

En resumen, puede decirse que la subunidad β de F_1 tiene un segmento conservado G-X-X-X-G-K-T, que correspondería al segmento 1 de la ADK, ubicado cerca del sitio catalítico y que experimenta también cambios conformacionales que podrían ser esenciales para la unión del sustrato y la catálisis. Sin embargo, los datos disponibles en la F_1 no permiten definir con precisión el dominio de unión del sustrato, el cual podría ser similar, pero quizá no idéntico al de la ADK (ver esquema 4).



ESQUEMA 4. A. Representación simplificada de la estructura cristalina de la ADK, que muestra la localización, determinada por resonancia magnética nuclear, del MgATP (tomado de la Ref. 105). B. Modelo de la estructura terciaria de unión de nucleótido en la subunidad β de la E. COLI F_1 -ATPasa. La molécula de ATP está colocada en la hendidura de unión, de manera semejante a la ubicación en el sitio de unión del MgATP en la ADK (tomado de la Ref. 104). C. Modelo tentativo del sitio catalítico en la F_1 -ATPasa mitocondrial. Se muestra al anillo de adenina del ATP en una cripta, en donde el carbono 2 interacciona con la Tyr 345 mientras que el carbono 8 lo hace con la Tyr 311. La cadena de fosfatos (en particular el fosfato y se localiza muy cerca de la Lys 162) interacciona con una región rica en Gly de la cadena β (aza de Gly) [tomado de la Ref. iii]. Los cilindros significan hélices α y las flechas indican hojas plegadas β . Se indican las posiciones aproximadas de las lisinas, ubicadas en las azas de glicina para las 3 moléculas.

1.5. OBJETIVOS DEL TRABAJO.

Hasta el momento se han descrito un cierto número de moléculas que afectan las propiedades catalíticas de la F_1F_0 ATP sintasa mitocondrial. Algunas de estas actúan a nivel del sector F_0 , i.e. oligomicina (113), dicitclohexilcarbodiimida (114) y alquilaciones (115). Un número aún mayor de moléculas no-fisiológicas afectan la porción F_1 , i.e. dicitclohexilcarbodiimida (116), nitrobenzofurazanos (117), aurovertina (118), alquilaciones (119,120), efrapeptina (121,122), batofenantrolina (123), y algunos análogos de nucleótidos de adenina (para una revisión, ver 110). Otros factores que afectan la función de la enzima son el fosfato y HCO_3^- (124) y está regulada, como ya se mencionó, por la magnitud del gradiente electroquímico de protones, la proteína inhibidora natural de la ATPasa (38,125) y la concentración de ADP y ATP. Sin embargo, hasta el momento no se ha reportado que los nucleótidos de piridina afecten la actividad catalítica de la enzima. Esto es de llamar la atención, puesto que un análisis de la estructura química del NADH revela que solamente difiere del ADP en su porción adicional nicotinamida-ribosa. Debido a tal similitud estructural entre ambos compuestos, se consideró interesante investigar si el NADH y los otros piridín nucleótidos (NADPH, $NADP^+$ y NAD^+) afectaban la síntesis y/o la hidrólisis desacoplada de ATP.

El hecho de que ciertos compuestos inhibidores como el AMPNP pueden afectar solamente la hidrólisis y no la síntesis de ATP (126,127), y el hecho de que la afinidad de la F_1 por ADP y P_i se incrementa notablemente en condiciones acopladas (85,86),

sugieren que la enzima experimenta cambios de conformación cuya consecuencia importante es la modificación del arreglo espacial del o los sitios catalíticos en las subunidades β . Schäfer (128), ha presentado evidencia, utilizando análogos nucleotídicos, de que la ATP sintasa puede adoptar dos estados conformacionales diferentes, y Boyer (71), ha considerado la posibilidad de que la inhibición por ADP y otros comportamientos observados podrían deberse a la expresión de dos estados conformacionales que adopta la enzima. Las interpretaciones de Komatsu-Takaki (129) sobre el comportamiento de la ATP sintasa de cloroplasto, correlacionando los estados de actividad sintética e hidrolítica, coinciden con las conclusiones del grupo de Boyer.

Los dos puntos anteriores (acción de los inhibidores y cambios conformacionales de la ATP sintasa) son muy importantes cuando se consideran los OBJETIVOS del presente trabajo:

I) Descripción del efecto de los piridín nucleótidos, NADH, NADPH, NAD^+ y NADP^+ sobre la hidrólisis desacoplada y la síntesis en la F_1F_0 mitocondrial.

II) Demostración de que el grado de inhibición de la síntesis de ATP producido por el NADH, depende de las concentraciones de ADP y P_i .

III) Evaluación de las características estructurales importantes del NADH en la inhibición de la síntesis de ATP.

IV) Análisis de los resultados obtenidos en relación a las características del sitio catalítico en presencia y en ausencia del gradiente electroquímico de protones.

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Preparación del material biológico.

2.1.1. Aislamiento de mitocondrias.

La preparación que se describe es la de Low & Vallin (130) para mitocondrias de corazón de res y consiste en romper el tejido mecánicamente y separar las mitocondrias por centrifugación diferencial. Todos los pasos que a continuación se describen fueron hechos a 4°C.

1. Se le eliminó al corazón de la res todo el tejido conectivo, grasa y coágulos de sangre, y se cortó al músculo en tiras de aproximadamente 2 a 4 cm de ancho. Se molió la carne.
2. Se agregaron 4 l de amortiguador A (sacarosa 200 mM, EDTA 15 mM/Tris-NaOH 5 mM, pH 7.4) por Kg de carne molida y se ajustó el pH a 7.4 con solución B (Tris saturado). Se licuó durante 90 segundos y se ajustó nuevamente el pH con la solución B.
3. Se colocó el licuado en botellas para centrifuga de 500 ml y se centrifugó a 2,500 rpm (1,100xg) durante 10 min a 4°C en los rotores JA-10 y GS-3. El sobrenadante rojo obtenido se decantó pasándolo a través de una gasa triple colocada sobre un vaso de 5 l, desechándose el precipitado.
4. El filtrado se centrifugó a 10,000 rpm (16,000xg) durante 10 min a 4°C, utilizando los rotores JA-14 y GSA para botellas de 250 ml. En el precipitado se encuentran las mitocondrias.
5. Las mitocondrias se resuspendieron en 500 ml de amortiguador B (sacarosa 250 mM, Tris-NaOH 5 mM pH 7.4) por Kg de carne molida y se centrifugó la suspensión a 2,000 rpm (600xg) 10 min/4°C en el rotor JA-14 o GSA.

6. El sobrenadante se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min/4°C. El sobrenadante se descartó. El precipitado está compuesto por una capa superior correspondiente a las "mitocondrias ligeras" y por un paquete fuertemente adherido al fondo de la botella y de color más oscuro que corresponde a las "mitocondrias pesadas".
7. Para obtener las mitocondrias ligeras se agitó la botella, decantando y enjuagando con unos ml de sacarosa 250 mM. Las mitocondrias pesadas se resuspendieron en el mínimo volumen posible de sacarosa 250 mM.
8. Por último se homogeneizaron por separado ambos tipos de mitocondrias y se determinó proteína por el método del Biuret en alícuotas de 20 μ l en presencia de desoxicolato de sodio al 0.33%. Estas mitocondrias se almacenaron concentradas (50-70 mg/ml) a una temperatura de -70°C hasta el momento de su uso. En estas condiciones, las mitocondrias permanecen al menos 6 meses sin alteración de sus propiedades.

2.1.2. Obtención de psm-MgATP.

El método que se usó fue el descrito por Lee & Ernster (131), el cual consiste en romper las "mitocondrias pesadas" de corazón de res (130), suspendidas en un medio acuoso neutro que contiene MgATP, por sonicación en tiempos de 45 segundos.

1. Se descongelaron aproximadamente 200 mg de mitocondrias a 30°C, y se resuspendieron por homogeneización ajustando la concentración a 20 mg/ml. El medio que se utilizó para resuspenderlas fue una solución de sacarosa 250 mM que contenía ATP 6 mM y acetato de Mg 6 mM. Se ajustó el pH a 6.9-7.1 con NaOH 10 N.

2. La suspensión de mitocondrias se sonicó durante 45 segundos, manteniendo el vaso del sonicado en baño de hielo a una temperatura no mayor de 10°C. El sonicado obtenido se centrifugó a 12,000 rpm (17,000xg) durante 15 min a 4°C en el rotor JA-20.
3. El sobrenadante se centrifugó a 45,000 rpm (105,000xg) durante 40 min a 4°C en el rotor 60 T1. El precipitado, formado por psm, se lavó por resuspensión con sacarosa 250 mM y se sometió nuevamente a centrifugación a 105,000xg por 40 min. El procedimiento de lavado se repitió 3 veces, resuspendiendo las psm con sacarosa 250 mM.
4. En el paso final, las psm se resuspendieron en sacarosa 250 mM a una concentración de 40-50 mg/ml y se almacenaron en alicuotas de 100 µl a una temperatura de -70°C. La proteína se cuantificó por el método de Lowry (131).

2.1.3. Obtención de psm-EDTA.

El procedimiento que se aplicó fue el descrito por Lee y col. (133) que consiste en romper "mitocondrias ligeras" de corazón de res, suspendidas en una solución que contiene sacarosa y EDTA, por sonicación.

1. Se llevaron 30 ml de "mitocondrias ligeras" a una concentración de 20 mg/ml en un medio que contenía sacarosa 250 mM/EDTA 2 mM. Se ajustó el pH a 8.2 con KOH.
2. Se sonicaron 50 ml de la suspensión anterior durante aproximadamente 12.5 min (2.5 min de sonicado/10 ml de suspensión), manteniendo el recipiente en baño de hielo. La temperatura durante todo el tiempo del sonicado se mantuvo abajo de los 10°C.

3. El sonicado se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min en el rotor JA-21. El sobrenadante se centrifugó a 45,000 rpm (105,000xg) durante 45 min a 4°C en el rotor 60 Ti.
4. El precipitado obtenido se lavó 3 veces con sacarosa 250 mM hasta que el sobrenadante quedó claro.
5. El precipitado final se resuspendió en sacarosa 250 mM y se determinó proteína por Biuret. La suspensión se dividió en alícuotas de aproximadamente 20 ml y se guardaron a -70°C.

2.1.4. Purificación de la F₁ mitocondrial.

La preparación de F₁ se hizo combinando los métodos de Knowles & Penefsky (10) y Tuena de Gómez-Puyou & Gómez-Puyou (22). Para esto se utilizaron las psm-EDTA previamente descritas. El procedimiento que se empleó fue el siguiente:

1. Se ajustó la concentración de psm-EDTA a 30 mg/ml con una solución de sacarosa 100 mM, ATP 4 mM y EDTA 2 mM (medio de ATP). El pH se equilibró a 9.2 con NH₄OH 1 N. La temperatura se mantuvo abajo de los 10°C.
2. La suspensión de psm-EDTA se sonicó en periodos de 2 min intercalando 1 min de descanso (este proceso se repitió 5 veces). El vaso del sonicado se colocó en agua/hielo manteniendo la temperatura entre 35° y 40°C. El sonicado se centrifugó a 40,000 rpm durante 1 hr a 20°C.
3. Se disminuyó el pH del sobrenadante a 5.4 con ácido acético 3 N y se centrifugó inmediatamente a 1500 rpm durante 5 min a 20°C. Después de esto el pH del sobrenadante se ajustó a 8.0 con NH₄OH 1 N.

NOTA: Estos pasos se hicieron en un tiempo total menor de 5 min.

4. El sobrenadante se pasó por una columna de sefarosa-hexilamónio (HA-sepharose 4B de Pharmacia), previamente lavada con 200 ml de H₂O y equilibrada con 40 ml de medio de ATP, a una velocidad de 1 gota/6 segundos, a temperatura ambiente (23°C). La columna se lavó con 80 ml de medio de ATP y las fracciones se recolectaron por elución con medio de ATP adicionado con KCl 1 M a una velocidad de 1 gota/5 segundos.

5. Se midió proteína por el método de Bradford a las diferentes fracciones colectadas. Las fracciones con el mayor contenido de proteína se juntaron y se procedió a precipitar el volumen final obtenido con un volumen igual de sulfato de amonio, a temperatura ambiente.

6. Después de la precipitación con sulfato de amonio, la(s) fracción(es) se dejaron en hielo durante 30 min. Al término de este tiempo se centrifugaron a 1,500 rpm por 15 min a 4°C.

7. El precipitado se resuspendió en medio de ATP y se centrifugó a 3,500 rpm/10 min. El sobrenadante se precipitó con un volumen de sulfato de amonio.

8. La proteína se determinó por Bradford y la actividad ATPasa por espectrofotometría.

2.2. TÉCNICAS.

2.2.1. Cuantificación del ATP formado durante la síntesis de ATP.

La síntesis de ATP, impulsada por la oxidación del succinato en presencia de rotenona y de una trampa de ATP (glucosa + hexoquinasa), se midió en las condiciones descritas en la sección de Resultados, usando [^{32}P] como trazador. Los nucleótidos de piridina y los otros compuestos (nicotinamida, nicotinamida-mononucleótido y adenosín-difosforribosa) se disolvieron en Tris-HCl 300 mM, pH 7.4. Una vez solubilizados se midió el pH y en el caso del NAD^+ y NADP^+ se ajustó a 7.4 con Tris sólido. Se tomaron alícuotas de las soluciones y se adicionaron a la mezcla de reacción. Los controles contenían concentraciones equivalentes de la solución amortiguada sin el compuesto a probar.

La mezcla de reacción (200 μl) se colocó en matraces Erlenmeyer de 25 ml y se incubó con agitación continua durante 4 min a 30°C. La reacción de síntesis se interrumpió al agregar 0.5 ml de ácido tricloroacético al 6%, y colocando los matraces en hielo. Los 0.7 ml de cada uno de los matraces se recuperaron en tubos de ensayo y se centrifugaron a 3,000 rpm/5 min a temperatura ambiente. Del sobrenadante obtenido se transfirieron 0.5 ml a tubos de ensayo.

La extracción del [^{32}P] libre se hizo agregando a los 0.5 ml del sobrenadante, 0.8 ml de H_2O + 1 ml de molibdato de amonio al 3.3% y H_2SO_4 3.75 N (para formar el complejo fosfomolibdato, soluble en fase orgánica) + 0.2 ml de acetona (favorece la separación de fase acuosa y orgánica). Se agitó en

vórtex durante 1 min y se adicionó 1 ml de isobutanol-benceno (1:1). Nuevamente se agitó en vórtex durante 45 segundos, se centrifugó y eliminó por succión la capa orgánica. Esta serie de pasos se repitieron 5 veces, para asegurar la remoción de todo el ^{32}P libre.

El ATP^{32}P formado se determinó indirectamente por detección de la radiactividad presente en la fase acuosa como [^{32}P]glucosa-6-fosfato.

2.2.2. Medición del fosfato liberado durante la hidrólisis de [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP.

La hidrólisis de ATP se midió por liberación del ^{32}P en las condiciones que se describen en la sección de Resultados. En este caso la reacción se paró con HCl 0.1 N que contenía 0.25 g de carbón activado por ml. Después de agregar el carbón, los tubos se agitaron en vórtex y se colocaron en hielo. Los tubos se centrifugaron a 3,000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. La cantidad de fósforo liberado durante la reacción se midió detectando la radiactividad presente en el sobrenadante como ^{32}P .

En la medición de ambas funciones (hidrólisis y síntesis) se incluyeron blancos para cada condición estudiada. Estos blancos contenían todos los componentes de la mezcla de reacción, excepto la enzima.

2.2.3. Cuantificación de proteína.

2.2.3.1. Método de Lowry.

1. Se colocaron por duplicado volúmenes de 20 μl y 40 μl de la suspensión final de psm en sacarosa 250 mM. En el caso de la F_1 soluble, ésta se diluyó 1:50 en medio de ATP.

2. Se agregó 1 ml de mezcla Lowry preparada de la manera siguiente: 100 ml de Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1 N + 1 ml de tartrato de Na^+/K^+ al 2% + 1 ml de CuSO_4 al 1%. Se dejó reposar durante 10 min. Esta mezcla se preparó inmediatamente antes de ser agregada.

3. Después de transcurrido el tiempo de reposo, se agregaron 0.2 ml de reactivo Folin-Ciocalteu diluido 1:3 con H_2O . Esta adición se efectuó mientras los tubos eran agitados en vórtex.

4. La curva estándar se hizo con 10-60 $\mu\text{g/ml}$ de albúmina sérica de bovino y se trató de idéntica forma que los problemas.

5. Se midió la absorción de estándares y problemas a 660 nm después de transcurridos 40 min.

2.2.3.2. Método de Bradford.

1. A la muestra conteniendo 4-50 μg de proteína se le adicionó 1 ml de reactivo de Bradford preparado como sigue: 100 mg de Coomassie G-250 en 50 ml de etanol al 95% + 100 ml de ácido fosfórico al 85% aforados a 1 l con agua y filtrado. Una vez agregado el reactivo se procedió a mezclarlo inmediatamente.

2. La absorción se midió a 595 nm 10 min después de adicionado el reactivo.

3. El blanco se preparó con agua, más la cantidad adecuada de amortiguador.

2.2.3.3. Método de Biuret.

1. Se aforó la muestra de proteína problema que contenía entre 0.25 mg y 5 mg a 1 ml con agua.

2. Para el blanco, se colocó un volumen adecuado del amortiguador utilizado para suspender la muestra y se aforó a 1 ml con agua.

3. La curva estándar se hizo agregando 1-6 mg/ml de albúmina sérica de bovino.

4. Se agregaron 2 ml del reactivo de Biuret a los blancos, estándares y problemas. El reactivo de Biuret tiene la composición siguiente: CuSO_4 al 0.15% + tartrato de Na^+/K^+ al 0.6% y NaOH al 3%.

5. Después de transcurridos 30 min de incubación, la absorción se leyó a 550 nm.

3. RESULTADOS.

3.1. EFECTO DE LOS PIRIDIN NUCLEÓTIDOS SOBRE LA HIDRÓLISIS DE ATP EN F₁ SOLUBLE Y PARTICULADA.

Se estudió el efecto del NADH sobre la actividad ATPasa de psm-MgATP variando la concentración de Mg-[γ ³²P]-ATP. A la mezcla de incubación se le agregó el desacoplante FCCP y rotenona en exceso para inhibir al complejo I mitocondrial y de esta forma evitar la oxidación del NADH. La figura 1 muestra el gráfico doble recíproco, en el cual la concentración final de NADH fue de 5 mM. Se observa que el NADH inhibió la actividad hidrolítica competitivamente. La Km para el control fue de aproximadamente 150 μ M y en presencia del NADH 5 mM el valor de la Km aumentó hasta 520 μ M. La Vmax fue de 0.8 μ mol mg⁻¹min⁻¹. El valor de la Ki para el NADH fue de 1.3 mM. Debido a que el efecto inhibitor del NADH fue de tipo competitivo con respecto al sustrato MgATP, los experimentos que se presentan en las figuras 2 y 4 se llevaron a cabo a una concentración constante de 100 μ M MgATP. En la figura 2 puede observarse que el NADPH y el NADP⁺ inhibieron la actividad ATPasa en forma casi igual que el NADH. La potencia del NAD⁺ para inhibir la hidrólisis fue menor comparada con la de los otros piridín nucleótidos.

Al observar que los piridín nucleótidos ejercían un efecto inhibitor sobre la hidrólisis en psm-MgATP, se consideró importante investigar si la enzima soluble se afectaba por estos compuestos. Del análisis de las figuras 3 y 4 se deduce que los resultados en la F₁ fueron similares a los obtenidos en las psm-

MgATP. La inhibición por NADH, NADPH, NADP⁺ y NAD⁺ fue de tipo competitivo con respecto al MgATP (Figura 3). Los valores de Km para el NADH, NADPH, NADP⁺ y NAD⁺ fueron, 676 μ M, 500 μ M, 500 μ M y 410 μ M, respectivamente. La magnitud de la inhibición causada por los tres primeros fue cuantitativamente similar (Figura 4), mientras que la potencia del NAD⁺ fue menor, pero comparable a la obtenida en las psm-MgATP.

Estos resultados indican que los piridín nucleótidos inhiben la hidrólisis de ATP, en la ATP sintasa mitocondrial, interactuando con el sector F₁ y muy probablemente actuando a nivel del o los sitios catalíticos en una forma competitiva con respecto al MgATP. Sin embargo, un comportamiento competitivo no estrictamente significa que el inhibidor bloquee al sitio catalítico puesto que podría entrar en un sitio cercano a éste, causando con ello una distorsión del sitio de reacción, lo cual daría lugar también a una inhibición de tipo competitivo (133). Sin embargo, el NADH así como los otros piridín nucleótidos, si entran al sitio catalítico, como lo indican los resultados que a continuación se describen.

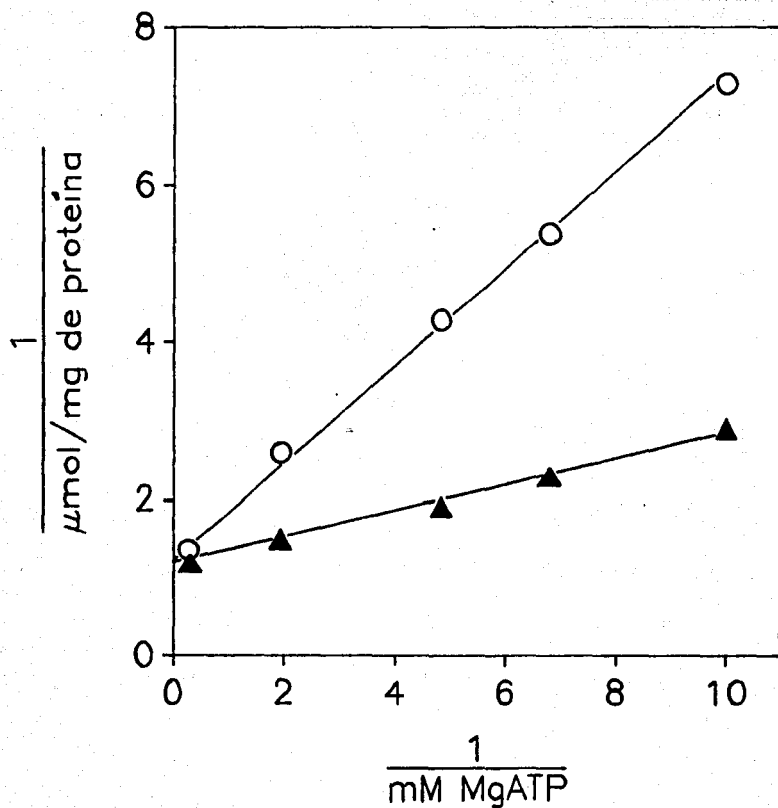


FIGURA 1. EFECTO DEL NADH SOBRE LA HIDROLISIS DE ATP EN PSM-MgATP. Partículas submitocondriales a una concentración de 125 $\mu\text{g/ml}$ se incubaron durante 4 min a 30°C en una mezcla que contenía Tris-HCl 30 mM pH 7.4, sacarosa 200 mM, rotenona 1 μM , FCCP 1 μM y las concentraciones indicadas de $\text{Mg}[\gamma\text{}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. La concentración de NADH utilizada fue de 5 mM. (▲) Control; (○) NADH.

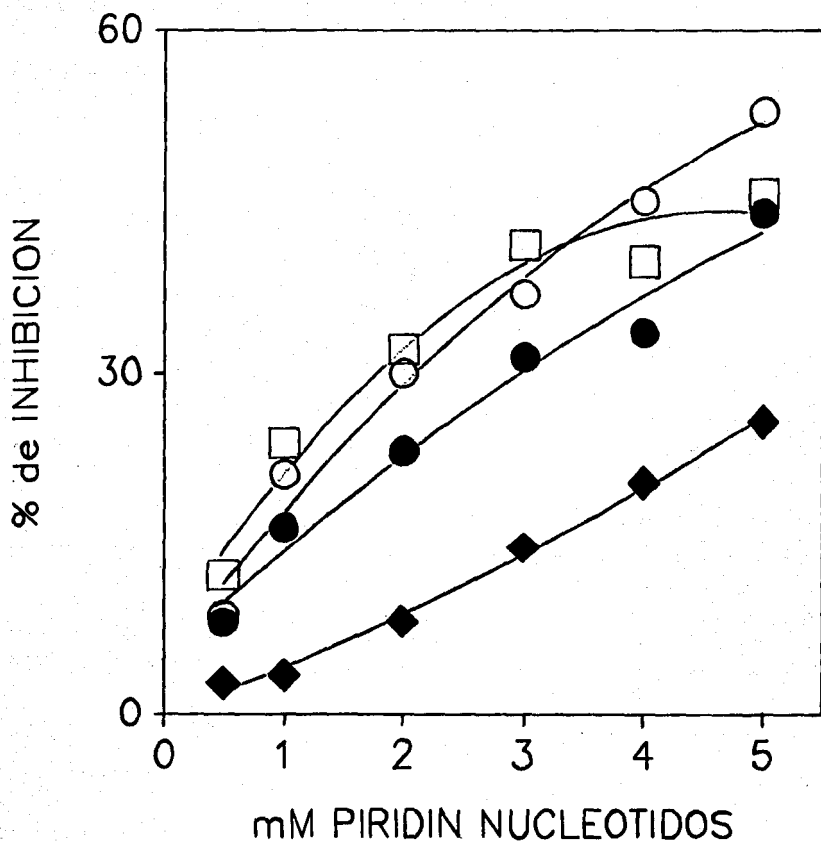


FIGURA 2. EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PIRIDIN NUCLEÓTIDOS SOBRE LA HIDRÓLISIS DE ATP EN PSM-MgATP. Las condiciones de incubación fueron las mismas que en la figura 1, excepto que la concentración de MgATP fue de 100 μ M con las concentraciones de piridín nucleótidos indicadas. La actividad específica del control fue de 57 nmol ATP hidrolizado $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. (○) NADH; (□) NADPH; (●) NADP⁺; (◆) NAD⁺.

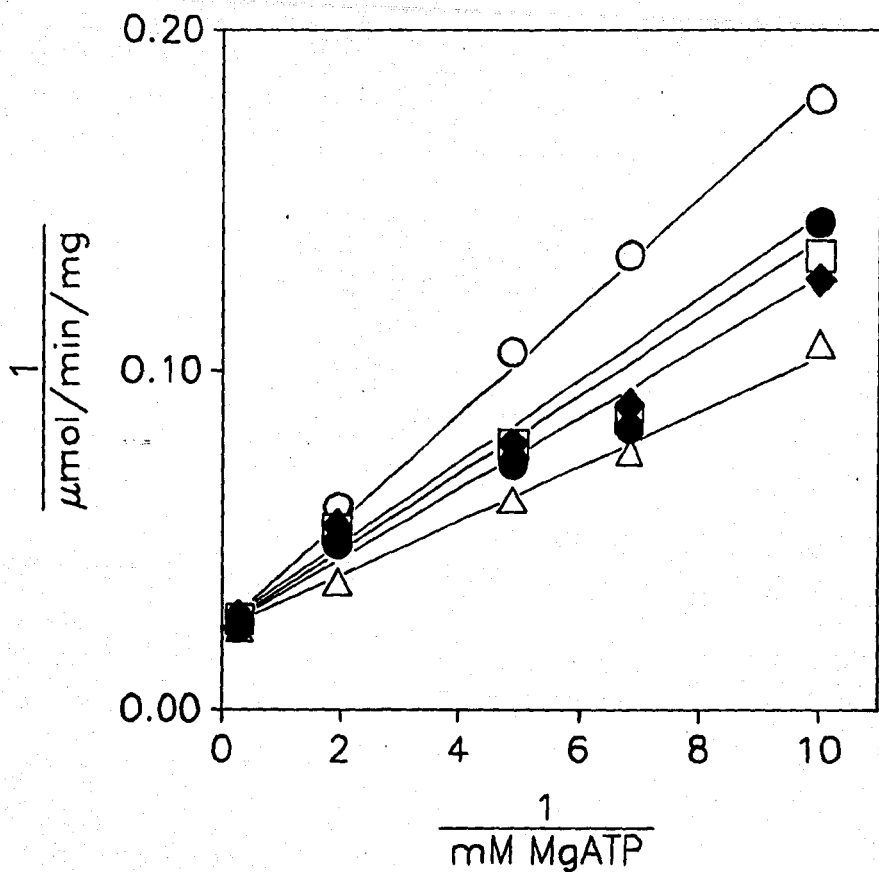


FIGURA 3. EFECTO DE NADH, NADPH, NADP⁺ y NAD⁺ SOBRE LA HIDRÓLISIS DE ATP EN F₁ SOLUBLE. Las condiciones de incubación fueron las mismas que las descritas en la Figura 1, excepto que se omitió la adición de rotenona y FCCP a la mezcla. La cantidad de F₁ empleada fue de 1.4 μg/ml de la mezcla de incubación. Todos los piridín nucleótidos se ensayaron a una concentración final de 5 mM.

(Δ) Control; (○) NADH; (◻) NADPH; (●) NADP⁺; (◐) NAD⁺.

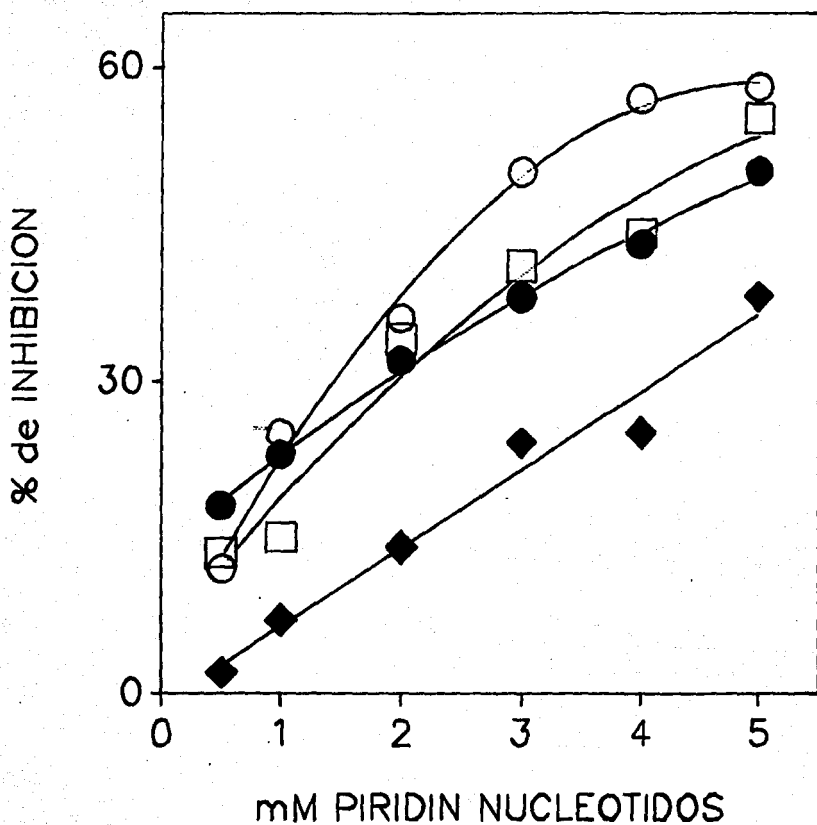


FIGURA 4. EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PIRIDIN NUCLEÓTIDOS SOBRE LA HIDRÓLISIS DE ATP EN F_1 SOLUBLE. Se emplearon las mismas condiciones experimentales que las descritas en la Figura 3, excepto que la concentración de MgATP fue de 100 μ M con las concentraciones indicadas de NADH, NADPH, $NADP^+$ y NAD^+ . En este caso la actividad específica del control fue de 7 μ mol ATP hidrolizado $\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$.
 (○) NADH; (□) NADPH; (●) $NADP^+$; (◆) NAD^+ .

3.2. EFECTO DE LOS PIRIDIN NUCLEÓTIDOS SOBRE LA SINTESIS DE ATP.

Puesto que los piridin nucleótidos inhibieron la hidrólisis de ATP en condiciones desacopladas, se consideró de interés explorar si estas moléculas también afectaban la síntesis de ATP. En todos los experimentos que se llevaron a cabo, las mezclas de reacción contenían psm-MgATP, succinato como sustrato respiratorio, rotenona y una "trampa" de ATP (hexoquinasa + glucosa) con el fin de mantener una concentración constante de ADP durante todo el experimento. Al ensayar diferentes concentraciones de ADP a una concentración constante de fosfato (Pi) de 5 mM, se observó que el NADH inhibió la síntesis de ATP de una forma competitiva con respecto al ADP. Este resultado puede observarse en la Figura 5. Los datos reportados en las figuras 1 a 5 sugieren que el NADH interactúa con el o los sitios catalíticos en la porción F_1 y que muy probablemente tal interacción se lleva a efecto por medio de la adenina o la parte ADP del NADH.

No obstante, se diseñaron experimentos para investigar si el efecto inhibitorio ejercido por el NADH se veía afectado por Pi o si solamente la interacción era por medio de la parte del sitio catalítico que une ADP. En la figura 6 se resumen los resultados de varios experimentos en los que se probó el efecto del NADH a una concentración final de 5 mM a tres concentraciones distintas de ADP, i.e. 10 μ M, 50 μ M (valor muy cercano a la K_m para el ADP, ver fig. 5) y 500 μ M. En cada una de estas concentraciones de ADP, la concentración de Pi se varió de 0.1 mM

a 10 mM. Como se puede observar, y de acuerdo a la cinética de tipo competitivo que se encontró para el NADH con respecto al ADP (figura 5), a concentraciones iguales de Pi la inhibición causada por el NADH fue mayor a menor concentración de ADP. Además de esto, se observó que el grado de inhibición producido por el NADH disminuyó a medida que la concentración de Pi se aumentó (fig.6). Es de llamar la atención que aún a una concentración de ADP de 500 μ M y 100 μ M de Pi, la inhibición de la síntesis de ATP obtenida es todavía significativa. De los resultados de estos experimentos es evidente que el grado en el cual una concentración dada de Pi es capaz de revertir la inhibición causada por el NADH depende de la cantidad de ADP presente.

Otro aspecto interesante a explorar fue la forma en que diferentes concentraciones de NADH inhibían la síntesis de ATP a distintas concentraciones de ADP y Pi. De la figura 7 es posible concluir que a concentraciones casi saturantes de Pi (5 mM) y limitantes de ADP (10 μ M), la acción inhibitoria de concentraciones crecientes de NADH fue menor que en la situación inversa (Pi limitante, 0.1 mM con ADP saturante, 500 μ M). La interpretación que surge de los datos presentados en las figuras 6 y 7 es que el Pi ejerce un efecto marcado sobre el mecanismo por el cual el NADH inhibe la síntesis de ATP.

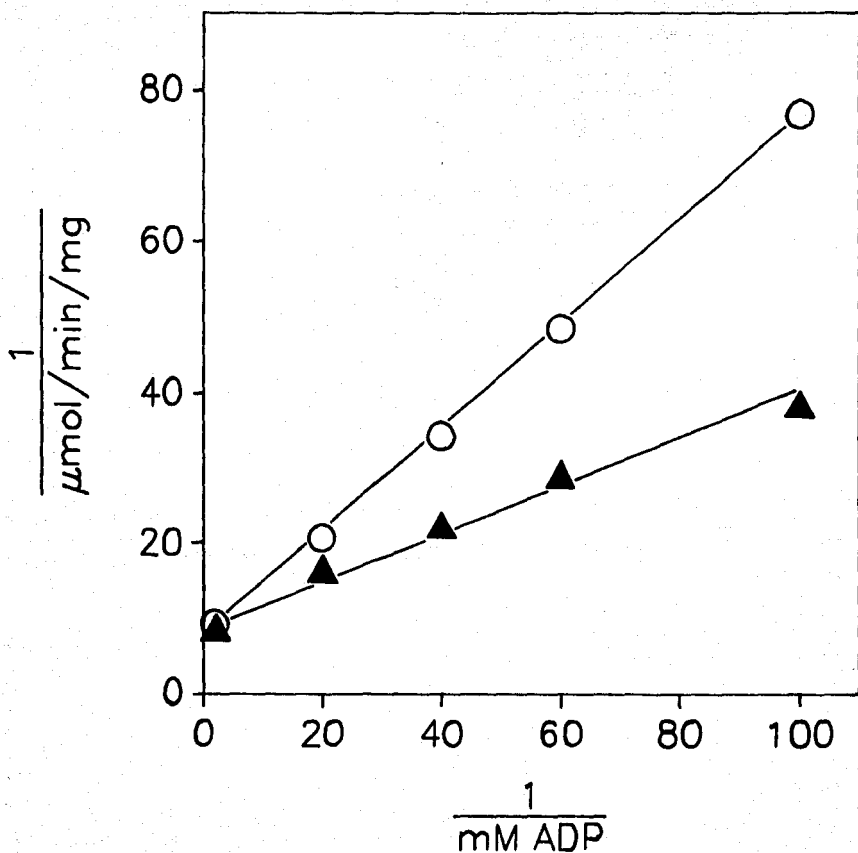


FIGURA 5. EFECTO DEL NADH SOBRE LA SINTESIS DE ATP. Partículas submitocondriales MgATP a una concentración de 450 $\mu\text{g/ml}$ se incubaron durante 4 minutos a 30°C en una mezcla que contenía Tris-HCl 30 mM pH 7.4, sacarosa 200 mM, succinato 10 mM, glucosa 20 mM, 7 Unidades de Hexoquinasa, $[^{32}\text{P}]$ como trazador y las concentraciones indicadas de ADP. Se determinó una K_m de 45 μM para el control (Δ) y de 91 μM en presencia de NADH 5 mM (\circ). La V_{max} fue de 125 nmol ATP formado $\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína.

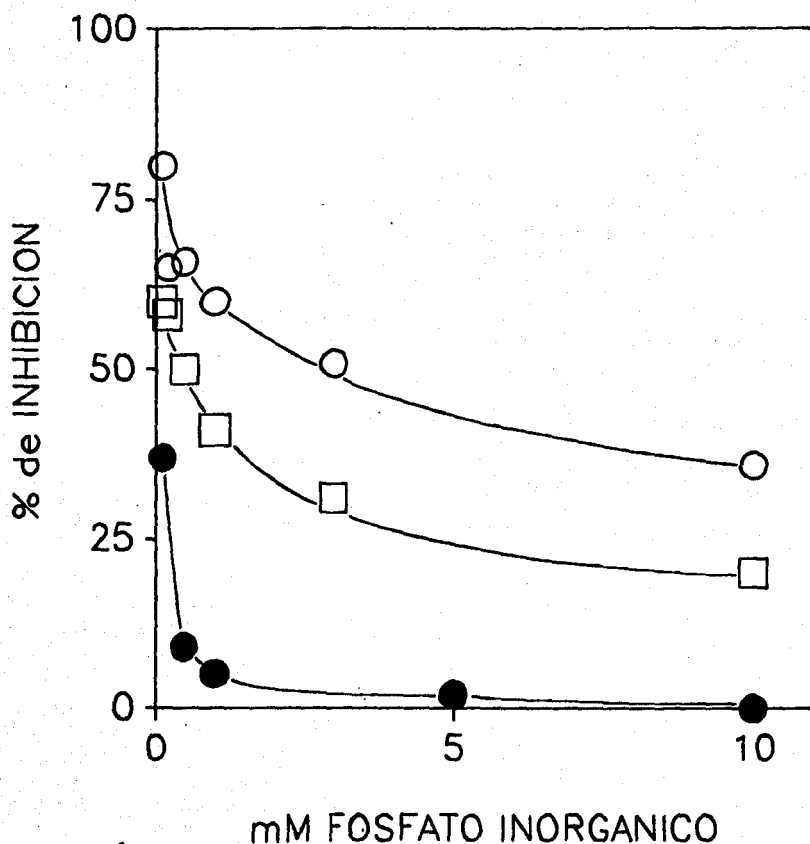


FIGURA 6. EFECTO DE CONCENTRACIONES VARIABLES DE ADP y FOSFATO SOBRE EL GRADO DE INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE ATP POR NADH. Se incubaron las psm-MgATP en las mismas condiciones que en la Figura 5, excepto que concentraciones de ADP de 10 μ M (\circ), 50 μ M (\square) y 500 μ M (\bullet) se emplearon con las concentraciones indicadas de fosfato. Las actividades específicas con 10 mM fosfato y ADP 10 μ M, 50 μ M y 500 μ M fueron: 17, 66 y 108 nmol ATP formado $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$, respectivamente. La concentración de NADH para cada condición fue de 5 mM constante.

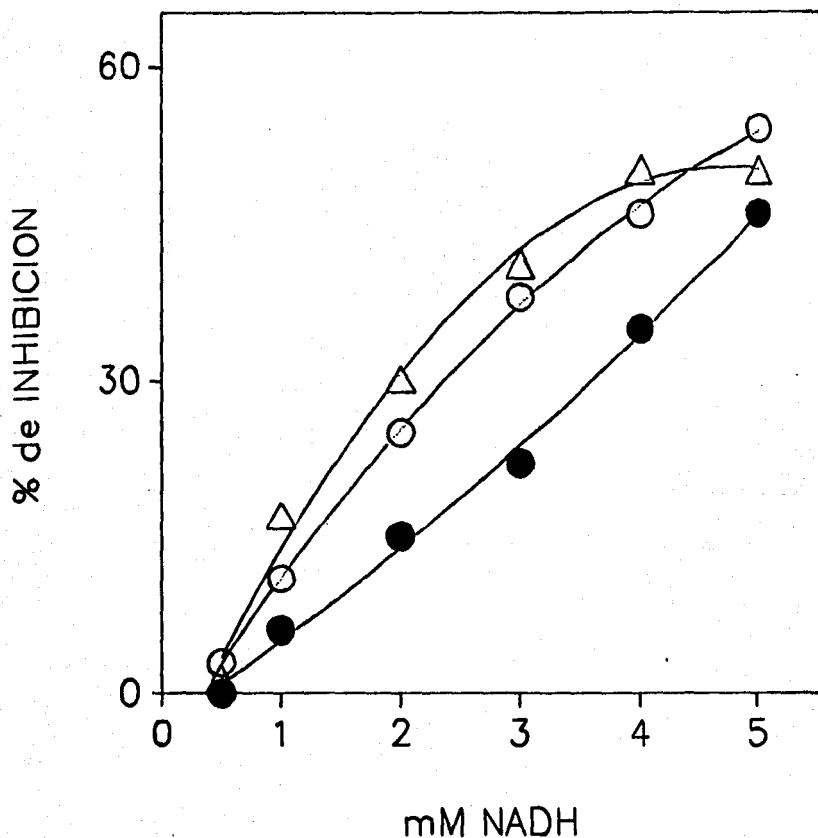


FIGURA 7. EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NADH SOBRE LA SINTESIS DE ATP. Las partículas submitocondriales se incubaron en las mismas condiciones que las descritas en la Figura 5, excepto que se ensayaron las condiciones siguientes: ADP 10 μM y fosfato 5 mM (●); ADP 50 μM y fosfato 0.5 mM (○) y ADP 500 μM y fosfato 0.1 mM (Δ), variando la concentración de NADH. Las actividades específicas de los controles, en cada condición, fueron: 36, 26 y 19 $\text{nmol min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, respectivamente.

3.3. EFECTO DE LOS PIRIDIN NUCLEOTIDOS Y SUS COMPONENTES MOLECULARES SOBRE LA SINTESIS DE ATP.

Con el objeto de explorar más a fondo la magnitud con que las diferentes partes de la molécula de NADH intervenían en la inhibición de la síntesis de ATP, se seleccionó una condición en la cual el NADH inhibió la actividad sintética en un 50%, es decir, a una concentración de ADP de 50 μM y P_i de 0.5 mM. A estas concentraciones de ADP y P_i , la molécula de ADP-ribosa causó una inhibición del 30% (Tabla 1). Este hallazgo apoya la observación anterior en el sentido de que aparentemente la porción ADP induce la mayor parte de la inhibición producida por el NADH; sin embargo, la sección nicotinamida del NADH también parece contribuir a la acción inhibitoria de la mitad ADP ya que se encontró que el NAD^+ causó relativamente poca inhibición. De este resultado se deduce que la carga (+) en el anillo nicotinamida juega un papel crucial en la inhibición producida por la molécula de NADH completa. Esto es, la porción ADP-ribosa unida a la parte nicotinamida ejerció un efecto inhibitorio marcado sólo en el caso en que el anillo nicotinamida careció de carga positiva (ADP-ribosa + anillo nicotinamida neutro = NADH). De hecho la carga positiva en el anillo nicotinamida aparentemente disminuye la interacción con la F_1 particulada, puesto que el efecto del ADP-ribosa fue mayor que el del NAD^+ (Tabla 1). Las otras moléculas que se probaron, nicotinamida y NMN, carentes de la porción ADP, afectaron muy poco la síntesis de ATP (Tabla 1).

TABLA 1. INHIBICIÓN DE LA SINTESIS DE ATP POR LOS PIRIDIN NUCLEÓTIDOS Y SUS PARTES.

<u>MOLÉCULA^a</u>	<u>% DE INHIBICIÓN DEL CONTROL</u>
NADH	50
ADP-R	30
NAD ⁺	17
NADPH	12
NADP ⁺	5
NMN	5
Nicotinamida	2

Los experimentos se llevaron a cabo con una concentración de ADP de 50 μ M y Pi de 0.5 mM siguiendo las condiciones descritas en la Figura 5. Los compuestos probados se disolvieron en Tris-HCl 300 mM, pH 7.4. En el caso del NAD⁺ y NADP⁺, el pH se ajustó a pH 7.4. Después de la adición de estas soluciones, la concentración final de Tris-HCl fue de 30 mM. El control también contenía esta concentración de Tris-HCl. La actividad específica del control fue de 19 nmol ATP min⁻¹.mg⁻¹.

a. Concentración final, 5 mM.

Es importante señalar que el NADPH ejerció una pequeña inhibición de la síntesis de ATP. Al parecer, la presencia de un fosfato adicional en la ribosa unida a la adenina es un factor que impide la acción inhibitoria del resto de la molécula. Por último, en el caso del NADP⁺ que contiene un anillo nicotinamida con carga positiva y el fosfato adicional, el efecto sobre la síntesis de ATP es prácticamente nulo (Tabla 1).

NOTA. Todos los experimentos descritos en esta sección de resultados se hicieron con un lote de NADH exento de la contaminación por ADP (ver addendum pp. 59).

4. DISCUSIÓN.

En las mitocondrias, el NADH es uno de los principales sustratos oxidables de la fosforilación oxidativa. Además, en el laboratorio, el NADH es un componente de uno de los métodos más ampliamente utilizados para estimar la hidrólisis de ATP en F_1 particulada o soluble (135). Es muy probable que el efecto inhibitorio del NADH sobre la hidrólisis y la síntesis de ATP no se haya observado con anterioridad debido a que las concentraciones de piridín nucleótidos requeridas para observar tales efectos caen en el rango mM. Estas concentraciones son mucho más elevadas que las que se emplean para medir actividad ATPasa con un sistema regenerador de ATP (135). Sin embargo, en muchos casos se utilizan concentraciones mM de NADH en estudios de fosforilación oxidativa.

De los resultados de esta investigación se derivan aspectos interesantes, como por ejemplo el hallazgo de que el NADH inhibió la síntesis de ATP más efectivamente que el NADPH y el $NADP^+$, a pesar de que estos dos últimos compuestos inhibieron la hidrólisis en grado similar al NADH. Debido a que la inhibición causada por los piridín nucleótidos fue de tipo competitivo, los datos sugieren que la selectividad del sitio catalítico es diferente en presencia y ausencia del potencial electroquímico de protones. Si se analizan los datos presentados en la Tabla 1, es evidente que ciertos factores estructurales de los piridín nucleótidos resultan ser importantes cuando se considera su capacidad para inducir inhibición de la síntesis de ATP. Por ejemplo, es interesante que el NADH sea un inhibidor

competitivo de la síntesis de ATP más potente que el NADPH. Este resultado indicaría que la F_1 al "sentir" el gradiente electroquímico cambia su estado conformacional haciéndose menos susceptible a la inhibición por NADPH. Esto hace pensar que la hendidura hidrofóbica del sitio catalítico donde se acopla la adenina-ribosa disminuye de tamaño, o bien que el grado de hidrofobicidad se incrementa impidiendo con ello que una molécula cargada como lo es el fosfato pueda penetrar. Siguiendo con esta línea de pensamiento, es interesante el dato de que la ADP-ribosa sea una molécula inhibidora más potente que el NADPH.

Por otro lado, si se compara la efectividad inhibitoria del NADH con ADP-ribosa y NAD^+ , se observa el orden siguiente: $NADH > ADP-ribosa > NAD^+$ (donde $>$ significa mejor inhibidor que...). Esto indica que la potencia de los piridín nucleótidos para inhibir la síntesis de ATP no sólo se ve afectada por la presencia del fosfato en la ribosa-adenina, sino también por las características del anillo nicotinamida. Aparentemente, la carga positiva en la nicotinamida es un rasgo muy importante que impediría al piridín nucleótido ser un inhibidor potente de la síntesis de ATP. Esto es muy claro cuando se compara la efectividad como inhibidor entre el NAD^+ y el NADH. Dicho en otros términos, se tiene evidencia de que en el sitio catalítico (particularmente cerca de o en el lugar donde se une el P_i) hay al menos un residuo de Lis (111,112) en la posición 162 (111). Si se interpretan los resultados obtenidos con el NAD^+ y el NADH de acuerdo a los hallazgos de Garin y col. (111) y Bullough y col. (112), podría concluirse que la menor capacidad del NAD^+ para

inhibir la síntesis de ATP se debe a una repulsión por carga entre la Lis-162 y el anillo nicotinamida del NAD^+ . Como corolario a estas interpretaciones, se obtuvieron datos en este trabajo que indican que concentraciones crecientes de Pi disminuyeron y abolieron el efecto inhibitorio del NADH sobre la actividad sintética.

Todos estos datos pueden interpretarse en su conjunto de la manera siguiente: la porción ADP del NADH ocuparía el sitio de unión del ADP en el sitio catalítico mientras que el resto de la molécula (ribosa-nicotinamida) interactuaría con el sitio donde el Pi entra en la reacción de síntesis.

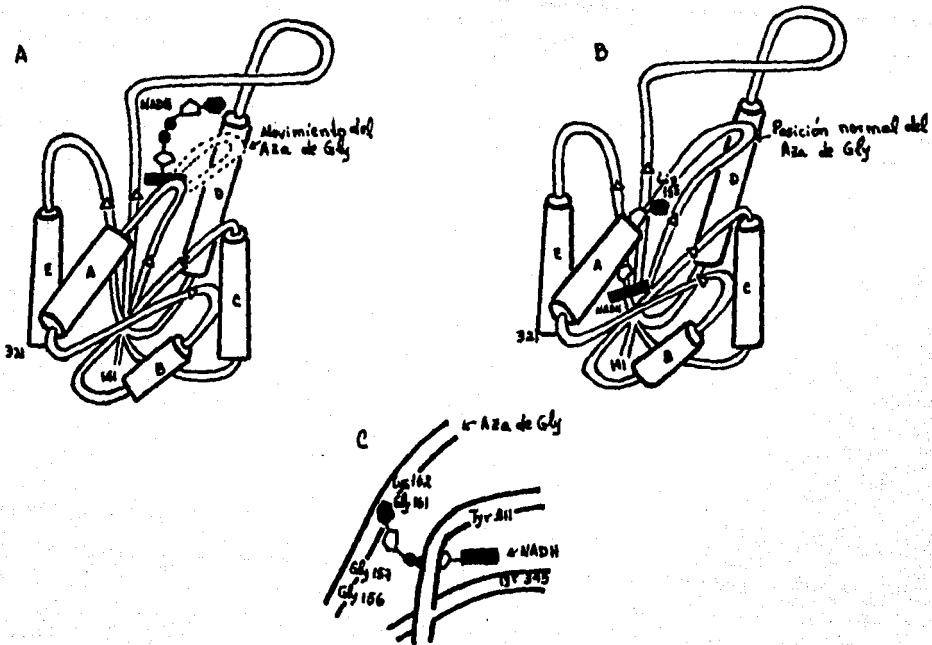
Se puede pensar que cuando existe un gradiente electroquímico de protones, el NADH entra a los sitios de unión del ADP y Pi en la F_1 por medio de su porción adenina-ribosa, es decir, este segmento actuaría como "punta de lanza" y sería el primero en ser reconocido por la enzima. Este mecanismo de entrada del NADH explicaría satisfactoriamente la baja potencia inhibitoria del NADPH en la síntesis de ATP. Aparentemente, en el sitio de unión del ADP las interacciones hidrofóbicas no permiten que esta región del sitio catalítico adopte configuraciones espaciales flexibles. De ninguna manera debe descartarse la posibilidad de que el NADPH entre al sitio; sin embargo la permanencia del fosfato adicional en un microambiente hidrofóbico no es termodinámicamente factible. Una vez que la porción adenina-ribosa del NADH se acomoda en el sitio del ADP, su función sería la de servir como "segmento ancla", permitiendo ahora que la porción ribosa-nicotinamida interactúe con otra región del sitio catalítico. Esta idea se sustenta en los datos

obtenidos con el ADP-Ribosa, NAD^+ , NMN y nicotinamida (Tabla 1). El ADP-Ribosa carece del anillo nicotinamida, por lo que su efecto inhibitorio es menor con respecto al ejercido por el NADH. Tal observación indicaría que no solamente el "segmento ancla" (adenina-ribosa) es importante sino que también el anillo nicotinamida debe estar presente para que el piridín nucleótido induzca el máximo grado de inhibición. Es muy factible que el anillo nicotinamida quede situado cerca de o en el sitio de unión del P1. No obstante, resulta trascendental que la nicotinamida esté presente en forma neutra (ver dato del NAD^+ , Tabla 1). La carga positiva en el anillo nicotinamida del NAD^+ podría causar una distorsión de la estructura en el aza de glicina que contiene a la Lis-162 (ver más adelante), impidiendo con ello que esta aza se acomodara apropiadamente, esto significa que el efecto "tapadera" o de "compuerta" del aza no se produciría. En el caso del NADP^+ , el cual tiene un fosfato adicional y el anillo nicotinamida cargado positivamente, tanto el efecto estérico y/o la inestabilidad termodinámica en el sitio del ADP como la interacción electrostática del nicotinamida se presentarían simultáneamente, reduciendo aún más la capacidad inhibitoria de este compuesto (comparar datos del NADP^+ , NAD^+ y NADH, Tabla 1). Por último, y apoyando el concepto del efecto "ancla" ejercido por la porción adenina-ribosa, están los resultados con el NMN y la nicotinamida (Tabla 1). Ambos compuestos parecen requerir la mitad adenina-ribosa para poder inducir inhibición. También se podría argumentar que como estos compuestos no bloquean la entrada del ADP a su sitio de unión, este ADP enlazado a la

enzima pudiera favorecer la entrada del P_i, probablemente aumentando su constante de afinidad, con lo que se disminuiría notablemente la posibilidad de que el NMN y el nicotinamida interactuaran con la región del sitio catalítico que une P_i. En el esquema 5 se presenta un modelo que trata de representar la forma en que el NADH entra al sitio catalítico y permanece unido a éste.

Es relevante el hecho de que una molécula como el NADH cuyo tamaño es mayor que el del ATP y además con una estructura diferente (en la porción ribosa-nicotinamida), pueda acoplarse al o los sitios catalíticos en la F₁. Esto induce a pensar en un posible papel para el aza de glicina que termina en la Lis-162 (iii) en el sitio catalítico de la F₁, y que de acuerdo a Fry y col. es equivalente al segmento 1 en la ADK (103). Probablemente la rigidez del sitio catalítico en la F₁ se modifique debido a que este segmento experimenta cambios conformacionales que permiten la entrada de moléculas tales como el NADH.

Aunque es evidente la importancia del NADH como una molécula útil para el estudio del sitio catalítico, actualmente no es posible asignarle un papel como regulador fisiológico. A las concentraciones elevadas de fosfato (20 mM), ATP (10 mM) y NADH (2-3 mM) que normalmente se encuentran en mitocondrias aisladas (136), un efecto regulador del NADH sobre la síntesis de ATP parecería poco probable.



ESQUEMA 5. A. Modelo que representa el movimiento espacial del aza de glicina en la ECF₁-ATPasa. Tal desplazamiento del aza permitiría la entrada del NADH por su porción adenina-ribosa. B. Colocación probable del NADH en el sitio de unión del MgATP. Observe que el aza de glicina ha retornado a su posición normal y que además el anillo nicotinamida se encuentra cerca de la lisina-155. C. Posición del NADH en el sitio de unión del ATP en la F₁-ATPasa mitocondrial. Se ha colocado al anillo nicotinamida muy cerca de la lisina-162.

5. REFERENCIAS.

1. Senior, A. E. (1988) *Physiol. Rev.* 68: 177.
2. Grant, W.D. (1987) *Microbiol. Sci.* 4: 251.
3. Mitchell, P. (1966) CHEMIOSMOTIC COUPLING IN OXIDATIVE AND PHOTOSYNTHETIC PHOSPHORYLATION, *Gly. Res. Lab., Bodmin, Cornwall, England.*
4. Skulachev, V. P. (1981) CHEMIOSMOTIC PROTON CIRCUITS IN BIOLOGICAL MEMBRANES, ed. V. P. Skulachev, P. C. Hinkle, pp. 3-46. Reading, Mass: Addison-Wesley.
5. Mitchell, P. (1981) In MITOCHONDRIA AND MICROSOMES IN HONOR OF LARS ERNSTER, ed. C. P. Lee, G. Shatz, pp. 427-457. Palo Alto, Calif: Addison-Wesley.
6. Amzel, L. M. y Pedersen, P. L. (1983) *Ann. Rev. Biochem.* 52: 801.
7. Hatefi, Y. (1985) *Ann. Rev. Biochem.* 54: 1015.
8. Pedersen, P. L. y Carafoli, E. (1987) *Trends Biochem. Sci.* 12: 146.
9. Senior, A. E. y Wise, J. G. (1983) *J. Membr. Biol.* 73: 105.
10. Knowles, A. F. y Penefsky, H. S. (1972) *J. Biol. Chem.* 247: 6617.
11. Yoshida, M., Sone, N., Hirata, H., Kagawa, Y. y Uri, N. (1979) *J. Biol. Chem.* 254: 9525.
12. Esch, F. S. y Allison, W. S. (1979) *J. Biol. Chem.* 254: 10740.
13. Dunn, S. D. y Heppel, L. A. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* 210: 421.
14. Dunn, S. D. (1982) *J. Biol. Chem.* 257: 7354.
15. Tybulewicz, V. L. J., Falk, G. y Walker, J.E. (1984) *J. Mol. Biol.* 179: 185.
16. Falk, G., Hampe, A. y Walker, J. E. (1985) *Biochem. J.* 228: 391.
17. Kanazawa, H. y Futai, M. (1982) *Annu. N. Y. Acad. Sci.* 402: 45.
18. Walker, J. E., Runswick, M. J. y Saraste, M. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 768: 164.

19. Walker, J. E., Gay, N. J., Saraste, M. y Eberle, A. N. (1984) *Biochem. J.* 224: 799.
20. Cozens, A. L. y Walker, J. E. (1987) *J. Mol. Biol.* 194: 359.
21. Walker, J. E., Fearnley, I. M., Gay, N. J., Gibson, B. W., Northrop, F. D., Powell, S. J., Runswick, M. J., Saraste, M. y Tybulewicz, V. L. J. (1985) *J. Mol. Biol.* 184: 677.
22. Tuena de Gómez-Puyou, M. y Gómez-Puyou, A. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 182: 82.
23. Sakamoto, J. y Tonomura, Y. (1983) *J. Biochem.* 93: 1601.
24. Sakamoto, J. (1984) *J. Biochem.* 96: 475.
25. Yoshida, M. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114: 907.
26. Gómez-Puyou, A., Tuena de Gómez-Puyou, M. y De Meis, L. (1986) *Eur. J. Biochem.* 159: 133.
27. Kandpal, R. P., Stempel, K. E. y Boyer, P. D. (1987) *Biochemistry* 26: 1512.
28. Feldman, R. I. y Sigman, D. S. (1982) *J. Biol. Chem.* 257: 1676.
29. Feldman, R. I. y Sigman, D. S. (1983) *J. Biol. Chem.* 258: 12178.
30. Sebald, W., Graf, T. y Lukins, H. B. (1979) *Eur. J. Biochem.* 93: 587.
31. Foster, D. L. y Fillingame, R. H. (1982) *J. Biol. Chem.* 257: 2009.
32. Sigrist, H., Sigrist-Nelson, K. y Gliter, C. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74: 178.
33. Toll, L. y Howard, B. D. (1980) *J. Biol. Chem.* 255: 1787.
34. McLennan, D. H. y Tzagaloff, A. (1968) *Biochemistry* 7: 1603.
35. Knowles, A. F., Guillory, R. y Racker, E. (1971) *J. Biol. Chem.* 246: 2672.
36. Sanadi, D. R. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 683: 39.
37. Huang, Y., Kantham, L. y Sanadi, D. R. (1987) *J. Biol. Chem.* 262: 3007.
38. Pullman, M.E. y Monroy, G. C. (1963) *J. Biol. Chem.* 238: 3762.
39. Gómez-Puyou, A., Tuena de Gómez-Puyou, M. y Ernster, L. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 547: 252.

40. Harris, D. A., Von Tschärner, V. y Radda, G. K. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 548: 72.
41. Schwerzmann, K. y Pedersen, P. L. (1981) *Biochemistry* 20: 6305.
42. Schwerzmann, K. y Pedersen, P. L. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* 250: 1.
43. McEnery, M. W., Buhle, E. L. Jr., Aebi, U. y Pedersen, P. L. (1984) *J. Biol. Chem.* 259: 4642.
44. Ryrie, I. J. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 184: 464.
45. Tzagaloff, A. (1979) *Methods. Enzymol.* 55: 351.
46. Sebald, W. y Wild, G. (1979) *Methods. Enzymol.* 55: 344.
47. Serrano, R., Kanner, B. I. y Racker, E. (1976) *J. Biol. Chem.* 251: 2453.
48. Galante, Y. M., Wong, S. Y. y Hatefi, Y. (1979) *J. Biol. Chem.* 254: 12372.
49. Tiedge, H., Schäfer, G. y Mayer, F. (1983) *Eur. J. Biochem.* 132: 37.
50. Tsuprun, V. L., Mesyanzhinova, I. V., Kozlov, I. A. y Orlova, E. V. (1984) *FEBS Lett.* 167: 285.
51. Boekema, E. J., Berden, J. A. y Van Heel, M. G. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 851: 353.
52. Akey, C. W., Spitsberg, V. y Edelstein, S. J. (1983) *J. Biol. Chem.* 258: 3222.
53. Amzel, L. M., McKinney, M., Narayanan, P. y Pedersen, P. L. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 5852.
54. Amzel, L. M. y Pedersen, P. L. (1978) *J. Biol. Chem.* 253: 2067.
55. Lünsdorf, H., Ehrig, K., Friedl, P. y Schairer, H. U. (1984) *J. Mol. Biol.* 173: 131.
56. Tiedge, H., Lünsdorf, H., Schafer, G. y Schairer, H. U. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7874.
57. Williams, N., Hullihen, J. M. y Pedersen, P. L. (1984) *Biochemistry* 23: 780.
58. Futai, M. y Kanazawa, H. (1982) In *TRANSPORT AND BIONERGETICS IN MEMBRANES*, ed., R. Sati y Y. Kagawa., pp. 59, Plenum-Press.

59. Cross, R. L. y Nalin, C. M. (1982) J. Biol. Chem. 257: 2874.
60. Weber, J., Lücken, U. y Schäfer, G. (1985) Eur. J. Biochem. 148: 41.
61. Issartel, J. P., Lunardi, J. y Vignais, P. V. (1986) J. Biol. Chem. 261: 895.
62. Esch, F. S. y Wielders, J. P. M. (1979) J. Biol. Chem. 254: 10740.
63. Williams, N. y Coleman, P. S. (1982) J. Biol. Chem. 257: 2834.
64. Lübben, M., Lücken, U., Webber, J. y Schäfer, G. (1984) Eur. J. Biochem. 143: 483.
65. Noumi, T., Tagaya, M., Takeda, M. K., Maeda, M., Fukui, T. y Futai, M. (1987) J. Biol. Chem. 262: 7686.
66. Khananashvili, D. y Gromet-Elhanan, Z. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 1886.
67. Webb, M. R., Grubmeyer, C., Penefsky, H. S. y Trentham, D. R. (1980) J. Biol. Chem. 255: 11637.
68. Boyer, P. D., Cross, R. L. y Momsen, W. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 2837.
69. Rosing, J., Kayalar, C. y Boyer, P. D. (1976) In THE STRUCTURAL BASIS OF MEMBRANE FUNCTION, eds., Y. Hatefi. y L. Djavadi-Ohniance, pp. 189., New York: Academic.
70. Boyer, P. D. (1979) In MEMBRANE BIOENERGETICS, eds., C. P. Lee, G. Shatz. y L. Ernster, pp. 461., Reading Mass: Addison-Wesley.
71. Boyer, P. D. (1989) FASEB J. 3: 2164.
72. Cross, R. L., Grubmeyer, C. y Penefsky, H. S. (1982) J. Biol. Chem. 257: 12101.
73. Grubmeyer, C., Cross, R. L. y Penefsky, H. S. (1982) J. Biol. Chem. 257: 12092.
74. Grubmeyer, C. y Penefsky, H. S. (1981) J. Biol. Chem. 256: 3718.
75. Grubmeyer, C. y Penefsky, H. S. (1981) J. Biol. Chem. 256: 3728.
76. Penefsky, H. S. (1985) J. Biol. Chem. 260: 13735.
77. Penefsky, H. S. (1985) J. Biol. Chem. 260: 13728.

78. Gresser, M. J., Myers, J. A. y Boyer, P. D. (1982) J. Biol. Chem. 257: 12030.
79. Kandpal, R. P. y Boyer, P. D. (1987) Biochim. Biophys. Acta 890: 97.
80. Musier, K. M. y Hammes, G. G. (1987) Biochemistry 26: 5982.
81. Wang, J. H. (1985) J. Biol. Chem. 260: 1374.
82. Wang, J. H., Joshi, V. y Wu, J. C. (1986) Biochemistry 25: 7996.
83. Bullough, D. A., Verburg, J. G., Yoshida, M. y Allison, W. S. (1987) J. Biol. Chem. 262: 11675.
84. Yohda, M. y Yoshida, M. (1987) J. Biochem. 102: 875.
85. Boyer, P. D., Cross, R. L. y Momsen, W. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 2837.
86. McCarty, J. E. G. y Ferguson, S. J. (1983) Eur. J. Biochem. 132: 425.
87. Matsuno-Yagi, A. y Hatefi, Y. (1986) J. Biol. Chem. 261: 14031.
88. Nelson, N., Nelson, H. y Racker, E. (1972) J. Biol. Chem. 247: 7657.
89. Cintron, N. M. y Pedersen, P. L. (1979) J. Biol. Chem. 254: 3439.
90. Smith, J. B., Sternweiss, P. C. y Heppel, L. A. (1975) J. Supramol. Struct. 3: 248.
91. Dreyfus, G. y Satre, M. (1984) Arch. Biochem. Biophys. 229: 212.
92. Satre, M., de Jerphanion, M. B., Huet, J. y Vignais, P. V. (1975) Biochim. Biophys. Acta 387: 241.
93. Frangione, B., Rosenwasser, E., Penefsky, H. S. y Pullman, M. E. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 7403.
94. Dianoux, A. C., y Hoppe, J. (1987) Eur. J. Biochem. 163: 155.
95. Matsubara, H., Hase, T., Hashimoto, T. y Tagawa, K. (1981) J. Biochem. 90: 1159.
96. Klein, G., Satre, M., Dianoux, A. C. y Vignais, P. V. (1980) Biochemistry 19: 2919.
97. Pedersen, P. L., Schwerzmann, K. y Cintron, N. (1981) Curr. Top. Bioenerg. 11: 149.

98. Tuena de Gómez-Puyou, M., Muller, U., Dreyfus, G. y Gómez-Puyou, A. (1983) *J. Biol. Chem.* 258: 13680.
99. Harris, D. A. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 463: 245.
100. di Pietro, A., Penin, F., Godinot, C. y Gautheron, D. C. (1980) *Biochemistry* 19: 5671.
101. Vasilyeva, E. A., Fitin, A. F., Minkov, I. B. y Vinogradov, A. D. (1980) *Biochem. J.* 188: 807.
102. Drobinskaya, I. Y., Kozlov, I. A., Murataliev, M. B. y Vulfson, E. N. (1985) *FEBS Lett.* 182: 419.
103. Fry, D. C., Kuby, S. A. y Mildvan, A. S. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 907.
104. Duncan, T. M., Parsonage, D. y Senior, A. E. (1986) *FEBS Lett.* 208: 1.
105. Fry, D. C., Kuby, S. A. y Mildvan, A. S. (1985) *Biochemistry* 24: 4680.
106. Deno, H. y Sugiura, M. (1984) *FEBS Lett.* 172: 209.
107. Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J. y Gay, N. J. (1982) *EMBO J.* 1: 945.
108. Tagaya, M., Yagami, T. y Fukui, T. (1987) *J. Biol. Chem.* 262: 8257.
109. Sachsenheimer, W. y Schulz, G. E. (1977) *J. Mol. Biol.* 114: 23.
110. Vignais, P. V. y Lunardi, J. (1985) *Ann. Rev. Biochem.* 54: 977.
111. Garin, J., Michel, L., Dupuis, A., Issartel, J. P., Lunardi, J., Hoppe, J. y Vignais, P. V. (1989) *Biochemistry* 28: 1442.
112. Bullough, D. A., Brown, E. L., Saario, J. D. y Allison, W. S. (1989) *J. Biol. Chem.* 263: 14053.
113. Lardy, H. A., Johnson, D. y Murray, W. C. (1958) *Arch. Biochem. Biophys.* 78: 587.
114. Beechey, R. B., Robertson, A. M., Holloway, C. T. y Knight, I. G. (1967) *Biochemistry* 6: 3867.
115. Papa, S., Guerrieri, F., Tuena de Gómez-Puyou, M., Barranco, J. y Gómez-Puyou, A. (1982) *Eur. J. Biochem.* 128: 1.
116. Pugeois, R., Satre, M. y Vignais, P. V. (1979) *Biochemistry* 18: 1408.

117. Ferguson, S. J., Lloyd, W. J., Lyons, M. H. y Radda, G. K. (1975) Eur. J. Biochem. 54: 117.
118. Lardy, H. A., Connelly, J. L. y Johnson, D. (1964) Biochemistry 3: 1961.
119. Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A. y Beigel, M. (1976) Arch. Biochem. Biophys. 73: 326.
120. Adade, A. B., O'Brien, K. L. y Vanderkooi, G. (1987) Biochemistry 26: 7297.
121. Lardy, H. A. (1980) Pharmacol. Ther. 11: 649.
122. Cross, R. L. y Kohlbrenner, W. E. (1978) J. Biol. Chem. 253: 4865.
123. Carlsson, C. y Ernster, L. (1981) Biochim. Biophys. Acta 638: 345.
124. Ebel, R. E. y Lardy, H. A. (1975) J. Biol. Chem. 259: 191.
125. Beltrán, C., Tuena de Gómez-Puyou, M., Darszon, A. y Gómez-Puyou, A. (1986) Eur. J. Biochem. 160: 163.
126. Penefsky, H. S. (1974) J. Biol. Chem. 249: 3579.
127. Holland, P. C., Wayne, C. L. B. y Lardy, H. A. (1974) Biochemistry 13: 4549.
128. Schäfer, G. (1982) FEBS Lett. 139: 271.
129. Komatsu-Takaki, M. (1987) J. Biol. Chem. 262: 8202.
130. Low, H. y Vallin, I. (1963) Biochim. Biophys. Acta 69: 361.
131. Lee, C. P. y Ernster, L. (1967) Methods. Enzymol. 10: 543.
132. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951) J. Biol. Chem. 193: 265.
133. Lee, C. P., Azzone, G. F. y Ernster, L. (1964) Nature 261: 152.
134. Segel, I. H. (1975) Enzyme Kinetics. Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems. John Wiley & Sons, New York.
135. Pullman, M. E., Penefsky, H. S., Datta, A. y Racker, E. (1960) J. Biol. Chem. 235: 3322.
136. Klingenberg, M., Slenczka, W. y Ritt, E. (1959) Biochem. Zeitschrift 332: 47.

6. ADDENDUM. Detección de ADP presente en preparaciones de NADH.

6.1. INTRODUCCIÓN.

Durante la década de los años 70's los estudios sobre la pureza de las preparaciones de NADH (1-4) resultaron de primordial importancia, puesto que algunas investigaciones anteriores (5-7) habían demostrado, de manera indirecta, la presencia de ciertos compuestos que eran capaces de inhibir la actividad catalítica de la enzima LDH. De acuerdo a estos trabajos (1-4), los inhibidores se forman por descomposición del NADH disuelto en amortiguadores de pH alcalino y mantenidos a temperatura ambiente, o bien a partir del NADH en forma sólida que se almacena a temperaturas entre 4 y 10°C en atmósfera húmeda. El trabajo de Miksic & Brown (2), es el primer estudio detallado acerca de las condiciones óptimas para el análisis de los productos formados por ruptura del NADH bajo condiciones ácidas. En este trabajo se establecieron las condiciones para la separación de compuestos estándares, tales como α y β -NADH, α y β -NAD⁺, AMP, ADP, ADP-ribosa, NMN, adenosina, adenina y nicotinamida, combinando las técnicas de HPLC en fase reversa y de intercambio iónico. Un año antes, en 1976, Margolis y col. (1) desarrolla un procedimiento por HPLC en fase reversa para la evaluación rápida de la pureza de algunas preparaciones comerciales de NADH. Aunque el método de Margolis (1) pudo separar eficazmente AMP y ADP-ribosa del NADH, no se detectó la presencia de ADP.

En este apartado se describirán una serie de experimentos que se diseñaron para determinar si el polvo de NADH conservado a una temperatura de 10°C contenía ADP. Este polvo de NADH permaneció guardado durante más de un año en un desecador mal cerrado y presentaba, al momento de su uso, un intenso color amarillo-anaranjado. Incluso las soluciones ligeramente alcalinas (pH 7.4) preparadas con este material eran también de color amarillo-anaranjado. Se presenta un resultado obtenido por HPLC de intercambio iónico, en el cual se aprecia claramente un pico cuyo tiempo de retención coincide con el tiempo de retención del estándar de ADP. De este resultado y de los demás que se muestran, se deduce que la concentración aproximada de ADP en una solución ligeramente alcalina de NADH 5 mM, fue $\approx 50 \mu\text{M}$.

6.2. RESULTADOS.

El hallazgo de que la solución alcalina de NADH, preparada con el polvo almacenado en refrigeración, contenía ADP en concentración alta (del orden μM), se derivó del estudio sobre el efecto de desplazamiento de un AdN unido a F_1 -psm-MgATP ejercido por el NADH. La Tabla 2 muestra que de todos los piridín nucleótidos probados, solamente el NADH causa la salida de 1 mol de AdN previamente enlazado a F_1 . Este dato fue muy interesante, puesto que el NADH es el único piridín nucleótido conocido que experimenta rompimiento de su molécula con la formación subsecuente de diversas sustancias, tales como AMP, ADP-ribosa, entre otras. A diferencia de lo que sucede en las soluciones de NADPH, NADP^+ y NAD^+ , las preparaciones de NADH sometidas a

ciertas condiciones de almacenamiento o por descomposición del polvo que ha adsorbido agua del medio ambiente, dan origen a la formación de varios inhibidores de la LDH que han sido detectados por métodos cromatográficos (8-10) y cinéticos (11). En 1981, Yamauti y col. (12) establecieron la estructura química de dos (I-1 e I-2) de los tres inhibidores de la LDH presentes en soluciones alcalinas de NADH. Los inhibidores según Yamauti (12), son: 1,6-dihidronicotinamida adenín dinucleótido (I-1) y un dímero formado por NADH y el I-1 (I-2). Estas dos moléculas se unen por medio del C-6 del anillo nicotinamida (NC-6) del NADH y el NC-2 del I-1. Ambos inhibidores son formas reducidas del NADH (12). Con base en la observación de que el NADH es el único piridín dinucleótido que induce la salida de 1 mol de AdN (Tabla 2) y con el antecedente de que puede descomponerse se pensó en la posibilidad de que algún producto generado por ruptura del NADH o bien uno o ambos inhibidores de la LDH, fuesen los responsables del efecto. Los resultados de la Tabla 3 sugieren que la potencia de un determinado lote de NADH para inducir el desplazamiento de 1 mol de AdN unido a la enzima, no dependía del tiempo que había permanecido almacenado y sin abrir el frasco sino de la presencia de algún compuesto diferente al NADH. Esto se dedujo en base a la observación de que el polvo de NADH del lote 13F-71101 (ver Tabla 3, experimento c) estaba contenido en un frasco sin abrir, colocado en desecador, por lo que se clasificó como un lote de NADH nuevo. El color del polvo de NADH de todos los lotes, excepto el 17F-71501, fue blanco (Tabla 3). A continuación se procedió a investigar si esta sustancia pudiera

ser uno de los inhibidores descritos por Yamauti y col. (12).

Una particularidad de los inhibidores presentes en ciertos lotes de NADH, es que son capaces de inhibir a la LDH. La Tabla 4 muestra los datos de un experimento en el cual se sometió la solución de NADH a tratamiento con LDH/piruvato. La hipótesis de este experimento fue la siguiente: si el NADH era la molécula responsable del desplazamiento de un AdN, entonces, al ser oxidado a NAD^+ por la LDH, el efecto debería desaparecer (Tabla 2). Sin embargo, el efecto continúa presentándose. Esto sugería que probablemente algún inhibidor fuese el compuesto que indujera la salida de 1 mol de AdN. ¿Era algún inhibidor de la LDH, presente en la solución de NADH, el causante del desplazamiento o el efecto estaba siendo causado por un producto de ruptura del NADH ?. Para contestar esta pregunta, se diseñó un experimento en el que a la solución de NADH se le trató con PMS. Este colorante oxida al NADH y destruye a los inhibidores de la LDH (I-1, I-2 e I-3) (12). Los resultados de la Tabla 5 claramente indican que una sustancia diferente al NADH y a los inhibidores es la responsable del desplazamiento de un AdN. En virtud de que uno de los productos generados por rompimiento de la molécula de NADH es ADP-ribosa, el experimento siguiente consistió en probar el efecto de esta sustancia sobre la salida del AdN. El resultado de este experimento se anota en la tabla 6, del cual, es evidente que esta molécula no es la efectora.

Después de haber descartado al NADH, a los inhibidores de la LDH y al ADP-ribosa como posibles moléculas responsables del efecto, se diseñaron los dos experimentos que a continuación se describen, en un intento por identificar a tal sustancia. El

primer experimento consistió en semicuantificar al ADP por fosforilación oxidativa en una solución de NADH 5 mM. La tabla 7 compara, a diferentes tiempos, las cpm obtenidas al usar una concentración final de ADP de 10 μ M como sustrato para la síntesis de ATP, con las cpm registradas cuando se utilizó al NADH que contiene una indeterminada concentración de la sustancia contaminante. Como un segundo control de este experimento se probó un lote de NADH que no tuvo efecto sobre la salida de AdN. El resultado de este experimento, claramente indica que el compuesto contaminante en la solución de NADH es ADP. Con el fin de comprobar que el ADP, detectado indirectamente por fosforilación oxidativa (Tabla 7), era la sustancia causante del efecto, se hizo una corrida en HPLC del NADH contaminado (Figura 8). Si se comparan los trazos presentados en la Fig. 8, puede apreciarse que el NADH eluye a un tiempo de retención de aproximadamente 4.0 (trazos a y b) mientras que el ADP muestra un tiempo de retención entre 7.5 y 7.7 (trazo c). En el cromatograma correspondiente al NADH contaminado puede observarse un pico cuyo tiempo de retención de 7.7 coincide con el tiempo de retención del ADP estándar (comparar trazos b y c). De estos dos últimos experimentos (Tabla 7 y Fig. 8), se calculó entre 30 y 50 μ M la concentración aproximada de ADP presente en una solución alcalina de NADH 5 mM, preparada con polvo contenido en un frasco almacenado por más de un año a 10°C y en un desecador mal cerrado. Sin embargo, el tiempo transcurrido después de abrir por primera vez el frasco, aparentemente no es el único factor que causa la ruptura del NADH con la correspondiente producción de

ADP y otros componentes (ver Tabla 3). Los resultados presentados en la Tabla 3 son importantes porque indican que en un lote de NADH nuevo (experimento c) también se puede detectar una cantidad apreciable de ADP.

TABLA 2. DESPLAZAMIENTO DE [³H] AdN ENLAZADO A F₁-PSM-MgATP POR PIRIDIN NUCLEÓTIDOS.

	<u>mol/mol F₁</u>
CONTROL	1.6
NADH	0.3
NAD ⁺	1.1
NADPH	1.2
NADP ⁺	1.1

Las psm a una concentración de 8.8 mg/ml se incubaron durante 15 seg a temperatura ambiente en una mezcla de reacción que contenía, en un volumen final de 100 µl, Tris-HCl 20 mM pH 7.4, sacarosa 200 mM, MgCl₂ 50 µM, ATP 50 µM, [³H]ATP como trazador, carboxiatractilósido 50 µM, adenosín-pentafosfato 50 µM, fosfoenolpiruvato 1 mM, KCl 20 mM, rotenona 2 µM y 100 U/ml de piruvato-quinasa. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, la mezcla se filtró por centrifugación a 3,000 rpm durante 1 min en columnas de Sephadex G-50 de 1 ml (columnas de Penefsky), previamente equilibradas con Tris-HCl 20 mM pH 7.4/sacarosa 200 mM. Los eluidos se juntaron y se separaron alícuotas de 100 µl en tubos eppendorf limpios de 0.5 ml. Al tubo control se le adicionó 11 µl de Tris-HCl 20 mM pH 7.4/sacarosa 200 mM, mientras que a los tubos problema se les agregó 11 µl de NAD(P)(H) 50 mM disueltos en Tris-HCl 20 mM pH 7.4. En el caso del NADP⁺ y NAD⁺, el pH se ajustó a 7.4 con Tris sólido después de la solubilización en el buffer. De esta forma, la concentración final del correspondiente piridín nucleótido fue de aproximadamente 5 mM. Después de incubar los controles y los problemas durante 5 min a temperatura ambiente, se filtraron nuevamente por centrifugación en columnas de Penefsky, previamente equilibradas con Tris-HCl 20 mM, pH 7.4/sacarosa 200 mM. A cada uno de los eluidos obtenidos de las diferentes columnas, se les agregó 100 µl de SDS al 1% + 400 µl de H₂O para hacer un volumen final aproximado de 600 µl. De estos 600 µl, 400 µl se colocaron en tritosol y se procedió al conteo en un contador de centelleo tipo Beckman LS-100. La proteína se midió por la técnica de Lowry. Para calcular los moles de AdN unido a la enzima, se consideró que la concentración de F₁ en las psm era de 0.42 nmol/mg de proteína. Todos los piridín nucleótidos se obtuvieron de Sigma.

TABLA 3. DESPLAZAMIENTO DE [³H]ADN UNIDO A F₁-psm-MgATP POR DIFERENTES LOTES DE NADH.

	<u>mol/mol F₁</u>
CONTROL	1.3
NADH ^a	0.25
NADH ^b	0.20
NADH ^c	0.63
NADH ^d	0.30
NADH ^e	0.40
NADH ^f	0.60

El experimento se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo descrito en la Tabla 2, excepto que en esta ocasión se probaron distintos lotes de NADH de la marca Sigma.

- a. lote 17F-71501 (tiempo de almacenaje, aproximadamente 18 meses). Concentración ensayada 2 mM.
- b. lote 17F-71501 (mismo que a.).
- c. lote 13F-71101 (abierto el día del experimento).
- d. lote 13F-71101 (tiempo de almacenaje, incierto).
- e. lote 58C-70501 (tiempo de almacenaje, 6 meses).
- f. lote 33F-72001 (tiempo de almacenaje, 9 meses).

El tiempo de almacenaje se refiere al tiempo aproximado transcurrido después de abierto el frasco. La concentración final ensayada para los lotes b-f fue de 5 mM.

TABLA 4. DESPLAZAMIENTO DE [³H]AdN POR NADH TRATADO CON LDH/PIRUVATO.

	<u>mol/mol F₁</u>
CONTROL ^a	1.2
CONTROL ^b	1.2
NADH ^c	0.18
NADH ^d	0.19

Las condiciones de ensayo fueron las mismas que las descritas en la Tabla 2, excepto que se introdujeron las modificaciones siguientes:

- a. Tris-HCl 20 mM, pH 7.4/sacarosa 200 mM.
- b. Lactato deshidrogenasa (LDH)/lactato 5 mM.
- c. NADH 50 mM disuelto en Tris-HCl 500 mM, pH 7.4; la concentración final ensayada de NADH fue de 5 mM.
- d. NADH 50 mM disuelto en 1 ml de piruvato 50 mM. A esta solución se le adicionó 2 µl de LDH y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. La concentración final ensayada de NADH fue de 5 mM; la concentración final de piruvato transformado en lactato también fue de 5 mM.

TABLA 5. DESPLAZAMIENTO DE [³H]AdN POR NADH TRATADO CON PMS.

	<u>mol/mol F₁</u>
CONTROL ^a	1.5
CONTROL ^b	1.5
NADH ^c	0.27
NADH ^d	0.25

Se siguió el mismo protocolo descrito en la Tabla 2, excepto que ahora las modificaciones del experimento fueron las siguientes:

- Tris-HCl 20 mM, pH 7.4/sacarosa 200 mM.
- PMS, 200 µM final.
- NADH 50 mM disuelto en Tris-HCl 20 mM, pH 7.4; la concentración final ensayada de NADH fue de 5 mM.
- NADH 50 mM tratado con PMS 2 mM durante un tiempo de incubación de 20 min. La concentración final de PMS ensayada fue de 200 µM.

TABLA 6. DESPLAZAMIENTO DE [³H]AdN POR ADP-Ribosa.

	<u>mol/mol F₁</u>
CONTROL	1.1
ADP-Ribosa	0.8

Las condiciones de ensayo fueron idénticas a las descritas en el experimento de la Tabla 2, excepto que ahora las concentraciones de MgCl₂ y ATP usadas fueron de 100 µM. La concentración final de ADP-Ribosa probada fue de 200 µM. Al tubo control se le agregó Tris-HCl 20 mM, pH 7.4/sacarosa 200 mM.

TABLA 7. DETECCIÓN DEL ADP PRESENTE EN NADH POR FOSFORILACIÓN OXIDATIVA.

<u>TIEMPO (min)</u>	<u>CONTROL^a</u>	<u>cpm</u>	
		<u>NADH^b</u>	<u>NADH^c</u>
5	2572	4722	392
10	5637	10483	784
15	7352	16796	1135

Se incubaron 100 $\mu\text{g/ml}$ de psm-MgATP a 30°C durante los tiempos especificados, en una mezcla de reacción que contenía Tris-HCl 20 mM, pH 7.4, sacarosa 200 mM, MgCl_2 10 mM, H_3PO_4 -Tris 10 mM, pH 7.4, [^{32}P] como trazador, rotenona 2 μM , glucosa 20 mM, succinato 10 mM y 5 U/ml de hexoquinasa (mezcla A).

- a. Mezcla A + ADP 10 μM .
- b. Mezcla A + NADH contaminado, 5 mM.
- c. Mezcla A + NADH exento de la contaminación, 5 mM.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

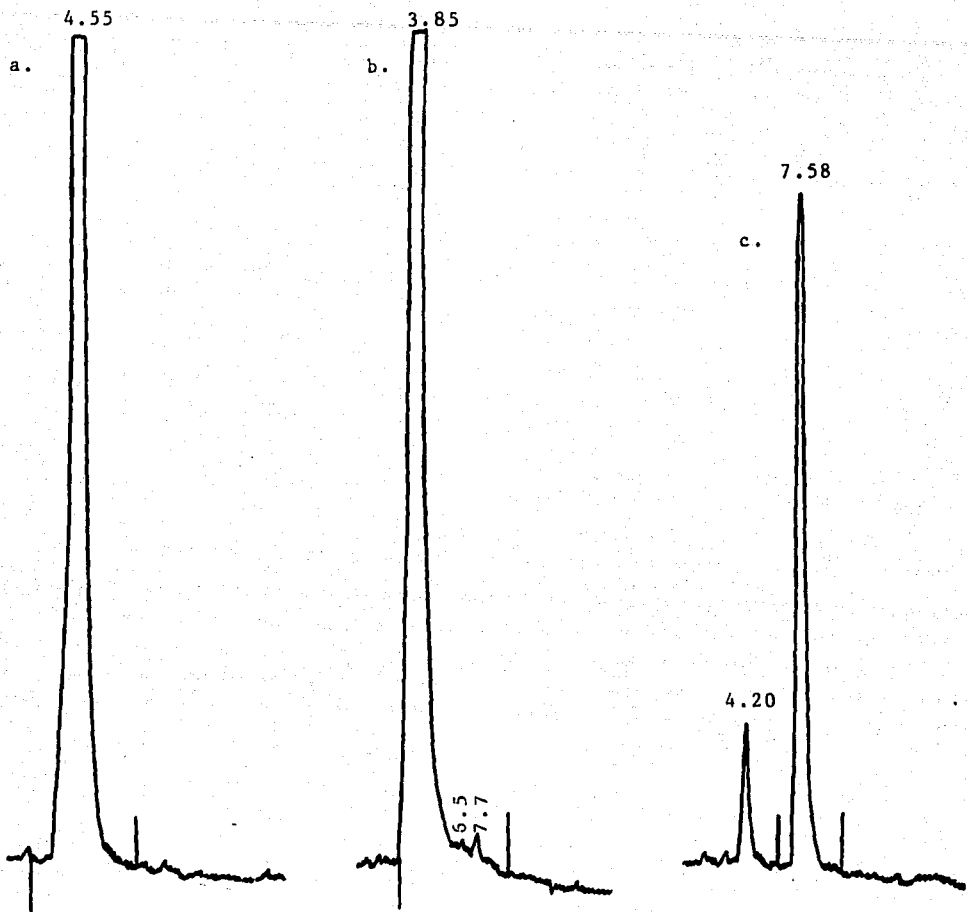


FIGURA 8. SEPARACION DE COMPUESTOS POR HPLC. La separación de las sustancias se hizo en una columna radial (Waters) PAK SAX P 3082 AOI que fue eluída isocráticamente con 0.25 M KH_2PO_4 y 0.5 M KCl, pH 5.0.

- a. 1 nmol del NADH que no tuvo efecto sobre la salida de AdN.
- b. 1 nmol del NADH que causó la salida de 1 mol de AdN. El pico con un tiempo de retención de 7.7 corresponde al ADP contaminante.
- c. 0.3 nmol de una solución de ADP estándar.

Los números sobre los picos indican los tiempos de retención en la columna para cada uno de los componentes separados.

6.3. CONCLUSIÓN.

La detección de una concentración tan alta de ADP en una solución de NADH 5 mM es importante debido a que, además de ser la primera ocasión que se identifica ADP como producto del rompimiento de la molécula de NADH, en lo subsiguiente se deberá tener extremo cuidado con la utilización del NADH en concentraciones mM como sustrato respiratorio oxidable en experimentos de fosforilación oxidativa. La interpretación de los resultados de tales experimentos podría ser incorrecta si en la solución de NADH empleada se ha producido una concentración elevada de ADP. Es recomendable, por lo tanto, asegurarse del grado de pureza de los lotes de NADH antes de utilizarlos.

6.4. REFERENCIAS.

1. Margolis, S. A., Howell, B. F. y Schäffer, R. (1976) Clin. Chem. 22: 1322.
2. Miksic, J. R. y Brown, P. R. (1977) J. Chromatogr. 142: 641.
3. Wenz, I., Loesche, W., Till, U. (1976) J. Chromatogr. 120: 187.
4. Gerhardt, W., Kofoed, B., Westlund, L. y Pavlu, B. (1974) Scand. J. Clin. Lab. Invest. 33 suppl. 39: 3.
5. Fawcett, C. P., Ciotti, M. M. y Kaplan, N. O. (1961) Biochim. Biophys. Acta 54: 210.
6. Strandjord, P. E. y Clayson, K. J. (1966) J. Lab. Clin. Med. 67: 144.
7. Holman, M. J., Willis, J. E. y Siegel, J. M. (1966) Clin. Chem. 12: 543.
8. McComb, R. B. y Gay, R. J. (1968) Clin. Chem. 14: 754.

9. Loshon, C. A., McComb, R. B., Bond, L. W., Bowers, G. N., Coleman, W. H. y Gwynn, R. H. (1977) Clin. Chem. 23: 1576.
10. Margolis, S. A., Howell, B. F. y Schaffer, R. (1977) Clin. Chem. 23: 1581.
11. Howell, B. F., Margolis, S. y Schaffer, R. (1976) Clin. Chem. 22: 1648.
12. Yamauti, J. I., Yoshimura, S., Takagahara, I., Fujii, K., Yamashita, J. y Horio, T. (1981) J. Biochem. 90: 941.