

03081

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE POSTGRADO

DEL C. C. H.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

*LA ASIMETRÍA FUNCIONAL DE LAS SUBUNIDADES "  $\beta$  "*

*DEL COMPLEJO NATIVO F<sub>1</sub>I SOLUBLE*

Tesis que presenta:

Ma. del Carmen Beltrán Núñez

M. C., Bioquímica.

para obtener el grado de:

DOCTOR EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

ESPECIALIDAD DE BIOQUÍMICA

TESIS CON  
FALSA FE CUBRIDA

México, D. F.

1989



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## A B R E V I A T U R A S.

ADP	Adenosina difosfato.
ATP	Adenosina trifosfato.
ATPasa	
H <sup>+</sup> -ATPasa ó	Adenosina-5'-trifosfatasa (E.C.3.6.1.3).
ATPsintasa ó	
F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> ó	
Complejo V	Complejo ATP sintasa completo.
Bicina	N, N-bis[2-hidroxietil]-glicina.
β.PI	Dímero obtenido por entrecruzamiento del complejo F <sub>1</sub> I por EEDQ.
ε.PI	Dímero obtenido por entrecruzamiento del complejo ECF <sub>1</sub> por EDAC.
CF <sub>1</sub>	ATPasa soluble de cloroplasto.
DCCD	Diciclohexilcarbodiimida.
DTT	Ditiotreitol.
ECF <sub>1</sub>	ATPasa soluble de Escherichia coli.
ECF <sub>1</sub> F <sub>0</sub>	Complejo ATP sintasa de Escherichia coli.
EDAC	1-etil-3-[3-(dimetilamino)propil]-carbodiimida.
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético.
EEDQ	N(etoxicarbonil)-2-etoxi-1,2-sihidroquinolina.
F <sub>0</sub>	Sector membranal del complejo ATP sintasa.
F <sub>1</sub> ó	
F <sub>1</sub> -ATPasa	ATPasa mitocondrial soluble.
F <sub>1</sub> I	ATPasa mitocondrial soluble que se obtiene con la Proteína Inhibidora endógena.
F <sub>1</sub> I.EEDQ-N-Nbf	Complejo F <sub>1</sub> I modificado con Nbf en Lisβ-162 después de entrecruzar con EEDQ.
FSBA	5'-p-fluorosulfonilbenzoiladenosina.
FSBI	5'-p-fluorosulfonilbenzoilinosina.
HEPES	Acido N-2-Hidroxietil piperazina-N'-2-etano sulfónico
kDa	kilo Daltones.
MABI	Metil-4-azidobenzoimidato.
MES	Acido 2(N-morfolino) etano sulfónico.
2-N <sub>9</sub> ADP	2-azido Adenosina difosfato.

B-N <sub>9</sub> ADP	B-azido Adenosina difosfato.
NADH	$\beta$ -nicotinamida adenina dinucleótido.
Nbf	7-Cloro-4-Nitrobenzofurazano.
Nbf-N-F <sub>1</sub>	F <sub>1</sub> modificada con Nbf en Lis- $\beta$ 162.
Nbf-O-F <sub>1</sub>	F <sub>1</sub> modificada con Nbf en Tir- $\beta$ 311.
NC	Nitrocelulosa.
NEM	N-etilmaleimida.
NTF	Nucleótido trifosfato.
OAc	Acetato.
OSCP	Proteína que confiere sensibilidad a oligomicina.
PA-SDS	Poliacrilamida-Dodecilsulfato de sodio.
PBS	Amortiguador salino de fosfatos.
Pi	ion fosfato.
PI	Proteína inhibidora de la F <sub>1</sub> .ATPasa mitocondrial.
P.M.	Peso molecular.
psm	Partículas submitocondriales.
psm-Klein	Partículas submitocondriales obtenidas por el método descrito por Klein.
psm-MgATP	Partículas submitocondriales obtenidas por sonicación de mitocondrias en presencia de Mg <sup>+</sup> y ATP.
SDS	Dodecilsulfato de sodio.
TEA	Trietanolamina.
TDAB	Bromuro de tetradeciltrimetil amonio.
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano.

I N D I C E G E N E R A L

I N T R O D U C C I O N----- 1

I.- FOSFORILACION OXIDATIVA----- 1

    1.- MECANISMO QUIMIOSMOTICO----- 1

    2.-MECANISMO CONFORMACIONAL----- 4

II.- H<sup>+</sup>-ATPasa----- 4

III.- La H<sup>+</sup>-ATPasa Mitocondrial----- 7

    1.-CARACTERISTICAS GENERALES----- 7

    2.- EL COMPLEJO NATIVO F<sub>1</sub>I----- 10

    3.- FUNCION DE LAS SUBUNIDADES DEL COMPLEJO F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>----- 11

    4.- ASIMETRIA DE LOS SITIOS CATALITICOS----- 19

        A) Asimetría estructural:----- 19

        B) Asimetría funcional:----- 20

IV.-MARCADORES QUIMICOS DEL COMPLEJO F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub>----- 22

    LA DICICLOHEXIL CARBODIIMIDA (DCCD)----- 25

    EL 7-CLORO-4-NITROBENZOFURAZANO (Nbf)----- 27

V.- ENTRECruzamiento QUIMICO----- 30

    N-(ETOXICARBONIL)-2-ETOXI-1,2-DIHIROQUINOLINA (EEDQ)-- 32

A N T E C E D E N T E S D I R E C T O S----- 34

O B J E T I V O S----- 35

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S----- 36

MATERIAL BIOLÓGICO----- 36

REACTIVOS----- 36

DETERMINACION DE PROTEINA----- 36

DETERMINACION DE ACTIVIDAD HIDROLITICA----- 36

PREPARACION DE MITOCONDRIAS DE CORAZON DE RES----- 37

PREPARACION DE PARTICULAS SUBMITOCONDRIALES MgATP (psm-MgATP)- 37

PURIFICACION DEL COMPLEJO NATIVO " F<sub>1</sub>I"----- 38

ACTIVACION DEL COMPLEJO F<sub>1</sub>I----- 39

OBTENCION DE F<sub>1</sub> A PARTIR DE F<sub>1</sub>I----- 40

PREPARACION DE PARTICULAS SUBMITOCONDRIALES KLEIN (psm-Klein)- 40

PURIFICACION DE LA H<sup>+</sup>-ATPasa SOLUBLE (F<sub>1</sub>) DE MITOCONDRIAS DE  
CORAZON DE RES----- 41

PURIFICACION DE PROTEINA INHIBIDORA ( PI ) DE LA H<sup>+</sup>-ATPasa DE  
MITOCONDRIAS DE CORAZON DE RES----- 43

RECONSTITUCION DE F <sub>1</sub> CON PROTEINA INHIBIDORA (PI) EXOGENA-----	45
COLUMNA DE PENEFSKY-----	46
INHIBICION DE F <sub>1</sub> Y F <sub>1</sub> I POR DICICLOHEXILCARBODIIMIDA (DCCD) Y FIJACION DE [ <sup>14</sup> C]DCCD-----	46
ENTRECRUZAMIENTO CON N-(ETOXI-CARBONIL)-2-ETOXIDIHIDRO- QUINOLINA (EEDQ)-----	47
MARCAJE DE F <sub>1</sub> I O F <sub>1</sub> CON 7-CLORO-4-NITROBENZOFURAZANO (Nbf)---	47
ELECTROFORESIS EN GEL-----	48
METODO PARA LA EXTRACCION DE PROTEINAS RADIOACTIVAS DE GELES DESNATURALIZANTES-----	48
METODO PARA LA DETECCION DE LA FLUORESCENCIA DE PROTEINAS SEPARADAS GELES-----	49
INMUNOTRANSFERENCIA DE PROTEINAS-----	49
TRANSFERENCIA DE PROTEINAS A PAPEL DE NITROCELULOSA (NC)-----	50
OBTENCION DE ANTICUERPOS ANTI-PI Y ANTI-β-----	51
REVELADO DE PI O DE β DE F <sub>1</sub> -ATPase CON SUEROS ANTI-PI O ANTI-β-----	51
R E S U L T A D O S-----	52
I.- CARACTERISTICAS CINETICAS DEL COMPLEJO F <sub>1</sub> I-----	52
II.-FORMACION DEL DIMERO "β.PI" POR ENTRECRUZAMIENTO CON EEDQ- 55	
A) REACTIVIDAD DEL EEDQ CON LA F <sub>1</sub> Y CON LA F <sub>1</sub> I-----	55
B) IDENTIFICACION DEL DIMERO β.PI FORMADO POR ENTRECRUZAMIENTO DEL COMPLEJO F <sub>1</sub> I CON EEDQ-----	63
1.- POR ANTICUERPOS ANTI-PI Y ANTI-β-----	63
2.- POR AUSENCIA DE MARCAJE CON [ <sup>14</sup> C]-NEM-----	65
III. REACTIVIDAD DEL COMPLEJO F <sub>1</sub> I NATIVO AL DCCD-----	65
IV.- REACTIVIDAD DEL COMPLEJO F <sub>1</sub> I NATIVO AL Nbf-----	71
1.- CARACTERISTICAS DE LA FIJACION DEL Nbf AL COMPLEJO NATIVO F <sub>1</sub> I EN COMPARACION CON EL COMPLEJO F <sub>1</sub> -----	71
A) CURSO ESPECTROFOTOMETRICO DE FIJACION DEL Nbf A-- F <sub>1</sub> Y F <sub>1</sub> I-----	80
2.- CARACTERISTICAS ESPECTRALES DE F <sub>1</sub> Y F <sub>1</sub> I MODIFICADOS CON Nbf EN TIROSINA-----	84
3.- CARACTERISTICAS DE LA ACTIVACION DE LOS COMPLEJOS Nbf.F <sub>1</sub> y Nbf.F <sub>1</sub> I-----	88
4.- TRANSFERENCIA DEL Nbf DE TIR-β311 A LIS-β162 EN F <sub>1</sub>	

Y F <sub>1</sub> I-----	95
AD.- EFECTO DE NUCLEOTIDOS EN LA VELOCIDAD DE ENTRADA DEL N <sub>bf</sub> A TIR-β311 Y EN LA TRANSFERENCIA A LIS-β162 EN F <sub>1</sub> Y F <sub>1</sub> I-----	99
5.- LA SUBUNIDAD β QUE INTERACTUA CON LA P <sub>I</sub> EN EL COMPLEJO NATIVO F <sub>1</sub> I, PERMITE LA FIJACION DEL N <sub>bf</sub> EN Lis.-----	103
6.- EL COMPLEJO F <sub>1</sub> I MODIFICADO CON DCCD PERMITE LA FIJACION DEL N <sub>bf</sub> EN Tir Y LA TRANSFERENCIA A Lis----	108
D I S C U S I O N-----	111
R E F E R E N C I A S-----	125

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

pag.

Fig. 1.- Esquema de la Topología de la Respiración Mitochondrial y la Fosforilación Oxidativa----- 3

Fig. 2.- Micrografía Electrónica de la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa de Escherichia coli reconstituida en membranas----- 6

Fig. 3.- Esquema de la Subunidad β de la F<sub>1</sub>-ATPasa Mitochondrial, mostrando la localización de residuos de aminoácidos de importancia en este trabajo-----13

Fig. 4.- Imagenes promedio de ECF<sub>1</sub> no teñidas mostrando un arreglo hexagonal-----21

Fig. 5.- Estructura química de EEDQ, DCCD y Nbf-----26

Fig. 6.- Activación del complejo nativo F<sub>1</sub>I en presencia de diferentes Amortiguadores-----53

Fig. 7.- Liberación de la PI del complejo F<sub>1</sub>I soluble durante la activación-----54

Fig. 8.- Inhibición de la actividad hidrolítica de F<sub>1</sub> y F<sub>1</sub>I por diferentes concentraciones de EEDQ-----56

Fig. 9.- Curso temporal de la inhibición de F<sub>1</sub>I por EEDQ-----57

Fig. 10.- Efecto de la presencia de Mg-ATP 2 mM en la inhibición del complejo F<sub>1</sub>I por EEDQ----- 59

Fig. 11.- Patrón electroforético de los complejos F<sub>1</sub>I y F<sub>1</sub>I-entrecruzado con EEDQ----- 60

Fig. 12.- Curso temporal de la desaparición de la PI y aparición de la banda "X" durante el entrecruzamiento con EEDQ----- 62

Fig. 13.- Inmunodetección de las subunidades β y PI en la banda de 66 kDa obtenidos por entrecruzamiento de la F<sub>1</sub>I----- 64

Fig. 14.- Gel de PA-SDS del complejo F<sub>1</sub>I entrecruzado y marcado con [<sup>14</sup>C]NEM----- 66

Fig. 15.- Efecto del DCCD en la actividad ATPasa de F<sub>1</sub>I y union de [<sup>14</sup>C]DCCD a F<sub>1</sub>I----- 67

Fig. 16.- Análisis electroforético de la F<sub>1</sub>I marcada con [<sup>14</sup>C]DCCD y entrecruzada----- 69

Fig. 17.- Análisis electroforético de la F<sub>1</sub> marcada con [<sup>14</sup>C]DCCD y reconstituida con PI exógena----- 72

Fig. 18.- Inhibición de la actividad hidrolítica de F<sub>1</sub> y F<sub>1</sub>I por diferentes concentraciones de Nbf----- 74

Fig. 19.-	Curso temporal de la inhibición de la actividad hidrolítica de $F_{iI}$ por diferentes concentraciones de $Nbf$ -----	75
Fig. 20.-	Curso temporal de la inhibición de la actividad hidrolítica de la $F_i$ y $F_{iI}$ por $Nbf$ 100 $\mu M$ , y reversibilidad de la actividad por $DTT$ -----	77
Fig. 21.-	Reversibilidad de la actividad hidrolítica de los complejos $Nbf.F_i$ Y $Nbf.F_{iI}$ , por diferentes concentraciones de $DTT$ sin preincubar-----	79
Fig. 22.-	Cinética de la reversibilidad de la actividad hidrolítica por $DTT$ 0.1 mM a distintos tiempos de preincubación-----	81
Fig. 23.-	Incremento de la absorbancia a 385 nm y de la fluorescencia, concomitante a la entrada del $Nbf$ a la enzima-----	82
Fig. 24.-	Cambios espectrales durante la interacción del $Nbf$ con la $F_{iI}$ -----	85
Fig. 25.-	Espectros del complejo $Nbf.F_{iI}$ obtenido al restar la unión glutation- $Nbf$ -----	87
Fig. 26.-	Fluorescencia de los complejos $Nbf.F_i$ y $Nbf.F_{iI}$ en condiciones basales y después de ser activados--	89
Fig. 27.-	Espectros de absorbancia de los complejos $Nbf.F_i$ y $Nbf.F_{iI}$ basales y sometidos a condiciones de activación-----	91
Fig. 28.-	Curso temporal de la entrada del $Nbf$ a $F_i$ y $F_{iI}$ y activación de los complejos $Nbf.F_i$ y $Nbf.F_{iI}$ seguidas por espectros de fluorescencia---	92
Fig. 29.-	Espectro de absorbancia del complejo $Nbf-N-F_{iI}$ -----	96
Fig. 30.-	Curso temporal de la transferencia del $Nbf$ de la $Tir-\beta 311$ a la $Lis-\beta 162$ en los complejos $Nbf.F_i$ y $Nbf.F_{iI}$ -----	97
Fig. 31.-	Curso temporal de la transferencia de $Tir-\beta 311$ A $Lis-\beta 162$ en $Nbf.F_i$ y $Nbf.F_{iI}$ seguido por absorbancia a 475 nm-----	100
Fig. 32.-	Entrada del $Nbf$ a $Tir-\beta 311$ y transferencia a $Lis-\beta 162$ en $F_i$ y $F_{iI}$ en ausencia de nucleótidos---	102
Fig. 33.-	Patron electroforético de los complejos $Nbf-N-F_i$	

	y Nbf-N-Fil-----	104
Fig. 34.-	Patrón electroforético del complejo Nbf-N-Fil entrecruzado-----	105
Fig. 35.-	Gel de PA-SDS del complejo Nbf.Fil-entrecruzado incubado a pH alcalino para inducir la transferencia a Lis. (COMPLEJO Nbf.Fil.EEDQ-pH 9.0)-----	107
Fig. 36.-	Distribución de fluorescencia en el complejo Fil modificado con DCCD y marcado con Nbf (Nbf-N-Fil.DCCD)-----	109
Fig. 37.-	Esquema que ilustra nuestras ideas sobre la interacción de Nbf, DCCD y PI con las distintas subunidades $\beta$ del complejo Fil.-----	124
Tabla I.	Salida de la PI del complejo Nbf.Fil en condiciones de activación-----	94

## INTRODUCCION.

### I.-FOSFORILACION OXIDATIVA.

#### 1.- MECANISMO QUIMIOSMOTICO.

La fosforilación oxidativa y la fotofosforilación, a través de sintetizar la mayor parte del ATP celular, son la fuente principal de energía en animales, plantas, hongos y bacterias. Este proceso está asociado a las estructuras membranales: A la membrana interna en mitocondrias, a la de tilacoides en cloroplastos, o la plasmática si se trata de bacterias.

El sistema de la fosforilación oxidativa mitocondrial está constituido por 5 complejos enzimáticos lipo-protéicos: la NADH - ubiquinona - oxidoreductasa ó complejo I; la Succinato - ubiquinona - oxidoreductasa ó complejo II; la Ubiquinol - ferricitocromo-c - oxidoreductasa ó complejo III; la ferricitocromo c - oxidoreductasa ó complejo IV y la ATP-sintasa ó complejo V. En mitocondrias de corazón de bovino, este sistema constituye el 50 % de las proteínas asociadas a la membrana interna, el resto incluye, entre otras, varias proteínas transportadoras y enzimas que actúan como donadoras de electrones de la cadena respiratoria (ver rev. Hatefi, 1985).

En mitocondrias intactas y en bacterias, el transporte basal de electrones se acelera cuando ocurre la formación de ATP a partir de ADP y Pi. Este acoplamiento entre la oxidación y la fosforilación, se ha explicado mediante el mecanismo llamado quimiosmótico, propuesto por Peter Mitchell en 1961. El

7

acoplamiento depende de las propiedades intrínsecas de la membrana que contiene la cadena transportadora de electrones y la ATP-sintasa.

El *Mecanismo Quimiosmótico* (ver fig. 1) propone que la energía derivada del transporte de electrones, es utilizada para translocar protones a través de la membrana. Esta translocación que va de la matriz mitocondrial hacia el citosol, origina una diferencia de potencial electroquímico transmembranal ( $\Delta\mu H^+$ ) que tiene dos componentes; una diferencia de pH ( $\Delta pH$ ) y una diferencia de potencial eléctrico ó de carga ( $\Delta\psi$ ) entre los compartimientos interior y exterior separados por una membrana impermeable a protones ( $H^+$ ). La energía almacenada al generarse el gradiente de protones, se utiliza para la formación del ATP, cuando los protones regresan del citosol hacia la matriz mitocondrial a través de un canal de  $H^+$  presente en la ATP-sintasa.

De acuerdo con Mitchell, la interconversión del potencial transmembranal ( $\Delta\mu H^+$ ) en la energía química del ATP, es reversible. Así el proceso de síntesis de ATP consume  $\Delta\mu H^+$ , en tanto que la hidrólisis regenera al  $\Delta\mu H^+$ .

Parte de la energía del gradiente se usa para impulsar la translocación de otras moléculas a través de la membrana, mediante un mecanismo de transporte acoplado. De esta manera el ADP y el Pi son llevados hacia el interior de la matriz mitocondrial para la síntesis del ATP.

La estequiometría de los iones fosfato incorporados en el ATP, por par de electrones que viaja a través de la cadena transportadora, se conoce como relación  $P/2e^-$ . Equivalente a la relación  $P/O$ , debido a que cada par de electrones reduce un átomo

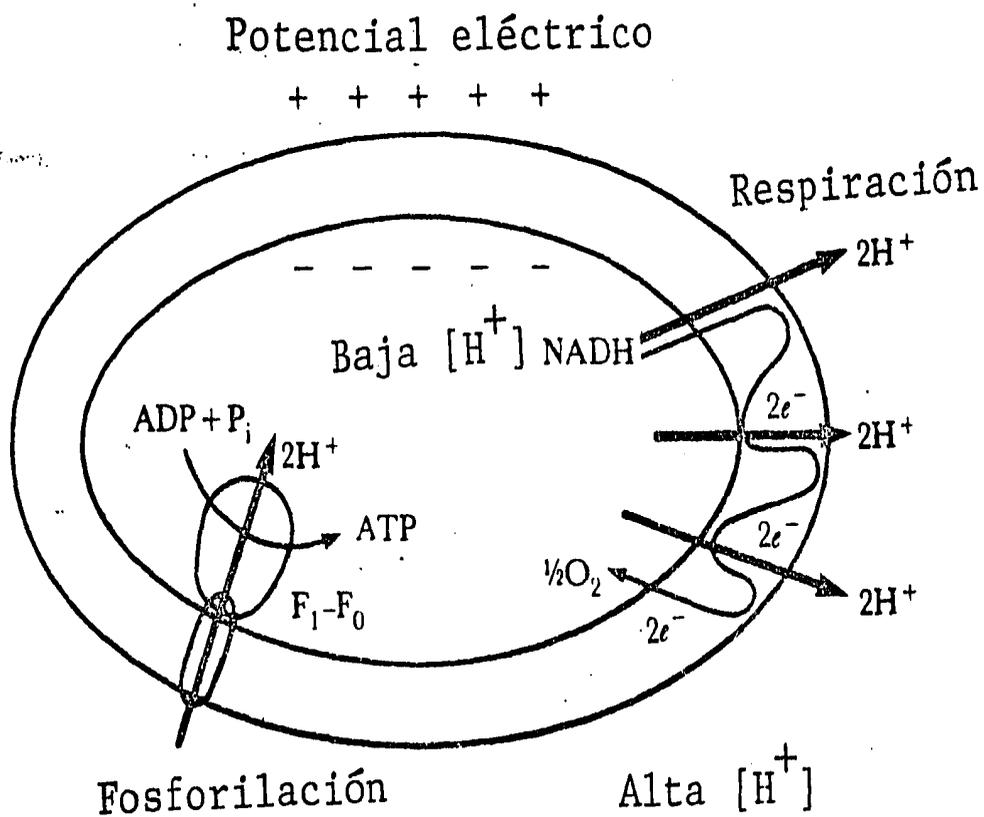


Fig. 1.- Esquema de la Topología de la Respiración Mitochondrial y la Fosforilación Oxidativa. F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> es el complejo enzimático responsable de la síntesis de ATP.

de oxígeno. En mitocondrias la relación  $P/O$  es de 3 para el NADH y substratos que transfieren electrones al NADH. La relación  $P/O$  es de 2 para substratos que transfieren electrones a flavoproteínas (ver rev. Mitchell, 1976).

## 2.-MECANISMO CONFORMACIONAL.

Aún no se conoce el mecanismo molecular por el cual funcionan las ATP-sintasas, pero se han propuesto modelos como el de *Catálisis Rotacional* (Boyer, 1983; Cox y col., 1984, 1986; Gresser y col., 1982) y el *Mecanismo de Unión y Cambio* (Gresser y col., 1982). El modelo más aceptado hasta ahora es este último: *MECANISMO DE UNION Y CAMBIO* ó "*Binding Change*". Las características principales de este modelo son: 1) La síntesis de ATP ocurre espontáneamente en los sitios catalíticos, y el paso que requiere energía es un cambio conformacional. Este cambio es necesario para convertir el sitio catalítico de alta afinidad por ATP en uno de baja afinidad (Boyer y col., 1963); 2) La unión del substrato y la liberación del producto están asociados al proceso de energización (Rosing y col., 1977); y 3) La unión del substrato y la liberación del producto ocurren simultáneamente en subunidades catalíticas separadas pero interactuantes (Kalayar y col., 1977).

## II.- $H^+$ -ATPasas.

Las  $H^+$ -ATPasas son complejos enzimáticos asociados a las membranas transductoras de energía de mitocondrias, bacterias y

7

cloroplastos. Su función puede separarse en tres partes: a) Translocación, que permite a los protones generados en la cadena oxidativa cruzar la bicapa lipídica; b) Acoplante, en la que dirige los protones de tal manera que la energía almacenada en su gradiente electroquímico se utiliza en la síntesis del ATP y c) Catálisis, durante la que se realiza la síntesis de ATP, partiendo de ADP y de Pi.

La enzima puede llevar a cabo la hidrólisis de ATP, que es la reversa de la reacción del proceso fosforilante. Se realiza en ausencia de sustratos oxidables en el caso de mitocondrias y de bacterias aeróbicas, o en la oscuridad si se trata de bacterias fotosintéticas y cloroplastos. Esta hidrólisis puede inducir la formación de un gradiente electroquímico de protones, el cual a su vez es capaz de revertir el flujo de electrones, regenerando el  $\Delta\mu\text{H}^+$ , pudiendo ser utilizado para el transporte de metabolitos (veanse rev. Senior, 1988; Schwezmann y Pedersen 1986; Wang, 1988; Ysern y col 1988).

Las  $\text{H}^+$ -ATP-sintasas (fig. 2) están constituidas por una porción  $F_1$  que, observada por medio de la microscopía electrónica, se ve como un botón de 9 nm de diametro que sobresale de la membrana interna de la mitocondria o de la membrana plasmática de las bacterias. Este sector es hidrofílico y posee el sitio catalítico para la síntesis e hidrólisis del ATP. La  $F_1$  está unida al sector membranal ( $F_0$ ) mediante un cuello de aproximadamente 4.5 nm de largo por 3.5 nm de ancho. El sector  $F_0$ , que parece tener una forma globular, con un diametro de 6-8 nm de ancho (Gogol y col., 1988; Tsuprun y col., 1989; Gogol y col., 1988) es la porción hidrofóbica de la enzima a través de la cual se

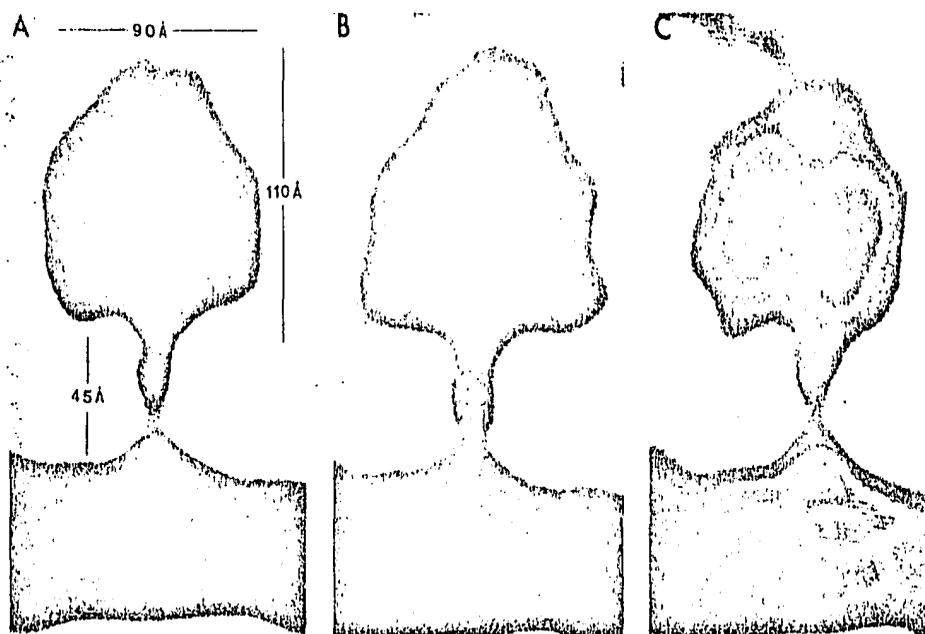


Fig. 2.- Micrografía Electrónica de la  $F_1F_0$ -ATPasa de *Escherichia coli* reconstituida en membranas. La  $ECF_1F_0$  se congeló rápidamente y se mantuvo en una capa delgada de hielo para verse al microscopio electrónico sin teñir y sin ningún tratamiento químico. (A) Vista lateral promedio de 30 moléculas; (B) y (C) Vista lateral promedio de 10 moléculas. (C) Muestra un dominio de diferente densidad electrónica en el interior de la  $ECF_1$  (Gagol, E.P. y col. 1987).

conducen los protones para llegar a la  $F_1$  (Senior, 1973, 1979, 1983). El complejo ATP-sintasa está formado de por lo menos 13 subunidades diferentes (Walker y col., 1987).

La  $F_1$  mitocondrial (Knowles y col., 1972; Tuena y Gómez-Puyou, 1977; Feinstein y Moudrianakis 1984) semejante a la de *E. coli* (Foster y Fillingame, 1979) y a la de Cloroplasto (Lien y Racker, 1971; Binder y col., 1978) pueden aislarse de la membrana por diferentes métodos. La  $F_1$  aislada solo cataliza la hidrólisis de ATP, y puede unirse nuevamente a la membrana, recuperando la función de síntesis de ATP. El hecho de poder purificar la  $F_1$  y reconstituirla en membranas carentes de ella pero que mantienen la porción  $F_0$ , ha sido de gran utilidad en el estudio de la estructura y el mecanismo de la enzima.

### III.- La $H^+$ -ATPasa Mitocondrial.

#### 1.-CARACTERISTICAS GENERALES.

La  $F_1$ -ATPasa mitocondrial tiene un peso molecular de 371 kDa y consta de 5 subunidades denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  con estequiometría de  $\alpha_2\beta_2\gamma\delta\epsilon$ , y pesos moleculares de 54, 50, 33, 17.5 y 5.7 kDa, respectivamente (Penefsky, 1979). Además de estas 5 diferentes subunidades, la  $F_1$  posee un polipéptido con P.M. de 9578 Da denominado Proteína Inhibidora (PI), el cual está involucrado en la regulación de la actividad catalítica de la enzima (ver rev. de Schwerzmann y Pedersen, 1986).

La mayor parte de las subunidades de la  $F_1F_0$ -ATPasa mitocondrial, están codificadas por genes nucleares. Esto es así

para todas las subunidades de la  $F_1$  (Nelson y Schatz, 1979). Otras como la  $\alpha$  y la  $c$  de  $F_0$ , son codificadas por el ADN mitocondrial (Neupert y Schatz, 1981; Fearnley y Walker, 1986). Las subunidades codificadas por los genes nucleares se sintetizan en forma de precursores en los ribosomas citoplásmicos (Hallermayer y col., 1977; Suissa y Schatz, 1982). Las proteínas precursoras poseen una secuencia adicional en el extremo amino terminal, que corresponde al péptido señal, que dirige la proteína hacia el interior del organelo (Schatz y Butow, 1983), que en el caso de la subunidad  $\alpha$  es de 43 aminoácidos (Breen y Garnet, 1989). Este péptido señal se remueve durante el procesamiento hasta la proteína madura. Para que las proteínas precursoras se transporten al interior de la mitocondria, se requiere que estas estén en una conformación extendida diferente a la conformación final (Chen y Douglas, 1987) además se necesita un receptor localizado en la superficie de la matriz mitocondrial (Hennig y col., 1983; Swizinski y col., 1983). Se ha descrito una peptidasa hidrosoluble que cataliza el procesamiento en la matriz mitocondrial (Böhni y col., 1983). También se requiere de energía para el transporte; esta la proporciona el componente  $\Delta\psi$  del potencial electroquímico de la membrana (Schatz, 1988).

Se desconoce aún lo que determina la estequiometría exacta de las subunidades de la  $F_1F_0$ , pero se ha sugerido que el mecanismo que controla la biosíntesis y el ensamble esta a nivel de la traducción. Experimentos en *E. coli* han mostrado que la frecuencia con que se usan los codones para las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $c$ , es mayor que la encontrada para  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $a$ . Esto implica que las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $c$ , que tienen estequiometría de 3, 3 y 10, se

traducen más frecuentemente (Grantam y col., 1981; Ikemura, 1981a, 1981b).

Se sabe que la secuencia de aminoácidos de  $F_1$  de diferentes orígenes muestra gran homología, independientemente de la fuente de que provengan.

La  $F_1$ -ATPasa soluble y purificada solo es capaz de realizar ciclos de hidrólisis de ATP, aunque se ha logrado sintetizar ATP unido a la enzima en presencia de concentraciones altas de  $P_i$  y dimetilsulfóxido (Sakamoto y Tonomura, 1983; Yoshida, 1983; Gómez-Puyou y col., 1986). El oligómero  $\alpha_3\beta_3\gamma$ , reconstituido a partir de las subunidades purificadas, tiene el tamaño (90-100 Å), y una actividad específica similar a la enzima nativa. Esto indica que son estas las subunidades esenciales para la hidrólisis de ATP (Yoshida y col., 1975; Futai, 1977; Kagawa y Nukiwa 1981).

Se sabe por experimentos directos de unión de nucleótidos, que la  $F_1$  posee 6 sitios para nucleótidos (Cross y Nalin, 1982; Weber y col., 1985; ver rev. Vignais y Satre, 1984). De estos, 3 recambian rápidamente con los nucleótidos del medio, y otros 3 recambian lentamente y son no catalíticos (Cross y Nalin, 1982). Los de recambio rápido presentan cooperatividad negativa (Cross y Nalin, 1982; Tiedge y col., 1982), y parecen dependientes de  $Mg^{2+}$  y específicos para nucleótidos de adenina (Kironde y Cross, 1986, 1987; Senior, 1979). Dado que la catálisis es dependiente de  $Mg^{2+}$  y utiliza diferentes trinucleótidos como sustratos, se cree que los tres sitios de nucleótidos de recambio rápido corresponden a los sitios catalíticos.

## 2.- EL COMPLEJO NATIVO F<sub>1</sub>I.

La H<sup>+</sup>ATP-sintasa mitocondrial, ya sea soluble o particulada, se obtiene con diferentes grados de actividad hidrolítica atribuibles al diferente contenido de *PI*. Cuando la actividad hidrolítica de la H<sup>+</sup>ATP-sintasa es baja, esta puede manifestarse al máximo por diferentes tratamientos que involucran el desplazamiento de la *PI* del sitio inhibitorio, o bien el ataque a ésta por proteasas.

En el caso de la ATPasa particulada, los métodos empleados para manifestar la actividad hidrolítica máxima por desplazamiento de la *PI* son: Energización de membranas por substratos oxidables o por hidrólisis de ATP, exposición del complejo a proteasas, a temperaturas altas (20-60 °C), pH alcalino y fuerza iónica (ver rev. Schwerzmann y Pedersen 1986).

En el complejo soluble, la actividad hidrolítica máxima se puede manifestar por incubación de la enzima en medio con fuerza iónica y temperatura altas (Lowe y Beechey, 1981; Feinstein y Moudrianakis, 1984), o bien por tripsinización (Horstman y Racker, 1970). Este aumento se atribuye a una inactivación del efecto catalítico de la proteína inhibidora.

En 1984 Feinstein y Moudrianakis, caracterizaron una preparación de F<sub>1</sub> que se obtiene con la *PI* endógena, y que tiene un comportamiento similar al de las partículas submitocondriales Mg-ATP (Beltrán y col., 1984), con un alto contenido de *PI*.

Esta preparación de F<sub>1</sub>I soluble se obtiene con una actividad hidrolítica muy baja (0-2  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ), y puede alcanzar el valor teórico máximo (100  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) al incubarse a

temperaturas mayores de 20 °C y a un pH alcalino en presencia de ATP como agente estabilizador. La velocidad de activación es más rápida a medida que se aumenta la temperatura (de 4 a 60 °C), o el pH (de 6.0 a 8.5). Se sabe que el complejo F<sub>1</sub>I es catalíticamente activo (Gómez-Puyou y col., 1986), ya que es capaz de sintetizar la misma cantidad de ATP unido (0.4 ATP/F<sub>1</sub>) que la F<sub>1</sub> (Sakamoto y Tonomura 1983; Sakamoto, 1984; Yoshida, 1983; Gómez-Puyou y col., 1986 ).

La F<sub>1</sub>I a diferencia de la F<sub>1</sub>, es estable a temperaturas de 0-4 °C, ya que como se mencionó arriba, la PI le confiere estabilidad al frío (Pullman y Monroy, 1963).

### 3.- FUNCION DE LAS SUBUNIDADES DEL COMPLEJO F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>

La Subunidad  $\alpha$  posee un sitio de unión para nucleótidos (por mol de  $\alpha$ ) que tiene una alta afinidad para ATP o ADP (Dunn y Futai, 1980), y la unión de éste a la subunidad  $\alpha$  le provoca un cambio conformacional importante (Paradies, 1980, 1981; Dunn, 1980). Sabemos también, que el sitio de unión para Mg<sup>2+</sup> no intercambiable que permanece unido a la F<sub>1</sub>, se recupera en el dímero " $\alpha\gamma$ " al desnaturalizar la F<sub>1</sub> (Williams, y col., 1987). Estos resultados junto con el hecho de que la liberación del ATP de la subunidad  $\alpha$  es muy lenta, sugieren que este sitio de nucleótido podría ser regulador o estructural (Dunn, 1980). La subunidad  $\alpha$  parece ser especie específica ya que a diferencia de las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$ , no forma híbridos con subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  de otras fuentes (Futai y col., 1980; Takeda y col., 1982).

Los resultados de experimentos usando F<sub>1</sub> de *E. coli* con

mutaciones a nivel de  $\alpha$  que resultan en la alteración de la cooperatividad entre los sitios, sugieren que la transmisión de cambios conformacionales entre subunidades, es esencial para la máxima actividad de ATPasa (Nuomi y col., 1984). Por experimentos de entrecruzamiento de [ $^{14}$ C]NEM-OSCP con  $F_1$  (Dupuis y col., 1984) y por experimentos en los que el tratamiento de la subunidad  $\alpha$  con tripsina altera la unión de OSCP con el segmento  $F_1$ , sabemos que la subunidad  $\alpha$  interactúa con la subunidad OSCP del cuello del complejo  $F_1F_0$ .

Las 3 Subunidades  $\beta$  son esenciales en la actividad catalítica del complejo ATP-sintasa, ya que poseen los sitios catalíticos y parte de los sitios no catalíticos de la enzima (Kananshvili y Gromet-Elhanan, 1985). Estas subunidades son las más conservadas y por tanto las más fáciles de substituir, ya que su homología con otras especies es mayor de 60 % (Walker y col., 1984), principalmente en la zona del sitio de unión de nucleótidos (Nelson y Cidon, 1984). Experimentos con la subunidad  $\beta$  aislada de  $F_1$  de *R. rubrum*, mostraron que ésta es capaz de llevar a cabo la hidrólisis del ATP, aunque este fenómeno no se ha visto para la subunidad aislada de otras especies (Kanashvili y Gromet-Elhanan, 1983b). Esta subunidad parece ser esencial también en la determinación de la especificidad de  $F_1$  para cationes divalentes, ya que una mutación a nivel de la subunidad  $\beta$  en *E. coli* cambia la especificidad de la  $F_1$  de  $Mg^{2+}$ -ATPasa a  $Ca^{2+}$ -ATPasa (Futai y col., 1974). Es importante mencionar que todos los residuos de aminoácidos de la subunidad  $\beta$  de la  $F_1$  que hasta ahora se han modificado, afectan la actividad hidrolítica (ver fig. 3). Estos residuos son: 1 ó 2 tirosinas que a pH neutro se modifican con

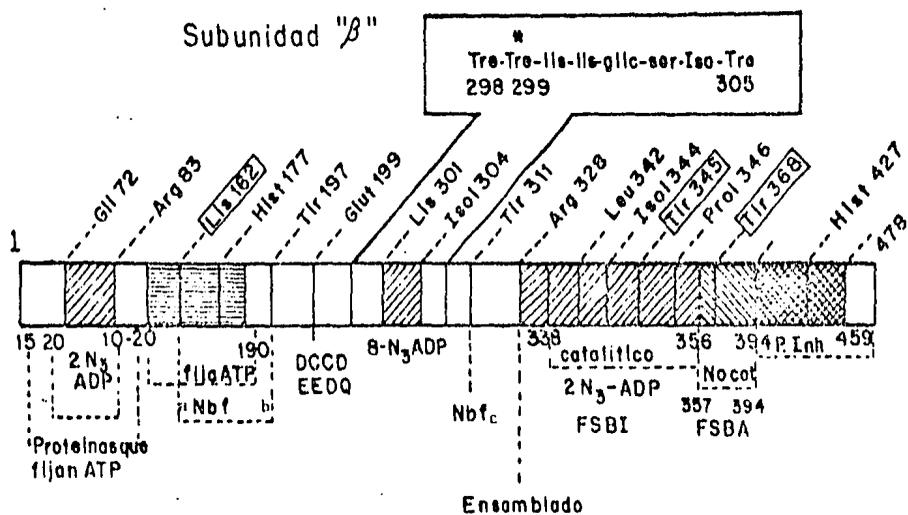


Fig. 3.- Esquema de la Subunidad  $\beta$  de la  $F_1$ -ATPasa Mitochondrial, mostrando la localización de residuos de aminoácidos de importancia en este trabajo.  $2-N_3ADP_a$  (Lunardi y col., 1987);  $Nbfa$  (Andrews y col., 1984b);  $Nbfb$  (Ho y Wang, 1983); DCCD (Esch y col., 1981); EEDQ (Laikind y col., 1986);  $8-N_3ADP$  (Hollemaans y col., 1983);  $Nbfc$  (Andrews y col., 1984a);  $2N_3ADP_b$  (Garin y col., 1986); FSBI (Bullough y Allison, 1986b); FSBA (Esch y Allison, 1979); P. Inh. (sitio de unión de la Proteína Inhibidora-Jackson y Harris, 1988).

Nbf, FSBA ó tetranitrometano; Una lisina modificable con Nbf a pH alcalino; una arginina que se modifica con fenilgloxal o con butanediona y un carboxilo que se marca con DCCD) ó con EEDQ (ver rev. Allison y col., 1986 y secciones IV y V). La subunidad  $\beta$  tiene además el sitio de unión de la Proteína Inhibidora (Klein y col., 1980, 1981; Beltran y col., 1988), que es un factor muy importante en la regulación de la actividad catalítica de la enzima.

La Subunidad  $\gamma$  parece ser indispensable para el ensamble de las otras subunidades de  $F_1$ , ya que en ausencia de esta subunidad no hay ensamble de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (Kanasawa y col., 1983; Klionsky y Simoni, 1985). Estudios de entrecruzamiento del complejo  $F_1$  soluble, y otros más recientes sobre la estructura tridimensional de la enzima (Gogol y col., 1989b), muestran que la subunidad  $\gamma$  se encuentra interactuando principalmente con la subunidades  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ . Experimentos realizados con subunidades de *E. coli*  $F_1$  mostraron que la mínima combinación de subunidades que presenta actividad hidrolítica es  $\alpha_3\beta_3\gamma$  (Kagawa y Nukiwa, 1981; Yoshida y col., 1975; Futai, 1977). Además se ha propuesto que la subunidad  $\gamma$  actúa como la compuerta del paso de los protones a la subunidad catalítica (Enns y Criddle, 1977).

Aunque se desconoce la función de las Subunidades  $\delta$  y  $\epsilon$ , se ha propuesto que éstas pueden anclar la estructura  $\alpha_3\beta_3\gamma$  a la porción  $F_0$  de la enzima. Esto se ha propuesto considerando que la subunidad  $\delta$  mitocondrial tiene como equivalente a la subunidad  $\epsilon$  en *E. coli* y en cloroplasto (Kimura y col., 1989), que se sabe desempeñan este papel (Futai y col., 1974; Sternweis, 1978; Kagawa y col., 1976; Dunn y Heppel, 1981; Humbert y col., 1983). Debemos

aclarar que la subunidad *c* de mitocondria, no tiene equivalente en *Bacterias* ni en *Cloroplasto* (Walker y col., 1985).

LA PROTEINA INHIBIDORA (PI), es un polipéptido con peso molecular de 9578 Da (Frangione y col., 1981). Fué aislado por primera vez por Pullman y Monroy en 1963 de mitocondrias de corazón de res, es un inhibidor de la hidrólisis y de todas las reacciones dependientes de ésta. Estudios posteriores mostraron que este polipéptido también regula la síntesis de ATP, así como las reacciones parciales del ciclo catalítico (Harris y Crofts, 1978; Gómez-Puyou y col., 1979; Harris y col., 1979; Tuena de Gómez-Puyou y col., 1983; Beltrán y col., 1986). Desde su descubrimiento a la fecha, se ha purificado de H<sup>+</sup>-ATP-sintasa prácticamente de todas las fuentes (ver rev. Pedersen y col., 1981). Su presencia confiere estabilidad al frío a la F<sub>1</sub> soluble (Pullman y Monroy, 1963; Horstman y Racker, 1970) y puede ser marcada con [<sup>14</sup>C] Fenilisotiocianato (Klein y col., 1980), [<sup>14</sup>C] Metil 4-azidobenzimidato (Klein y col., 1981) o con <sup>125</sup>I (Wong y col., 1982; Power y col., 1983) sin perder actividad. La estequiometría PI:F<sub>1</sub> es de uno (Gómez-Fernández y Harris, 1978), esta proteína interactúa con el extremo carboxilo terminal (Jackson y Harris, 1988) de una de las 3 subunidades β del complejo F<sub>1</sub> (Klein y col., 1980, 1981; Jackson y Harris, 1983; Beltran y col., 1988). La interacción de PI-F<sub>1</sub> también ocurre en la F<sub>1</sub> de *E. coli* (Lötscher y col., 1986) en la cual la subunidad *c* desempeña la función de PI (Dreyfus y Satre, 1984; Sternweis y Smith, 1980).

La inhibición de la actividad hidrolítica de la F<sub>1</sub>-ATPasa, por la PI requiere de preincubación a pH cercano de 6.7 en

presencia de un nucleótido trifosfatado (NTP) hidrolizable y de un catión divalente (Pullman y Monroy, 1963; Horstman y Racker, 1970). En 1978 Gómez-Fernandez y Harris propusieron que la hidrólisis del NTP podría generar un estado conformacional que favoreciera la interacción de la *PI* con la *F<sub>1</sub>*. Experimentos posteriores indicaron que la interacción se favorece por una relación baja ATP/ADP (Van de Stadt y Van Dam, 1974), y resultados recientes sugieren que la forma de la enzima a la cual se une la *PI* es como ATPasa-ADP (Power y col., 1983; Tuena de Gómez-Fuyou y col., 1983; Ernster y Nordenbrand, 1984).

No se ha llegado a un consenso con respecto al número de sitios de unión que la *F<sub>1</sub>* tiene para la *PI*. Jackson y Harris (1983, 1986) proponen la existencia de un solo sitio, en tanto que otros autores, aseguran que existen al menos 2 sitios (Van de Stat y col., 1973; Wong y col., 1982): uno inhibitorio y otro no inhibitorio.

El grupo de Tagawa (Hashimoto y col., 1984; Okada y col., 1986) demostró, que la ATP sintasa de levadura, tiene además 2 proteínas estabilizadoras de PM de 9,000 y 15,000 daltones en una relación equimolecular con el complejo *F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>*. Estas proteínas se requieren para estabilizar el complejo inactivo *PI-F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>* en la membrana mitocondrial. Por otro lado, se sabe que la *PI* sufre cambios conformacionales dependientes de pH que parecen estar relacionados con su actividad inhibitoria (Fujii y col., 1983; Harris, 1984).

La importancia fisiológica de la *PI* en la regulación de la hidrólisis de ATP se demostró *in vivo* en músculo cardíaco isquémico (Rouslin, 1983, 1987).

El sector hidrofóbico (Fo) del complejo ATP-sintasa, confiere a la enzima estabilidad al frío y sensibilidad a la oligomicina y al DCCD (1-5 nmoles/mg de proteína) (Kagawa y Racker, 1966). En *Bacteria* el segmento Fo, está constituido de 3 subunidades diferentes  $\alpha$ ,  $b$  y  $c$  con estequiometría 1:2:10 (Senior y Wise, 1983). En mitocondrias parece ser mucho más complejo, ya que la composición y estequiometría de sus subunidades no se ha establecido claramente. Entre los polipéptidos que se han encontrado formando parte del sector Fo en mitocondria de corazón de res, están: La "ATP-asa  $\alpha$ " ( $\alpha$ ) de 24.8 kDa (Anderson y col., 1982), la subunidad  $b$ , el *proteolípido* ( $c$ ) de 7.4 kDa (Walker y col., 1984), el polipéptido *A<sub>6</sub>L* de 7.9 kDa (Fearnley y Walker, 1986) y una *Proteína que une desacoplante* (Hanstein, 1976).

El *Proteolípido*, subunidad  $c$  ó *Proteína que une DCCD*, es la que puede ser modificada covalentemente por DCCD (Lauguin y col., 1980), bloqueando la translocación de protones a través de Fo y por tanto inhibiendo la actividad hidrolítica y sintética de la ATP-sintasa (Criddle y col., 1977; Glaser y col., 1980; Sebald y Hoppe, 1981). El *proteolípido* es el componente principal (5-10 % de F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>) del segmento Fo, y es esencial para que la Fo sea funcional. Es también el sitio de unión de la oligomicina que es un inhibidor de la síntesis y la hidrólisis del ATP (Criddle y col., 1977). El *Proteolípido* tiene homólogos en *Bacterias* y *Cloroplastos* (Sebald y Hoppe 1981).

La *Proteína que une Desacoplante* (UBP), es el polipéptido de mayor peso molecular que se encuentra formando parte de Fo. Fue purificado por primera vez en 1976 por Hanstein y parece ser el único componente esencial para la unión del *desacoplante* en la

membrana interna mitocondrial.

Entre las subunidades responsables de unir  $F_1$  a  $F_0$ , es decir, las que forman el  *cuello*, se encuentran la subunidad *OSCP* (Proteína que confiere sensibilidad a oligomicina) con P.M. de 20.9 kDa (Ovchinnikov y col., 1983), la  $F_6$  con P.M. de 8 kDa (Fong y col., 1984) y la subunidaad  $\epsilon$ .

*LA PROTEINA QUE CONFIERE SENSIBILIDAD A OLIGOMICINA (OSCP)*, es un polipéptido hidrofílico, que interactúa con las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  y cuya función principal es la de unir el segmento  $F_0$  al segmento  $F_1$  (Dupuis y col., 1985), confiriéndole a éste último sensibilidad a la oligomicina [(Tzagoloff, 1970), sin ser su sitio de unión (Criddle y col. 1977)], al DCCD y a la Rutamicina (Van de Stadt y col., 1972). La *OSCP* es esencial para el restablecimiento de las funciones dependientes del gradiente de protones en experimentos de reconstitución de  $F_1$  con  $F_0$  (Tzagoloff y col., 1968; Racker, 1981). Esta proteína junto con el *Factor B* ( $F_b$ ) y el *Factor  $\delta$*  ( $F_\delta$ ), se requieren para reconstituir la actividad de intercambio  $ATP-^{32}P$  (Liang y Fisher 1983). Los resultados de experimentos utilizando reactivos entrecruzadores, muestran que la *OSCP* interactúa con las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la  $F_1$ . Esta proteína solo se ha aislado de mitocondria, pero funcionalmente tiene su homóloga en la subunidad  $\delta$  de *E. coli* (Walker y col., 1982).

El *Factor B*, es una proteína que se encuentra unida a  $F_0$  del lado de la matriz mitocondrial. Se ha sugerido que además de estar involucrada en la reacción de intercambio  $ATP-^{32}P$  (Liang y Fisher 1983) y afectar la permeabilidad a protones cuando se adiciona a membranas carentes de el (Huang y col., 1987), participa en la organización del canal de protones mediante sus 2 grupos tiol

(Sanadi, 1982).

La función de  $F_0$  no está aún bien definida, algunos autores (Vadineau y col., 1976; Russel y col., 1976) proponen que participa en la unión de  $F_1$  a  $F_0$ , al igual que *OSCP* y que junto con ésta confieren sensibilidad a la oligomicina. Sin embargo Liang y Fisher (1982), difieren de esta conclusión, y sugieren que la  $F_0$  participa junto con la  $F_b$  y la *OSCP* en la actividad de intercambio  $ATP \rightarrow ^{32}P$  del complejo  $F_1F_0$ .

#### 4.- ASIMETRIA DE LOS SITIOS CATALITICOS.

##### A) Asimetría estructural:

En 1982 Amzel y col., basados en estudios estructurales y de difracción de Rayos X y en la estequiometría  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta c$ , propusieron por primera vez la *Asimetría Estructural* de  $F_1$  dada por las subunidades pequeñas. Lo que se observó en este caso, y también por estudios de tinción negativa de moléculas de  $F_1$ , fué un arreglo hexagonal formado por 6 lóbulos del mismo tamaño (aprox. 80 Å) que representan las 3 subunidades  $\alpha$  y las 3  $\beta$ . En 1986 Boekema y col., lograron ver además una séptima densidad electrónica central o asimétrica que parece estar dada por las subunidades pequeñas ( $\gamma\delta c$ ). Este año Gogol y Col (1989a) combinaron dos técnicas: 1a.- Reconstrucción tridimensional de imágenes de cristales bidimensionales de  $ECF_1$  teñidos negativamente, y 2a, análisis de una sola partícula de  $ECF_1$ , preservada en su forma nativa mediante congelamiento, y usando criomicroscopía electrónica, lograron tener una imagen más

informativa de la enzima. Además del hexágono formado (95-100 Å) por 6 densidades de proteína alargadas de aprox. 90 x 30 Å, en el centro de  $ECF_1$  observaron una cavidad acuosa (30-40 Å), que abarca prácticamente la longitud del complejo. Esto apoya el hecho de que el segmento  $F_0$  de *E. coli* forma un poro de protones al reconstituirse en membranas (Schneider y Altendorf, 1985). También pudieron visualizar una séptima densidad de proteína compacta, que se encuentra asociada estrechamente con las subunidades periféricas, y que obstruye parcialmente la cavidad central (fig. 4). El mismo grupo (Gogol y col., 1989b), usando la técnica de criomicroscopía electrónica con el complejo  $ECF_1$  decorado con anticuerpos Anti- $\alpha$ , pudo confirmar claramente la alternancia entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  en la enzima. También pudieron ver que la densidad en el interior de la estructura dada por las subunidades pequeñas  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  (Bragg y Hou, 1987; Gavilanes-Ruiz y col., 1988) está en una posición asimétrica, adyacente a las masas periféricas no marcadas, indicando que su interacción principal es en la subunidad  $\beta$ . De la misma manera el análisis de la  $ECF_1$ -tripsinizada que carece de  $\delta$ ,  $\epsilon$  y parte de la subunidad  $\gamma$ , permitió ver que la densidad central disminuye debido a la ausencia de  $\delta$  y  $\epsilon$ . Finalmente usando fragmentos Fab' contra epítomos accesibles de las subunidades pequeñas ( $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ ), confirmaron que éstas son las responsables de la masa asimétrica que interactúa con la subunidad  $\beta$  no marcada.

#### B) Asimetría funcional:

Por otra parte, los resultados de experimentos de

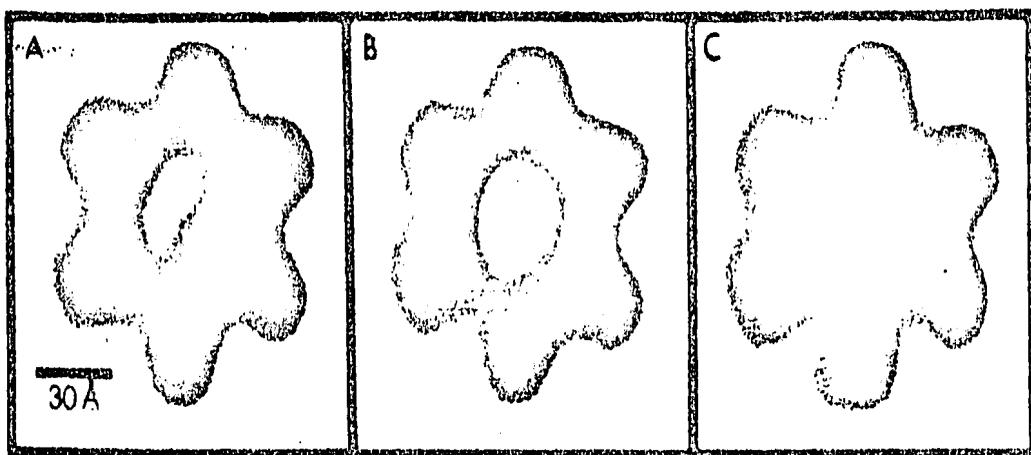


Fig. 4.- *Imágenes promedio de ECF1 no teñidas mostrando un arreglo hexagonal. (A) Promedio de 63 imágenes con un centro asimétrico, (B) 33 imágenes con centro abierto, y (C) 11 imágenes con el centro parcialmente cerrado (Gogol, E.P. y col. 1989).*

desnaturalización por frío (Williams y col 1984), y de modificaciones químicas de la  $F_1$  con DCCD (Pougeois y Col, 1979), EEDQ (Pougeois y Col, 1978), Nbf (Ferguson y Rada, 1975a) y FSBI (Bullough y Allison, 1986b), reactivos con los cuales la enzima muestra solo un tercio de reactividad (Wang, 1987), son consistentes con los modelos propuestos para  $F_1$  con subunidades  $\beta$  no equivalentes. Así tenemos también el ejemplo de la  $ECF_1$  en la cual las tres subunidades  $\beta$  tienen diferente reactividad (Stan-Lotter y Brag, 1986a):  $\beta_1$  interactúa con la subunidad  $\epsilon$ ,  $\beta_2$  reacciona con DCCD y  $\beta_3$  acepta la entrada de Nbf e IAANS que es un reactivo específico para grupos -SH. Todo esto sugiere que además de la *Asimetría Estructural*, la  $F_1$ -ATPasa posee una *Asimetría Funcional*. En este sentido sabemos además que solo uno de los 3 sitios de nucleótidos clasificados como no catalíticos puede intercambiar nucleótidos en presencia de EDTA (Kironde y Coss 1987). Posteriormente Bulygin y Vinogradov (1988) usando partículas submitocondriales, mostraron que el complejo  $F_1F_0$ -ATP sintasa posee 2 sitios inhibitorios específicos para ADP que corresponden a sitios no catalíticos, y un sitio específico para ATP que es hidrolítico.

#### IV.-MARCADORES QUÍMICOS DEL COMPLEJO $F_1$ - $F_0$ .

En los últimos años el uso de *marcadores químicos* para el estudio de la estructura y la función del complejo  $F_1$ -ATPasa mitocondrial, ha tenido un gran desarrollo.

Los *marcadores químicos* se pueden dividir en 2 grupos dependiendo del tipo de unión: *Covalentes* y *No Covalentes* ó

Reversibles; Entre los Marcadores No covalentes se encuentran los análogos de nucleótidos y algunos Inhibidores del complejo ATPasa, dentro de éstos últimos están Inhibidores específicos de la  $F_1$ , como la Aurovertina (Lunardi y col., 1984) y la Efrapeptina (Kohlbrenner y Cross, 1978, 1979), y NO específicos como la quercetina, la Batofenantrolina y la Azida. También en éstos podrían incluirse los Inhibidores Específicos para el segmento  $F_0$  como la Oligomicina y la Venturicidina (Linnet y Beechey, 1979).

Con respecto a los Análogos de Nucleótidos (Vignais y Lunardi, 1985), estos se han utilizado marcados radioactivamente, y se sabe que cuando se ponen en contacto con la  $F_1$ , interactúan principalmente con la subunidad  $\beta$  (ver fig.3). Sin embargo, varios autores han observado que una porción importante de la radioactividad total incorporada se recupera también en la subunidad  $\alpha$ . Esto ha llevado a proponer que los sitios de unión para nucleótidos pueden estar compartidos entre  $\alpha$  y  $\beta$  o bien que  $\alpha$  posee un sitio (No Catalítico) y  $\beta$  otro (Catalítico) pero que dado que hay una interacción muy estrecha entre  $\alpha$  y  $\beta$ , se obtiene un marcaje cruzado. Los resultados de experimentos con 2-azido [ $\alpha$ - $^{32}$ P] ADP en  $F_1$  mitocondrial, mostraron que cada subunidad  $\beta$  contiene 2 sitios de unión para nucleótidos, uno que pertenece solo a la  $\beta$  (sitio catalítico) y otro que es compartido con la subunidad  $\alpha$  (sitio no catalítico) (Lunardi y col., 1987).

Por último es importante mencionar que utilizando el análogo 5'-p- fluorosulfonilbenzoiladenosina (FSBA) se marcan 3 residuos de Tyr- $\beta$ 368/ $F_1$  a pH 8, que corresponden a los 3 sitios no catalíticos y 3 de Hys- $\beta$ 427 a pH 6.5 (Bullough y Allison, 1986a). En cambio, si se emplea el análogo 5'-pfluorosulfonil-

benzoilinosina (FSBI) se marca específicamente la Tir- $\beta$ 345/F<sub>1</sub> que corresponde a un sitio catalítico de la enzima (Bullough y Allison, 1986b).

Dentro de los *Marcadores Covalentes* se encuentran los *reactivos dirigidos a grupos específicos del centro activo* y los *reactivos entrecruzadores*.

Entre los reactivos más utilizados y que se unen *covalentemente* a la ATP-sintasa y modifican su actividad, están: El DCCD y el EEDQ que reaccionan con un grupo carboxilo de una subunidad  $\beta$  de la F<sub>1</sub>. Tanto el Nbf como el FSBA, a pH neutro modifican una tirosina cada uno, el primero la Tir- $\beta$ 311 y el segundo la Tir- $\beta$ 368; la butanediona y el fenilgloxal que modifican un residuo de arginina; el Nbf que reaccionado con la Tir- $\beta$ 311 a pH alcalino, se transfiere a la Lis- $\beta$ 162. Por último se encuentra el fosfato de piridoxal, que a diferencia de los inhibidores anteriores, debe unirse a 10 lisinas para inactivar la F<sub>1</sub> de mitocondrias (Godinot y col., 1979; Koga y Cross, 1982), de bacterias (Peters y col., 1980), y de cloroplastos (Sugiyama y Mukohata, 1979).

Aunque existen también reactivos que modifican los grupos -SH de la enzima, su actividad hidrolítica es insensible a éstos. La F<sub>1</sub> contiene residuos de cisteína en las subunidades  $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\epsilon$  que pueden marcarse con la N-etilmaleimida (NEM) (Senior, 1973). Sin embargo cuando se eliminan los nucleótidos de la enzima, su actividad hidrolítica se inhibe por NEM (Tamura y Wang, 1983). La actividad de recambio ATP-Pi de una preparación de ATP-sintasa aislada de mitocondrias de corazón de res, es sensible a reactivos de -SH como la carboxipiridina y el p-cloro-mercuri-benzoato. Los

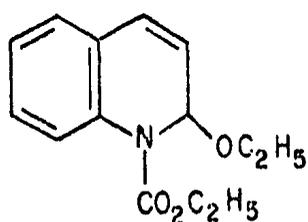
grupos -SH que reaccionan con estos reactivos se encuentran en una proteína de 8 kDa y en la subunidad  $\alpha$  (Godinot y col., 1981).

#### LA DICICLOHEXIL CARBODIIMIDA (DCCD)

La diciclohexilcarbodiimida (fig. 5) es un inhibidor del complejo ATP-sintasa que puede interactuar tanto en la  $F_1$  como en la  $F_0$ . A pH alcalino el DCCD (en concentraciones nanomolares) se une específicamente a un residuo glutámico de una de las (6-10) copias del *Proteolípido* ( ó *Proteína que une DCCD*), inhibiendo la síntesis de ATP (Beechey y col., 1966, 1967), la hidrólisis y el recambio  $^{32}\text{P}$ i-ATP (Kopecky y col., 1982).

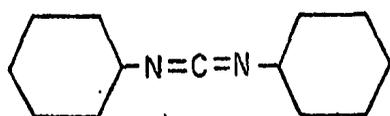
El DCCD es un inactivador específico de las  $F_1$ -ATPasas de varias fuentes [bacteria termófila *PSa* (Yoshida y col., 1981); *E. coli* (Satre y col., 1979); cloroplasto (Shoshan y Selman, 1980); *Rhodospirillum rubrum* (Kananshvili y Gromet-Elhanan, 1983)] , que reacciona con grupos carboxilo para formar intermediarios activados que pueden actuar como nucleófilos. Estos grupos activados son capaces de inducir entrecruzamiento con subunidades adyacentes, sin embargo se sabe que el grado de entrecruzamiento inducido en la  $F_1$  es despreciable (Pougeois y col., 1979; Satre y col., 1979). La velocidad de inactivación de la  $F_1$  por el DCCD aumenta al disminuir el pH de 8 a 6; la concentración que se usa normalmente para inhibir la enzima mitocondrial es del orden micromolar. Se requiere solo un mol de DCCD por mol de enzima para inhibir la actividad hidrolítica en un 95 % sin modificar en igual grado la actividad sintética (Sakamoto y Tonomura, 1983). La unión

EEDQ



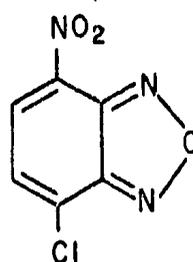
1(etoxicarbonil)-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina

DCCD



N, N'-Diciclohexilcarbodiimida

Nbf



4-cloro-7-Nitrobenzofurazano

Fig. 5.- ESTRUCTURA QUIMICA DE EEDQ, DCCD Y Nbf.

de 2 moléculas de DCCD por enzima produce la inactivación total (Pougeois y col., 1979). El DCCD se une específicamente al glutámico 199 de la subunidad  $\beta$  de la  $F_1$ -ATPasa mitocondrial en presencia o en ausencia de ADP (Esch y col., 1981). Debido a que en presencia de  $Mg^{2+}$  la enzima se inhibe por DCCD, se ha sugerido que el carboxilo que une DCCD está involucrado en la unión del  $Mg^{2+}$  a la enzima (Pougeois y col., 1979).

#### EL 7-CLORO-4-NITROBENZOFURAZANO (*Nbf*)

El *Nbf* (fig. 5) es un reactivo que inicialmente se empezó a usar debido a su alta reactividad con grupos -SH. La unión *Nbf*-SH presenta un máximo de absorción característico a 420 nm (Birket y col., 1970; Ferguson y Radda 1974).

Cuando el *Nbf* a concentraciones del orden  $\mu M$  y a pH neutro se añade a la  $F_1$ -ATPasa de diferentes fuentes [Cloroplasto (Deters y col., 1975); *E. coli* (Lunardi y col., 1979); *Levadura* (Gregory y col., 1981); *R. rubrum* (Kananshvili y Gromet-Elhanan, 1983)], inhibe la actividad hidrolítica del complejo. En el caso de la  $F_1$  mitocondrial la inhibición no se afecta por la presencia de nucleótidos, y se acompaña de un incremento en la absorción a 385 nm (Ferguson y Radda, 1975a), que se debe a la unión del *Nbf* al residuo de Tir 311 de una subunidad  $\beta$  (Andrews y col., 1984). La unión *Nbf*-O- $F_1$  es inestable y reversible por ditioneitol (DTT), de manera que para la identificación del residuo con el cual reacciona el *Nbf*, fué necesario estabilizar el complejo inhibido, utilizando ya sea ditionita (Andrews y col., 1984), ó  $Zn^{2+}$  en

presencia de 4-4'-dipiridil (Wu y Wang, 1987). En el primer caso el residuo modificado por *Nbf* se identificó como la Tir 311. En el segundo caso, en presencia de  $Zn^{2+}$  y 4-4'-dipiridil, la tirosina modificada con *Nbf* correspondió a la Tir- $\beta$ 197, que está muy cercana al Glu  $\beta$ 199 modificable por DCCD.

Si el complejo *Nbf*-O- $F_1$  se expone a SDS al 1 %, ocurre una transferencia rápida del *Nbf* del residuo de tirosina a los grupos -SH expuestos. Esto se hace evidente debido a la desaparición del máximo de absorción a 385 y la aparición de un nuevo máximo a 420 nm, que es característico de la unión *Nbf*-SH (Ferguson y Radda, 1975).

Un mol de *Nbf*/ $F_1$  inhibe drásticamente la actividad hidrolítica, aunque se ha descrito que la enzima es capaz de unir más de una molécula de *Nbf* (Ferguson y col., 1975b; Lunardi y Vignais, 1979; Ting y Wang, 1980). Los resultados de experimentos de reconstitución de partículas submitocondriales carentes de  $F_1$ , con *Nbf*-O- $F_1$ , muestran que aunque la hidrólisis esté inhibida, la actividad sintética de la enzima prácticamente no se modifica (Steinmeier y Wang, 1979).

El *Nbf* unido a tirosina en la  $F_1$ , puede transferirse intramolecularmente (Ferguson y Radda 1975b) a la Lis 162 de la misma subunidad  $\beta$  (Andrews y col., 1984b). La unión *Nbf*-N- $F_1$  es estable; el complejo presenta un máximo de absorción a 475 nm y es fluorescente. La actividad de la  $F_1$  modificada con *Nbf* en la lisina, no se puede recuperar por la adición de DTT. La transferencia del *Nbf* de Tir a Lis puede promoverse con pH alcalino (Ferguson y Radda, 1975b) o con iluminación directa (Guillory, 1979), aunque ésta última no es muy recomendable debido a que el

7

Nbf se hidroliza con la luz (Heinzelmann y Guilgen, 1976). La transferencia del Nbf se afecta por la presencia de nucleótidos, a tal grado que a pH alcalino en presencia de EDTA, la transferencia de Tir a Lis se efectúa en 60 min, y en presencia de ATP/EDTA se requieren de 18 a 20 hrs (Ferguson y Radda, 1975b). No se conoce con certeza el mecanismo por el cual el Nbf inhibe la actividad hidrolítica de la F<sub>1</sub>, ya que existe controversia con respecto a si la tirosina 311 modificada por el Nbf se encuentra o no en el sitio catalítico de la enzima (Ver rev. Vignais y col., 1985). Se sabe que la tirosina libre no reacciona a pH neutro con el Nbf, lo cual sugiere que la tirosina que modifica el Nbf se encuentra en un microambiente no usual (Ferguson y Radda, 1975a). Además la modificación con Nbf no evita el marcaje de otras tirosinas con tetranitrometano. Se sabe también que un marcador específico del sitio no catalítico (FSBA), modifica la Tir 368 (Bullough y Allison, 1986a) y que el marcador del sitio catalítico (FSBI) se une a la Tir 345 (Bullough y Allison, 1986b); ambas tirosinas diferentes a las que marca el Nbf. Por otro lado, los resultados de experimentos con F<sub>1</sub> de *E. coli* en la cual se substituyeron la Tir 311 por Phe y la Lis 162 por Glu o Gln, sugieren que la tirosina no es un aminoácido esencial para la actividad hidrolítica en tanto que la lisina si (Parsonage y col 1987). En experimentos de transferencia de energía en F<sub>1</sub> de *Cloroplasto* modificada con Nbf (Nbf-O-CF<sub>1</sub>), se encontró que el Nbf se localiza a 41 Å del sitio activo del complejo (Cerione y Hammes, 1982). Es importante mencionar que una molécula extendida de ATP ocupa un espacio de 16-19 Å. Resultados de experimentos más recientes en los cuales se marca el sitio activo con 2-Azido-ADP, muestran que

el sitio activo marcado se encuentra en una subunidad  $\beta$  diferente a la cual se unió el *Nbf*. Este hecho parece ser semejante en la *F<sub>1</sub>-ATPasa* mitocondrial en la cual el sitio activo se marcó con FSBI (Ceccarelli y col., 1989).

La mayoría de los resultados enumerados, sugieren fuertemente que el *Nbf* no modifica directamente el sitio activo de la *F<sub>1</sub>-ATPasa*. Por lo que podría ser que la inhibición de la enzima se deba solamente a un cambio conformacional, producido únicamente por la unión del *Nbf* a la enzima, como se ha visto en la *F<sub>1</sub>* de *E. coli* (Stan-Lotter y Brag, 1986; Brag y Hou, 1987).

#### V.- ENTRECruzAMIENTO QUIMICO.

El *Entrecruzamiento Químico* ("Crosslinking") es una herramienta metodológica importante que se ha usado en el análisis estructural de las membranas biológicas (veanse rev. Wolf, 1972; Peters y Richards, 1977; Ji, 1979; Freedman, 1979).

Este entrecruzamiento se puede hacer, con reactivos bifuncionales o monofuncionales; en el primer caso, se introduce un puente de 3 a 20 Å, y en el segundo, catalizando la formación de un nuevo enlace entre los residuos de aminoácido de los componentes interactuantes. Los reactivos entrecruzadores bifuncionales, pueden ser homo- o hetero- funcionales, dependiendo de si los grupos reactivos de los extremos, son iguales o diferentes. Algunos ejemplos de catalizadores empleados son: La batofenantrolina-cúprica, el peróxido de hidrógeno, la 1-etil-3-[(dimetilamino)-propil]-carbodidimida (EDAC) la N-(etoxicarbonil)-2-etoxidihidroquinolina (EEDQ fig.5) y la

metil-4-azidobenzoimidato (MABI).

La técnica de entrecruzamiento se usó inicialmente para explorar la estructura terciaria de las proteínas con una sola cadena polipeptídica. Posteriormente Davies y Stark (1979), mostraron que analizando las proteínas entrecruzadas mediante geles de PAGE-SDS, era posible estudiar también la estructura cuaternaria de enzimas oligoméricas solubles.

En los primeros experimentos con  $F_1$ -ATPasa de mitocondrias de corazón de res usando el dimetilsuberimidato (reactivo entrecruzador homofuncional de 12 Å de longitud), los productos de entrecruzamiento predominantes fueron:  $\alpha\alpha$  y  $\alpha\beta$  (Klein y col., 1976). Posteriormente se identificaron 2 productos mas como  $\alpha\gamma$  y  $\beta\gamma$  (Baird y Hammes 1977). Usando geles de PA-SDS bidimensionales, el dimetil 3-3'-ditiobispropionato que forma un puente de 11 Å y la fenantrolina cúprica que entrecruza grupos -SH en la interfase de las subunidades, encontraron además los siguientes dímeros:  $\beta\gamma$ ,  $\gamma\epsilon$  y  $\delta\epsilon$  (Baird y Hammes 1977). Usando la misma estrategia con  $F_1$  de hígado de rata, los dímeros que se obtuvieron fueron:  $\alpha\beta$ ,  $\alpha\gamma$ ,  $\beta\gamma$  y  $\delta\epsilon$  (Brag y Hou, 1982). Este es un enfoque que ha permitido evidenciar las subunidades con las que interactúan la PI y la OSCP en la  $F_1$ -ATPasa mitocondrial. El uso de EDAC, EEDQ (Klein y col., 1980) y [ $^{14}$ C]MABI-PI (Klein y col., 1981), demostró que la PI interactúa con la subunidad  $\beta$  del complejo. De la misma manera el entrecruzamiento de la  $F_1$  de *E. coli* con EDAC, mostró la formación del dímero  $\beta\epsilon$  (Lötscher y col., 1984). En éste punto es importante recordar que que la subunidad  $c$  es (funcionalmente) el equivalente a la PI de la  $F_1$ -ATPasa mitocondrial. Por otro lado, el entrecruzamiento de [ $^{14}$ C]NEM-OSCP con  $F_1$ , demostró que la OSCP

interactúa con las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la enzima.

N-(ETOXICARBONIL)-2-ETOXI-1,2-DIHIROQUINOLINA  
(EEDQ)

El EEDQ (fig. 5) es una carbodiimida hidrosoluble que actúa como reactivo entrecruzador "sin grupo espaciador". El reactivo activa grupos carboxilo de los residuos aspártico y glutámico, los cuales reaccionan con aminos cercanos de otros residuos de aminoácidos para dar un enlace amida. El EEDQ es un inhibidor irreversible de la hidrólisis del ATP en  $F_1$ -ATPasas de diferentes fuentes (Laikind y col., 1985; Pougeois y col. 1978; Satre y col., 1983; Pougeois, 1983). En el caso de la  $F_1$ -ATPasa mitocondrial, igual que en la *E. coli*, sabemos que se requiere 1 mol de EEDQ por mol de enzima para tener inactivación total (Pougeois y col., 1978; Satre y col. 1983). Pougeois, basado en evidencia indirecta, concluyó que la diciclohexilcarbodiimida (DCCD) y el EEDQ modificaban diferentes carboxilos al inactivar la  $F_1$ -ATPasa mitocondrial. Posteriormente en 1985 Lakind y col., demostraron que la inactivación de la  $F_1$ -ATPasa mitocondrial con EEDQ en presencia de [ $^3$ H]Anilina, lleva a la formación de la [ $^3$ H]anilida del glutámico 199 de la subunidad  $\beta$ , el mismo residuo que se modifica cuando la enzima se inactiva con [ $^{14}$ C]DCCD.

Si la  $F_1$ -ATPasa reconstituida con *PI* exógena se inhibe con EEDQ, uno de los productos de entrecruzamiento es la formación de un dímero  $\beta$ .*PI*, de donde se concluye que la proteína inhibidora exógena se encuentra interactuando con una subunidad  $\beta$  (Klein y col., 1980).

La 1-etil-3-(3-(dimetilamino)propil) carbodiimida (EDAC), es otra carbodiimida hidrosoluble que como el EEDQ además de modificar covalentemente a la enzima, también promueve la formación de entrecruzamientos inter e intramolecularmente. En 1984 Lötscher y col., demostraron que el principal producto de entrecruzamiento al inhibir la F<sub>1</sub> de *E. coli* con EDAC es el dímero  $\beta.c.$  En éste punto cabe recordar que la subunidad  $c$  es el equivalente funcional de la PI en la F<sub>1</sub> de *E. coli* (Sternweis y Smith 1980; Dreyfus y Satre, 1984).

## ANTECEDENTES DIRECTOS

En 1980, Klein y col., usando experimentos de reconstitución con  $F_1$  soluble y  $PI$  purificada, mostraron que la  $PI$  exógena interactúa principalmente con la subunidad  $\beta$  de la ATPasa. Por el mismo tiempo Jackson y Harris (1983) obtuvieron resultados similares empleando tanto la ATPasa soluble como la particulada. Posteriormente el grupo de Capaldi (Lötscher y col., 1984) usando la  $F_1$  de *E. Coli* ( $ECF_1$ ), y un reactivo entrecruzador "sin grupo espaciador" (EDAC) demostró que en esta enzima la subunidad  $\epsilon$  (que desempeña la función de  $PI$ ), está en contacto con la subunidad  $\beta$ .

No sabemos si la  $PI$  endógena del complejo mitocondrial interactúa también con la subunidad  $\beta$ . En 1963 Warshaw y col., y posteriormente otros autores (Galante y col., 1981; Valdés y Dreyfus, 1987), propusieron que la  $PI$  exógena y la endógena no se comportaban igual en la ATPasa, por lo que se cree que no se unen al mismo sitio.

Está claramente demostrado que la  $ECF_1$  (constituida por 5 subunidades diferentes) presenta *asimetría estructural* dada por la interacción de las subunidades pequeñas ( $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ ), con uno de los 3 pares  $\alpha\beta$  del complejo (Gogol y col., 1989b). En la  $F_1$ -ATPasa mitocondrial, el problema es más complejo que en *E. coli*, ya que la  $PI$  es una entidad adicional. En este sistema el arreglo de las subunidades  $\beta$  tiene que ser de tal forma que al menos una interactúe con el complejo  $\gamma\delta\epsilon$ , y otra (¿la misma?) con la  $PI$ .

Existen también resultados experimentales que sugieren que las subunidades  $\beta$  no son equivalentes, es decir, que además de *asimetría estructural* la  $F_1$ -ATPasa también posee una *asimetría*

funcional (Ferguson y Radda, 1975a; Pougeois y col., 1978, 1979; Williams y col., 1984; Bulloug y Allison, 1986b; Stan-Lotter y Brag 1986a; Kironde y Cross, 1987; Bullygin y Vinogradov, 1988).

Con base en los antecedentes anteriores, y usando como sistema de estudio el complejo nativo *F<sub>1</sub>I*, un reactivo entrecruzador "sin grupo espaciador" (EEDQ), anticuerpos *Anti-PI* y *Anti-β* y reactivos específicos contra las diferentes subunidades ( $^{14}\text{C}$ )DCCD, *Nbf* y  $^{14}\text{C}$ NEM; ver fig. 5), nos propusimos como *Objetivo* contestar las siguientes preguntas:

- 1) ¿Con cual subunidad (es) interactúa la *PI* en el complejo nativo *F<sub>1</sub>I*?
- 2) ¿El complejo *F<sub>1</sub>I* nativo que tiene a la *PI* endógena, muestra *Asimetría Funcional*?

## MATERIALES Y METODOS

### MATERIAL BIOLÓGICO

Para la preparación de mitocondrias se usaron corazones de res frescos obtenidos en un rastro local.

### REACTIVOS

El N-(Etoxi-carbonil)-2-etoxidihidroquinolina (EEDQ), la Didiclohexilcarbodiimida (DCCD), el 7-Cloro-4-Nitrobenzofurazano (Nbf) y los amortiguadores usados fueron de Sigma. La [<sup>14</sup>C]DCCD y la [<sup>14</sup>C]N-Etilmaleimida (NEM) de Amersham. Los reactivos para los análisis electroforéticos en gel de Bio-Rad.

### DETERMINACION DE PROTEINA

Para la determinación de proteína se siguió el método de Biuret (Gornall y col., 1949) en el caso de membranas, y los métodos de Lowry (Lowry y col., 1951) o Bradford (1976) si se trataba de fracciones solubles. En ambos casos se usó Albúmina de suero Bovino como estandar.

### DETERMINACION DE ACTIVIDAD HIDROLITICA

La actividad ATPasa se midió espectrofotométricamente, a pH 8.0, a temperatura ambiente y en presencia de un sistema

regenerador de ATP (Pullman y col., 1960), fosfoenol piruvato y piruvato cinasa.

#### PREPARACION DE MITOCONDRIAS DE CORAZON DE RES

Las mitocondrias se prepararon a partir de corazones frescos siguiendo el método reportado por Löw y Vallin en 1963.

#### PREPARACION DE PARTICULAS SUBMITOCONDRIALES MgATP ( *psm-MgATP* )

Se usó esencialmente el método descrito por Lee y Ernster en 1967. Este consiste en la resuspensión de las mitocondrias a 20 mg de prot/ml en sacarosa 250 mM, MgATP 6 mM, pH 6.9-7.1. Posteriormente la suspensión se sonicó a 70 watts, durante 45 seg/10 ml en baño de hielo. El sonicado se centrifugó a 17,000 x g durante 15 min. a 4 °C. El sobrenadante, que contiene las PSM, se centrifugó a 105,000 x g durante 30 min. a 4 °C. El precipitado conteniendo las PSM, se resuspendió en el volumen inicial de sacarosa 250 mM y las PSM se recentrifugaron para lavarlas. Este lavado se repitió una vez más. Las PSM lavadas se resuspendieron en sacarosa 250 mM y se determinó proteína por el método de Biuret (Gornall y col., 1949) para ajustarlas a una concentración final de 40-50 mg/ml. Las PSM se utilizaron inmediatamente o se almacenaron a -70 °C. Las PSM-MgATP se obtienen con un alto grado de acoplamiento y una actividad hidrolítica baja (0.2-0.5  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ), debido al alto contenido de proteína inhibidora endógena.

## PURIFICACION DEL COMPLEJO NATIVO " F<sub>1</sub>I "

Para la purificación de este complejo se utilizaron partículas submitocondriales MgATP que tienen alto contenido de proteína inhibidora. Para esto, seguimos la técnica descrita por Feinstein y Moudrianakis en 1984 y modificada en el laboratorio como se describe a continuación. Todo el procedimiento es a 4 °C.

- 1.- Las PSM-MgATP se resuspendieron a una concentración de 10 mg proteína/ml en sacarosa 250 mM, MES-TRIS 10 mM, KCl 100 mM, pH 6.8.
- 2.- Se centrifugaron a 105,000 x g durante 30 minutos a 4 °C y se descartó el sobrenadante.
- 3.- El precipitado se resuspendió en sacarosa 250 mM a 10 mg/ml y se sonicó a 70 watts durante 30 minutos a 0-15 °C.
- 4.- Al sonicado se le adicionó MES a una concentración final de 10 mM a pH 6.8 y se centrifugó a 105,000 x g por 30 min.
- 5.- El precipitado de la centrifugación se sometió a una segunda extracción de F<sub>1</sub>I. A ambos sobrenadantes que son un extracto crudo de F<sub>1</sub>I, se les adiciona ADP a una concentración final de 0.1mM.
- 6.- Los sobrenadantes de la 1<sup>a</sup> y 2<sup>a</sup> extracción se recentrifugaron a 105,000 x g durante 90 minutos a 4 °C . Esta centrifugación elimina restos de PSM.
- 7.- El extracto crudo de F<sub>1</sub>I se pasó a través de una columna de afinidad de 1.5 x 7 cm Sefarosa-Hexilamonio, equilibrada previamente con sacarosa 250 mM, MES-TRIS 10 mM, ADP 0.1mM, pH 6.8. La columna con la enzima unida, se lavó con el mismo amortiguador para eliminar la unión inespecífica.

- 8.- La enzima se eluyó con el mismo amortiguador conteniendo KCl 500 mM.
- 9.- El pico de proteína detectado por Bradford se precipitó con sulfato de amonio sólido a una concentración final de 50 % y se incubó a 0 °C durante 20 minutos. La suspensión se centrifugó a 17,000 x g durante 10 minutos.
- 10.- El precipitado que contiene la enzima se resuspendió en el amortiguador de sacarosa 250 mM, MES 10 mM, ADP 0.1 mM, pH 6.8 y se centrifugó durante 10 minutos en la centrifuga Eppendorf para eliminar restos de proteína desnaturalizada.
- 11.- El sobrenadante es el complejo F<sub>1</sub>I nativo que se almacena en alícuotas pequeñas a -70 °C y es estable por lo menos 6 meses.
- El complejo F<sub>1</sub>I normalmente se obtiene con una actividad hidrolítica de 1-2  $\mu\text{Mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ .

#### ACTIVACION DEL COMPLEJO F<sub>1</sub>I.

ACTIVACION RAPIDA: El complejo F<sub>1</sub>I se diluyó a 0.1-1 mg de prot/ml con sacarosa 250 mM, HEPES-KOH 50 mM, ATP 10 mM, EDTA 1.5 mM, pH 8.0 y se incubó a 50 °C durante 70 minutos .

ACTIVACION LENTA: la enzima se diluyó en sacarosa 250 mM, MOPS-TRIS 50 mM, ATP 10 mM, EDTA 1.5 mM, pH 6.8 y se incubó a 45 °C durante 3.5 hrs.

Con éste tratamiento la enzima que originalmente tenía una actividad hidrolítica de 0-2  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ , alcanzó una actividad de 60-100  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ .

### OBTENCION DE F<sub>1</sub> A PARTIR DE F<sub>1</sub>I.

El complejo F<sub>1</sub>I se colocó en condiciones de activación y al final de ésta se eliminó la proteína inhibidora libre. Para esto se utilizaron dos técnicas diferentes:

#### A) Precipitación con sulfato de amonio.

La mezcla de activación se precipitó con sulfato de amonio sólido a una concentración final de 50 %. La suspensión se incubó a 0 °C durante 20 minutos y se centrifugó a temperatura ambiente en una centrifuga clinica durante 10 minutos. El precipitado que contiene la F<sub>1</sub> se resuspendió en el amortiguador deseado y se filtró por una columna de Penefsky (1977) de Sephadex G-50 equilibrada en el mismo amortiguador para eliminar el sulfato de amonio.

#### B) Filtración directa por columnas de Penefsky.

La mezcla de activación se filtró por una columna de Penefsky (1977) montada con Sepharose 6B, y equilibrada previamente con el amortiguador deseado.

### PREPARACION DE PARTICULAS SUBMITOCONDRIALES KLEIN ( *psm-Klein* )

La PSM-Klein se prepararon siguiendo esencialmente el método descrito por Klein y col., en 1986. Para esto se utilizaron mitocondrias ligeras de corazón de res (Löw y Vallin 1963).

Las mitocondrias se resuspendieron a 20 mg de prot/ml en sacarosa 250 mM, KCl 125 mM, EDTA 2 mM, TRIS-SO<sub>4</sub> 30 mM, pH 8,0, y se sonicaron en baño de hielo a 70 watts durante 3 min. por cada

10 ml de volúmen. El sonicado se centrifugó a 17,000 x g durante 15 min. a 4 °C. El sobrenadante, que contiene las PSM, se incubó a 37 °C durante 1hr. Al final de la incubación, la suspensión se centrifugó a 105,000 x g durante 30 min. a 25 °C. El sobrenadante de ésta centrifugación, contiene un extracto crudo de PI que puede purificarse posteriormente siguiendo el método de Horstman y Racker (1970). El precipitado contiene las PSM-Klein, las cuales se resuspendieron en el volúmen original de sacarosa 250 mM y se centrifugaron a 105,000 x g durante 30 min. a 4 °C. Este paso se repitió una vez para lavar las PSM y el precipitado final se resuspendió a 40-50 mg de prot/ml de sacarosa 250 mM. Las PSM se usaron inmediatamente o se almacenaron a -70 °C con una pérdida mínima de actividad hidrolítica en aproximadamente 6 meses. Las PSM-Klein se obtienen con una actividad hidrolítica alta de 5-10  $\mu\text{Moles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  debido a que carecen de proteína inhibidora.

*PURIFICACION DE LA  $H^+$ -ATPasa SOLUBLE ( $F_1$ ) DE MITOCONDRIAS DE  
CORAZON DE RES*

Existen diferentes técnicas para la purificación del complejo  $F_1$  soluble, la empleada en éste trabajo es una modificación de otras 3 ya reportadas (Klein y col., 1982; Knowles y Penefsky, 1972; Tuena y Gómez-Puyou, 1977). Dado que la temperatura óptima para la  $F_1$  es de 25 °C, todo el procedimiento de purificación se llevó a cabo a temperatura ambiente, a menos que se indique lo contrario.

- 1.- Se descongeló 1 gr de proteína de PSM-Klein a 30 °C y resuspendió a 30 mg de prot/ml en medio de ATP (sacarosa 250 mM, ATP 2 mM, EDTA 2 mM, TRIS-SO<sub>4</sub> 50 mM, pH 8.0). Se ajustó el pH de la suspensión a 9.2 con NH<sub>4</sub>OH 1 N.
- 2.- Se incubó a 25 °C durante toda la noche o a 37 °C por 3 hrs. Al final de la incubación se reajustó el pH de la suspensión a 9.2.
- 3.- Se sonicó a 70 watts durante 30 min. a 40-45 °C.
- 4.- La suspensión se centrifugó a 105,000 x g durante 90 min. y se descartó el precipitado que corresponde a PSM depletadas de F<sub>1</sub>.
- 5.- El sobrenadante que es un extracto crudo de F<sub>1</sub>, se pasó por una columna de 1.5 x 7 cm de Sefarosa-Hexilamonio preequilibrada con medio de ATP.
- 6.- La columna se lavó con 75 ml de medio de ATP para eliminar la unión inespecífica de proteínas. Posteriormente la enzima se eluyó con medio de ATP que contenía KCl 500 mM y se colectaron 15 fracciones de 3 ml.
- 7.- Se determinó la actividad hidrolítica con 1 µl de cada fracción y se juntaron las fracciones que mostraron actividad.
- 8.- A las fracciones en las que se encontró actividad se añadió sulfato de amonio sólido al 50 % de concentración final y se incubaron en baño de hielo durante 20 min.
- 9.- Al final de la incubación se centrifugó a 26,000 x g durante 10 min. a 25 °C.
- 10.- El precipitado se resuspendió en 0.5 ml de medio de ATP pH 8.0 y se centrifugó en una centrifuga Eppendorf durante 15 min para descartar el precipitado formado por proteínas desnaturalizadas. El sobrenadante contiene la F<sub>1</sub> que se

reprecipitó con sulfato de amonio sólido al 50 % y se almacenó a 4 °C.

La actividad hidrolítica de la F<sub>1</sub> se midió espectrofotométricamente con 1 µl de la suspensión determinando la proteína por el método de Bradford (1976) en el cual no interfiere el sulfato de amonio.

Antes de emplear la enzima se eliminó el sulfato de amonio, centrifugando en una centrifuga Eppendorf durante 10 min. El precipitado (F<sub>1</sub>) se resuspendió en el amortiguador adecuado para el experimento y se filtró por una columna de Penefsky (1977) equilibrada en el mismo medio.

#### *PURIFICACION DE PROTEINA INHIBIDORA ( PI ) DE LA H<sup>+</sup>-ATPasa DE MITOCONDRIAS DE CORAZON DE RES*

La técnica usada en éste trabajo para la purificación de la PI, fué descrita por Klein y col., en 1982 y tiene la ventaja de que del mismo lote de mitocondrias se pueden preparar F<sub>1</sub> soluble y PI.

Para la purificación de la PI se partió del sobrenadante de 105,000 x g después de la incubación de las PSM-Klein a 37 °C (ver Preparación de PSM-Klein), que es un extracto crudo de PI.

- 1.- El extracto crudo de la PI se precipitó con sulfato de amonio sólido al 50 % y se incubó a 0 °C durante 20 min. con agitación constante. La suspensión se centrifugó a 17,000 x g durante 10 min. a 4 °C y se descartó el precipitado.
- 2.- El sobrenadante del paso anterior se precipitó con sulfato de

amonio sólido al 35 % y se incubó y recentrifugó siguiendo el mismo procedimiento del paso 1.

3.- El precipitado que contiene la PI, se puede almacenar a -70 °C, o continuar con la purificación, se resuspende en 7 ml de sacarosa 250 mM/g de mitocondrias originales.

4.- Se precipitó la suspensión de PI adicionando 0.86 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 50 % por cada 10 ml de suspensión, y centrifugando rápidamente a 26,000 x g durante 5 min. a 4 °C.

5.- Se resuspendió rápidamente el precipitado en 1 ml de agua a 0 °C por gramo original de mitocondrias y se ajustó el pH a 5.0 con KOH 1N centrifugando nuevamente a 26,000 x g; se descarta el precipitado.

6.- Se reajustó el pH del sobrenadante a 7.4 con KOH y se midió el volumen final para llevar a 250 mM con sacarosa sólida.

7.- Medir la conductividad de la solución y añadir el sulfato de amonio sólido necesario para tener una conductividad igual a una solución de sulfato de amonio 0.83 M. Para esto se hace una curva de calibración con sulfato de amonio.

8.- La PI se precipitó con 1.7 ml de etanol a 4 °C por ml de volumen y se centrifugó en tubos de vidrio a 26,000 x g durante 5 min para descartar el sobrenadante.

9.-El precipitado que contiene la PI se resuspendió en 0.8 ml de sacarosa 250 mM, TRIS-SO<sub>4</sub> 10 mM, pH 7.4 por g de mitocondrias y se centrifugó nuevamente para descartar el precipitado.

10.- Se midió la conductividad del extracto y se ajustó nuevamente a 0.83 M de sulfato de amonio como en el paso 7.

11.- Se repitió la precipitación con etanol a 4 °C como se indica en el paso 8.

12.- El precipitado que contiene la PI, se resuspendió en 0.7 ml del amortiguador empleado en el paso 9 por cada g de mitocondrias originales y se pasó a un matraz Kitasato. Este se conectó a una bomba de vacío y se dejó con agitación constante a temperatura ambiente durante 2 hrs, para remover el etanol.

13.- El extracto de PI se sumergió en un baño maría a 90 °C durante 3 min. con agitación constante. Se dejó enfriar para centrifugarse a 26,000 x g por 5 min. El sobrenadante contiene la PI purificada.

Generalmente se determinó proteína con 10 y 20 µl de PI por el método de Bradford (1976) y se almacenó en alícuotas a -70 °C. La actividad de la PI se probó en PSM-Klein que carecen de PI. Las psp-Klein se resuspendieron a 1 mg de prot/ml de sacarosa 250 mM, MOPS-TRIS 10 mM, MgATP 2 mM, pH 6.8. A ésta suspensión de PSM se les adicionó de 0.1-1.0 µg de PI/mg de PSM y se incubaron a 30 °C durante 20 min. para medir actividad hidrolítica (Pullman y col., 1960).

#### *RECONSTITUCION DE F<sub>1</sub> CON PROTEINA INHIBIDORA (PI) EXOGENA*

La F<sub>1</sub>-ATPasa soluble se incubó con PI purificada (0.1 µg PI/µg F<sub>1</sub>) en sacarosa 250 mM, MOPS-HCl 10 mM, MgATP 2 mM, pH 6.8, a 30 °C durante 20-30 min (Klein y col., 1980). El exceso de PI, se eliminó utilizando cualquiera de los metodos mencionados para eliminar PI libre.

## COLUMNA DE PENESKY

Esta técnica de filtración-centrifugación, fué descrita originalmente por Penefsky (1977) y se utiliza principalmente para desalinizar mezclas de proteínas. Las columnas de Penefsky, son jeringas desechables de plástico de 1 ml, con un poco de lana de vidrio en el fondo para impedir la salida del sephadex. Estas se colocan dentro de un tubo de vidrio y se cargan con Sephadex G-50 previamente hidratado. A continuación se equilibran con 3 ml del amortiguador adecuado para el experimento. Ya equilibrada, la columna se centrifuga a 3000 rpm durante 1 min. en una centrifuga clínica a temperatura ambiente. La columna se transfiere a otro tubo, y se añade la solución de enzima, y se centrifuga exactamente en las mismas condiciones de la primera centrifugación. El eluado contiene la enzima en el amortiguador deseado. Las sales, nucleótidos y proteínas de bajo peso molecular, se retienen en la columna.

### INHIBICION DE F<sub>1</sub> Y F<sub>1</sub>I POR DICICLOHEXILCARBODIIMIDA (DCCD) Y FIJACION DE [<sup>14</sup>C]DCCD.

El complejo F<sub>1</sub> o F<sub>1</sub>I, se filtró a través de una columna de Penefsky preequilibrada con sacarosa 250 mM, MOPS-TRIS 50 mM, ATP 4 mM, EDTA 2 mM, pH 7.0 y se incubó a 24 °C en presencia de 150 µM de DCCD frío ó [<sup>14</sup>C]DCCD. A los tiempos deseados la mezcla de incubación se filtró por 2 columnas de Penefsky para eliminar el DCCD libre.

## ENTRECRUZAMIENTO CON N-(CETOXI-CARBONIL)-2-ETOXIDIHIDROQUINOLINA

( EEDQ )

El entrecruzamiento se efectuó incubando la enzima en sacarosa 250 mM, MOPS-HCl 10 mM, pH 6.8, MgATP 2 mM y EEDQ 2mM a 30 °C durante 20 min. La reacción se detuvo ya sea añadiendo SDS a una concentración final de 1 %, ó filtrando por una columna de Penefsky (1977) ó diluyendo los grupos amino con TRIS 500 mM.

## MARCAJE DE F<sub>1</sub> O F<sub>1</sub> CON 7-CLORO-4-NITROBENZOFURAZANO ( Nbf ).

Para marcar la F<sub>1</sub>-ATPasa con Nbf se usó el procedimiento ya descrito (Ferguson y Radda, 1975a). La enzima se incubó en sacarosa 250 mM, TEA 50 mM, ATP 4 mM, EDTA 2 mM, pH 7.4, en presencia de Nbf 100 µM en la oscuridad y a 25 °C durante 90 min. En éstas condiciones el Nbf reacciona con tirosina β311 de una subunidad β del complejo F<sub>1</sub> o F<sub>1</sub>I y la actividad hidrolítica se inhibe 95 %. La inhibición se puede revertir con DTT. Al final de la incubación la enzima inhibida se filtra por una columna de Penefsky (1977) para eliminar el Nbf libre. Si se desea marcar la enzima en condiciones que presente fluorescencia, la columna de Penefsky se debe equilibrar con el mismo amortiguador usado arriba, pero a pH 9.0. La incubación se continúa en la luz y a la misma temperatura por 17 hrs. En éste caso el Nbf que estaba en la tirosina 311 se transfiere a la lisina 162 de una de las subunidades β de la enzima. En estas condiciones la actividad hidrolítica del complejo F<sub>1</sub>.N-Nbf no puede revertirse por DTT. Además el complejo es fluorescente (Ferguson y Radda, 1975b).

ELECTROFORESIS EN GEL

Para el análisis de las proteínas se usaron geles de poliacrilamida - dodecilsulfato de sodio (PA-SDS) como los descritos por Laemmli (1970), con un gel concentrador de 5 % y un gel separador de 13.5 % de acrilamida. Como marcadores de peso molecular se emplearon 7 proteínas diferentes de 66, 45, 36, 29, 24, 20 y 14,2 Kda (Dalton Mark VII-L, Sigma). Para separar específicamente las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del complejo F<sub>1</sub> se usaron geles ácidos (PA-Acido) con 12 % de acrilamida como los descritos por Amory (Amory y col., 1980). Para la identificación de las bandas de proteína, los geles se tificaron con Coomassie R-250 al 0.05 % disuelto en metanol 20 %, ácido acético 7 % y se destificaron en la misma solución sin el Coomassie. En el barrido de los geles se utilizó un espectrofotómetro Beckman DU-64.

METODO PARA LA EXTRACCION DE PROTEINAS RADIOACTIVAS  
DE GELES DESNATURALIZANTES.

Para extraer las proteínas radioactivas de los geles, los carriles se cortaron en fracciones de 0.2 cm. Cada fracción se incubó en viales conteniendo 0.4 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 % a 60 °C durante 6 hrs. Al final de la incubación se les adicionó a cada vial 5 ml de líquido de centelleo (Tritosol), y se contó la radioactividad en un contador Beckman LS-100C.

## METODO PARA LA DETECCION DE LA FLUORESCENCIA DE PROTEINAS

### SEPARADAS EN GELES

Los geles que contenían proteínas marcadas con fluorescencia, se colocaron en la oscuridad sobre un transiluminador de luz ultravioleta de onda larga y se fotografiaron las bandas fluorescentes.

### INMUNOTRANSFERENCIA DE PROTEINAS

La Inmunotransferencia de proteínas ["Western blotting" (Towbin y col., 1979)] es un método que se usa ampliamente, y que permite la identificación de una proteína específica en una muestra compleja de proteínas. La importancia que ahora tiene la Inmunotransferencia se debe al resultado de la combinación de la separación de proteínas mediante geles de poliacrilamida, con métodos inmunoquímicos altamente específicos y sensibles. Aunque existen muchas variantes de la técnica de inmunotransferencia, siempre consiste de 3 pasos básicos:

- 1) Separación electroforética de la muestra de proteínas en un gel.
- 2) Transferencia de las proteínas separadas a papel de nitrocelulosa.
- 3) Inmunodetección de proteínas específicas en la membrana de nitrocelulosa.

### TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A PAPEL DE NITROCELULOSA ( NC )

Después de separar las proteínas en un gel de poliacrilamida-SDS, éste se incubó en amortiguador de transferencia (TRIS 125 mM, glicina 75 mM, SDS 0.1%, metanol 20%) durante 30 min. Al final de la incubación, se obtiene una réplica de las proteínas separadas en el gel transfiriéndolas electroforéticamente a un papel de nitrocelulosa ( NC ). Para esto se sumergieron en el amortiguador de corrida : 4 hojas de papel filtro Wattman No. 3, 8 franelas dobles y 2 hojas de papel de NC. El papel filtro y el papel de NC deben ser 0.5 cm más grandes que el gel. Sobre la placa metálica del cátodo se colocaron sucesivamente: 4 franelas, 2 hojas de papel filtro, el gel de poliacrilamida, 2 hojas de NC, 2 hojas de papel filtro, 4 franelas y finalmente la placa metálica del electrodo negativo (ánodo) (Towbin y col., 1979).. Se debe evitar la presencia de burbujas entre el gel y la hoja de NC. El proceso de transferencia se efectuó aplicando una corriente de 127 Volts durante 60 min. Para verificar que realmente se transfirieron las proteínas al papel de nitrocelulosa, se pueden hacer 3 pruebas: a) Tefir el gel con azul de coomassie, b) Tefir con tinta china una tira del papel de nitrocelulosa, ó c) Revelar una proteína específica con anticuerpos contra ella. Si después de la transferencia la hoja de NC no se usa para inmunodetección, ésta se puede almacenar a -20 °C para pruebas posteriores.

#### OBTENCION DE ANTICUERPOS ANTI-PI Y ANTI- $\beta$ .

Para la obtención de anticuerpos anti-PI y anti- $\beta$ , se usaron las proteínas purificadas o bien extraídas de geles de SDS. Para separar la PI se usaron geles de PA-SDS (Laemmli, 1970) y para la subunidad  $\beta$  geles Acidos (Amory y col., 1980). Se cortaron las bandas correspondientes a estas subunidades después de teñir los geles con coomassie R-250, y en ambos casos se homogeneizaron en 1 ml de adyuvante completo de Freund para inyectarse a conejos intradérmicamente. Los conejos se inyectaron 3 veces (25, 5 y 5  $\mu$ g de proteína) con intervalos de 8 días y a los 8 días de la tercera inyección se sangraron por punción cardiaca para obtener el suero el cual se almacenó en alícuotas a  $-70^{\circ}\text{C}$ . La segunda y la tercera inyección se hicieron con la proteína resuspendida en PBS sin adyuvante.

#### REVELADO DE PI O DE $\beta$ DE $F_1\text{-ATPase}$ CON SUEROS ANTI-PI O ANTI- $\beta$ .

Se incubó el papel de nitrocelulosa, que contiene las proteínas transferidas del gel, en amortiguador salino de fosfatos: NaCl 150 mM, Na-Pi 10 mM, pH 7.4 (PBS)-Tween 0.1 %, durante 30 min. a temperatura ambiente, esto hace innecesario el bloqueo de sitios inespecíficos. Posteriormente se adicionó suero inmune Anti-PI o Anti- $\beta$  entre 0.1 y 1 %, dejando a temperatura ambiente por dos horas. Se lavó 6 veces con PBS-Tween 0.1 % durante 10 min. y se reveló durante 2 hrs. con una solución de proteína A-oro. Se continuó con 2 lavados en PBS durante 5 min., uno en PBS-Tween 0.1 % por 10 min. y finalmente dos con PBS durante otros 5 min. cada uno.

## RESULTADOS

### I.- CARACTERISTICAS CINETICAS DEL COMPLEJO F<sub>1</sub>I.

La H<sup>+</sup>-ATPasa soluble o membranal, se puede obtener con diferentes grados de actividad hidrolítica dependiendo del método usado para su preparación. En 1975 Feinstein y Moudrianakis, describieron un método para purificar el complejo F<sub>1</sub>I soluble de mitocondrias de corazón de res. Esta enzima, se obtiene con una actividad hidrolítica de únicamente 1-2  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  debido a la presencia de la proteína inhibidora (Pullman y Monroy 1963). La actividad de éste complejo puede alcanzar el valor máximo teórico (activación) si se incuba en presencia de ATP a temperaturas de 30-50 °C (Feinstein y Moudrianakis 1984). La activación del complejo F<sub>1</sub>I soluble al igual que la de las psm-MgATP (Beltrán y col 1984), es independiente del amortiguador que se use (fig. 6A), y dependiente de la temperatura y del pH. Trabajos previos de nuestro laboratorio (Beltrán y col. 1984) mostraron que el proceso de activación del complejo F<sub>1</sub>I particulado involucra la salida de la proteína inhibidora (PI) de su sitio de unión. En la fig. 7A se muestra que el aumento en la actividad hidrolítica, no correlaciona directamente con la liberación de la proteína inhibidora al sobrenadante. Como se puede observar la enzima logra alcanzar hasta aproximadamente un 20 % de su actividad hidrolítica máxima sin pérdida ostensible del contenido de proteína inhibidora. Cuando la enzima rebasa el 20 % de actividad la PI se empieza a liberar al sobrenadante, hasta llegar a 100 % de actividad hidrolítica y 0 % de PI (fig. 7B). Estos resultados,

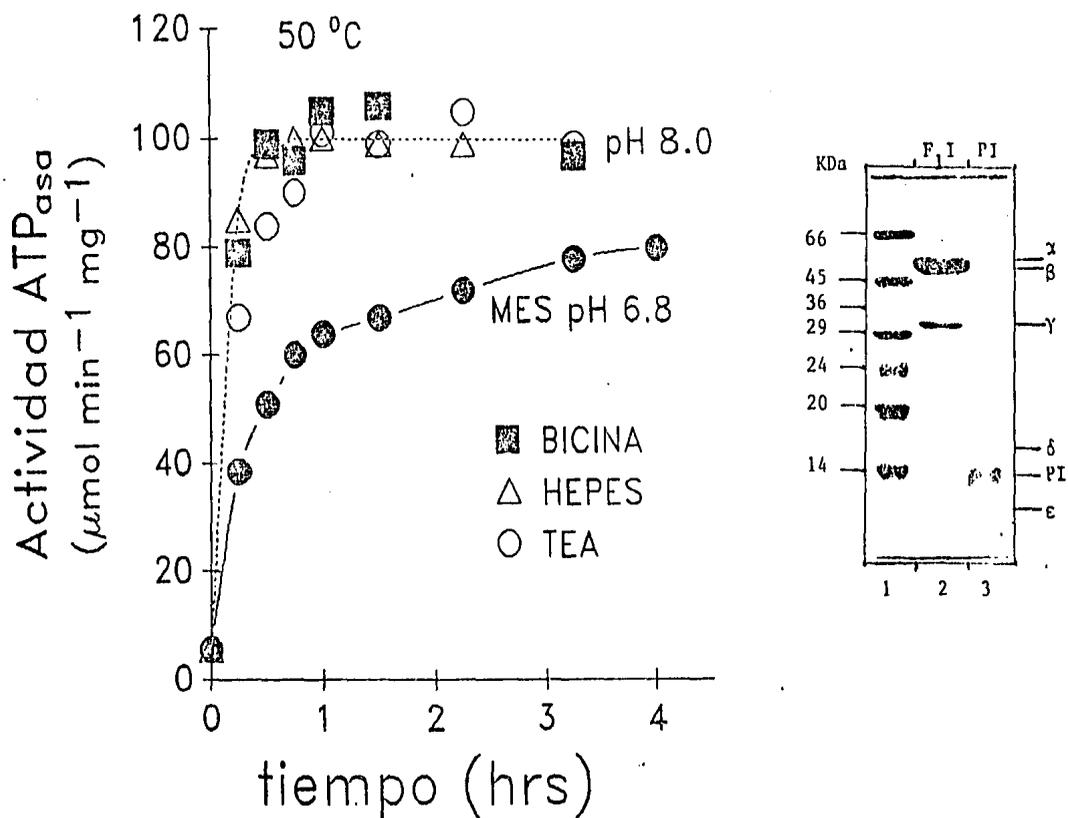


Fig. 6.- Activación del complejo nativo F<sub>1</sub>I en presencia de diferentes Amortiguadores. La F<sub>1</sub>I (0.24 mg/ml) se incubó a 50 °C en sacarosa 250 mM, Amortiguador 50 mM, ATP 10 mM, EDTA 1.5 mM, pH 8.0 (Δ, O, □) ó pH 6.8 (●). A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para medir actividad hidrolítica espectrofotométricamente. Los Amortiguadores fueron: Mes (●), Bicina (□), Hepes (Δ), y TEA (O). El gel de PA-SDS al 13.5 % muestra: 1) marcadores de P.M. (Dalton Mark VII - Sigma); 2) 25 μg de F<sub>1</sub>I y 3) 5 μg de PI.

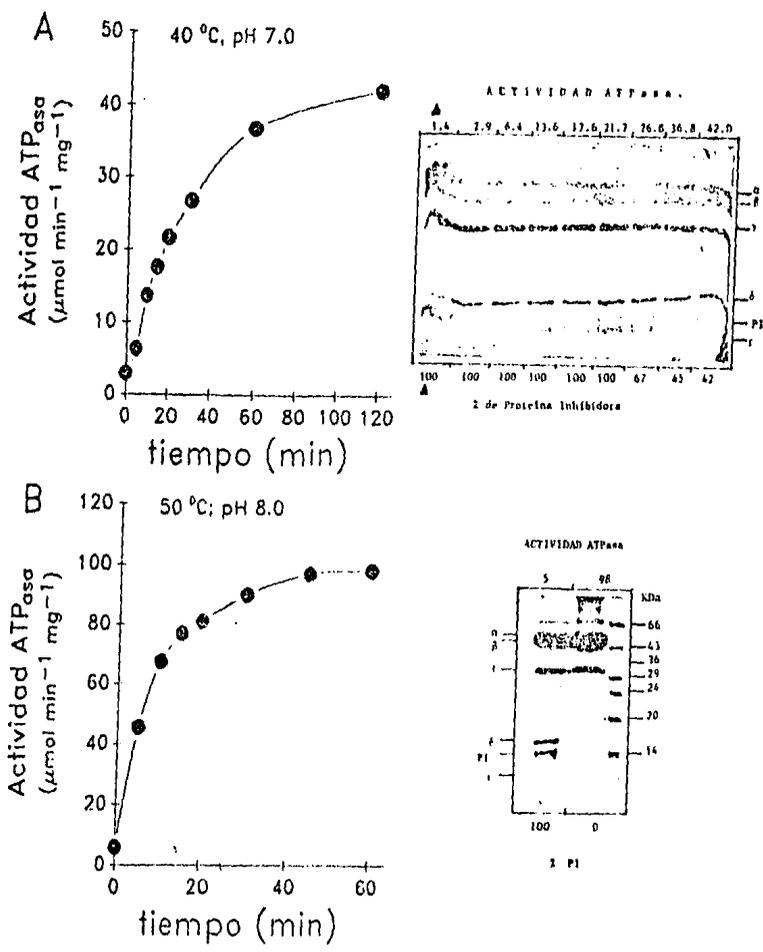


Fig. 7.- Liberación de la PI del complejo F<sub>1</sub>I soluble durante la Activación. A) La F<sub>1</sub>I (8.6 mg/ml) se incubó a 40 °C en sacarosa 250 mM, HEPES-KOH 50 mM, ATP 10 mM, EDTA 1.5 mM, pH 7.0. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas de 100 μl para eliminar la PI libre por filtración en una columna de Penefsky de Sepharosa 6B. A los eluados de la columna se les determinó actividad hidrolítica espectrofotométricamente y se los separó en un gel de PA-SDS. Después de tefir y secar el gel, se hicieron barridos densitométricos de los diferentes carriles, y se calculó por área, el contenido de PI. El primer carril del gel (A) corresponde al t<sub>0</sub> de la enzima sin filtrar. B) Curva de activación del complejo F<sub>1</sub>I a 50 °C y pH 8.0. La eliminación de la PI libre se hizo igual que en (A).

podrían sugerir la existencia de un sitio no inhibitorio para la PI, y que probablemente éste sitio se encuentra en la superficie de la enzima (Tuena de Gómez-Poyou y col., 1983). La existencia de un sitio no inhibitorio para la PI se ha propuesto tanto en partículas submitocondriales de MgATP (Van de Stadt y col. 1973; Dreyfus y col 1981; Rouslin, 1987) como en la enzima soluble de *E. coli* (Lötscher y col. 1984b).

## II.-FORMACION DEL DIMERO " $\beta$ .PI" POR ENTRECruzAMIENTO CON EEDQ

### A) REACTIVIDAD DEL EEDQ CON LA $F_1$ Y CON LA $F_1I$ .

El N-(etoxicarbonil)-2-etoxi 1,2-dihidroquinolina (EEDQ) es una carbodiimida soluble en agua que inhibe la actividad hidrolítica de la  $F_1$ -ATPasa (Pougeois y col. 1978; Pougeois, 1983). El EEDQ es un reactivo activador de grupos carboxilo que actúa como reactivo entrecruzador de "sin grupo espaciador" catalizando la formación de enlaces amida entre grupos carboxilo y amino cercanos, formando así uniones covalentes inter o intramoleculares (Belleau y Malek, 1968).

Ambos complejos  $F_1I$  y  $F_1$  (fig. B), se inhiben en su actividad hidrolítica por el EEDQ, siendo el complejo  $F_1I$  ligeramente más resistente. El 50 % de inhibición de la  $F_1$  se obtiene con 0.25 mM de EEDQ en 5 min de incubación, mientras que para obtener el mismo grado de inhibición en las mismas condiciones, la  $F_1I$  requiere de una concentración de EEDQ de 0.5 mM. Siguiendo el curso temporal de la inhibición del complejo  $F_1I$  por EEDQ (fig. 9), se observó que la actividad hidrolítica se inhibe 100 % en 45 min con 1 mM de EEDQ y en 20 min con 2 mM. Durante el mismo tiempo de incubación,

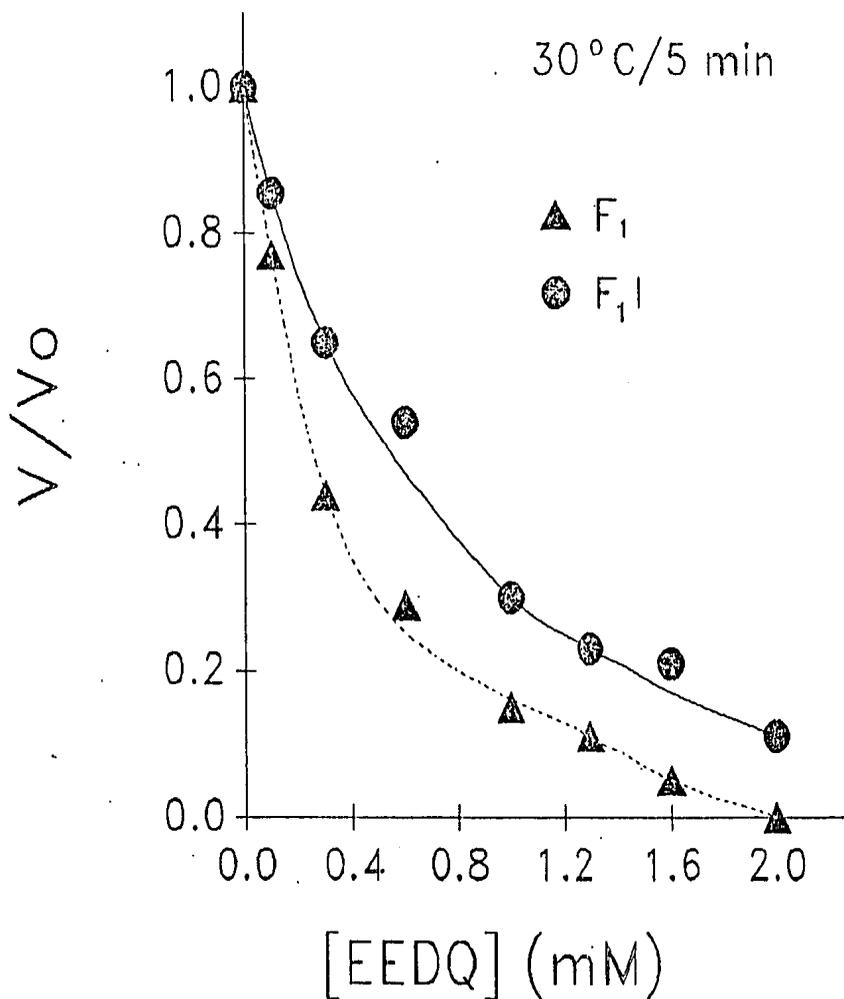


Fig. B.- Inhibición de la actividad hidrolítica de  $F_1$  y  $F_{1I}$  por diferentes concentraciones de EEDQ. Los complejos  $F_1$  y  $F_{1I}$  (1.6 mg/ml) se incubaron en Sac 250 mM, MOPS-HCl 10 mM, pH 6.8, en presencia de diferentes concentraciones de EEDQ (disuelto en etanol) a 30 °C durante 5 min. Al final de la incubación, se tomaron alícuotas para medir actividad hidrolítica de la  $F_1$  y la  $F_{1I}$ . El resto se filtró por una columna de Penefsky de Sephadex G-50 equilibrada con Sac 250 mM, Mes-Tris 10 mM, ADP 0.1 mM, pH 6.8 para eliminar el EEDQ libre. El eluado en cada punto pasó a condiciones de activación en amortiguador de HEPES (ver fig. 6 métodos), a 50 °C y pH 8.0 durante 60 min. para expresar la actividad al máximo. La actividad de la  $F_1$  y la del complejo  $F_{1I}$ -activado fué de 60 y 75  $\mu\text{Mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  respectivamente.

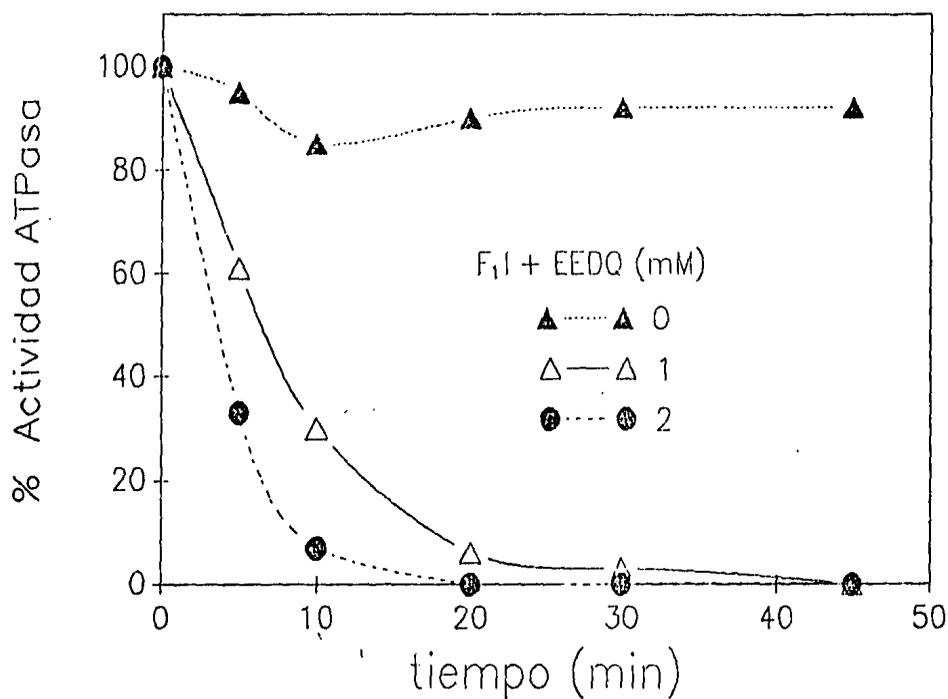


Fig. 9.- *Curso temporal de la inhibición de F<sub>1</sub>I por EEDQ.* El complejo F<sub>1</sub>I, se incubó a 2 mg/ml en Sac 250 mM, MOPS-HCl 10 mM, pH 6.8 en presencia de 1 y 2 mM de EEDQ (disuelto en 100 % de etanol) y a 30 °C por diferentes tiempos. Al final de la incubación el EEDQ libre se eliminó por filtración en columna de Penefsky y el eluado se pasó a condiciones de activación como en la fig. 8. La concentración final de etanol en la mezcla de incubación, siempre es menor de 2 %, que no altera la actividad.

el control sin EEDQ permaneció sin cambio.

Con el objeto de prevenir la activación del complejo  $F_1I$  durante el tiempo que requería la inhibición con el EEDQ a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se adicionó MgATP 2 mM al medio de incubación. Sabemos que su hidrólisis, favorece la fijación de la proteína inhibidora al sitio inhibitorio (Gómez-Fernandez y Harris, 1978). En la fig. 10 se ilustra la inhibición de la actividad en estas condiciones, observándose que la velocidad de inhibición del complejo  $F_1I$  por el EEDQ, no se modificó por la presencia del MgATP.

El patrón electroforético del complejo  $F_1I$  expuesto a 2 mM EEDQ durante 20 min, se muestra en la fig. 11. El complejo entrecruzado, comparado con el control sin entrecruzar, presenta disminución de las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ , desaparición de la PI y aparición de complejos entrecruzados de pesos moleculares mayores que  $\alpha$  y  $\beta$ . Entre los complejos entrecruzados que aparecen, cabe hacer notar la presencia de la banda "X" con peso molecular aproximado de 66 kDa. Esta banda es característica del complejo  $F_1I$  y no aparece cuando la  $F_1$  se expone al reactivo entrecruzador (no mostrado).

Sabemos que el peso molecular de las subunidades de la  $F_1$  es de 54, 50, 33, 17.5, y 5.7 kDa para  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ , respectivamente (Penefsky, 1979), y que la PI muestra un peso molecular de 14 a 15 kDa en geles de PA-SDS (Pullman y Manroy, 1963; fig. 11). Calculando por suma de pesos moleculares qué subunidades están formando el complejo "X" al exponer la  $F_1I$  al reactivo entrecruzador EEDQ, encontramos que los dímeros  $\alpha PI$  (69 kDa),  $\beta PI$  (65 kDa),  $\beta\delta$  (67.5 kDa) y  $\gamma\gamma$  (66 kDa), serían los posibles candidatos para formar la banda de 66 kDa, que es el peso

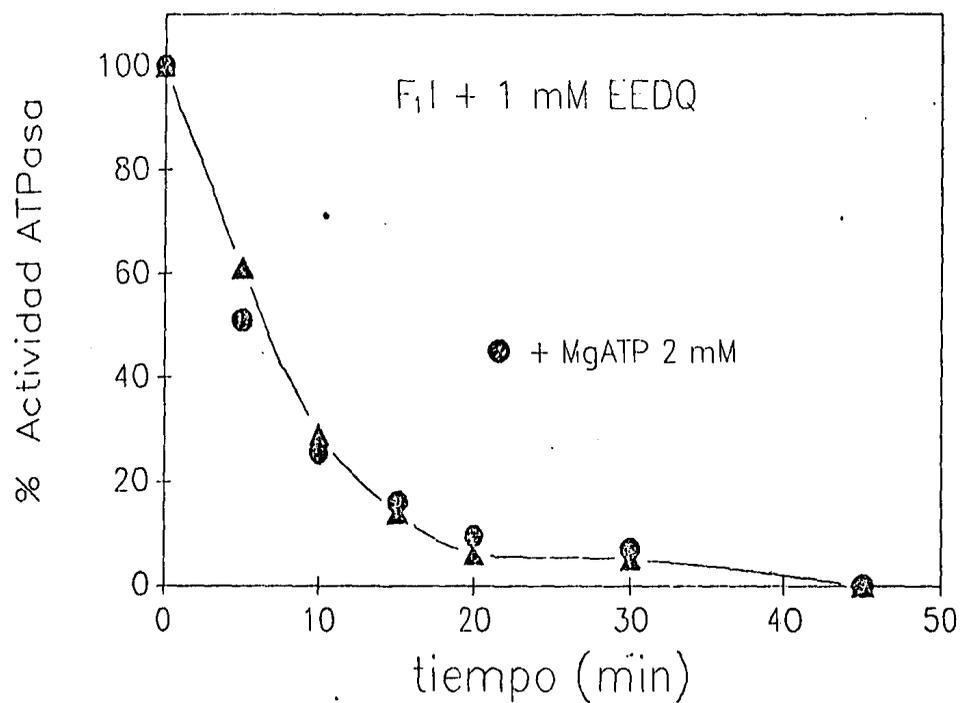


Fig. 10.- Efecto de la presencia de Mg-ATP 2 mM en la inhibición del complejo F<sub>1</sub>I por EEDQ. El complejo F<sub>1</sub>I se incubó a 2 mg/ml en presencia de de EEDQ 1 mM y Mg-ATP 2 mM en las mismas condiciones de la fig. 8. Los triángulos llenos ( ) representan al complejo F<sub>1</sub>I incubado con EEDQ en ausencia de Mg-ATP.

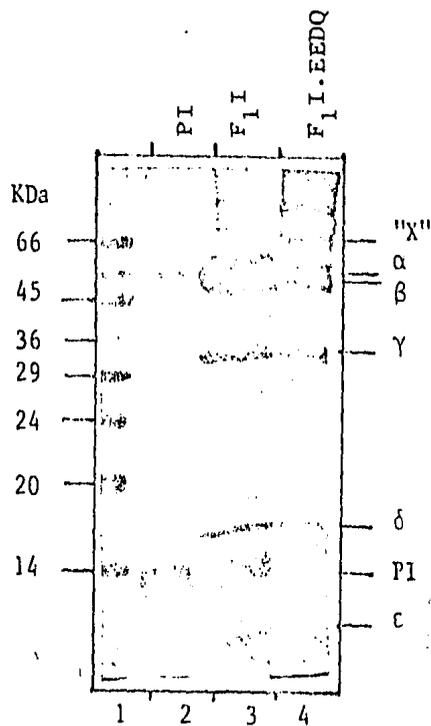


Fig. 11.-Patrón electroforético de los complejos  $F_1I$  y  $F_1I$ -entrecruzado con EEDQ. Gel de PA-SDS al 13.5 %. La  $F_1I$  se incubó como se indica en la fig. 9 a 30 °C/20 min. con 2 mM de Mg-ATP en ausencia y presencia de EEDQ 2 mM. Carril 1) marcadores de P.M. (Dalton Mark-VII Sigma - ver métodos); 2) 5 µg de PI, 3) 40 µg de  $F_1I$  y 4) 40 µg de  $F_1I$ -entrecruzado.

molecular de "X". De estos, podemos eliminar el dímero  $\gamma\gamma$ , debido a que el reactivo entrecruzador que estamos usando no tiene "brazo espaciador". Sin embargo, quedaban por dilucidar los componentes de la banda de 66 kDa de las tres opciones restantes.

Con el fin de confirmar los componentes de la banda de 66 kDa, se hizo el experimento de la figura 12, que muestra el curso temporal de la inhibición de la hidrólisis del complejo F<sub>1</sub>I por 1 mM de EEDQ. En cada punto de la curva de actividad, se tomó una alícuota de la mezcla de incubación se filtró en columnas de Penefsky para parar la reacción y eliminar el EEDQ libre. Cada una de las alícuotas se separaron en un gel de PA-SDS el cual después de teñido y seco se le hizo un barrido densitométrico del que se calculó el área de la PI y de la banda "X". Como se puede observar en la fig. 12, existe una correlación temporal entre la inhibición de la actividad hidrolítica, la disminución de la PI y la aparición de la banda "X". Esto sugiere que la proteína inhibidora podría ser uno de los componentes de la banda de 66 kDa. En este experimento vemos que la velocidad de aparición del complejo entrecruzado "X" es mucho más lenta que la velocidad de inactivación. Este comportamiento es similar al obtenido cuando la ECF<sub>1</sub> se expone a entrecruzamiento por EEDQ (Satre y col., 1983), donde se ha sugerido que la inactivación de la ECF<sub>1</sub> no se debe al entrecruzamiento de la enzima, sino a la modificación de una de las tres subunidades  $\beta$  por EEDQ.

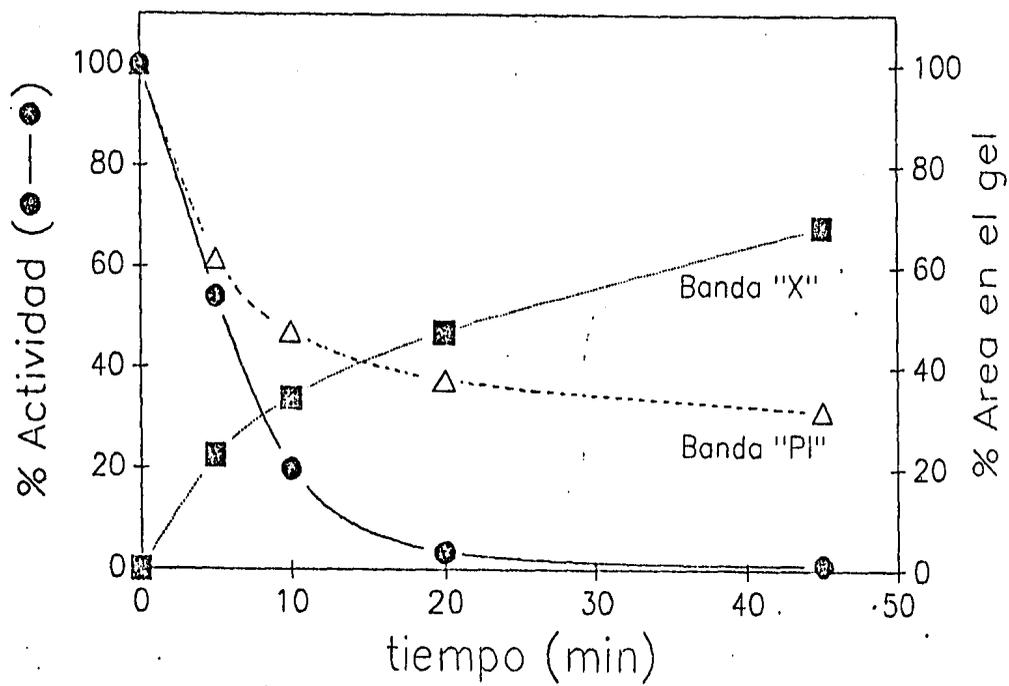


Fig. 12.- Curso temporal de la desaparición de la PI y aparición de la banda "X" durante el entrecruzamiento con EEDQ. El complejo F<sub>1</sub>I se incubó a 2 mg/ml con EEDQ 1 mM en presencia de Mg-ATP 2 mM. A los tiempos indicados se filtraron por columnas de Penefsky alícuotas de 100  $\mu$ l. Del eluido una parte se activó para expresar la actividad al máximo (ver fig. B) y 40  $\mu$ g de muestra de tres geles distintos, se separaron en un gel de PA-SDS. El gel teñido y seco se barrió densitométricamente a 560 nm para calcular el área de la banda "X" y de la banda de PI en cada punto. El 100 % de actividad en la gráfica corresponde a 75  $\mu$ Mol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>.

B) IDENTIFICACION DEL DIMERO  $\beta$ .PI FORMADO POR  
ENTRECruzAMIENTO DEL COMPLEJO F<sub>1</sub>I CON EEDQ.

1.- POR ANTICUERPOS ANTI-PI Y ANTI- $\beta$ .

Para la identificación de las subunidades que forman el complejo entrecruzado "X", se utilizaron anticuerpos contra la proteína inhibidora purificada, obtenidos como se describió en métodos. Los complejos F<sub>1</sub>I y F<sub>1</sub>I entrecruzado, se separaron en un gel PA-SDS y se transfirieron a un papel de nitrocelulosa (NC) mediante la técnica de Towbin y col. (1979). El papel de NC se incubó en presencia de anticuerpos anti-PI. La detección del complejo PI-anticuerpo en el papel de NC, se realizó haciendo reaccionar proteína A marcada con oro con la porción Fc de los anticuerpos unidos a la PI. Esta unión se manifiesta como una banda de color rosa. La fig. 13 muestra el análisis densitométrico de los complejos F<sub>1</sub>I (A), y F<sub>1</sub>I entrecruzado (B) y un esquema (A y B) de la reactividad de ambos complejos a los anticuerpos anti-PI. El esquema ilustra que la PI es una de las subunidades que forman parte del complejo "X", que se obtiene por entrecruzamiento de F<sub>1</sub>I. Este resultado descarta la posibilidad de que otras de las subunidades pequeñas estuvieran participando en la formación de la banda "X", y quedaba por aclarar si la otra subunidad que forma el complejo con la PI era la subunidad  $\alpha$  ó la  $\beta$ . Para esto, se repitió el experimento anterior usando anticuerpos contra la subunidad  $\beta$ . La fig. 13B muestra que la banda de 66 kDa formada por entrecruzamiento del complejo F<sub>1</sub>I con EEDQ, es un dímero que corresponde a la unión de  $\beta$  con la PI ( $\beta$ .PI). Estos resultados

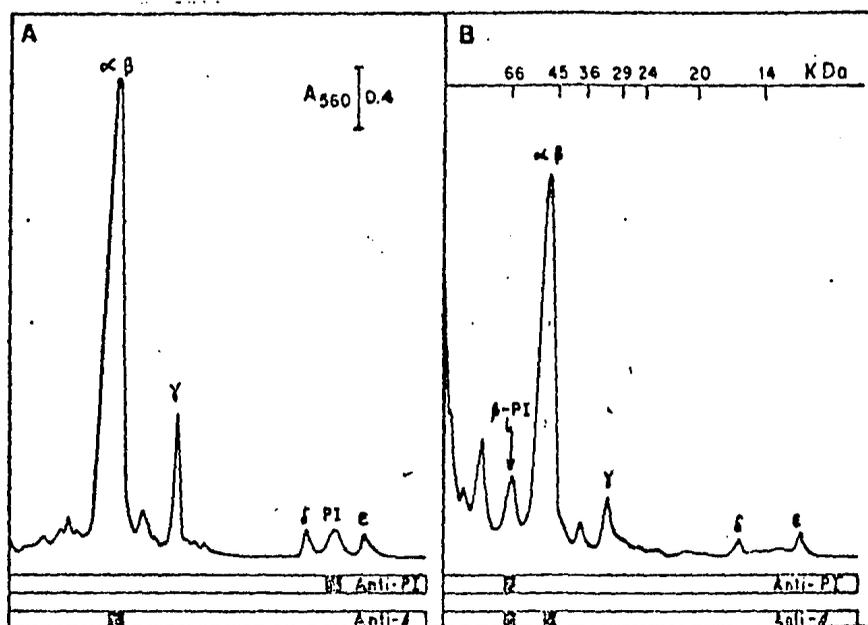


Fig. 13.- Inmunodetección de las subunidades  $\beta$  y PI en la banda de 66 KDa obtenidos por entrecruzamiento de la F<sub>1</sub>I. Los complejos F<sub>1</sub>I y F<sub>1</sub>I-entrecruzado (obtenido como en la fig. 11) se separaron en un gel de PA-SDS al 13.5 %. Posteriormente se transfirieron a un papel de NC (como se describe en métodos) el cual se hizo reaccionar con anticuerpos Anti-PI ó Anti- $\beta$ . Después de eliminar el Anticuerpo no unido específicamente, al papel de NC se incubó en presencia de proteína A marcada con oro que forma bandas de precipitación de color rosa en los sitios en que se encuentra la subunidad  $\beta$  ó la PI. (A) 35  $\mu$ g de F<sub>1</sub>I; (B) 50  $\mu$ g de F<sub>1</sub>I-entrecruzado.

indican que tanto la PI exógena (Klein y col., 1980), como la endógena, están en contacto con una de las subunidades  $\beta$ . Esto no descarta la posibilidad de que los resultados de experimentos con  $F_1$  reconstituida con PI exógena, puedan ser diferentes a los obtenidos con el complejo  $F_1I$  nativo.

## 2.- POR AUSENCIA DE MARCAJE CON [ $^{14}C$ ]-NEM.

Para descartar la posibilidad de que la subunidad  $\alpha$  estuviera formando parte de la banda "X" (fig. 14), el complejo  $F_1I$  entrecruzado se incubó con [ $^{14}C$ ]-NEM en presencia de SDS al 1 % (Klein y col., 1980), con el objeto de marcar los residuos -SH de las subunidades que los contienen:  $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\epsilon$  (Senior, 1973). El complejo  $F_1I$  entrecruzado y marcado con [ $^{14}C$ ]-NEM, se separó en un gel de PA-SDS y se fragmentó para extraer la marca de [ $^{14}C$ ]-NEM. La fig. 14 confirma que la banda "X" no contiene la subunidad  $\alpha$ .

## III.- REACTIVIDAD DEL COMPLEJO $F_1I$ NATIVO AL DCCD.

Por trabajos anteriores, sabemos que la actividad hidrolítica de la  $F_1$  soluble, se inhibe al unir un mol de DCCD (Pougeois y col., 1979) al glutámico 199 (Glu- $\beta$ 199) de una de las tres subunidades  $\beta$  del complejo (Esch y col. 1981). Dado que en la  $F_1I$  una de las subunidades  $\beta$  se encuentra interactuando con la PI, decidimos explorar si el dímero  $\beta$ .PI reaccionaba con el DCCD. El complejo  $F_1I$  se incubó en presencia de DCCD (fig. 15), y después de eliminar el DCCD libre por filtración en columna de Penefsky, se determinó la actividad hidrolítica basal y activada del

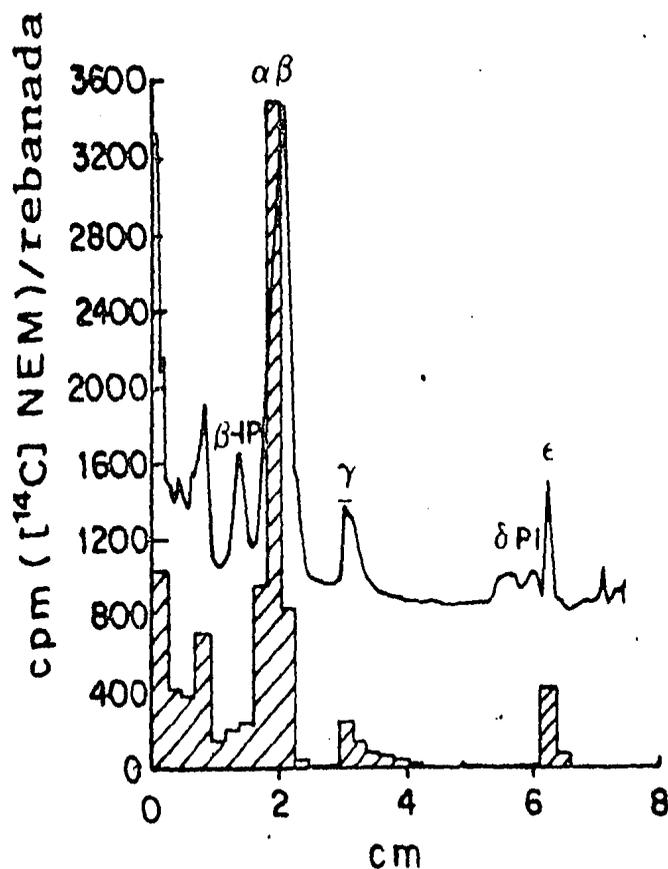


Fig. 14.- Gel de PA-SDS del complejo FcI entrecruzado y marcado con  $[^{14}\text{C}]\text{NEM}$ . El complejo FcI se entrecruzó con 2 mM de EEDQ como en la fig. 11. El complejo  $[^{14}\text{C}]\text{NEM.FcI}$ -entrecruzado se separó en un gel de PA-SDS al 13.5 % y se cortó en fracciones pequeñas para extraer la radioactividad (ver métodos). Después de filtrarse el complejo FcI entrecruzado se incubó con  $[^{14}\text{C}]\text{NEM}$  3 mM siguiendo las condiciones de Klein y col. 1980. Las barras muestran el perfil de radioactividad y la línea continua es el trazo densitométrico de un duplicado.

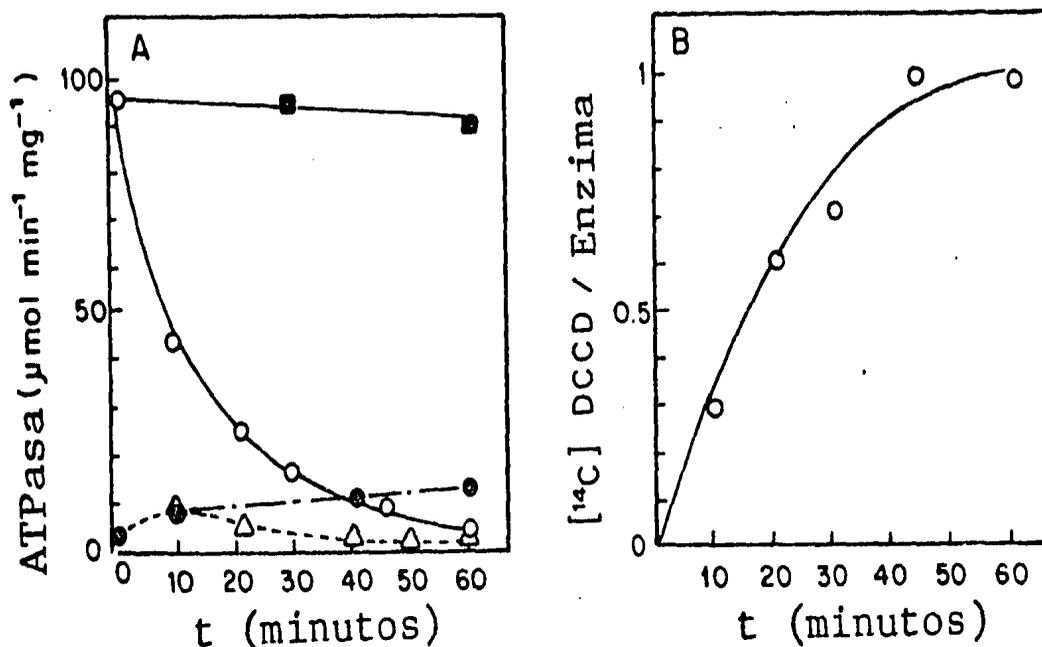


Fig. 15.- Efecto del DCCD en la actividad ATPasa de F<sub>1</sub>I y union de [<sup>14</sup>C]DCCD a F<sub>1</sub>I. En (A) la F<sub>1</sub>I se incubó en MOPS-TRIS 50 mM, pH 7.0, ATP 4 mM, EDTA 2 mM con (Δ,○) y sin (●,■) DCCD 200 µM a 24 °C. En (●) y (Δ), se determinó actividad ATPasa a los tiempos indicados. En los trazos indicados como (■) y (○) se tomaron alícuotas de la mezcla para filtrarlas a través de columnas de Penefsky previamente equilibradas con un medio de activación (sac 250 mM, TEA 50 mM, ATP 10 mM, EDTA 1.5 mM, pH 8.0); Se incubaron a 50 °C durante 70 min. y se determinó actividad ATPasa. (B) F<sub>1</sub>I (1.7 mg/ml) se incubó como en (A) con [<sup>14</sup>C]DCCD 240 µM. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas y se filtraron dos veces en columnas de Penefsky. Se determinó proteína y radioactividad en el filtrado.

complejo DCCD.F<sub>1</sub>I. La fig. 15A muestra que el DCCD disminuye la actividad hidrolítica del complejo F<sub>1</sub>I, así como el grado de actividad que se alcanza al exponer el complejo DCCD.F<sub>1</sub>I a condiciones de activación. Al repetir el experimento con [<sup>14</sup>C]-DCCD encontramos que cuando la actividad hidrolítica de la enzima se inhibe en un 95 %, la cantidad de DCCD unido es de un mol de [<sup>14</sup>C]-DCCD por F<sub>1</sub>I (fig. 15 A y B). Esto indica que la presencia de la PI en el complejo F<sub>1</sub> no altera su reactividad al DCCD durante el mismo tiempo de incubación. En ausencia del DCCD la actividad del complejo F<sub>1</sub>I aumenta únicamente un 20 % (fig. 15A) comparado con el valor máximo que se obtiene al eliminar totalmente la PI por activación. Esto asegura que durante el tiempo de activación del complejo F<sub>1</sub>I con el DCCD, por lo menos el 80 % de las enzimas poseen a la PI en su sitio inhibitorio (fig. 15A).

Al analizar el complejo [<sup>14</sup>C]-DCCD.F<sub>1</sub>I en un gel PA-SDS (fig. 16A), el patrón electroforético es similar al del complejo F<sub>1</sub>I no modificado con DCCD (fig. 13A). La extracción de la radioactividad de las fracciones del gel (fig. 16A), mostró que la mayor parte de esta se encuentra a nivel de la subunidad  $\beta$  y una pequeña porción a nivel de la subunidad  $\gamma$ . El análisis del complejo [<sup>14</sup>C]-DCCD.F<sub>1</sub>I en un gel de PA-ácido (fig. 16B) que separa las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , nos confirmó que la radioactividad debida al [<sup>14</sup>C]-DCCD se encuentra en la subunidad  $\beta$ . Estos resultados demuestran que en la F<sub>1</sub>I, así como en la F<sub>1</sub> (Pougeois y col., 1979), la modificación con DCCD es a nivel de la subunidad  $\beta$ . Cuando el complejo [<sup>14</sup>C]-DCCD.F<sub>1</sub>I se entrecruza con EEDQ y se analiza en un gel de PA-SDS (fig. 16C), se puede observar que cerca de un 50 % de la

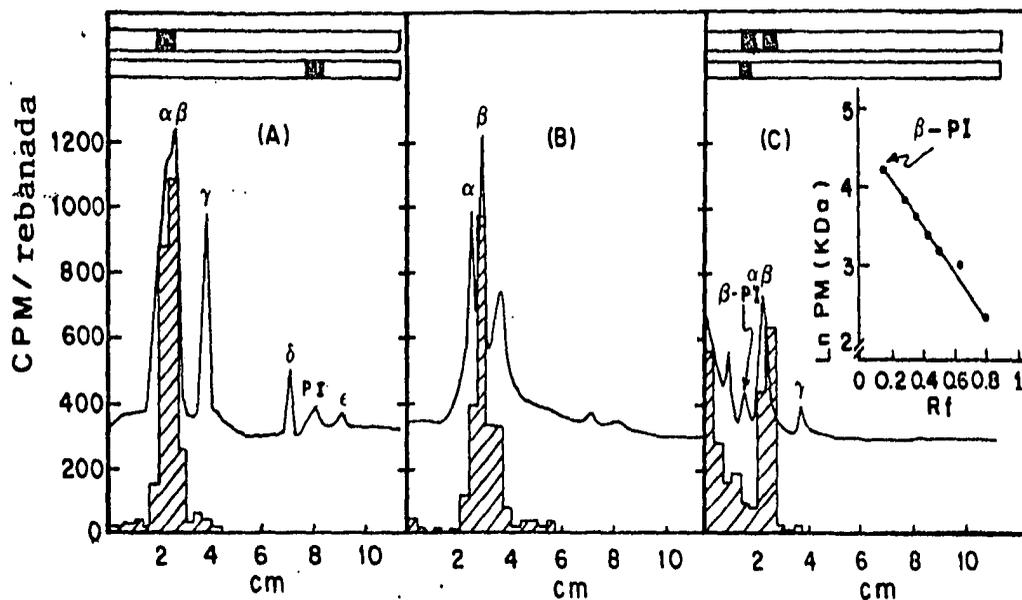


Fig. 16.- Analisis electrofóretico de la F1I marcada con  $[^{14}\text{C}]\text{DCCD}$  y entrecruzada. La F1I se incubó con  $[^{14}\text{C}]\text{DCCD}$  durante 2 hrs hasta alcanzar un valor de 2.1 mol de DCCD por F1I. Después de eliminar el DCCD libre por filtración, la enzima se analizó por (A) gel PA-SDS y (B) gel PA-Acido. (C) Muestra el análisis de la F1I entrecruzada, y el perfil de radioactividad del gel fragmentado (barras). El inserto en (C) muestra el Peso Molecular del complejo  $\beta$ -PI; como estandars se usó una mezcla de siete proteínas diferentes de 66, 45, 36, 29, 24, 20 y 14 KDa (Dalton Mark VII-L). Los esquemas superiores en (A) y (C) ilustran la reactividad a Antisuero Anti- $\beta$  (barra superior) y Anti-PI (barra inferior).

radioactividad total se localiza en el origen del gel. También hay una cantidad muy importante a nivel de la subunidad  $\beta$ , que no presentó entrecruzamiento, pero no existe radioactividad en la zona del dímero  $\beta$ .PI. Esto indica que en el complejo  $F_1I$  soluble, la subunidad  $\beta$  que interactúa con la PI endógena no acepta la entrada del [ $^{14}C$ ]-DCCD (fig. 16C).

Aparentemente nuestros resultados difieren de lo encontrado por Klein y col. (1980) con respecto al marcaje con [ $^{14}C$ ]-DCCD de la subunidad  $\beta$  que participa en el dímero  $\beta$ .PI formado por entrecruzamiento. Sin embargo, un análisis detallado de sus datos nos muestra que solo una fracción muy pequeña de la radioactividad total de las subunidades  $\beta$ , aparece al nivel del dímero  $\beta$ .PI. A pesar de que este grupo trabaja con  $F_1$  reconstituida con PI exógena, y no elimina el exceso de esta, el [ $^{14}C$ ]-DCCD parece tener, en nuestras condiciones experimentales y las de Klein y col. (1980), mayor preferencia por las subunidades  $\beta$  que no están en contacto con la PI.

Por otro lado, nuestros resultados (fig. 16C) están de acuerdo con los obtenidos por el grupo de Capaldi (Tomassino y Capaldi, 1985; Lötscher y Capaldi, 1984) en la  $F_1$  soluble de *E. coli* (ECF<sub>1</sub>), donde demuestran que la subunidad  $\beta$  que interactúa con la  $\epsilon$ , que desempeña las funciones de PI (Sternweis y Smith, 1980; Dreyfus y Satre, 1984) no se marca con [ $^{14}C$ ]-DCCD.

Estos datos sugieren fuertemente que las  $H^+$ -ATP sintasas funcionan con subunidades  $\beta$  no equivalentes.

Sabemos que tanto el DCCD (Esch y col. 1981), como el EEDQ (Laikind y col. 1985), interactúan con el grupo carboxilo del Glu- $\beta$ 199. Además, el EEDQ cataliza la formación de un enlace amida

entre el carboxilo que activa y un amino vecino. El hecho de que el producto que se obtiene al entrecruzar los complejos F<sub>1</sub>I nativo, F<sub>1</sub>.PI reconstituido (Klein y col., 1980), ó ECF<sub>1</sub> (Tomassino y Capaldi, 1985; Lötscher y Capaldi, 1984) sea  $\beta$ .PI ó  $\beta$ . $\epsilon$ , sugiere fuertemente que la PI se encuentra en contacto con el Glu- $\beta$ 199. Esto implicaría que el residuo 199 sería poco accesible al DCCD en la subunidad  $\beta$  que interactúa con la PI, siendo esto independiente del orden en el que se añadan ya sea el DCCD o la PI al complejo F<sub>1</sub>. Para explorar esta predicción, la F<sub>1</sub> carente de PI se incubó en presencia de [<sup>14</sup>C]-DCCD, hasta fijar dos moles de [<sup>14</sup>C]-DCCD por mol de F<sub>1</sub>. Al final se eliminó el DCCD libre por filtración en columna de Penefsky, y al complejo [<sup>14</sup>C]-DCCD.F<sub>1</sub> se le añadió Mg-ATP y 0.1  $\mu$ g de PI/ $\mu$ g F<sub>1</sub> y se incubó a 30 °C. Después de eliminar la PI libre por filtración, el complejo [<sup>14</sup>C]-DCCD.F<sub>1</sub>.PI se entrecruzó con EEDQ.

La fig. 17A muestra nuevamente que la mayor parte de la radioactividad del complejo F<sub>1</sub> modificado con [<sup>14</sup>C]-DCCD y reconstituido con PI exógena ([<sup>14</sup>C]DCCD.F<sub>1</sub>.PI), se encuentra localizada a nivel de la subunidad  $\beta$ , y una porción muy pequeña a nivel de  $\gamma$ . La fig. 17B muestra el complejo [<sup>14</sup>C]DCCD.F<sub>1</sub>.PI entrecruzado, y podemos observar que tampoco en este caso observamos radioactividad en la subunidad  $\beta$  que forma parte del dímero  $\beta$ .PI. Con estos datos podemos concluir que el DCCD y la PI se excluyen mutuamente de la misma subunidad  $\beta$ .

#### IV. -REACTIVIDAD DEL COMPLEJO F<sub>1</sub>I NATIVO AL Nb<sub>f</sub>.

##### 1. - CARACTERISTICAS DE LA FIJACION DEL Nb<sub>f</sub> AL COMPLEJO NATIVO F<sub>1</sub>I EN COMPARACION CON EL COMPLEJO F<sub>1</sub>.

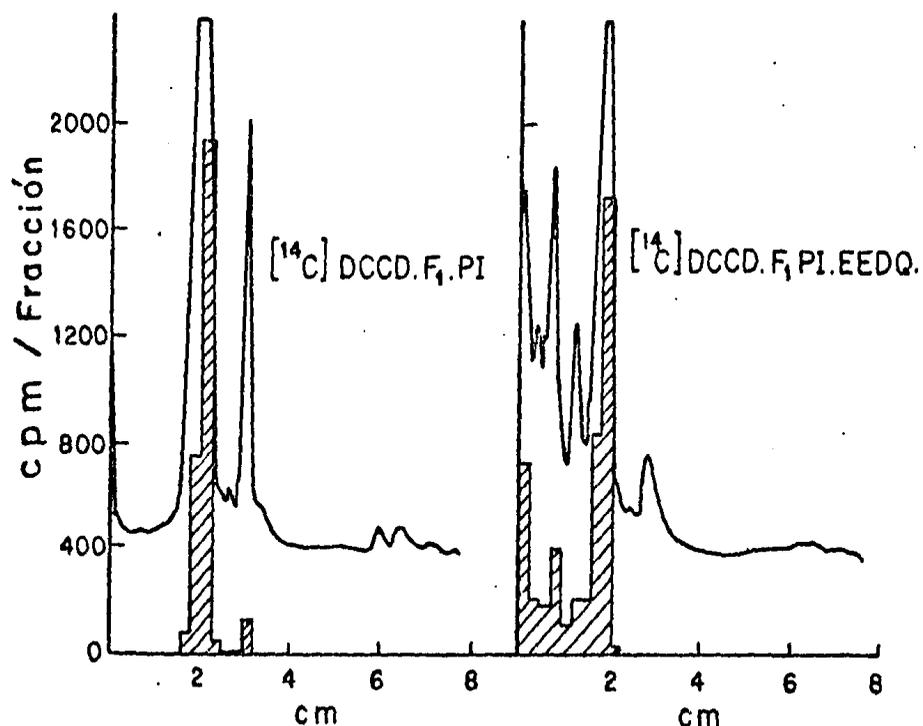


Fig. 17.- Análisis electroforético de la F<sub>1</sub> marcada con [<sup>14</sup>C]DCCD y reconstituida con PI exógena. La F<sub>1</sub> (10.5 mg/ml) se incubó en las condiciones de la fig 15 en presencia de [<sup>14</sup>C]DCCD hasta alcanzar un valor de 2.02 Moles de [<sup>14</sup>C]DCCD por F<sub>1</sub>. Al final de la incubación el DCCD libre se eliminó filtrando dos veces por una columna de Penefsky equilibrada en sac 250 mM, MDPS-HCl 10 mM, pH 6.7. Después de determinar proteína y radioactividad, a 1 ml de eluido (1,05 mg de prot/ml) se le añadió MgATP 2 mM y 100 µg de PI liofilizada. Se incubó a 30 °C durante 3.5 hrs y al final se eliminó la PI libre filtrando en una columna de Penefsky de Sepharosa 6B. Al complejo [<sup>14</sup>C]DCCD.F<sub>1</sub>.PI (0.77 mg prot/ml), se le añadió MgATP 2 mM y EEDQ 2 mM, y se incubó a 30 °C durante 20 min. La reacción se paró con SDS al 1 %. La figura muestra el análisis del complejo [<sup>14</sup>C]DCCD.F<sub>1</sub>.PI (A) y de [<sup>14</sup>C]DCCD.F<sub>1</sub>.PI-entrecruzado (B) en un gel de PA-SDS.

Experimentos de otros autores (Ferguson y Radda, 1974a) demostraron que la actividad hidrolítica de la  $F_1$  se inhibe por la fijación de un Nbf al residuo de Tir- $\beta$ 311 de una de las 3 subunidades " $\beta$ " del complejo, (Andrews y col. 1984). Con el propósito de marcar fluorescentemente el complejo nativo  $F_1I$ , se decidió probar si éste, que tiene una de las subunidades " $\beta$ " interactuando con la PI, era capaz de aceptar la entrada del Nbf. La fig. 18 ilustra el resultado de incubar la  $F_1$  y la  $F_1I$  en presencia de diferentes concentraciones de Nbf, observándose que la actividad hidrolítica de ambas enzimas disminuye. Esta inhibición se revierte en un 95 % si se adiciona DTT a una concentración de 1 mM, el cual desprende el Nbf unido a la Tir- $\beta$ 311 sin formar un complejo con ésta (Ferguson y Radda, 1975a). Al normalizar las curvas de inhibición (ver inserto de fig. 18), observamos que el complejo  $F_1I$  sí permite la fijación del Nbf, pero esta actividad parece ser un poco más resistente a este reactivo. Esto es semejante a los resultados obtenidos al inhibir el complejo  $F_1I$  con EEDQ (ver fig. 8).

Las condiciones de fijación del Nbf en la Tirosina  $\beta$ 311 (sac 250 mM, ATP 4 mM, EDTA 2 mM, pH 7.4), son muy similares a las de activación (sac 250 mM, ATP 10 mM, EDTA 1.5 mM, pH 8) del complejo  $F_1I$ , que es en las que se observa salida de la PI de su sitio de inhibición. Tratando de encontrar un balance entre el proceso de activación y el de inhibición por Nbf, se consideró conveniente estudiar el curso temporal de la actividad de la  $F_1I$  en presencia de diferentes concentraciones de Nbf. Como podemos observar en la fig. 19, a concentraciones de Nbf menores o iguales a 50  $\mu$ M, el equilibrio parece estar desplazado hacia la salida de la PI de su sitio de inhibición. Sin embargo a concentraciones mayores de 80  $\mu$ M, la entrada del Nbf parece ser más rápida que la salida de la PI. Debido a que la concentración de 100  $\mu$ M fue la utilizada para la caracterización de la inhibición de la  $F_1$  (Ferguson y Radda, 1975a), y con los resultados de la fig. 19 en donde esta

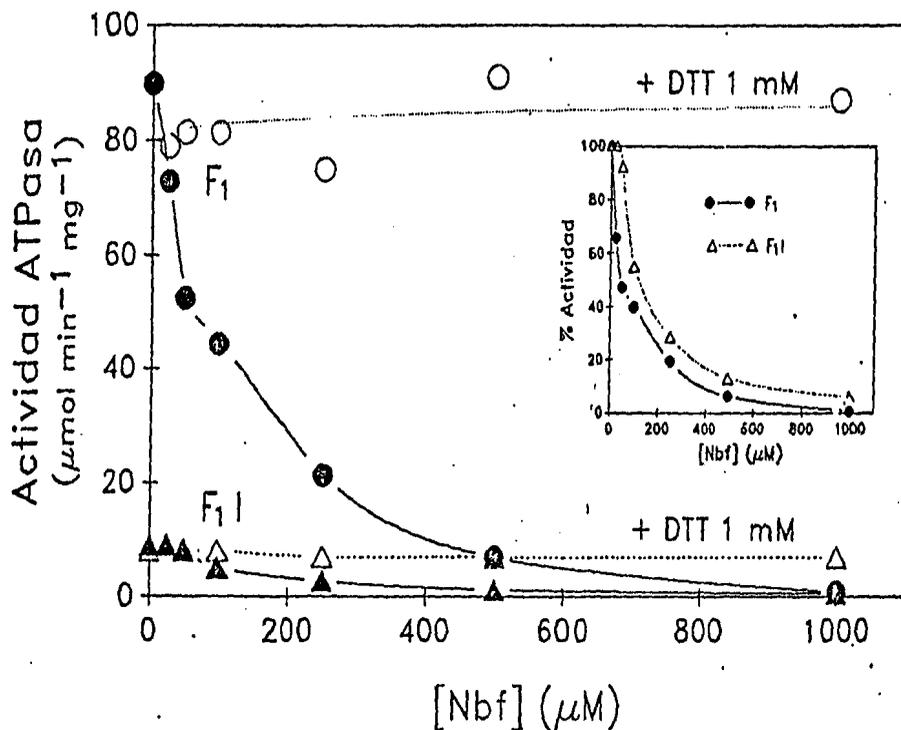


Fig. 1B. - Inhibición de la actividad hidrolítica de  $F_1$  y  $F_{1I}$  por diferentes concentraciones de  $Nbf$ . A) La enzima ( $F_1$  ó  $F_{1I}$ ) preequilibrada en Sac 250 mM, TEA-HCl 50 mM, ATP 4 mM, EDTA 2 mM, pH 7.4, a una concentración de 0.6 mg de proteína/ml, se incubó en presencia de diferentes concentraciones de  $Nbf$ . La incubación fué a 25 °C durante 15 min en obscuridad. Al final de la incubación se tomaron alícuotas para medir actividad hidrolítica espectrofotométricamente en ausencia (●, ▲) y presencia (○, △) de DTT 1 mM. El inserto muestra las curvas de inhibición normalizadas, tomando como 100 % la actividad de la enzima incubada sin  $Nbf$ .

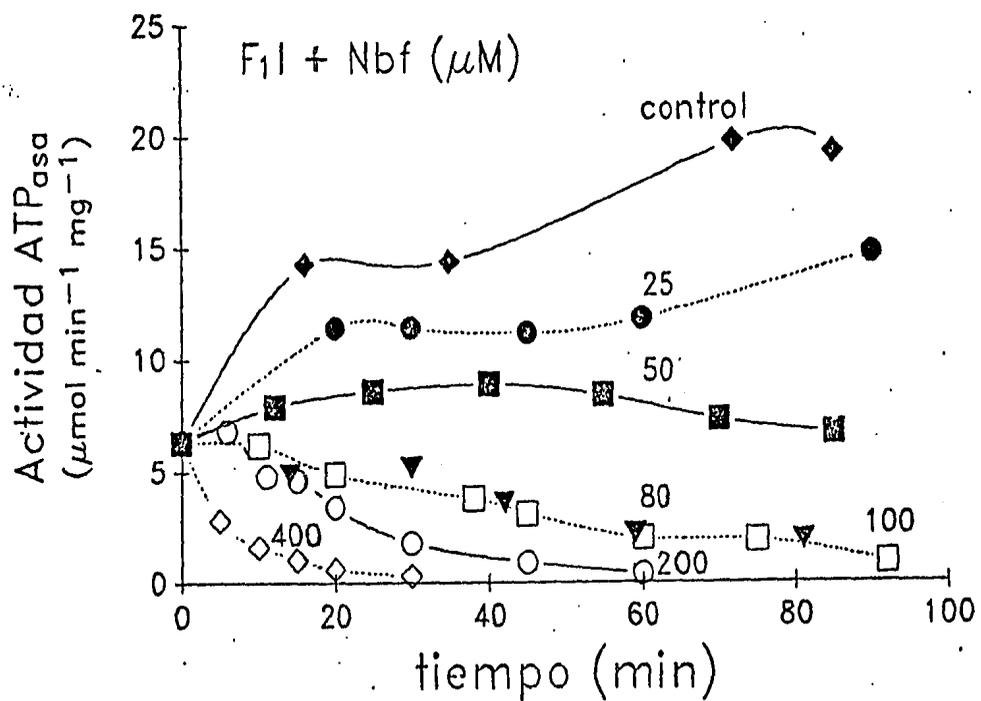


Fig. 19.- Curso temporal de la inhibición de la actividad hidrolítica de F<sub>1</sub>I por diferentes concentraciones de Nbf. La enzima se incubó a 0.75 mg de proteína/ml en las mismas condiciones que en la fig. 18. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para medir espectrofotométricamente la actividad hidrolítica.

concentración ya es inhibitoria para el complejo F<sub>1</sub>I, decidimos usarla durante 90 min en los estudios de la interacción del Nbf con el complejo F<sub>1</sub>I. La fig. 20A muestra el comportamiento de la actividad hidrolítica del complejo F<sub>1</sub>, en presencia de Nbf 100  $\mu$ M y a diferentes tiempos de incubación, así como la reversibilidad de su actividad por DTT. Este es un experimento hecho comparativamente con F<sub>1</sub>I (fig. 20B) y en iguales condiciones. Normalizando las curvas de inhibición de la actividad obtenidas con F<sub>1</sub> y F<sub>1</sub>I (fig. 20C), y tomando como 100 % de actividad para F<sub>1</sub>I cada uno de los puntos de la curva control (fig. 20B), observamos una marcada diferencia, tanto en el grado de inhibición, como en la reversibilidad de la actividad con DTT. En la literatura hay datos que indican que la reversibilidad total por DTT de la actividad hidrolítica del complejo Nbf-O-F<sub>1</sub>, requiere de una preincubación más larga. Esto se puede observar en la mayor reversibilidad con 20 min de preincubación. Si al complejo Nbf.F<sub>1</sub>I le adicionamos DTT durante la determinación espectrofotométrica de la actividad (aprox. 1 min), solo se revierte la actividad en un 20 % (fig. 20C). Este valor aumenta a un 40 % cuando el complejo Nbf.F<sub>1</sub>I se incuba con DTT durante 20 min. Aunque se observa una diferencia en la forma de la curva de inhibición de F<sub>1</sub>I comparada con F<sub>1</sub>, es importante hacer notar que la actividad específica a la cual llegan ambas enzimas a los 90 min de incubación, prácticamente es la misma. Si el tiempo de incubación se prolonga hasta 4 hrs, la actividad hidrolítica de ambas se reduce a 0.1  $\mu$ Mol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> (no mostrado). Por otro lado, sabemos por datos de la literatura (Ferguson y Radda, 1975a), que la unión de Nbf a la Tir- $\beta$ 311 de F<sub>1</sub> (Nfb-O-F<sub>1</sub>), no es

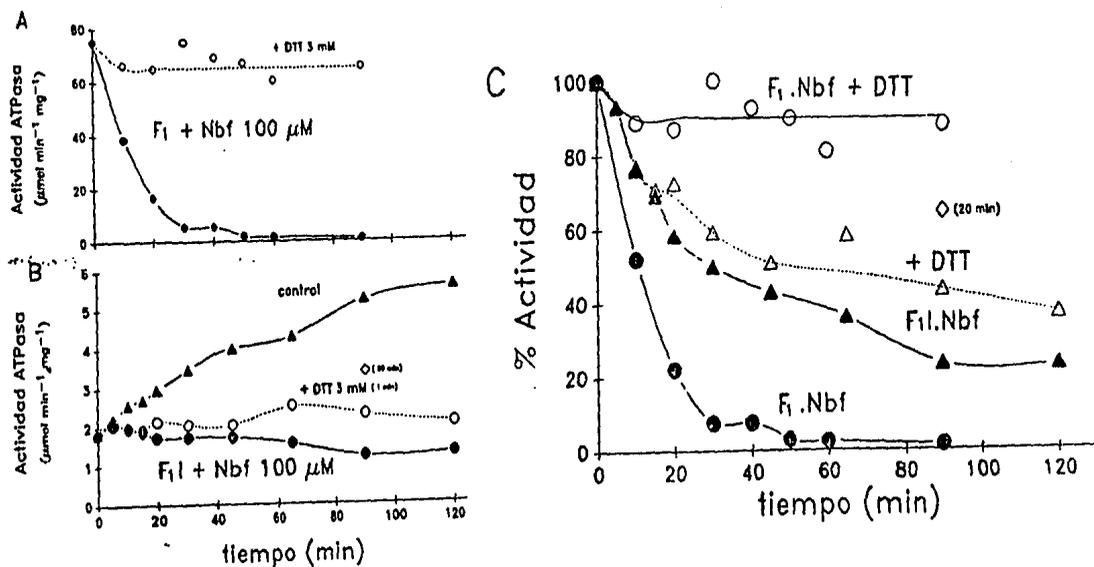


Fig. 20.- Curso temporal de la inhibición de la actividad hidrolítica de la  $F_1$  y  $F_{1I}$  por  $Nbf$   $100 \mu M$ , y reversibilidad de la actividad por DTT. La  $F_1$  obtenida a partir de  $F_{1I}$  como se indica en métodos (A), y  $F_{1I}$  (B), se incubaron en presencia de  $100 \mu M$  de  $Nbf$  en las mismas condiciones de la figura 18. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para medir actividad hidrolítica en ausencia (●), ó en presencia (○) de DTT  $3 mM$  añadido durante el trazo. En (B), la curva superior (▲) representa la actividad de la enzima  $F_{1I}$  incubada en las mismas condiciones, pero sin  $Nbf$ . (◇) indica la actividad del complejo  $Nbf.F_{1I}$  incubado con DTT durante 20 min. La actividad control de la  $F_1$  no cambió durante la incubación. (C) muestra la inhibición de  $F_1$  (A) y  $F_{1I}$  (B) por  $Nbf$  normalizadas. Para el complejo  $Nbf.F_{1I}$  se tomó como 100 % de actividad la curva control de (B).

estable y que la actividad hidrolítica no se inhibe 100 %. Esto se debe a que existe un equilibrio constante entre la entrada y la salida del Nbf de la enzima (Tinh y Wang, 1980). Además, trabajos previos han demostrado, que si el complejo Nbf-O-F<sub>1</sub> se incubaba a temperatura ambiente, a pH 9 y en presencia de nucleótidos durante 18-20 hrs (Ferguson y Radda, 1975b), ó a 38 °C en ausencia de nucleótidos (Ceccarelli y col. 1989) parte del Nbf unido a la  $\beta$ Tir-311 se libera y parte se transfiere intramolecularmente a la Lis-312, siendo esta unión irreversible.

Como la reversibilidad por DTT en la F<sub>1</sub>I no era total, a diferencia de la F<sub>1</sub>, existía la posibilidad de que la unión Nbf- $\beta$ Tir en el complejo F<sub>1</sub>I fuera menos accesible al DTT comparado con la F<sub>1</sub>. Por lo que decidimos titular con diferentes concentraciones de DTT los complejos Nbf.F<sub>1</sub> y Nbf.F<sub>1</sub>I adicionándolo durante la determinación espectrofotométrica de la actividad hidrolítica. Como podemos observar en la fig. 21, la reversibilidad de la inhibición de la actividad por Nbf es semejante para ambas enzimas. En el inserto de la fig. 21 se muestra que concentraciones de DTT mayores de 3 mM, empiezan a inhibir la actividad hidrolítica.

Como aparentemente las condiciones experimentales estaban determinando las diferencias en la reactividad de los complejos al DTT, se siguió el curso temporal de la recuperación de la actividad de estos complejos. Para ésto se escogió una concentración de 0.1 mM de DTT que adicionada en el trazo durante la determinación de la actividad, nos da una recuperación menor del 80 % (fig. 21). En estas condiciones experimentales (fig. 22), hidrolítica, es ligeramente menor en el complejo Nbf.F<sub>1</sub>I comparado

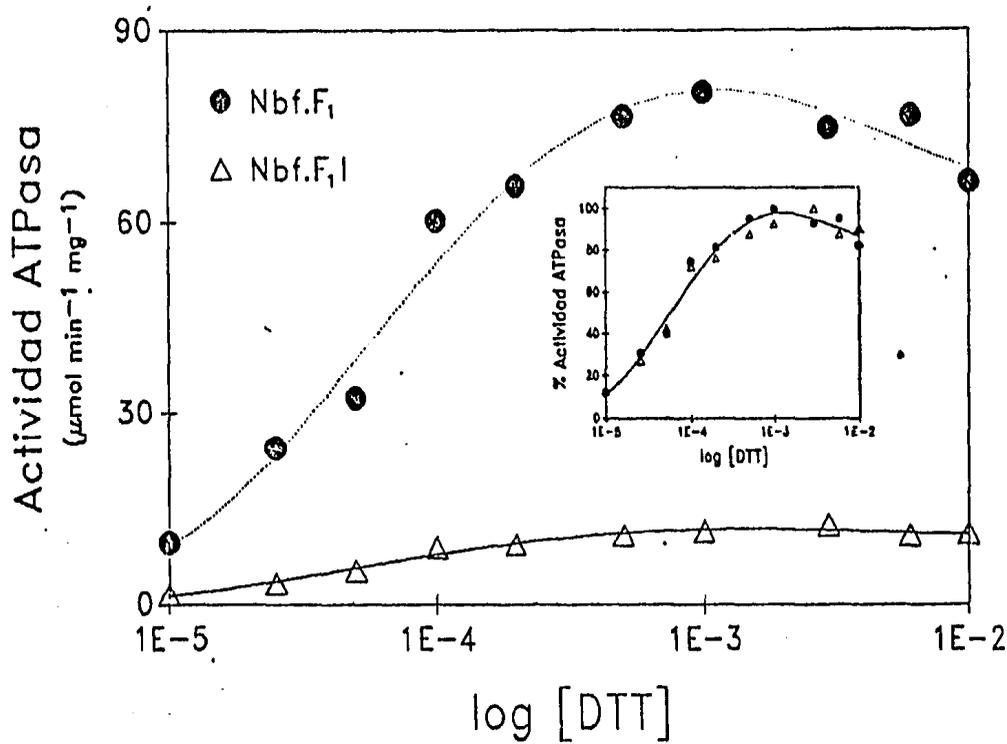


Fig. 21.- Reversibilidad de la actividad hidrolítica de los complejos *nbf.F<sub>1</sub>* y *nbf.F<sub>1</sub>I*, por diferentes concentraciones de DTT sin preincubar. A los complejos *Nbf.F<sub>1</sub>* (1.47 mg/ml) y *Nbf.F<sub>1</sub>I* (1.59 mg/ml) se les determinó actividad hidrolítica espectrofotométricamente en presencia de las concentraciones indicadas de DTT. Las actividades de *Nbf.F<sub>1</sub>* y *Nbf.F<sub>1</sub>I* fueron de 1.2 y 0.68  $\mu\text{Mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  medidas en ausencia de DTT. Para el inserto se tomó como 100 %, la actividad más alta determinada en presencia de DTT. Esta fue de 80.4  $\mu\text{Mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  con 1 mM de DTT y de 12.4  $\mu\text{Mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  con 3 mM de DTT para los complejos *Nbf.F<sub>1</sub>* y *Nbf.F<sub>1</sub>I* respectivamente.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

con el complejo Nbf.F<sub>1</sub>. Por ejemplo a 1.5 min de preincubación podemos ver que la velocidad de recuperación de la actividad con DTT 0.1 mM se midió la actividad obteniéndose una recuperación del 60 % para F<sub>1</sub>I y del 75 % para F<sub>1</sub>. Si a los mismos complejos modificados con Nbf se les adiciona DTT ahora a una concentración de 1 mM en el trazo durante la determinación de la actividad, la actividad recuperada es de 80 % para Nfb.F<sub>1</sub>I y 100 % para el complejo Nbf. F<sub>1</sub>. Cabe mencionar que se tomó como el 100 % para ambos casos la actividad obtenida a los 30 min de preincubación con DTT; 11.6 y 101  $\mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  para F<sub>1</sub>I y F<sub>1</sub> respectivamente. Estos resultados nos muestran, que aunque la reversibilidad total de la actividad de las dos enzimas modificadas con Nbf puede obtenerse con concentraciones similares de DTT, la recuperación del 100 % de actividad del complejo F<sub>1</sub>I requiere mas tiempo de preincubación con DTT. Por otro lado, debemos considerar el hecho de que el 100 % de actividad del complejo Nbf.F<sub>1</sub>I, sea efectivamente el que se obtiene al preincubar éste con DTT 0.1 mM por 30 min ó 1 mM durante 15 min.

#### *A) CURSO ESPECTROFOTOMETRICO DE FIJACION DEL Nbf A F<sub>1</sub> Y F<sub>1</sub>I.*

Dado que la actividad hidrolítica del complejo F<sub>1</sub>I comparada con la F<sub>1</sub> es muy baja, y aprovechando que la unión Nbf-O-F<sub>1</sub> presenta un máximo de absorción a 385 nm (Ferguson y Radda, 1975a), se consideró conveniente utilizar este método (además del de la actividad hidrolítica) para seguir la fijación del Nbf al complejo F<sub>1</sub>I comparativamente con F<sub>1</sub>. En la fig 23A se muestra un

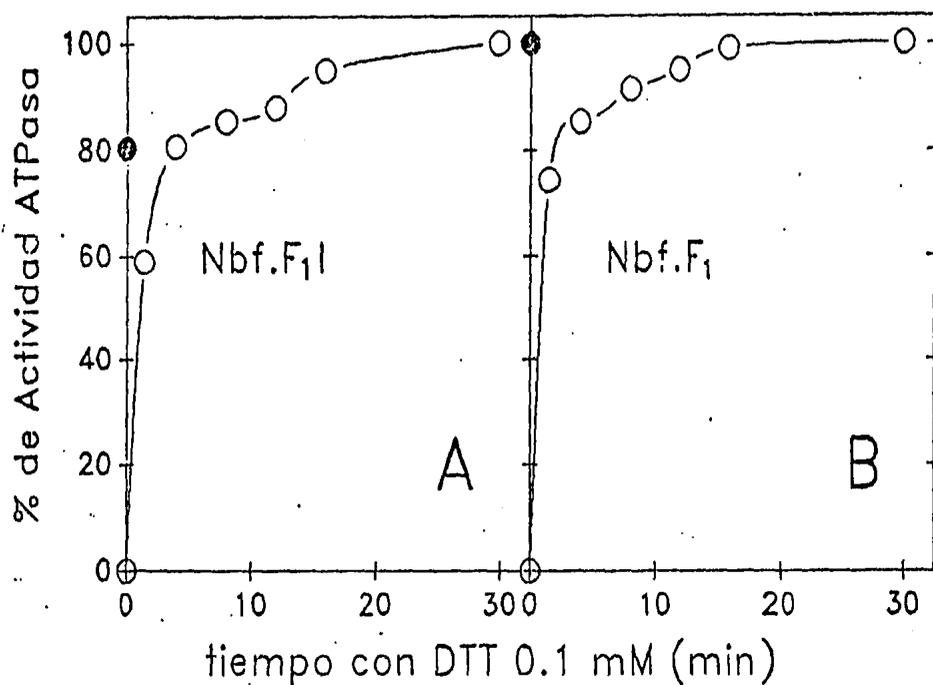


Fig. 22.- *Cinética de la reversibilidad de la actividad hidrolítica por DTT 0.1 mM a distintos tiempos de preincubación.* 0.6  $\mu\text{g}$  de Nbf.F<sub>1</sub> ó 0.13  $\mu\text{g}$  de Nbf.F<sub>1</sub>I se preincubaron en 0.5 ml de medio de ATPasa pH 8.0 sin sistema regenerador de ATP 2X (DL + PK + PEP + NADH + ATP) para iniciar la determinación de la actividad hidrolítica. Las actividades de los complejos Nbf.F<sub>1</sub> y Nbf.F<sub>1</sub>I fueron de 3.3 y 0.96  $\mu\text{Mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  respectivamente. El 100 % de actividad se tomó como la obtenida al preincubar los complejos con DTT 0.1 mM durante 30 min. Los símbolos (●) sobre los ejes Y de A y B, representan la actividad hidrolítica obtenida al añadir DTT 1 mM durante la determinación de actividad.

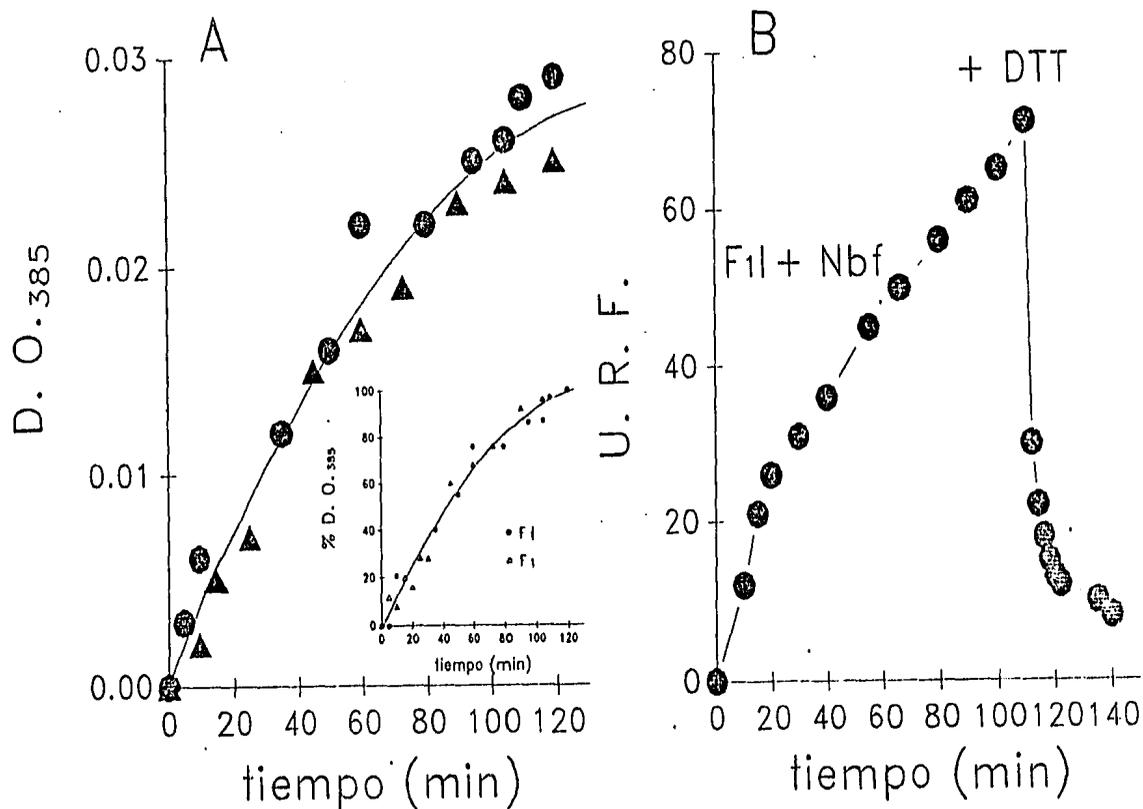


Fig. 23.- Incremento de la absorbancia a 385 nm y de la fluorescencia, concomitante a la entrada del Nbf a la enzima. (A) F1 (Δ) y F1I (●) se incubaron a la misma concentración de proteína (1.1 mg/ml), en las condiciones de la fig. 20. A los tiempos indicados se leyó la absorbancia a 385 nm. La gráfica (B) muestra el aumento en las unidades relativas de fluorescencia (URF,  $\lambda_{exc}=464$  nm;  $\lambda_{emi}=520$  nm) al incubar F1I (0.5 mg/ml) en presencia de 100  $\mu$ M de Nbf en las mismas condiciones de (A). La flecha indica la reversibilidad de la fluorescencia al agregar DTT 3 mM.

curso temporal de la fijación del Nbf a  $F_1$  y  $F_1I$  obtenida por la aparición de la absorbancia a 385 nm, observándose que es idéntica en ambas enzimas.

Si el Nbf estuviera fijándose más a la Lis- $\beta$ 162 en el complejo  $F_1I$  que en la  $F_1$ , deberíamos haber observado diferencias en la magnitud de la absorción a 385 nm durante la fijación del Nbf. Esto no descarta totalmente la posibilidad de que esté fijándose más Nbf a la Lis- $\beta$ 162 en  $F_1I$  ya que el máximo de absorción de esta unión es a 475 nm que está alejado de 385 nm.

Por otro lado, se sabe que la fijación del Nbf en la Lis- $\beta$ 162, forma un complejo (Nbf-N- $F_1$ ) fluorescente. Empleando este nuevo método y en las mismas condiciones descritas por Ferguson y Radda (1975b), donde mostraron que esta fluorescencia se debe a la unión exclusiva del Nbf a la subunidad  $\beta$ , seguimos la fijación del Nbf al complejo  $F_1I$ . Como se puede observar en la fig. 23B, al incubar el complejo  $F_1I$  en condiciones de transferencia del Nbf a la lisina, la fluorescencia aumentó con el tiempo, sin embargo ésta se revirtió casi en su totalidad al adicionar DTT al complejo Nbf. $F_1I$ . Esto se repitió en el caso de la  $F_1$  (no mostrado). Este hecho indica claramente que la fluorescencia observada no se debe a la fijación del Nbf a la Lis- $\beta$ 162, ya que como se mencionó arriba, esta unión es irreversible por DTT. Es importante señalar que el Nbf es un compuesto muy reactivo para grupos -SH (Ferguson y Radda, 1974; Birket y col., 1970). y que la unión Nbf-SH además de tener un máximo de absorción a 420 nm, es fluorescente y reversible por DTT. Dado que 3 de las subunidades ( $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\epsilon$ ) de la  $F_1$  poseen grupos -SH (Senior, 1970), existe la posibilidad de que en

7

curso temporal de la fijación del Nbf a  $F_1$  y  $F_1I$  obtenida por la aparición de la absorbancia a 385 nm, observándose que es idéntica en ambas enzimas.

Si el Nbf estuviera fijándose más a la Lis- $\beta$ 162 en el complejo  $F_1I$  que en la  $F_1$ , deberíamos haber observado diferencias en la magnitud de la absorción a 385 nm durante la fijación del Nbf. Esto no descarta totalmente la posibilidad de que esté fijándose más Nbf a la Lis- $\beta$ 162 en  $F_1I$  ya que el máximo de absorción de esta unión es a 475 nm que está alejado de 385 nm.

Por otro lado, se sabe que la fijación del Nbf en la Lis- $\beta$ 162, forma un complejo (Nbf-N- $F_1$ ) fluorescente. Empleando este nuevo método y en las mismas condiciones descritas por Ferguson y Radda (1975b), donde mostraron que esta fluorescencia se debe a la unión exclusiva del Nbf a la subunidad  $\beta$ , seguimos la fijación del Nbf al complejo  $F_1I$ . Como se puede observar en la fig. 23B, al incubar el complejo  $F_1I$  en condiciones de transferencia del Nbf a la lisina, la fluorescencia aumentó con el tiempo, sin embargo ésta se revirtió casi en su totalidad al adicionar DTT al complejo Nbf- $F_1I$ . Esto se repitió en el caso de la  $F_1$  (no mostrado). Este hecho indica claramente que la fluorescencia observada no se debe a la fijación del Nbf a la Lis- $\beta$ 162, ya que como se mencionó arriba, esta unión es irreversible por DTT. Es importante señalar que el Nbf es un compuesto muy reactivo para grupos -SH (Ferguson y Radda, 1974; Birket y col., 1970). y que la unión Nbf-SH además de tener un máximo de absorción a 420 nm, es fluorescente y reversible por DTT. Dado que 3 de las subunidades ( $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\epsilon$ ) de la  $F_1$  poseen grupos -SH (Senior, 1970), existe la posibilidad de que en

nuestras condiciones de incubación el Nbf se fije a un (ó algunos) grupo (s) -SH.

## 2. - CARACTERISTICAS ESPECTRALES DE F<sub>1</sub> Y F<sub>1</sub>I MODIFICADOS CON Nbf EN TIROSINA.

La fig. 24 muestra el espectro obtenido del complejo Nbf.F<sub>1</sub>I. Como podemos observar al incubar el complejo F<sub>1</sub>I en presencia del Nbf, el pico de absorción más conspicuo es asimétrico con un máximo de absorción a 420 nm, característico de la unión Nbf-SH, además existen dos hombros a 385 nm y a 475 nm, correspondientes a las uniones Nbf-O-F<sub>1</sub> y Nbf-N-F<sub>1</sub> respectivamente, los espectros son iguales a los que se obtuvieron al incubar la F<sub>1</sub> purificada por tres métodos diferentes (Tuena y Gómez-Puyou, 1977; Penefsky, 1977, y F<sub>1</sub>I activada, obtenida a partir de F<sub>1</sub>I), en presencia de Nbf y en condiciones idénticas (no mostrado). Esto sugiere que en ambas enzimas (F<sub>1</sub> y F<sub>1</sub>I), el Nbf está interactuando además de la Tir-β311 y la Lis-β162, con grupos de cisteína. Estos resultados podrían explicar la fijación adicional del Nbf en grupos -SH que Ting y Wang (1980), observan al exponer la F<sub>1</sub> al Nbf, así como la marca que el grupo de Allison (Allison y col. 1984a) encontró en la subunidad α al determinar con [<sup>14</sup>C]Nbf el residuo de Tir en que estaba el Nbf en la F<sub>1</sub> y a la cual en su artículo la refieren como "marcaje inespecifico".

El glutatión reducido, a semejaza del DTT, revierte la inhibición de la F<sub>1</sub> por el Nbf a nivel de la Tir-β311, pero a diferencia de este último, forma una unión covalente estable con el Nbf, con un pico máximo de absorción a 420 nm característico de

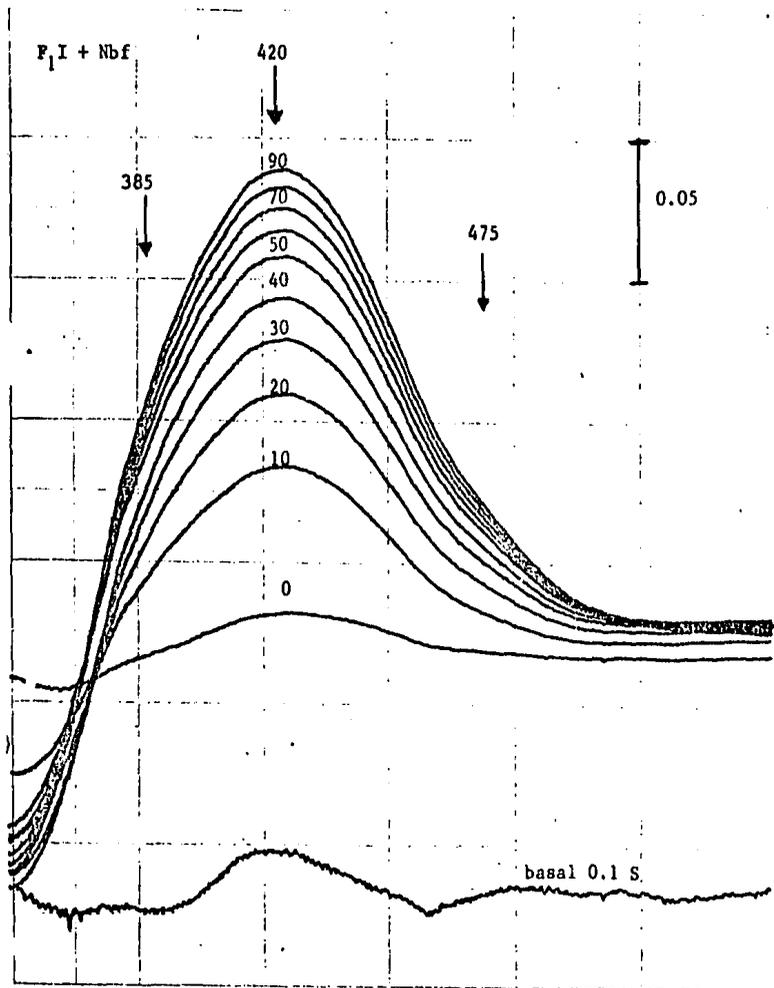


Fig. 24.- Cambios espectrales durante la interacción del Nbf con la F<sub>1</sub>I. El complejo F<sub>1</sub>I se incubó a una concentración de 1.14 mg/ml en las condiciones de la fig 13 en presencia de Nbf 100  $\mu$ M. A los tiempos indicados en la gráfica, se corrieron espectros de absorbancia de 350 a 550 nm utilizando un espectrofotómetro Aminco de doble haz. La línea base se obtuvo con amortiguador en la celda de referencia y con amortiguador mas enzima en la celda de la muestra. La reacción se inició añadiendo 100  $\mu$ M de Nbf en ambas celdas.

la unión Nbf-SH (Ferguson y Radda, 1975a). Al eliminar el pico de absorción a 420 nm del espectro de absorbancia del complejo Nbf.F<sub>1</sub>I añadiendo dos moles de glutatión reducido a la celda de referencia que contenía solo amortiguador y Nbf, se pudieron evidenciar los picos correspondientes a Nbf-Tir y Nbf-Lis (fig. 25). Con estos resultados y utilizando los coeficientes de extinción molar de 11600 M<sup>-1</sup> y 26000 M<sup>-1</sup> (Ferguson y col., 1975a y b) para las uniones de Nbf a Tir y Lis respectivamente, pudimos obtener una estequiometría total de 3.4 Nbf/F<sub>1</sub>I: 2 Nbf en -SH; 1.2 Nbf en Tir y 0.2 Nbf en Lis. Es importante señalar que estos valores no están muy alejados de los 1.15 moles de Nbf en Tir que se obtienen al incubar la F<sub>1</sub> en presencia de Nbf 100 μM durante 60 min en la cual solo el 15 % de la radioactividad se encontró unida a la Lis-β162 (Andrews y col. 1984a).

La diferencia importante entre los datos del presente trabajo y los reportados con anterioridad (Ferguson y Radda, 1975a; Andrews y col., 1984a), está en la reactividad que observamos del Nbf con dos grupos -SH. Como mencionamos en la sección anterior, ésta unión a grupos -SH podría explicar la estequiometría mayor de 1 que Ting y Wang (1980) encuentran al incubar la F<sub>1</sub> por tiempos mayores de 60 min o en presencia de concentraciones mayores de 100 μM de Nbf. Por otro lado, cabe mencionar que cuando la ECF<sub>1</sub> se expone a Nbf, éste además de reaccionar con Tir-β311 lo hace con actividad hidrolítica, grupos -SH. La reacción con -SH se elimina con la preincubación de la ECF<sub>1</sub> en presencia de Iodoacetamida (Ceccarelli y col. 1989). El complejo F<sub>1</sub>I se comportó de manera similar a los reportado, ya que cuando preincubamos a la enzima F<sub>1</sub>I en presencia de Iodoacetamida, se une a grupos -SH sin

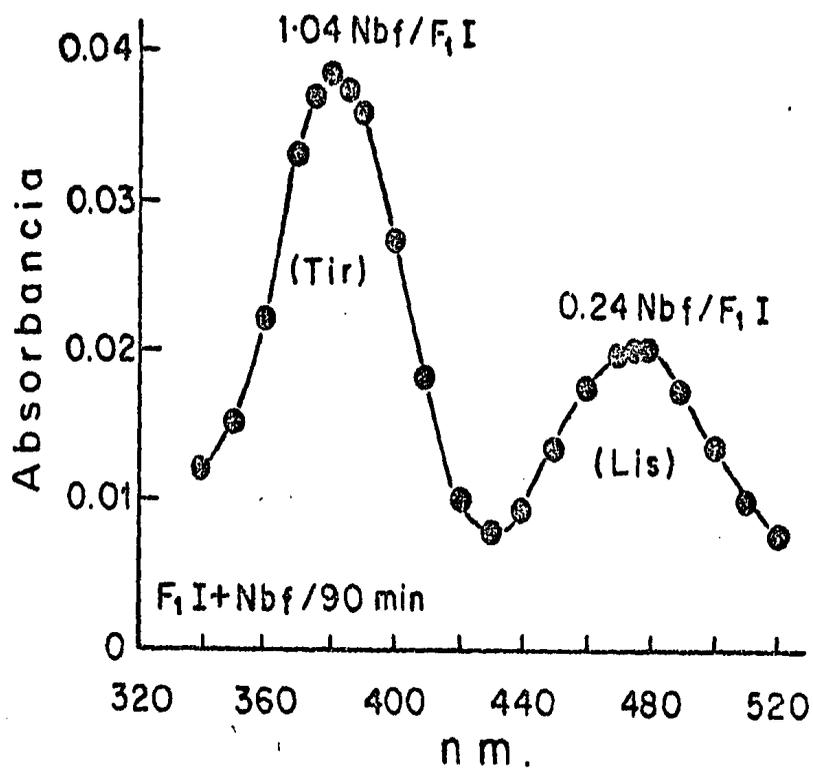


Fig. 25 .- Espectros del complejo NbF.F<sub>1</sub>I obtenido al restar la union glutatión-NbF. La enzima F<sub>1</sub>I (0.98 mg/ml) se incubó en las condiciones de la fig 13 en presencia de NbF durante 90 min. Al final de la incubación, se obtuvo el espectro de absorción como se explicó en la fig. 23 y a la celda de referencia que contenía NbF se le añadió el glutatión reducido necesario para obtener la línea base original. El espectro que se muestra en la figura es el resultado de la condición explicada anteriormente.

modificar la actividad hidrolítica (no se muestra). La fijación posterior del Nbf a los grupos -SH, seguida por espectrofotometría, disminuyó ostensiblemente (fig. 24). Consideramos que esta es una prueba más de que el Nbf, está reaccionando con grupos -SH de la enzima en nuestras condiciones.

3.- CARACTERISTICAS DE LA ACTIVACION DE LOS COMPLEJOS Nbf.F<sub>1</sub> y Nbf.F<sub>1</sub>I.

El complejo nativo F<sub>1</sub>I soluble, tiene una actividad hidrolítica muy baja debido a la presencia de la Proteína Inhibidora. Cuando la PI se remueve de su sitio de interacción, la enzima expresa la máxima actividad hidrolítica.

La fig. 26 muestra el % de actividad hidrolítica y la fluorescencia de los complejos Nbf.F<sub>1</sub>I (A) y Nbf.F<sub>1</sub> (C), obtenidos a diferentes tiempos de incubación de las enzimas con Nbf. Si cada uno de estos complejos se activa eliminando la PI se obtienen las curvas (B) y (D). Los complejos F<sub>1</sub> y F<sub>1</sub>I modificados con Nbf se comportan igual al activarlos. La reversibilidad de la actividad hidrolítica por DTT es igual para ambos complejos antes [A y C y fig 18] y después (B y ) de someterlos a condiciones de activación. Aunque aparentemente la reversibilidad de la actividad por DTT es menor para el complejo Nbf.F<sub>1</sub>I (B). Simultáneamente a la disminución de la reversibilidad, observamos un incremento en la intensidad de fluorescencia atribuible a Nbf-Lis (B). Este aumento en la fluorescencia es más lento en el complejo Nbf.F<sub>1</sub> (D) y no parece estar relacionado con la irreversibilidad de la actividad por DTT.

La comparación de los espectros de absorbancia (fig. 27) de

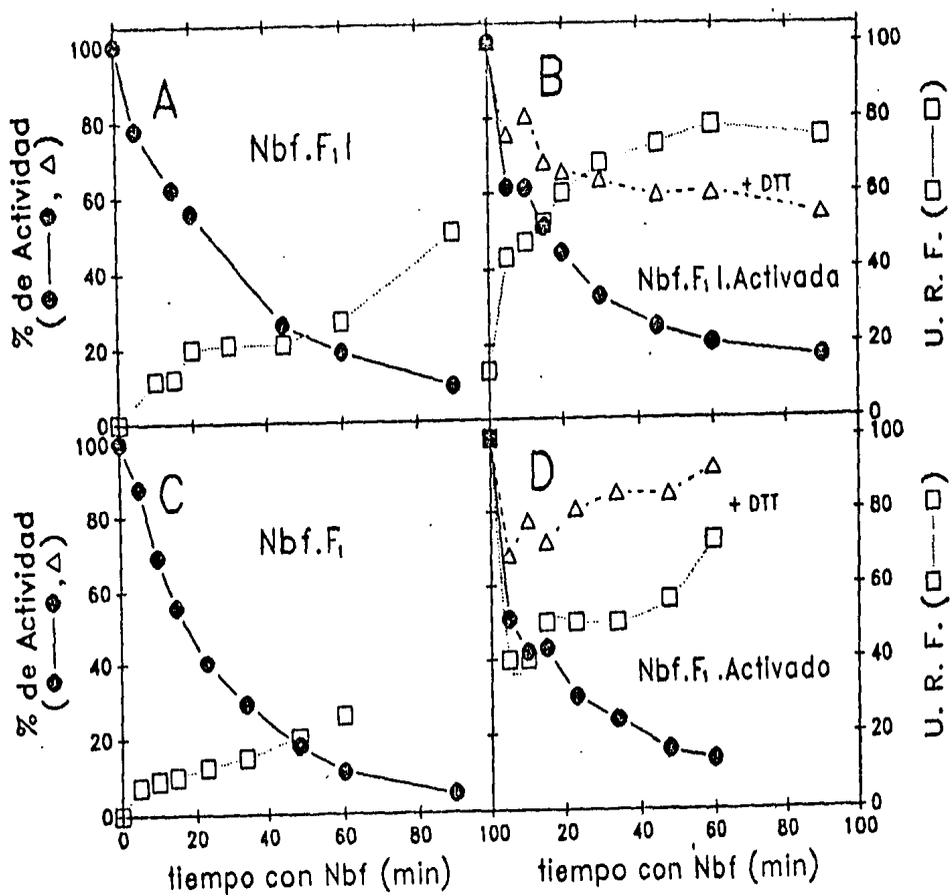


Fig. 26.- Fluorescencia de los complejos Nbf.F<sub>1</sub> y Nbf.F<sub>1</sub>I en condiciones basales y despues de ser activados . Las enzimas se incubaron en sac 250 mM, TEA 50 mM, ATP 4 mM, EDTA 2 mM, pH 7.4 (4 mg prot/ml), en presencia de Nbf 100 μM, a 25 °C y en la obscuridad. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas de 100 μl para filtrarse por columnas de Penefsky. A los eluados se les determinó actividad hidrolítica en ausencia (●) y presencia de 3 mM de DTT, y se diluyeron a 2 ml con el mismo amortiguador para medir la fluorescencia (λ<sub>ex</sub>= 485; λ<sub>emi</sub>=530) dada por la unión del Nbf a Lis (---□---) y además de registrarse los espectros a las siguientes longitudes de onda: Ex 400-500; Emi 530 (ver fig. 28) Para activar, los complejos Nbf.Enzima se incubaron a 50 °C durante 70 min en el medio de activación de la fig. B. Se midió actividad hidrolítica en ausencia (●) y presencia (○) de DTT 3 mM y la fluorescencia (---□---), y los espectros de exitación con las mismas condiciones de antes de Activar (fig. 28). En las graficas (A) y (C) la actividad hidrolítica se normalizó tomando como 100 % de actividad la obtenida en presencia de DTT 3 mM en cada punto. En las figuras (B) y (D) el 100 % de actividad es el obtenido en el control sin Nbf; 35 y 41 μMol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>, para los complejos Nbf.F<sub>1</sub>I.Activado (B) y Nbf.F<sub>1</sub>.Activado (D) respectivamente.

los complejos Nbf.F<sub>1</sub>I.Activado (A) y Nbf.F<sub>1</sub>.Activado (B) con los espectros obtenidos en condiciones basales, se observó que la activación produce una disminución muy importante, en la cantidad de Nbf unido a los residuos de Tir (385 nm) y de -SH (420 nm). Al tratar con DTT los complejos modificados con Nbf y activados, podemos determinar la concentración de Nbf unido a la Lis- $\beta$ 162 (475 nm). Comparando este trazo con el del complejo Nbf.Enzima tratado con DTT antes de activar, podemos ver que gran parte del Nbf se liberó por las condiciones de activación y del que quedó, solamente una porción muy pequeña se transfirió a la Lis- $\beta$ 162. El escaso contenido de Nbf unido a la Lis (0.07 Nbf/F<sub>1</sub> y 0.1 Nbf/F<sub>1</sub>I) no explica la baja reversibilidad observada por la adición de DTT (fig. 26) que presenta el complejo Nbf.F<sub>1</sub>I (B) comparado con el complejo Nbf.F<sub>1</sub> (D). Además debemos señalar que la enzima puede tener unidos 0.2 moles de Nbf en la Lis- $\beta$ 162 sin que esto altere el grado de reversibilidad de la actividad por DTT (fig. 25).

Por otro lado si observamos los espectros de fluorescencia de cada uno de los complejos Nbf.Enzima obtenidos en la fig. 27, lo que vemos es que, para ambas enzimas, la fijación del Nbf se manifiesta como un incremento en la fluorescencia con dos máximos en el espectro de excitación (fig. 28 A y B) a 450 y 480 nm y un máximo a 530 en el espectro de emisión (no mostrado). Al activar los complejos Nbf.F<sub>1</sub> (C) y Nbf.F<sub>1</sub>I (D), los espectros muestran una disminución del máximo de excitación a 450 y un aumento en el máximo a 485 nm. Al tratar estos complejos con DTT (fig. 28 A y C), que elimina el Nbf de Tir y de -SH, solo persiste el pico de fluorescencia debido a la unión Nbf-Lis que es el de 480 nm ya que el de 450 nm es sensible a DTT. Por otro lado como

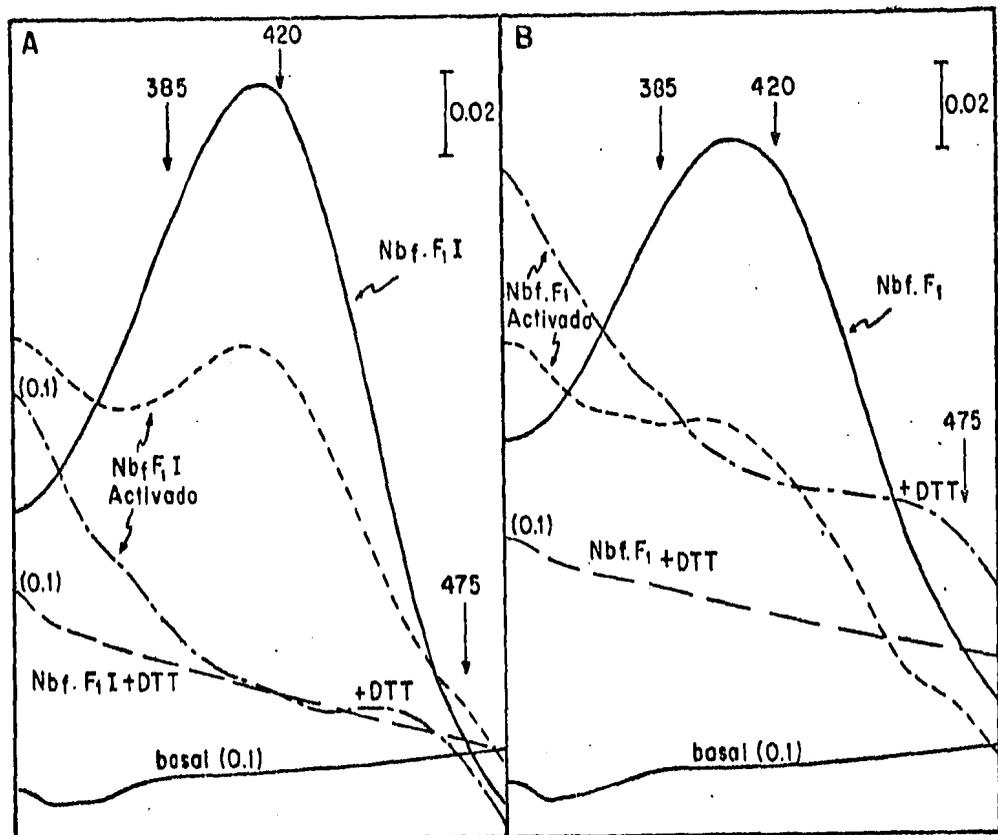


Fig. 27.- Espectros de absorbancia de los complejos NbF.Fi y nbf.fii basales y sometidos a condiciones de activacion. Los complejos NbF.Fi (1.45 mg prot/ml) y NbF.FiI (1.62 mg/ml) se obtuvieron por incubación de las enzimas con Nbf 100  $\mu$ M durante 90 min. en las condiciones de la fig. 26, y se les hicieron espectros de absorbancia de 335 a 485 nm (—). Las muestras se diluyeron 1:1 con el mismo amortiguador (sac 250 mM, TEA 50 mM, ATP 4 mM, EDTA 2 mM, pH 7.4). Una parte se unció con DTT durante 20 min. (---) y a la otra se le añadió 6 mM de ATP y se le aumentó el pH a 8.0 para activar a 50 °C durante 60 min. (---). Calculando el contenido de Nbf unido a grupos -SH por absorción a 420 nm  $\mu$ mo de 2 NbF/Fi y 2.4 NbF.FiI usando el coeficiente de extinción para la unión Nbf-SH de 13000  $M^{-1}$  (Ferguson y col. 1975a). El Nbf unido a lisina de los complejos NbF.Enzima.Activados es de 0.07 NbF/Fi y 0.1 NbF/FiI calculado usando el coeficiente de extinción molar para la unión Nbf-N de 26000  $M^{-1}$  (Ferguson y col. 1957b).

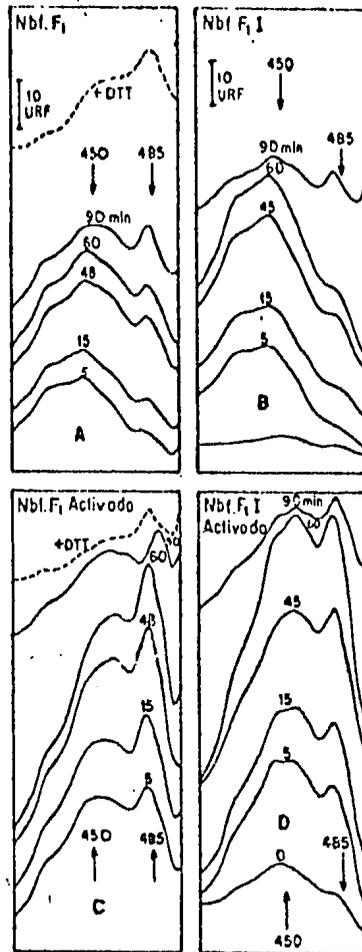


Fig. 2B.- Curso temporal de la entrada del Nbf a F<sub>1</sub> y F<sub>1</sub>I, y activación de los complejos Nbf.F<sub>1</sub> y Nbf.F<sub>1</sub>I seguidas por espectros de fluorescencia. A los complejos modificados en diferentes grados con Nbf (ver fig. 26) se les corrieron espectros de excitación (400-500 nm; Emis = 530). Esto se repitió después de someter los complejos a activación como se indica en la fig. 8. Los números sobre las curvas (—) indican el tiempo durante el cual la F<sub>1</sub> ó la F<sub>1</sub>I estuvieron en presencia de Nbf 100  $\mu$ M. Las líneas punteadas corresponden a los complejos Nbf.F<sub>1</sub> basal y activado preincubadas con DTT 3 mM durante 30 min. Los espectros de fluorescencia se hicieron en 3 ml de solución de los complejos Nbf.Enzima, excepto en los tiempos de 90 min para los cuales los 2 ml se diluyeron a 3 ml con el mismo amortiguador.

sabemos que la Tir que se modifica con Nbf está en una de las subunidades  $\beta$  y dado que la PI interactúa también con una subunidad  $\beta$ , existía la posibilidad de que la modificación de la enzima con Nbf impidiera la salida de la PI producida por la activación. La Tabla I muestra que la modificación de la enzima producida por Nbf no impide la salida de la PI.

La tabla I muestra además que el complejo Nbf.F<sub>1</sub>I prácticamente puede activarse (75 %) hasta el mismo valor que el complejo Nbf.F<sub>1</sub>I pretratado con DTT durante 20 min antes de la activación (100 %). También si restamos la actividad porcentual del complejo Nbf.F<sub>1</sub>I (21.3 %) de la actividad recuperada al añadirle 1 mM de DTT (79.3 %), podemos ver que la diferencia obtenida, de 58 %, se debe a la inhibición de la enzima F<sub>1</sub>I por Nbf. Si repetimos este cálculo para la enzima Nbf.F<sub>1</sub>I activada considerando como 100 % su control correspondiente (Nbf.F<sub>1</sub>I.DTT.Activada), encontramos que la inhibición de la enzima debida a Nbf es solo de un 20.3 %. Esto está de acuerdo con lo observado con los espectros de absorbancia (fig.27), y confirma que las condiciones de activación de la enzima modificada con Nbf, favorece la salida de éste último. Por otro lado los resultados del gel de PA-SDS (ver gel de Tabla I) correspondientes a los complejos del experimento de la Tabla I nos muestran que la banda de la PI del complejo Nbf.F<sub>1</sub>I activado, desapareció totalmente con la activación (carril e). Estos hechos confirman lo observado en la Tabla I, e indican que la modificación de la F<sub>1</sub>I con Nbf no afecta la salida de la PI inducida por las condiciones de activación, a pesar de que ambos inhibidores el Nbf y la PI son capaces de interactuar con una subunidad  $\beta$ .

TABLA I

ACTIVACION DEL COMPLEJO Nbf.F<sub>1</sub>I

ENZIMA	ACTIVIDAD ATPasa			
	- DTT	% Actividad	+ DTT	% Actividad
F <sub>1</sub> I <sup>b</sup>	6.8		-	
F <sub>1</sub> I Activada <sup>c</sup>	60.0		-	
Nbf.F <sub>1</sub> I.DDT/20 min.	-		15.0	(100.0)
Nbf.F <sub>1</sub> I.DDT.Activada <sup>d</sup>	-		53.3	100.0*
Nbf.F <sub>1</sub> I	3.2	(21.3)	11.9	(79.3)
Nbf.F <sub>1</sub> I Activada <sup>e</sup>	29.0	54.7*	40.1	75.0*

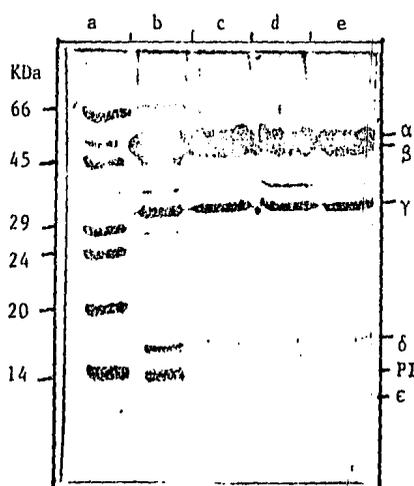


Tabla I.- Salida de la PI del complejo Nbf.F<sub>1</sub>I en condiciones de activación. A las enzimas Nbf.F<sub>1</sub>I (1.61 mg/ml) y Nbf.F<sub>1</sub> tratada con DTT durante 20 min. (1.74 mg/ml) se les añadió igual volumen de amortiguador de activación (ver métodos) y se incubaron a 50 °C durante 70 min. y se midieron las actividades expresadas en la tabla en  $\mu\text{Mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ . Al final de la activación la PI liberada se eliminó por precipitación con sulfato de amonio como se indica. El complejo Nbf.F<sub>1</sub>I para este experimento se obtuvo por incubación de la F<sub>1</sub>I con 100  $\mu\text{M}$  de Nbf durante 2 hrs en las condiciones de la fig. 18. Una alícuota de los filtrados se utilizó para detectar las bandas de la F<sub>1</sub> en geles de PA-SDS al 13%. Carril (a) mezcla de marcadores de PM de 66-14.2 KDa (ver métodos; 50  $\mu\text{g}$  de proteína de los complejos F<sub>1</sub>I (b), F<sub>1</sub>I.Activada (c), Nbf.F<sub>1</sub>I.DDT. Activada (d) y Nbf. F<sub>1</sub>I.Activada (e).

#### 4.- TRANSFERENCIA DEL Nbf DE TIR- $\beta$ 311 A LIS- $\beta$ 162 EN F<sub>1</sub> Y F<sub>1</sub>I.

Ferguson y Radda en 1975b, encontraron que el Nbf unido a Tir- $\beta$ 311 (Andrews y col., 1984a) puede transferirse intramolecularmente a la Lis- $\beta$ 162 (Andrews y col., 1984b). Esto ocurre al incubar el complejo Nbf-O-F<sub>1</sub> a pH 9.0, en presencia de ATP y a temperatura ambiente durante 18-20 hrs. La fig. 29 muestra el cambio en los máximos de absorción de 385 y 420 (ver inserto de fig. 29) a 475. Este último se debe a la unión del Nbf a Lis- $\beta$ 162 en el complejo Nbf.F<sub>1</sub>I al incubarse en las condiciones anteriores durante 15 hrs. Si además seguimos los cambios de los espectros de excitación de fluorescencia (fig. 30) durante la transferencia del Nbf de Tir a Lis, vemos que estos son muy similares en ambos complejos Nbf.F<sub>1</sub> (A) y Nbf.F<sub>1</sub>I (B). Nuevamente como en el caso de la activación (fig. 28) observamos que a medida que pasa el tiempo, el máximo de excitación a 450 disminuye y el de 480 aumenta. el último espectro (---) corresponde a las enzimas Nbf.F<sub>1</sub> (A) y Nbf.F<sub>1</sub>I (B) sometidas a condiciones de activación e incubadas a 25 °C el mismo tiempo que los complejos incubados a pH 9.0 durante 24 hrs (Nbf.F<sub>1</sub>) y 18 hrs (Nbf.F<sub>1</sub>I). Es claro que, los cambios espectrales son idénticos. Esto se debe a que los medios de incubación para activar (sac 250 mM, HEPES 50 mM, ATP 10 mM, EDTA 1.5 mM, pH 8.0) y para promover la transferencia de Tir a Lis (sac 250 mM, TEA 50 mM, ATP 4 mM, EDTA 2 mM, pH 9.0) son semejantes y provocan ambos fenómenos simultáneamente.

En los insertos de los espectros de fluorescencia (fig.30), se observa el comportamiento de la actividad hidrolítica durante la transferencia intramolecular del Nbf. En el caso del complejo

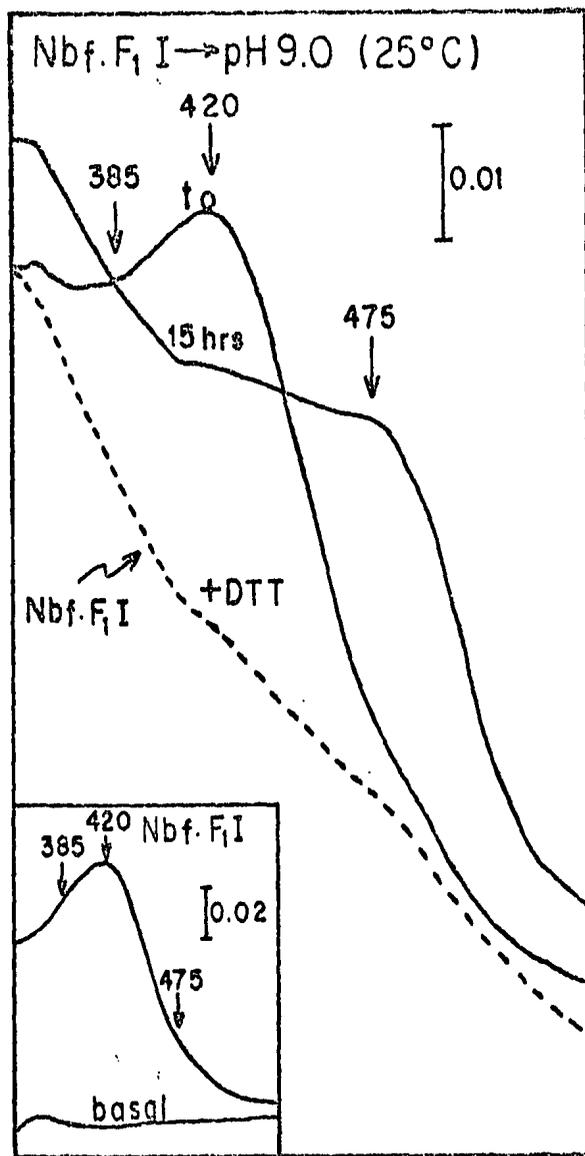


Fig. 29.- *Espectro de absorbancia del complejo NbF-N-F<sub>1</sub>I.* El complejo NbF.F<sub>1</sub>I, se obtuvo por incubación de la F<sub>1</sub>I (1.14 mg/ml) con NbF 100 μM durante 90 min. en las condiciones de la fig. 18. Al final de la incubación el NbF libre se eliminó por filtración en una columna de Penefsky. El inserto muestra el espectro (350-550 nm) del complejo NbF.F<sub>1</sub>I. El complejo se diluyó 1:1 con el amortiguador de incubación y una parte se preincubó con DTT 3 mM durante 15 min (---). La otra parte de la muestra, se llevó a pH 9.0 con TRIS saturado (t<sub>0</sub>). La muestra a pH 9.0 se incubó a temperatura ambiente durante 15 hrs en la oscuridad. La cantidad de NbF unido a Lis en el complejo calculado considerando un coeficiente de extinción molar de 26000 M<sup>-1</sup> (Ferguson y col. 1975b), es de 0.73 NbF/F<sub>1</sub>I.

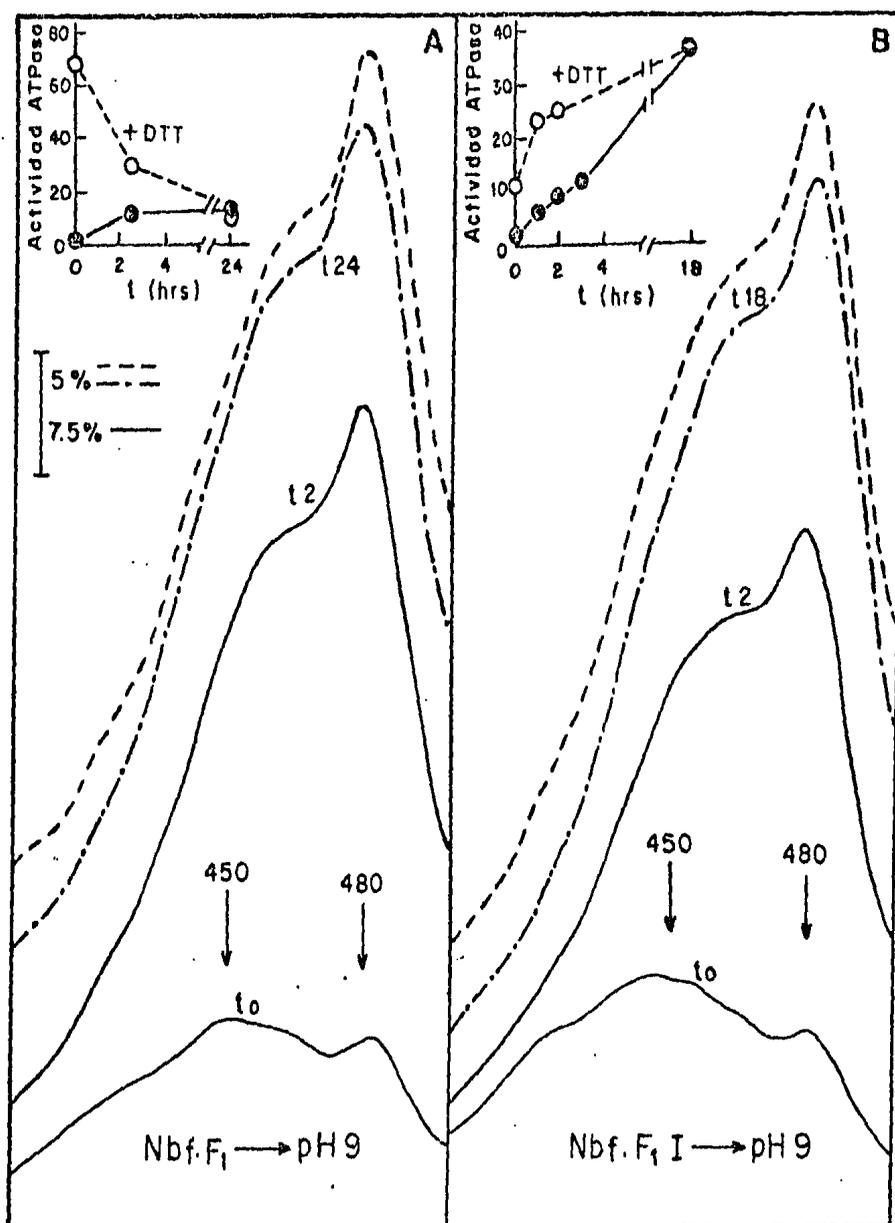


Fig. 30.- Curso temporal de la transferencia del Nbf de la Tir-β311 a la Lis-β162 en los complejos Nbf.F<sub>1</sub> Y Nbf.F<sub>1</sub>I. Los complejos Nbf.F<sub>1</sub> (0.14 mg/ml), y Nbf.F<sub>1</sub>I (0.13 mg/ml) obtenidos como en la fig. 29, se llevaron a pH 9.0 con TRIS saturado y se incubaron a 25 °C durante 24 y 18 hrs respectivamente. A los tiempos indicados se registraron espectros de excitación de 400-500 nm (Emis. = 530). La línea discontinua (---) representa el espectro del complejo Nbf.Enzima.Activado y dejado a temperatura ambiente los mismos tiempos que la enzima a pH 9.0. Los insertos muestran la actividad hidrolítica en  $\mu\text{Mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de los complejos Nbf.Enzima incubados a pH 9.0, los mismos tiempos.

Nbf.F<sub>1</sub> (inserto de fig. 30 A) observamos que durante la incubación a pH 9.0 probablemente existe una pequeña hidrólisis espontánea del Nbf, descrita por otros autores (Ting y Wang, 1980). Concomitante a esto se observa una disminución de la reversibilidad de la actividad hidrolítica por DTT (inserto de A), hasta un nivel en que la actividad medida en ausencia y presencia de DTT es la misma. Esto indica que todo el Nbf presente en la enzima se encuentra unido a la Lis-β162. La curva de actividad del complejo Nbf.F<sub>1</sub>I (inserto de fig. 30 B) incubado en las mismas condiciones, deja ver que la actividad hidrolítica del Nbf.F<sub>1</sub>I medida en presencia de DTT aumenta con el tiempo de 11 a 36 μMol min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup>, en lugar de disminuir, punto en que al igual que en Nbf.F<sub>1</sub>, la actividad es igual en presencia o en ausencia de DTT. Esto podría indicar que las condiciones de transferencia intramolecular del Nbf favorecen al mismo tiempo la transferencia a Lis y la salida de la PI de su sitio de inhibición, ya que las dos condiciones experimentales son similares.

Dado que la comparación con las actividades hidrolíticas de los complejos F<sub>1</sub> y F<sub>1</sub>I es difícil por ser tan diferentes, decidimos recurrir a otro parámetro como es el cambio en absorbancia simultáneo a la transferencia y comparar las velocidades de asta del Nbf de Tir a Lis en los dos complejos. En el experimento de la fig. 31 los complejos Nbf.F<sub>1</sub> y Nbf.F<sub>1</sub>I se incubaron a la misma concentración de proteína (0.7 mg/ml) en presencia de nucleótidos a pH 9.0 y a diferentes tiempos se midió el cambio en D.O. a 475 nm característico de la unión Nbf-N-F<sub>1</sub>. Como podemos observar, la velocidad de transferencia del Nbf de Tir a Lis, es igual para ambas enzimas, y también la magnitud

calculada con el coeficiente de extinción molar que es similar (0.68 Nbf/F<sub>1</sub> y 0.85 Nbf/F<sub>1</sub>I).

A).- EFECTO DE NUCLEOTIDOS EN LA VELOCIDAD DE ENTRADA DEL Nbf A TIR- $\beta$ 311 Y EN LA TRANSFERENCIA A LIS- $\beta$ 162 EN F<sub>1</sub> Y F<sub>1</sub>I.

Ferguson y Radda en 1975a, demostraron que el Nbf inhibe a la F<sub>1</sub> a la misma velocidad en presencia y ausencia de nucleótidos, pero que la presencia del nucleótido hacía más lenta la transferencia intramolecular del Nbf de Tir a Lis. En ese trabajo mencionan que la transferencia del Nbf en ausencia de nucleótido es técnicamente difícil de medir debido a que la enzima sin nucleótido se inactiva rápidamente a pH 9.0.

Resultados recientes de la literatura (Ceccarelli y col. 1989), mostraron que en la F<sub>1</sub> soluble de cloroplasto modificada con Nbf (Nbf.CF<sub>1</sub>), la transferencia del Nbf se lleva a cabo en 1 hr en sacarosa, TEA, EDTA, pH 9.0 a 38 °C. Dado que nuestra enzima (F<sub>1</sub>I) y la CF<sub>1</sub> son muy similares en cuanto a actividad hidrolítica (ambas tienen actividad latente), decidimos estudiar la fijación del Nbf y su transferencia intramolecular en el complejo F<sub>1</sub>I comparativamente con F<sub>1</sub> en el medio utilizado para la CF<sub>1</sub>.

En la fig. 32 A ratificamos que el Nbf entra en la F<sub>1</sub> en ausencia de nucleótido, y que en estas condiciones la enzima es muy inestable. Esta inestabilidad se hace más evidente al pasar el complejo Nbf.F<sub>1</sub> a 38 °C y pH 9.0 (fig. 32 C), condiciones que inducen la transferencia intramolecular del Nbf. Si tratamos de la misma manera al complejo F<sub>1</sub>I (fig. 32 B y D), vemos que la curva

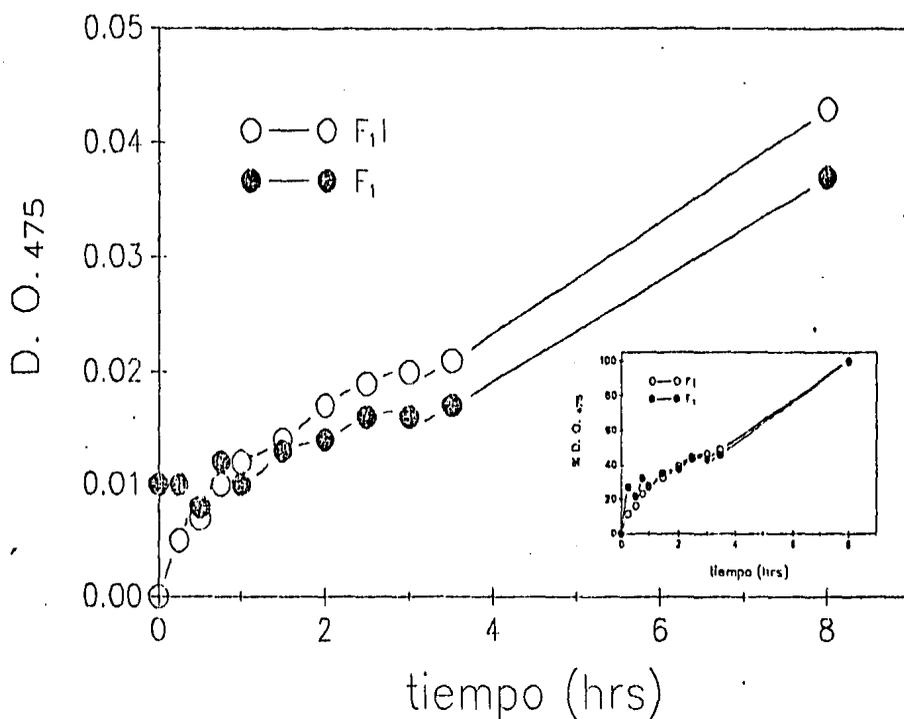


Fig. 31.- Curso temporal de la transferencia de Tir- $\beta$ 311 a Lis- $\beta$ 162 en Nbf.F<sub>1</sub> Y Nbf.F<sub>1</sub>I seguido por absorbancia a 475 nm. A) Los complejos Nbf.F<sub>1</sub> (0.77 mg/ml) y Nbf.F<sub>1</sub>I (0.72 mg/ml) en sac 250 mM, ATP 4 mM, EDTA 2 mM, pH 9.0, se incubaron a 25 °C en la obscuridad. A los tiempos indicados se midió la Absorbancia a 475 nm. La cantidad de Nbf transferida a Lis- $\beta$ 162 fué de 0.68 Nbf/F<sub>1</sub> y de 0.85 Nbf/F<sub>1</sub>I, considerando el coeficiente de extinción de 26000 M<sup>-1</sup>. B) Curvas normalizadas tomando como 100 % de Absorbancia la alcanzada por los complejos a las 17 hrs de incubación que fué de 0.037 y 0.043 para Nbf.F<sub>1</sub> y Nbf.F<sub>1</sub>I respectivamente.

de inhibición por Nbf es semejante a la encontrada en presencia de ATP (fig. 20). Igual que en la  $F_1$  carente de PI, la presencia de ATP no tiene ningún efecto en la fijación del Nbf. Es importante señalar que en éstas condiciones en las que no existen nucleótidos que favorezcan la salida de la PI (Feinstein y Moudrianakis, 1984) y en las que el grado de activación del control es menor, la reversibilidad por DTT es completa (fig. 32C). Cuando el complejo Nbf. $F_1$ I se pasa a pH 9.0 y 38 °C (fig. 32D), se observa que efectivamente la transferencia del Nbf de Tir a Lis se lleva a cabo muy rápido (60 min) comparado con las 18-20 hrs que toma ésta en presencia de nucleótido.

La fig 33 muestra la distribución de fluorescencia de los complejos Nbf-N- $F_1$  (A) y Nbf-N- $F_1$ I (B), separados en un gel de PA-SDS. En el gel de PA-SDS las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  corren en una sola banda, pero al separar el complejo Nbf-N- $F_1$  (C) en un gel ácido vemos que la fluorescencia se localiza exclusivamente en la subunidad  $\beta$ . Esto es semejante en el complejo Nbf-N- $F_1$ I (no mostrado). También en  $\gamma$  se presenta fluorescencia con menor intensidad que en  $\beta$ , igual que lo que sucede cuando se marca con Nbf la  $F_1$  soluble de cloroplasto ( $CF_1$ ). En este caso, se sabe que la fluorescencia en la subunidad  $\gamma$  se debe a la unión Nbf-SH, debido a que la marca se elimina preincubando la  $CF_1$  con iodoacetamida antes del tratamiento con Nbf (Ceccarelli y col., 1989).

Estos resultados nos muestran que a pesar de que una porción importante del Nbf unido a Tir se hidroliza durante la transferencia a Lis (fig. 30), aún existe suficiente Nbf unido a Lisina útil lo que hace posible la detección de derivados

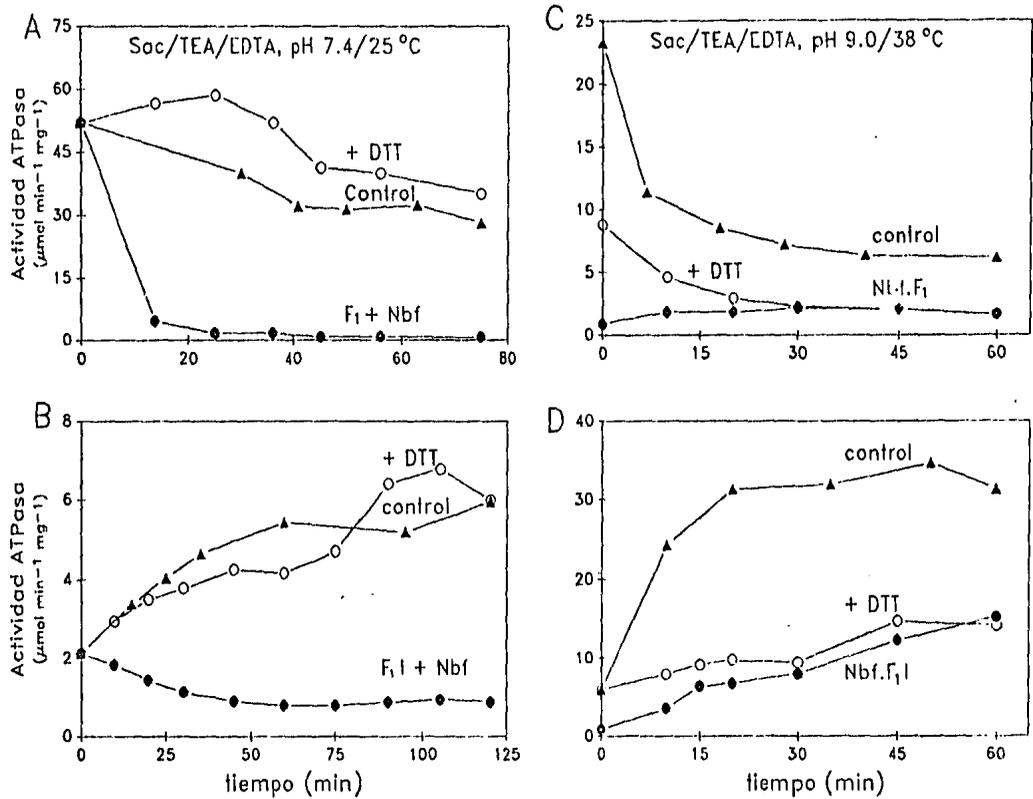


Fig. 32.- Entrada del Nbf a Tir-β311 y transferencia a Lis-β162 en F<sub>1</sub> y F<sub>1</sub>I en ausencia de nucleótidos. Las enzimas F<sub>1</sub> (2.1 mg/ml) (A) y F<sub>1</sub>I (9.1 gm/ml) (B), se incubaron en sac 250 mM, TEA 50 mM, EDTA 0.5 mM, pH 7.4 a 25 °C en la obscuridad en ausencia (O) y presencia (●) de Nbf 100 μM. A los tiempos indicados se determinó actividad hidrolítica en ausencia (●) y presencia (Δ) de DTT 3 mM. Al final de la incubación los complejos Nbf.F<sub>1</sub> y Nbf.F<sub>1</sub>I se filtraron por columnas de Penefsky equilibradas con el mismo amortiguador pero a pH 9.0, para eliminar el Nbf libre. Los controles (O) y los complejos Nbf.F<sub>1</sub> (C) y Nbf.F<sub>1</sub>I (D) se incubaron a 38 °C. A diferentes tiempos se tomaron alícuotas para medir actividad hidrolítica en ausencia (●) y presencia (Δ) de DTT 3 mM.

fluorescentes.

5. - LA SUBUNIDAD  $\beta$  QUE INTERACTUA CON LA PI EN EL COMPLEJO NATIVO F<sub>1</sub>I, PERMITE LA FIJACION DEL Nbf EN Lis.

Los resultados anteriores, mostraron que el complejo F<sub>1</sub>I nativo sí acepta la fijación del Nbf, y permite la transferencia a la Lisina. Esto se hizo evidente por el cambio en los máximos de absorbancia de 385 y 420 a 475 nm (fig. 29) al incubar el complejo Nbf.F<sub>1</sub>I a pH alcalino, así como por el marcaje fluorescente del complejo (fig. 33). Desconocíamos hasta este punto, si la subunidad  $\beta$  que interactúa con la PI presentaba o no el marcaje fluorescente con Nbf. Debemos recordar que la subunidad  $\beta$  que une a la PI no fija el [<sup>14</sup>C]DCCD (fig. 16 y 17).

Seleccionando la subunidad  $\beta$  con la cual interactúa la PI por entrecruzamiento del complejo Nbf-N-F<sub>1</sub>I con EEDQ, encontramos que la presencia de la PI no impidió el marcaje fluorescente del dímero  $\beta$ .PI (fig. 34- carril 5).

Trabajos anteriores (Stan-Lotter y Brag, 1986; Brag y Hou, 1987), sugirieron que la fijación del Nbf y del DCCD en la ECF<sub>1</sub>, producen un cambio conformacional en el complejo. Dado que el mecanismo de acción del EEDQ es similar al del DCCD (Laikind y col. 1985), cabe la posibilidad de que en el complejo F<sub>1</sub>I-entrecruzado (F<sub>1</sub>I.EEDQ), no se realice el marcaje fluorescente del dímero  $\beta$ .PI. Como se ilustra en la fig. 34, esto no fue así, ya que independientemente de que el marcaje fluorescente del complejo F<sub>1</sub>I se haga antes ó después del entrecruzamiento, seguimos observando la fluorescencia en el dímero  $\beta$ .PI.

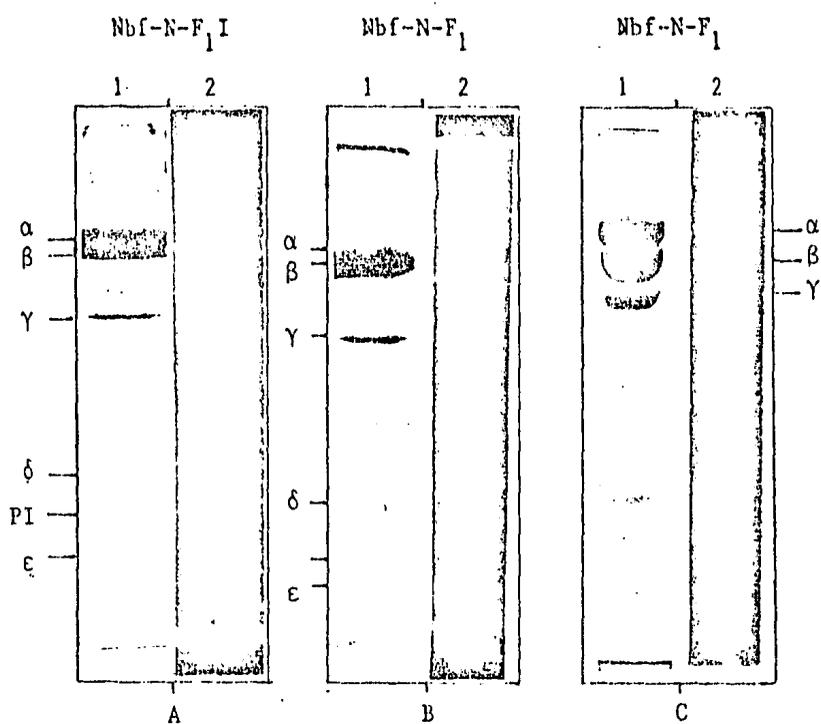


Fig. 33.- *Patron electroforético de los complejos Nbf-N-F<sub>1</sub> y Nbf-N-F<sub>1</sub>I.* En (A) y (B) son geles de PA-SDS al 13.5 %, y (C) en un gel de PA-Acido. En el carril (1) el gel se tiñó con Coomassie y en el (2) es la fluorescencia del gel sin teñir fotografiado (película XXX; 30 seg. de exposición) sobre un transiluminador de UV de onda larga. En (A) 40  $\mu$ g del complejo Nbf-N-F<sub>1</sub>I obtenido en las condiciones alcalinas de la fig. 29, donde la fijación en Tirosina del Nbf y transferencia a Lisina fueron en presencia de nucleótidos. En (B) y (C) 35  $\mu$ g de Nbf-N-F<sub>1</sub> obtenido marcando con Nbf en Tirosina, en presencia de nucleótido (fig. 29) y transfiriendo a la Lisina en ausencia de éste (condiciones de fig. 32).

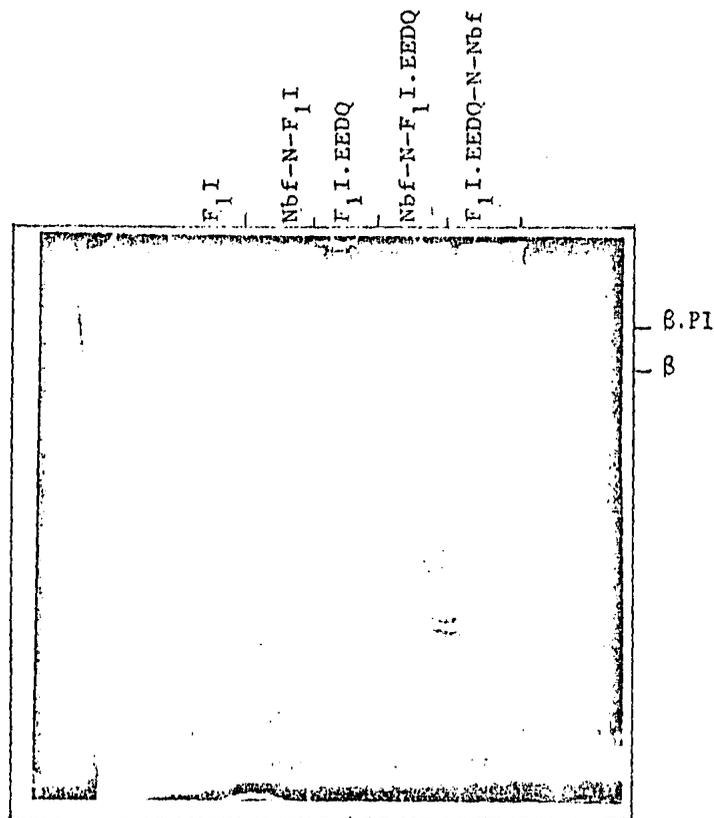
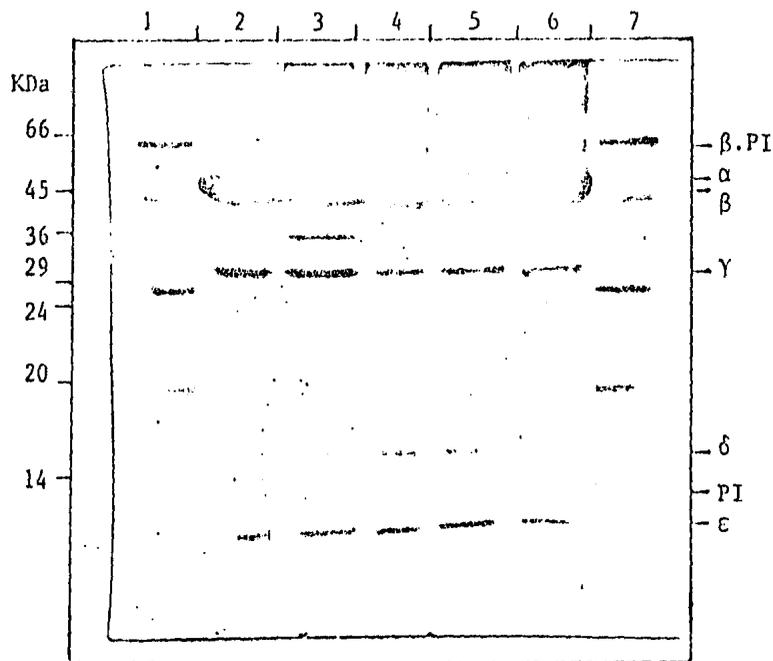


Fig. 34.- Patron electroforético del complejo Nbf-N-F<sub>1</sub>I entrecruzado y F<sub>1</sub>I.EEDQ-N-Nbf. Gel de PA-SDS al 13.5 % (A) teñido con Coomassie y (B) fotografiados sobre un transiluminador de UV de onda larga antes de teñir. (1) y (7) mezcla de marcadores de peso molecular igual que la empleada en la fig. 16. (2) 35 μg de F<sub>1</sub>I; (3) 35 μg de Nbf-N-F<sub>1</sub>I; (4) 40 μg de F<sub>1</sub>I-entrecruzado (F<sub>1</sub>I.EEDQ); (5) 50 μg de Nbf-N-F<sub>1</sub>I.EEDQ; (6) 50 μg de F<sub>1</sub>I.EEDQ-N-Nbf.

Existía la posibilidad de que el entrecruzamiento del complejo Nbf.F<sub>1</sub>I, impidiera la transferencia del Nbf unido al residuo de Tir a la Lis. La fig. 35 ilustra que el inducir la transferencia del Nbf en un complejo F<sub>1</sub>I modificado con Nbf y entrecruzado (Nbf.F<sub>1</sub>I.EEDQ), no modifica el patrón de fluorescencia de éste. Aún en condiciones en las cuales el complejo fluorescente se indujo después del entrecruzamiento, el dímero  $\beta$ .PI es fluorescente. Estos resultados sugieren que el sitio de interacción, de la PI en la subunidad  $\beta$  que, se localiza en la porción carboxilo terminal (residuos 394-459; ver fig. 3), no interfiere con la fijación del Nbf a la Tir- $\beta$ 311, ni con su transferencia a la Lis- $\beta$ 162. Es importante aclarar que aunque los residuos de aminoácido a los que se une la PI (394-459) están alejados de los que fijan el Nbf (Tir- $\beta$ 311 y Lis- $\beta$ 162), el arreglo subunida $\beta$  en el complejo no es lineal. De hecho, como se mencionó anteriormente (sección III), es probable que la porción carboxilo terminal de la subunidad  $\beta$  (sitio de unión de la PI), se encuentre muy cercana al residuo Lis- $\beta$ 162, ya que posiblemente el Glu- $\beta$ 199 es el que está formando una unión covalente con la PI al entrecruzar con EEDQ.

Los resultados anteriores demuestran que el entrecruzamiento con EEDQ del complejo F<sub>1</sub>I no afecta la modificación de dicho complejo con Nbf, ni su transferencia de Tir a Lis, independientemente del paso en que el complejo se someta al entrecruzamiento (fig. 34 y 35). Esto podría sugerir que el EEDQ no modifica ostensiblemente la conformación de la enzima, sino que al entrecruzarla fija su conformación en una posición determinada.

No se puede descartar la posibilidad de que en los complejos

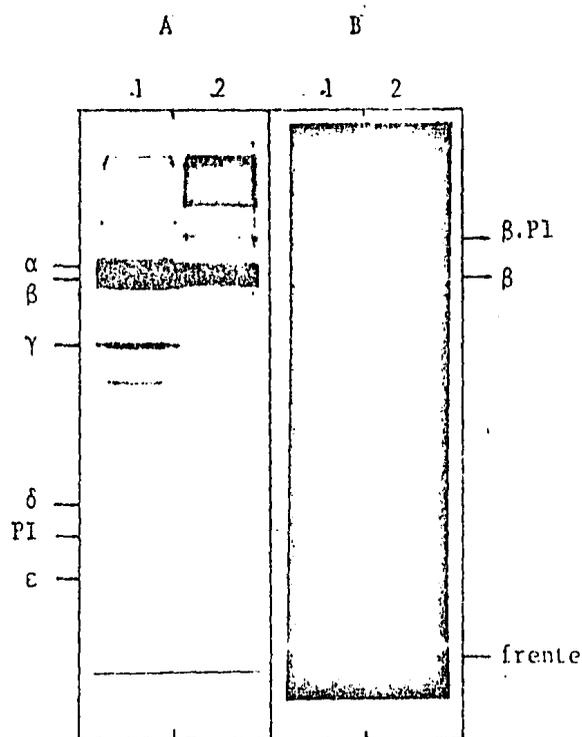


Fig. 35.- Gel de PA-SDS del complejo Nbf.F1I-entrecruzado con EEDQ e incubado a pH alcalino para inducir la transferencia a Lis. (Complejo Nbf.F1I.EEDQ-pH 9.0). El complejo F1I se modificó con Nbf 100  $\mu$ M por incubación durante dos horas. Al final de esta, el Nbf libre se eliminó filtrando en una columna de Penefsky equilibrada con sac. 250 mM, MOPS-HCl 10 mM, pH 6.7. Al eluido se le añadió Mg-ATP y EEDQ 2 mM, y se reincubó a 30 °C durante 20 min en la oscuridad. Al final del entrecruzamiento el EEDQ libre se eliminó filtrando en una columna de Penefsky equilibrada con sac. 250 mM, TEA 50 mM, ATP 4 mM, EDTA 2 mM, pH 9.0, y se reincubó a 25 °C durante 20 hr en la oscuridad. El complejo obtenido de esta manera (Nbf.F1I.EEDQ-pH 9.0) se analizó en un gel de PA-SDS (A y B-2), comparativamente con un control que no se sometió a entrecruzamiento (Nbf-N-F1I; A y B-1). (A) gel teñido con Coomassie y (B) fotografiado en las condiciones de la fig. 33 sobre un transiluminador de UV antes de teñir.

F<sub>1</sub>I-entrecruzado y Nbf.F<sub>1</sub>I.EEDQ.-pH 9.0, la transferencia del Nbf de Tir a Lis sea intermolecular, es decir, que el Nbf unido a la Tir de una subunidad  $\beta$  (Nbf.Tir- $\beta_1$ 311) se transfiera a una Lis de otra subunidad  $\beta$  diferente (Nbf.Lis- $\beta_2$ 162).

6. - EL COMPLEJO F<sub>1</sub>I MODIFICADO CON DCCD PERMITE LA FIJACION DEL Nbf EN Tir Y LA TRANSFERENCIA A Lis.

Nuestros primeros resultados (fig. 16 y 17), demostraron que el [<sup>14</sup>C]DCCD marca una subunidad  $\beta$  diferente a la que interactúa con la PI. Por otro lado se ha sugerido que el marcaje de la ECF<sub>1</sub> con DCCD modifica su conformación (Stan-Lotter y Brag, 1986; Brag y Hou, 1987). Con estos antecedentes existía la posibilidad de que la conformación modificada del complejo DCCD.F<sub>1</sub>I no permitiera el acceso del Nbf a la Tir y la transferencia de este a la Lis. El carril 1 de la fig. 36 (A) y (B), muestra que en el complejo F<sub>1</sub>I modificado con DCCD existe marcaje fluorescente con Nbf, y que la subunidad  $\beta$  que interactúa con la PI (carril 2A) se marcó fluorescentemente con el Nbf, aunque esto no se distingue claramente en la fotografía (carril 2B). Esto significa que en el complejo F<sub>1</sub>I nativo existe una de las tres subunidades " $\beta_1$ " que es menos reactiva, comparada con las dos restantes las cuales son modificables fácilmente con DCCD ( $\beta_2$  y  $\beta_3$ ). La entrada de DCCD y PI son mutuamente excluyentes, no así la del Nbf que es capaz de marcar la subunidad " $\beta$ " que interactúa con la PI. Los resultados anteriores sugieren que en el complejo F<sub>1</sub>I nativo, semejante a lo que se observa en la F<sub>1</sub> carente de PI, existe una *asimetría*

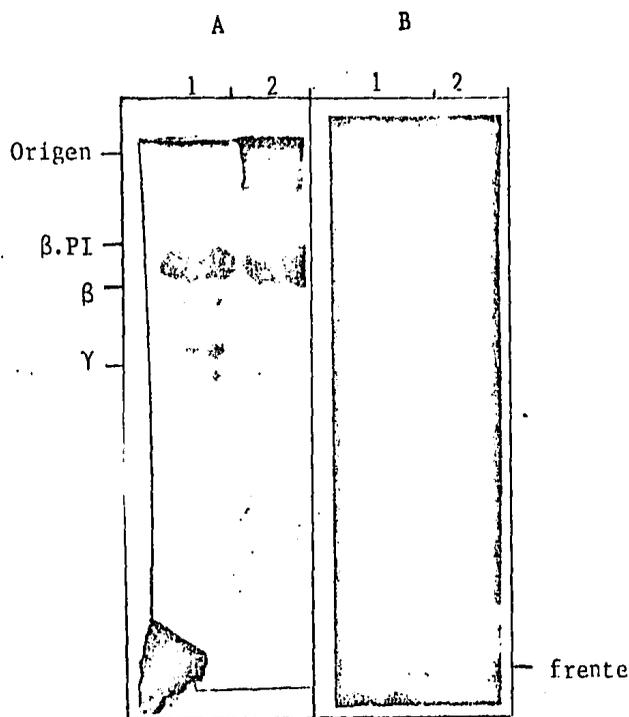


Fig. 36.- Distribucion de la fluorescencia en el complejo  $F_{1I}$  modificado con DCCD Y marcado con Nbf (DCCD. $F_{1I}$ -Nbf). El complejo  $F_{1I}$  se incubó en presencia de DCCD en las condiciones de la fig. 15, hasta inhibir su actividad hidrolítica en un 95 %. Al final de la incubación, el DCCD libre se eliminó filtrando en una columna de Penefsky equilibrada con sac. 250 mM, TEA 50 mM, ATP 4 mM, EDTA 2 mM, pH 7.4\*. El complejo DCCD. $F_{1I}$  se incubó a 25 °C durante dos horas en presencia de Nbf 100  $\mu$ M, y al final de ésta se filtró nuevamente por una columna de Penefsky equilibrada con el mismo amortiguador (\*) a pH 9.0. El complejo DCCD. $F_{1I}$ .Nbf se dejó a 25 °C y posteriormente se analizó en un gel de 6A-SDS al 13.5 % (1). (A) Gel teñido con Coomassie, y (B) Fluorescencia del gel sin teñir colocado sobre un transiluminador de UV. El carril 2 tiene el complejo DCCD. $F_{1I}$ -N-Nbf entrecruzado con EEDQ en las condiciones de la figura 11. Nota: en el gel (a) la proteína se ve difusa debido a que se tiñó con Coomassie 8 días después de correr el gel.

funcional evidenciada por la reactividad diferencial a inhibidores (Nbf, DCCD y PI), además de la *asimetría estructural* a nivel de las subunidades  $\beta$  del complejo. Dada por la existencia de una sola copia de las subunidades pequeñas ( $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ ).

## DISCUSION

### I.- CARACTERISTICAS DEL COMPLEJO $F_1I$ SOLUBLE.

En 1975 Feinstein y Moudrianakis, describieron un método para purificar el complejo  $F_1I$  soluble de mitocondrias de corazón de res, que se obtiene con una actividad hidrolítica de  $1-2 \mu\text{Mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ . Posteriormente (1984), encontraron que este complejo puede alcanzar su actividad hidrolítica máxima incubando a temperaturas altas en presencia de ATP (Activación). En nuestro laboratorio obtuvimos una preparación similar partiendo de psm-MgATP que tienen un alto contenido de PI (ver métodos) En este complejo, semejante a lo que se observa en las psm-MgATP (Beltrán y Col. 1984), la activación depende de la temperatura y del pH (fig. 5). Igual que en las psm Mg-ATP, el proceso de activación involucra la salida de la PI del sitio de inhibición (fig. 6). Nuestras observaciones en las que la enzima puede activarse hasta un 20 % sin pérdida ostensible de PI, apoyan la propuesta de que existe un sitio no inhibitorio para la PI (Van de Stadt y Col. 1973; Dreyfus y Col. 1981; Rousling, 1987; Lótscher y Col. 1984b), y sugieren que este sitio se encuentra en la superficie de la enzima. Estos resultados están de acuerdo con lo encontrado por el grupo de Capaldi (Lótscher y Col. 1984b) en  $ECF_1$ , en donde muestran que la interconversión de la enzima de una forma con baja actividad hidrolítica a una de alta, bajo la acción del detergente óxido de laurildimetilamina (LDAO), se debe a la liberación de la acción inhibitoria de  $c$  en en la subunidad  $\beta$ , sin que se remueva ésta del complejo  $ECF_1$ .

## 11.- FORMACION DEL DIMERO $\beta$ .PI POR ENTRECruzAMIENTO DEL COMPLEJO F<sub>1</sub>I CON EEDQ.

La actividad hidrolítica del complejo nativo F<sub>1</sub>I (figs. 7, 8, y 9), igual que en la F<sub>1</sub> carente de PI (Pougeois y Col. 1978) y la ECF<sub>1</sub> (Satre y Col. 1983), se inhibe por el reactivo entrecruzador EEDQ que puede catalizar la formación de un enlace amida entre un carboxilo y un amino vecino. Se ha descrito que el Mg<sup>+2</sup> a concentraciones de 2 mM protege a la F<sub>1</sub> de la inactivación por EEDQ, siendo más evidente este efecto al aumentar la concentración de Mg<sup>+2</sup> hasta 10 mM. Esto ha llevado a sugerir que el sitio de acción del EEDQ, igual que el del DCCD (Pougeois y Col. 1979), se encuentran muy cerca del sitio de unión del Mg<sup>+2</sup> libre en la enzima, ya que el sitio activo no tiene Mg<sup>+2</sup> como tal (Senior 1981). En las condiciones de incubación del presente trabajo del complejo F<sub>1</sub>I con EEDQ, observamos (fig. 10) que la presencia del sustrato de la enzima (MgATP) a una concentración de 2 mM a diferencia del Mg<sup>+2</sup> libre, no tiene ningún efecto protector en la velocidad de inactivación. Para nuestros objetivos la presencia de MgATP durante el tiempo de incubación de la F<sub>1</sub>I con el EEDQ es importante, debido a que la hidrólisis favorece que la PI permanezca en su sitio inhibitorio (Gómez-Fernández y Radda, 1978; Beltrán y Col. 1984). El análisis electroforético del complejo F<sub>1</sub>I inhibido con EEDQ (fig. 11), muestra que en éste, como en la F<sub>1</sub> reconstituida con PI exógena (Klein y Col. 1980), el EEDQ da lugar a bandas entrecruzadas de peso molecular mayor que las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Entre los complejos entrecruzados, existe una banda ("X") con peso molecular aproximado de 66 kDa que aparece solo cuando la

PI exógena (Klein y Col. 1980), ó la endógena (fig. 11) está presente en la F<sub>1</sub>.

La separación del complejo F<sub>1</sub>I entrecruzado en un gel de PA-SDS, muestra que existe una correlación entre la desaparición de la banda correspondiente a la PI (fig. 12) y la aparición de la banda con PM de 66 KDa.

El uso de anticuerpos Anti-PI y Anti- $\beta$  (fig. 13) nos permitió comprobar que efectivamente la banda de 66 KDa que se obtiene por entrecruzamiento del complejo nativo F<sub>1</sub>I con EEDQ, corresponde a un dímero y que está formado por la PI y una de las subunidades  $\beta$  del complejo. Estos resultados, y el hecho de que en el sistema reconstituido con PI exógena, ésta también forma parte de la banda de 66 KDa, sugieren que en la F<sub>1</sub>I nativa, una subunidad  $\beta$  está en contacto con la PI, independientemente de la historia del complejo.

El dímero " $\beta$ .PI" también se forma cuando la F<sub>1</sub> soluble ó particulada se reconstituyen con la PI exógena y se entrecruzan con EDAC que es otra carbodiimida que actúa como reactivo entrecruzador "sin grupo espaciador" (Jackson y Harris, 1983). Por otro lado, el entrecruzamiento de la ECF<sub>1</sub> con EDAC (Lótscher y Col. 1984a), produce el dímero " $\beta$ . $\epsilon$ " que es equivalente a " $\beta$ .PI", debido a que la subunidad  $\epsilon$  parece desempeñar las funciones de la PI en la ECF<sub>1</sub> (Sternweis y Smith, 1980; Dreyfus y Satre, 1984). El uso de reactivos entrecruzadores "sin grupo espaciador" como el EEDQ y el EDAC, seguido de análisis electroforético, ha resultado de utilidad en el estudio de los complejos F<sub>1</sub>I nativo y F<sub>1</sub> reconstituido con PI exógena, ya sea soluble (Klein y Col. 1980; Jackson y Harris, 1984 y el presente trabajo), ó particulada

(Jackson y Harris, 1984), debido a que de esta manera es posible seleccionar la subunidad  $\beta$  que interactúa con la PI.

Al hacer la inmunodetección de las subunidades  $\beta$ , en la F<sub>1</sub>I-entrecruzada con el anticuerpo Anti- $\beta$ , se identificó en la banda de 66 KDa la subunidad " $\beta$ " (fig. 13 y 16), sin embargo no se observaron bandas de precipitación a nivel de los complejos de PM mayor que el dímero " $\beta$ .PI"; A pesar de que los experimentos con [<sup>14</sup>C]DCCD (fig. 16 y 17) demostraron que en dichos complejos participa la subunidad  $\beta$ . Esto podría deberse a que la concentración de anticuerpo usado no fuera la adecuada para el reconocimiento de esos complejos.

El marcaje con [<sup>14</sup>C]NEM del complejo F<sub>1</sub>I entrecruzado (fig. 14), demostró que en el dímero de 66 KDa no participa ninguna de las 3 subunidades ( $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\epsilon$ ) que poseen residuos de cisteína y que se marcan con NEM (Senior, 1970). Esto confirma que dicha banda corresponde al dímero " $\beta$ .PI".

El hecho de que tanto en el sistema nativo como en el reconstituido la PI se encuentre interactuando con una subunidad  $\beta$ , no descarta la posibilidad de que las interacciones de ambos complejos puedan ser diferentes. Experimentos comparativos entre el complejo nativo F<sub>1</sub>I y F<sub>1</sub>.PI reconstituido han demostrado que ambos complejos no se comportan igual (Warshaw y Col 1963; Galante y Col. 1981; Valdés y Dreyfus, 1987).

### III. - REACTIVIDAD DEL COMPLEJO F<sub>1</sub>I NATIVO AL DCCD.

La reactividad del complejo F<sub>1</sub>I frente al DCCD, es similar al

descrito para la  $F_1$  (Pougeois y Col. 1979). La unión de un mol de de [ $^{14}C$ ]DCCD por  $F_1I$  (fig. 15 B), inhibe en un 95 % (fig. 15 A) la actividad hidrolítica (expresada al máximo) del complejo. El análisis electroforético del complejo  $F_1I$  modificado con [ $^{14}C$ ]DCCD, mostró que tanto en éste como en la  $F_1$  carente de PI, la fijación del DCCD es en la subunidad  $\beta$  (fig. 16 A y B). La selección por entrecruzamiento con EEDQ, de la subunidad " $\beta_1$ " que interactúa con la PI (fig. 16 C), demostró que ésta subunidad " $\beta_1$ " no reacciona con el [ $^{14}C$ ]DCCD. Analizando detenidamente, los resultados del grupo de Vignais (Klein y Col. 1980) en que marcan con [ $^{14}C$ ]DCCD al sistema reconstituido sin eliminar el exceso de PI, se observó que solo una porción muy pequeña de la radioactividad total de las subunidades  $\beta$  se encuentra a nivel del dímero " $\beta.PI$ ". De acuerdo con esto, es posible suponer que la síntesis y la hidrólisis del ATP que cataliza el complejo  $F_1I$  particulado (Beltrán y Col, 1986), se realiza en una enzima que no tiene las tres subunidades  $\beta$  funcionalmente equivalentes. Esta conclusión está de acuerdo con los resultados obtenidos en  $ECF_1$  por el grupo de Capaldi (Tomassino y Capaldi, 1985; Lötscher y Capaldi, 1984), quienes demostraron que el complejo " $\beta.\epsilon$ " en el que la subunidad  $\epsilon$ , equivalente funcional de la PI (Sternweis y Smith, 1980; Dreyfus y Satre, 1984), no reacciona con DCCD. Esto sugiere que probablemente todas las  $H^+$ -ATP sintetasas funcionan con subunidades  $\beta$  no equivalentes.

Trabajos anteriores (Laikind y Col., 1985) demostraron que el EEDQ actúa en la  $F_1$  activando el residuo de Glu- $\beta$ 199. Dado que este reactivo produce el entrecruzamiento de la  $F_1$  con la PI, es muy probable que la PI se encuentre interactuando con ese residuo de Glutámico. Esto explica por que el Glu- $\beta$ 199 de una subunidad  $\beta$

puede fijar, ó la proteína inhibidora, ó el DCCD, pero no ambos inhibidores a la vez.

Los resultados de análisis electroforéticos de la  $F_1$  modificada con 2 moles de [ $^{14}C$ ]DCCD, indican que se puede reconstituir con PI exógena (Fig. 17A). Al seleccionar por entrecruzamiento la subunidad  $\beta_1$  que interactúa con la PI (fig. 17B), observamos que tampoco en este caso hay radioactividad en el dímero  $\beta$ .PI. Estos resultados confirman que la PI y el DCCD no pueden interactuar con la misma subunidad  $\beta$ .

#### IV. - REACTIVIDAD DEL COMPLEJO $F_1I$ NATIVO AL Nbf.

##### A) CON TIROSINA $\beta_{311}$ Y CISTEINA.

El Nbf se utilizó como otro inhibidor específico de la actividad hidrolítica de la  $F_1$ -ATPasa que reacciona con las subunidades  $\beta$  del complejo. Con este reactivo, igual que con el DCCD, el EEDQ y la PI, la enzima presenta un tercio de reactividad en las subunidades  $\beta$ . Esto es, que la unión de 1 mol de cualquiera de estos inhibidores por mol de enzima, es suficiente para inhibir cooperativamente la actividad hidrolítica en un 95 %, a pesar de que el complejo tiene tres copias de la subunidad  $\beta$  con estructura primaria idéntica. En el complejo nativo  $F_1I$ , el Nbf es capaz de inhibir la actividad hidrolítica (fig. 18, 19 y 20). Esta inhibición es dependiente de la concentración de inhibidor (fig. 18) y del tiempo de incubación (fig. 19 y 20).

Por datos anteriores, sabemos que la inhibición de la actividad hidrolítica de la  $F_1$  por Nbf se debe a la modificación

específica del residuo de Tir- $\beta$ 311 (Ferguson y Radda, 1975a; Andrews y Col., 1984) de una de las subunidades  $\beta$  del complejo, y que esta inhibición puede revertirse 100 % por DTT. En el complejo F<sub>1</sub>I derivatizado con Nbf (Nbf.F<sub>1</sub>I) la reversibilidad también es total. Esta conclusión derivó de datos espectrofotométricos (figs. 23, 24 y 25) y no se pudo establecer a partir de medidas de actividad catalítica (figs. 20, 21 y 22), ya que la interpretación de éstos últimos resultó ser un poco ambigua.

Aunque el Nbf es muy reactivo con grupos -SH (Birkett y Col. 1970), Ferguson y Radda (1974) demostraron que los residuos de Cis de las subunidades  $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\epsilon$  de la F<sub>1</sub> (Senior, 1970), no reaccionaban con él. Sin embargo, en nuestras condiciones, tanto la F<sub>1</sub> (fig.27 B), como la F<sub>1</sub>I (fig. 24 y 27 A) muestran un máximo de absorbancia a 420 nm, característico de la unión Nbf-S-Cis. Para diferenciar esta unión a grupos -SH de la unión Nbf-N-Lis, siendo ambas fluorescentes, se utilizó la reversibilidad por DTT que es exclusiva de la unión Nbf-S-Cis. Esto explica la reversibilidad de la fluorescencia que se obtuvo al tratar el complejo Nbf.F<sub>1</sub>I con DTT (fig. 23 B). El glutatión actúa de manera similar al DTT, revirtiendo la inhibición de la actividad hidrolítica del complejo Nbf.enzima, pero a diferencia de este último, el glutatión forma una unión covalente con el Nbf mediante su grupo -SH, dando como resultado un máximo de absorción a 420 nm. Esta característica del glutatión, nos permitió calcular, a partir de los espectros, la estequiometría Nbf:F<sub>1</sub>I, a nivel de tirosina y lisina. Esta es similar a la que presenta la F<sub>1</sub> carente de PI, y es de 1 mol en Tir y 0.2 moles en Lis (fig. 25). La diferencia importante entre este trabajo y el reportado con

7

anterioridad (Ferguson y Col., 1975a), radica en la reactividad del Nbf con dos grupos -SH, tanto en F<sub>1</sub>I (figs. 23, 24, 27 y 28), como en la F<sub>1</sub> (figs. 27 y 28), lo cual se manifiesta en los espectros de absorbancia (fig. 27) y de fluorescencia (fig. 28) de los complejos Nbf.enzima. Este comportamiento lo observamos en 3 preparaciones de F<sub>1</sub>, obtenidas por métodos diferentes (Penefsky, 1977; Tuena y Gómez-Puyou, 1977 y F<sub>1</sub> obtenida a partir de F<sub>1</sub>I - Métodos de este trabajo). Sabemos que el número de residuos de Cisteína accesibles a reactivos contra -SH varía dependiendo del reactivo que se use para detectarlo, de las condiciones de incubación, y del método de obtención de la F<sub>1</sub>. También se conoce que la actividad hidrolítica de ésta (Penefsky y Warner, 1965) y de la F<sub>1</sub>I, no se altera por la modificación de grupos -SH. Por otro lado e independientemente del reactivo anti-SH que se utilice, y del método empleado en la obtención de la F<sub>1</sub>, la enzima siempre tiene accesible, por lo menos, un grupo -SH. La discrepancia con los trabajos del grupo de Radda (Ferguson y Col. 1975a; Ferguson y Radda, 1974), en el cual estudiaron la reactividad de la F<sub>1</sub> con el Nbf, que tiene una gran capacidad de reaccionar con grupos -SH, y en la que no encontraron esta unión, no es clara, sin embargo nuestros resultados son acordes a los obtenidos por el grupo de Allison (Ceccarelli y Col., 1989). Al modificar la CF<sub>1</sub> con Nbf, ellos, al igual que nosotros, encontraron que en ese complejo, el Nbf además de reaccionar con la Tir-β311, modifica residuos de Cis. Esta modificación de -SH la eliminan preincubando la CF<sub>1</sub> con iodoacetamida, que los bloquea sin modificar la actividad enzimática.

B) CARACTERISTICAS DE LA ACTIVACION  
DE LOS COMPLEJOS Nbf.F<sub>1</sub> Y Nbf.F<sub>1</sub>I.

las condiciones de activación del complejo F<sub>1</sub>I, favorecen la salida de la PI de su sitio de inhibición, y permiten que la enzima exprese su actividad hidrolítica máxima (fig. 6). Estas condiciones no pueden usarse para conocer el grado de inhibición real, del complejo Nbf.F<sub>1</sub>I debido unicamente al Nbf. Esto se debe a que las condiciones de activación de los complejos F<sub>1</sub> y F<sub>1</sub>I modificados con Nbf en diferentes grados, (fig. 26), provoca hidrólisis parcial del Nbf unido a nivel de Tirosina (fig. 27 -- máximo a 385 nm).

Sin embargo, aunque no es posible determinar exactamente el grado de inhibición de la catálisis, se encontró que la modificación del complejo F<sub>1</sub>I con Nbf no afecta la salida de la PI por activación (Tabla I). Esto a pesar de que los dos inhibidores (Nbf y PI), interactúan con una subunidad  $\beta$ .

C) TRANSFERENCIA DEL Nbf DE Tir- $\beta$ 311 A Lis- $\beta$ 162 EN F<sub>1</sub> Y F<sub>1</sub>I

La incubación a pH 9 durante 15-20 hrs del complejo F<sub>1</sub>I modificado con Nbf, induce la transferencia de este último al residuo de Lis- $\beta$ 162 (figs. 29, 30 y 31). Esto es similar a lo que se obtiene en la F<sub>1</sub> carente de PI (Ferguson y Col. 1975b; figs. 30 y 31). Durante la incubación de los complejos Nbf.F<sub>1</sub> (fig. 30 A y Nbf.F<sub>1</sub>I (fig. 30 B), en condiciones alcalinas, hay hidrólisis espontánea de una porción del Nbf unido a ambos complejos (Ting y

Wang, 1980). En nuestras condiciones a pH 9.0, sí existió transferencia de Nbf a la Lis- $\beta$ 162; Esto se concluye a partir del hecho de que se detectó aparición del máximo de absorción a 475 nm (fig. 29) y aumento de fluorescencia con un máximo a 480 nm del espectro de excitación, al final de la incubación de los complejos Nbf.F<sub>1</sub> (fig. 30 A) y Nbf.F<sub>1</sub>I (fig. 30 B) en condiciones alcalinas.

La cantidad de Nbf que se recuperó en la Lis- $\beta$ 162 por las condiciones alcalinas, es similar (fig. 31) en F<sub>1</sub> (0.7 moles) y en F<sub>1</sub>I (0.8 moles).

*C-1) EFECTO DE NUCLEOTIDOS EN LA TRANSFERENCIA DEL Nbf DE  
Tir- $\beta$ 311 A Lis- $\beta$ 162 EN F<sub>1</sub> Y F<sub>1</sub>I.*

Los estudios comparativos entre F<sub>1</sub> (fig. 32 A) y F<sub>1</sub>I (fig. 32 B) mostraron que la inhibición de ambos complejos por Nbf, es independiente de la presencia de nucleótido en el medio de incubación (figs. 20, 32 A y B). De acuerdo con los resultados obtenidos por otros autores (Ferguson y Col. 1975b) para F<sub>1</sub>, confirmamos que la enzima necesita del nucleótido para mantenerse estable durante las condiciones de transferencia a la Lis- $\beta$ 162 (fig. 32 A).

La velocidad de transferencia intramolecular del Nbf en los complejos Nbf.F<sub>1</sub> y Nbf.F<sub>1</sub>I, aumenta de manera importante en ausencia de nucleótido, ya que el tiempo de incubación de 18-20 hrs (figs. 29, 30 y 31), disminuye a 60 min (fig. 32). Además y de acuerdo con lo encontrado con anterioridad (Ferguson y Col. 1975b), se observa que la inestabilidad de la F<sub>1</sub> en ausencia de

nucleótido, se hace más evidente a pH 9.0.

El análisis electroforético del complejo Nbf-N-F<sub>1</sub>I, en geles de PA-SDS, muestra que la fluorescencia debida a la unión Nbf-Lis, se encuentra ligada a la subunidad  $\beta$  (fig. 33 A), que esta de acuerdo con lo descrito para la F<sub>1</sub> carente de PI (fig. 33 B y C; Ferguson y Col., 1975b). Por otro lado y de acuerdo con los resultados obtenidos con el complejo Nbf-N-CF<sub>1</sub> (Ceccarelli y Col. 1989), encontramos que el complejo Nbf-N-F<sub>1</sub>I (fig. 33 A), y el Nbf-N-F<sub>1</sub> (fig. 33 B), separados en un gel de PS-SDS, presentan un poco de fluorescencia a nivel de la subunidad  $\gamma$ . Esta fluorescencia, que es de menor intensidad (Birkett y Col. 1970) que la que se observa por la unión Nbf-Lis, se debe a la interacción Nbf-S-Cis (Ceccarelli y Col. 1989).

La selección por entrecruzamiento, de la subunidad  $\beta_1$  que interactúa con la PI, nos permitió demostrar que ésta subunidad  $\beta_1$  tiene accesible la Lis- $\beta$ 162, ya que permite la modificación fluorescente con Nbf (fig. 34) a pesar de la presencia de la PI. Esto es independiente de que el entrecruzamiento de la enzima se haga posterior a la modificación con Nbf (fig. 34 carril 5), antes de ésta (carril 6), ó después del marcaje con Nbf en Tir y Cis y antes de la transferencia a Lis (fig. 35). Esto señala que el entrecruzamiento no modifica la accesibilidad de los residuos que toman parte en la transferencia, sin embargo, no podemos descartar la posibilidad, de que en el complejo nativo F<sub>1</sub>I la transferencia del Nbf de Tirosina o de Cisteína a la Lisina, sea *intermolecular* a diferencia de lo reportado para la F<sub>1</sub> carente de PI (Ferguson y Col., 1975a).

Los resultados del presente trabajo difieren de lo encontrado

por Brag y Hou (1986), al modificar con Nbf el complejo  $F_1$  soluble de *E. coli* ( $ECF_1$ ). En ese sistema observaron que la subunidad  $\beta_1$  que interactúa con la " $\epsilon$ " (equivalente funcional de la PI - Sternweis y Smith, 1980; Dreyfus y Satre, 1984), el sitio del Nbf está impedido por la presencia de la subunidad  $\epsilon$  en esa " $\beta$ ". Debemos tener presente que en la  $F_1$ -ATPasa mitocondrial, a diferencia de la de bacteria y la de cloroplasto, el inhibidor natural (PI), es una proteína adicional que aumenta la complejidad del sistema.

Observamos además que la modificación del complejo  $F_1I$  con DCCD, no altera ni impide la entrada del Nbf a la Lis- $\beta$ 162, seguida por el marcaje fluorescente de la subunidad  $\beta_1$  que interactúa con la PI (fig.36).

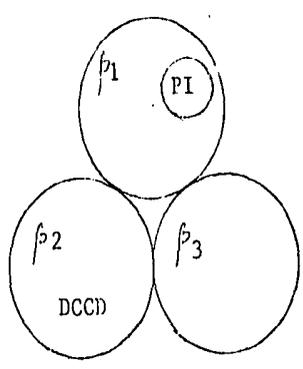
El complejo Nbf-N- $F_1I$ -entrecruzado, separado en geles desnaturalizantes (fig. 34, 35, 36), muestra fluorescencia en el dímero  $\beta$ .PI y a nivel de las subunidades  $\beta$  libres de PI, señalando que el Nbf puede unirse a cualquiera de las subunidades  $\beta$  con o sin PI. También podrían estar contribuyendo subunidades  $\beta_1$  que interactúan con la PI, pero que no sufrieron entrecruzamiento.

*Resumen:* En el presente trabajo demostramos que la subunidad  $\beta_1$  que interactúa con la PI (fig. 37), acepta el marcaje fluorescente con Nbf, pero no la modificación con DCCD (fig. 37). Estos resultados, sugieren que el complejo nativo  $F_1I$  soluble posee una *Asimetría estructural* dada por las subunidades pequeñas ( $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ ) y por el inhibidor natural PI. Esto se traduce en una *Asimetría funcional* de las subunidades " $\beta$ ". Esto se basa en: 1) El DCCD no modifica la subunidad " $\beta$ " que interactúa con la PI en el complejo  $F_1I$ ; esto es independiente de que la enzima se exponga

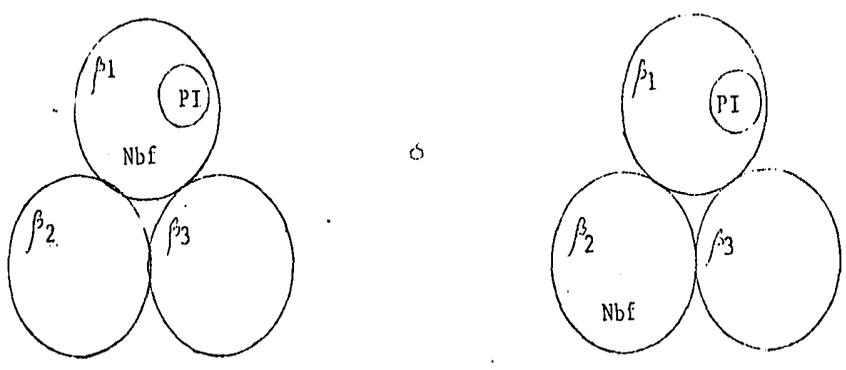
7

primero al DCCD ó a la PI (fig. 16 y 17); 2) La modificación del complejo nativo F<sub>1</sub>I con DCCD, no impide el marcaje fluorescente de la subunidad  $\beta_1$  con Nbf, y 3) La modificación fluorescente de la subunidad  $\beta_1$  con Nbf es igual e independiente de que la enzima se entrecruce con EEDQ antes o después de derivatizar con Nbf (fig. 34 y 35). Esto sugiere que la *Asimetría* de las subunidades  $\beta$  es permanente.

a) Modificado con 1 mol de DCCD.



b) Modificado con Nbf.



c) Modificado con DCCD y Nbf.

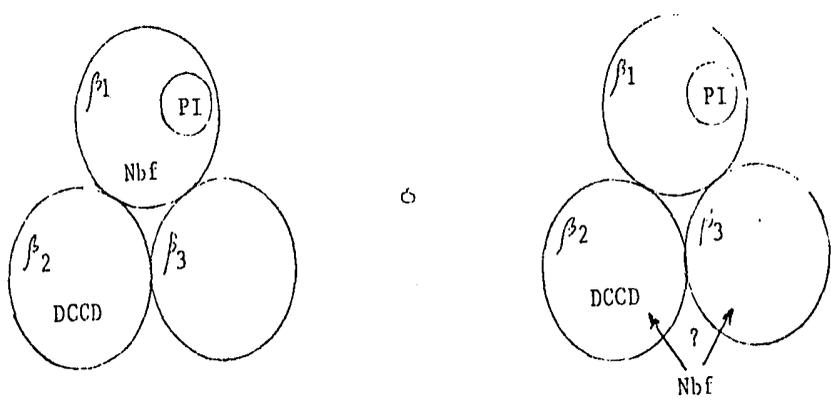


Fig. 37. Esquema que ilustra nuestras ideas sobre la interacción de Nbf, DCCD y PI con las distintas subunidades  $\beta$  del complejo PI.

## REFERENCIAS

- Allison, W.S., Bullough, D.A. y Andrews, W.W. (1986). *Meth. in Enzymol.* 126:741-761.
- Amory, A., Foury, F. y Goffeau, A. (1980). *J. Biol. Chem.* 255:9353-9357.
- Amzel, L.M., McKinney, M., Nathanan, P. y Pedersen, P.L. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79:5582-5586.
- Anderson, M.S., De Bruijn, H.L., Coulson, A.R., Eperon, I.C., Sanger, F. y Young, I.G. (1982). *J. Mol. Biol.* 156:683-717.
- Andrews, W.W., Hill, F.C. y Allison, W.S. (1984a). *J. Biol. Chem.* 259:8219-8225.
- Andrews, W.W., Hill, F.C. y Allison, W.S. (1984b). *J. Biol. Chem.* 259:14378-14382.
- Andrews, W.W., Yoshida, M., Hill, F.C. y Allison, W.S. (1984c). *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 123:1040-.
- Baird, B.A. y Hammes, G.G. (1977). *J. Biol. Chem.* 252:4743-4748.
- Beechey, R.B., Holloway, C.T., Knight, I.G. y Robertson, A.M. (1966). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 23:75-80.
- Beechey, R.B., Robertson, A.M., Holloway, C.T. y Knight, I.G. (1967). *Biochemistry* 6:3867-3879.
- Beisiegel, U. (1986). *Electrophoresis* 7:1-18.
- Belleau, B. y Malek, G. (1968). *J. Am. Chem. Soc.* 90:1651-1652.
- Beltrán, C. Gómez-Puyou, A. y Tuena de Gómez-Puyou, M. (1988). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 152:867-873.
- Beltrán, C., Tuena de Gómez-Puyou, M., Darszon, A. y Gómez-Puyou, A. (1986). *Eur. J. Biochem.* 160:163-168.
- Beltrán, C., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A. y Darszon, A. (1984). *Eur. J. Biochem.* 144:151-157.
- Binder, A., Jagendorf, A. y Ngo, E. (1978) *J. Biol. Chem.* 253:3094-3100.
- Birkett, D.J., Price, N., Radda, G.K. y Salmon, A.G. (1970). *FEBS Lett.* 6:346-348.
- Boekema, E.J., Berden, J.A. y VanHeel, M.G. (1986). *Biochim. Biophys. Acta.* 851:353-360.
- Boulay, F., Dalbon, P. y Vignais P.V. (1985). *Biochemistry* 24:7372-7379.
- Boyer, P.D. Cross, R. L. y Monsen, W. (1973). *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. USA. 70:2837-2839.
- Boyer, P.D. (1983). en *Biochemistry of Methabolic Processes* (Lennon, D.F., Stratman, F.W. y Zahlten, R. eds. ). pp 465-477, Elsevier, New York.
- Bradford, M. M. (1976). *Anal. Biochem.* 162:11-17.
- Bragg, P.D. y Hou, C. (1987). *Biochim. Biophys. Acta* 894:127-137.
- Bragg, P.D. y Hou, C. (1982). *Biochem. Int.* 4:31-38.
- Bullough, D.A. y Allison, W.S. (1986a). *J. Biol. Chem.* 261: 5722-5730.
- Bullough, D.A. y Allison, W.S. (1986b). *J. Biol. Chem.* 261:14171-14177.
- Bullough, D.A., Verburg, J.G., Yoshida, M. y Allison, W.S. (1987). *J. Biol. Chem.* 262:11675-11683.
- Bulygin, V.V. y Vinogradov, A.D. (1988). *FBBS Lett.* 236:497-500.
- Burnette, W. N. (1981). *Anal. Biochem.* 112:195-203.
- Cerione, R.A. y Hammes, G.G. (1982). *Biochemistry* 21:745-752.
- Ceccarelli, E.A., Verburg, J.G., Zhuo, S. y Allison, W. (1989). *Arch. Biochem. Biophys.* 272:400-411.
- Chen, W-J. y Douglas, M.G. (1987). *J. Biol. Chem.* 262:15605-15609.
- Copecky, J., Dedina, J., Votruba, J. Svoboda, P., Houstek, J., Babitch, S. y Drahotka, Z. (1982). *Biochim. Biophys. Acta* 680:80-87.
- Cox, G.B., Jans, D.A., Fimmel, A.L., Gibson, F. y Hatch, L. (1984). *Biochim. Biophys. Acta* 768:201-208.
- Cox, G.B., Jans, D.A., Fimmel, A.L., Gibson, F. y Hatch, L. (1984). *Biochim. Biophys. Acta* 849:62-69.
- Criddle, R.S., Packer, L. y Shich, P. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74:4306-4310.
- Cross, R.A., Cunningham, D. Miller, C.G. Xue, Z., Zhou, J.M. y Boyer, P.D. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:5715-5719.
- Cross, R.L. y Nalin, C.M. (1982). *J. Biol. Chem.* 257:2874-2881.
- 251
- Deters, D.W. Racker, E. Nelson, N. y Nelson H. (1974). *J. Biol. Chem.* 250:1041-1047.
- Dreyfus, G. y Satre, M. (1984). *Arch. Biochem. Biophys.* 229:212-219.
- Dunn, S.D. (1980). *J. Biol. Chem.* 255:11857-11860.
- Dunn, S.D. y Futai, M. (1980). *J. Biol. Chem.* 255:113-118.
- Dunn, S.D. y Heppel, L.A. (1981). *Arch. Biochem. Biophys.*

- 210:421-436.
- Dupuis, A., Lunardi, J., Issartel, J.P. y Vignais, P.V. (1985).  
Biochemistry 24:734-739 .
- Enns, K. y Criddle, R.S. (1977). Arch. Biochem, Biophys.  
183:742-752.
- Esch, F.S. y Allison, W.S. (1979). J. Biol. Chem. 254:10740-10746.
- Esch, F.S., Böhlen, P., Otsutka, A.S., Yoshida, M. y Allison, W.S.  
(1981). J. Biol. Chem. 256:9084-9089.
- Fang, J.K., Jacobs, J.W., Kanner, B.I., Racker, E. y Bradshaw,  
R.A. (1984). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81:6603-6607.
- Fearnley, I.M. y Walker, J.E. (1986). EMBO J. 5:2003-2008.
- Feinstein y Moudrianakis (1984). J. Biol. Chem. 259:4230-4236.
- Fellous, G., Godinot, C., Baubichon, H., DiPietro, A. y Gautheron,  
D.C. (1984). Biochemistry 23:5294-5299.
- Ferguson, S.J., Lloyd, W.J. Lyons, M.H. y Radda, G.K. (1975a).  
Eur. J. Biochem. 54:117-126.
- Ferguson, S.J. Lloyd, W.J. y Radda, G.K. (1974) FEBS Lett.  
38:234-236
- Ferguson, S.J. Lloyd, W.J. y Radda, G.K. (1975)b Eur. J. Biochem.  
54:127-133.
- Frangione, B. Rosenwasser, E. Penefsky, H.S. y Pullman, M.E.  
(1981). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:7403-7407.
- Freedman, R.B. (1979). Trends. in Biochem. Sci. (1979). Sep:193-197.
- Fujii, S., Hashimoto, T., Yoshida, Y., Miura, R., Yamano, T. y  
Tagawa, K. (1983). J. Biochem. 93:189-196.
- Foster, D.L. y Fillingame, R. H. (1979) J. Biol. Chem.  
254:8230-8236.
- Futai, M. (1977). Biochem. Biophys. Res. Commun. 79:1231-1237.
- Futai, M., Kanasawa, H., Takeda, T. y Kagawa, Y. (1980). Biochem.  
Biophys. Res. Commun. 96:227-234.
- Futai, M., Sternweis, P.C. y Heppel, L.A. (1974). Proc. Natl.  
Acad. Sci. USA 71:2725-2729.
- Galante, Y.M., Wong, Y-S. y Hatefi, Y. (1981). Biochemistry  
20:2671-2678.
- Garin, J., Boulay, F., Issartel, J-P., Lunardi, J. y Vignais, P.V.  
(1986). Biochemistry 25:4431-4437. .
- Gavilanes-Ruiz, M., Tommasino, M y Capaldi, R.A. (1988)  
Biochemistry 27:603-609.

- Glaser, E., Norling, B. y Ernster, L. (1980). *Eur. J. Biochem.* 110:225-235 .
- Godinot, C. y Gautheron, D.C., Galante, Y.M. y Hatefi, Y. (1981). *J. Biol Chem.* 256:6776-6782.
- Godinot, C., Penin, F. y Gautheron, D.C. (1979). *Arch. Biochem. Biophys.* 192:225-234.
- Gogol, E.P., Aggeler, R., Sagermann, M. y Capaldi, R.A. (1989b). *Biochemistry* 28:4717-4724.
- Gogol, E.P., Lücken, U. Bork, T. y Capaldi, R.A. (1989a). *Biochemistry* 28:4709-4716.
- Gogol, E.P., Lücken, U. y Capaldi, R.A. (1987). *FEBS Lett.* 219:274-278.
- Gómez-Fernandez, J.C. y Harris, D.A. (1978). *Biochem. J.* 176:967-975.
- Gómez-Puyou, A., Tuena de Gómez-Puyou M. y De Meis, L. (1986). *Eur. J. Biochem.* 159:133-140.
- Gornall, J. A., Bardawill, C. S. y David, M. M. (1949). *J. Biol. Chem* 177:751
- Grantham, R., Gautier, D., Govy, M., Jacobson, M. y Mercier, R. (1981). *Nucleic Acid Res.* 9:43-74.
- Gregory, R. Recktenwald, D. y Hess, B. (1981). *Biochim. Biophys. Acta* 635:284-294.
- Gresser, M.J., Myers, J.A. y Boyer, P.D. (1982). *J. Biol. Chem.* 257:12030-12038.
- Guillory, R.J. (1979). *Curr. Top. Bioenerg.* 9:267-414.
- Hanstein, W.G. (1976). *Biochim. Biophys. Acta* 456:126-148.
- Harris, D.A. (1978). *Biochim. Biophys. Acta* 463:245-273.
- Harris, D.A. (1984).  $H^+$ -ATPase (ATPsynthase): structure, function, biogenesis of the  $F_1$ - $F_0$  complex of coupling membranes (Papa, S. y Col., eds., Bari, Italia: Adriatica), pp. 387-395.
- Harris, D.A. Brook, J. y Baltscheffsky, M. (1985). *Biochemistry* 24:3876-3883.
- Hashimoto, T., Yoshida, Y. y Tagawa, K. (1984). *J. Biochem.* 95:131-136.
- Heinzelmann, W. y Gilgen, P. (1976). *Helv. Chim. Acta* 56:2727-.
- Ho, J.W. y Wang, J.H. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 116:599-604.
- Holleman, M., Runswick, M.J., Fearnley, J.M. y Walker, J.E.

- (1983). *J. Biol. Chem.* 258:9307-9313.
- Horstman, L.L. y Racker, E. (1970). *J. Biol. Chem.* 245:1336-1344.
- Huang, Y., Kantham, L. y Sanady, D.R. (1987). *J. Biol. Chem.* 262:3007-3010.
- Humbert, R., Brusilow, W.S.A., Gunsaaalus, R.P., Klionsky, D.J. y Simoni, R.D. (1983). *Biochem. J.* 210:395-403.
- Ikemura, T. (1981). *J. Mol. Biol.* 146:1-21.
- Ikemura, T. (1981). *J. Mol. Biol.* 151:389-409.
- Jackson, P.J. y Harris, D.A. (1983). *Biosc. Reports* 3:921-926.
- Jackson, P.J. y Harris, D.A. (1987). *FEBS Lett.* 229:224-228.
- Ji, H. T. (1979). *Biochim. Biophys. Acta* 559:39-63.
- Kagawa, Y. y Nukiwa, N. (1981). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 100:1370-1376.
- Kagawa, Y. y Racker, E. (1981). *J. Biol. Chem.* 241:2461-2466.
- Kagawa, Y., Sone, N., Yoshida, M., Hirata, H. y Okamoto, H. (1976). *J. Biochem. (Tokyo)*. 80:141-151.
- Kalayar, C., Rosing, J. Y Boyer, P.D. (1977). *J. Biol. Chem.* 252:2486-2491.
- Kananshvili, D. y Gromet-Elhanan, Z. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:1886-1890.
- Kananshvili, D. y Gromet-Elhanan, Z. (1983). *J. Biol. Chem.* 258:3714-3719.
- Kananshvili, D. y Gromet-Elhanan, Z. (1983b). *J. Biol. Chem.* 258:3720-3725.
- Kanasawa, H., Noumi, T. Futai, M. y Nitta, T. (1983). *Arch. Biochem. Biophys.* 223:521-532.
- Kimura, T., Nakamura, K, Kajiura, H., Hattori, H., Nelson, N. y Asahi, T. (1989). *J. Biol. Chem.* 264:3183-3186.
- Kironde, F. y Cross, R.L. (1986). *J. Biol. Chem.* 261:12544-12549.
- Kironde, F. y Cross, R.L. (1987). *J. Biol. Chem.* 262:3488-3495.
- Klein, G., Lunardi, J. y Vignais, P.V. (1981). *Biochim. Biophys. Acta* 636:185-192.
- Klein, G. Satre, M. Dianoux, A. C. y Vignais, P. V. (1980). *Biochemistry* 19:2919-2925.
- Klein, G., Satre, M., Zaccai, G. y Vignais, P. V. (1982). *Biochim. Biophys. Acta* 681:226-232.
- Klionsky, D.J. y Simoni, R.D. (1985). *J. Biol. Chem.* 260:11200-11206.
- Knowles, A. F. y Penefsky, H. S. (1972). *J. Biol. Chem.*

- 247:6617-6623.
- Koga, P.C. y Cross, R.H. (1982). *Biochem. Biophys. Acta* 679:269-278.
- Kohlbrenner, W.E. y Boyer, P.D. (1982). *J. Biol. Chem.* 257:441-3446.
- Kohlbrenner, W.E. y Cross, R.L. (1978). *J. Biol. Chem.* 253:7609-7611.
- Kohlbrenner, W.E. y Cross, R.L. (1979). *Arch. Biochem. Biophys.* 198:598-607.
- Laemmli, M. K. (1970). *Nature* 227:680-685.
- Laikind, P.K., Hill, F.C. y Allison, W.S. (1985). *Arch. Biochem. Biophys.* 240:904-920.
- Lauguin, G. Fougeois, R. y Vignais, P.V (1980). *Biochemistry* 19:4620-4626.
- Lee, C.P y Ernster, L. (1967) en *Meth. Enzymol.* X:543-548.
- Liang, A.M. y Fisher, R.L. (1983). *J. Biol. Chem.* 258:4784-4788.
- Lien, S. y Racker, E. (1971) *Methods Enzymol.* 23:547.
- Linnet, P. y Beechey, R.B. (1979). *Meth. Enzymol.* 55:472-518.
- Lötscher, H.R. y Capaldi, R.A. (1984). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 121:331-339.
- Lötscher, H.R., deJong, C. y Capaldi, R.A. (1984a). *Biochemistry* 23:4134-4140.
- Lötscher, H.R., deJong, C. y Capaldi, R.A. (1984b). *Biochemistry* 23:4140-4143.
- Löw, H. y Vallin, I. (1963). *Biochim. Biophys. Acta* 69:361-364.
- Lowe, P.N. y Beechey, R.B. (1981). *Biobchemistry J.* 196:443-449.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951). *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Lunardi, J., Garin, J., Issartel, J-P. y Vignais, P.V. (1987). *J. Biol. Chem.* 262:15172-15181.
- Lunardi, J., Klein, G. y Vignais, P.V. (1984). en:  $H^+$ -ATPase (ATPsynthase): structure, function, biogenesis of the  $F_1$ - $F_0$  complex of coupling membranes (Papa, S. y Col., eds., Bari, Italia: Adriatica), pp. 229-230.
- Lunardi, J. Satre, M. Bof, M. y Vignais, P.V. (1979): *Biochemistry* 24:5310-5316.
- 18:5310-5316.
- Lunardi, J. y Vignais, P.V. (1979). *FEBS Lett.*

- 102:23-28.
- Matsuno-Yagi, A. y Hatefi Y. (1984). *Biochemistry* 23:3508-3514.
- Nalin, C.M. Snyder, B. y McCarty R.E. (1985). *Biochemistry* 24:2318-2324.
- Nelso, N. y Cidon, S. (1984). *J. Bioenerg. Biomemb.* 16:11-36.
- Nelson, N. y Schatz, G. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4365-4369.
- Noumi, T., Futai, M. y Kanasawa, H. (1984). *J. Biol. Chem.* 259:10076-10079.
- Okada, Y., Hashimoto, T., Yoshida, Y. y Tagawa, K. (1986) *J. Biochem.* 99:251-256.
- Parsonage, D., Wilke-Mounts, S. y Senior, A.E. (1987). *J. Biol Chem.* 262:8022-8026.
- Penefsky, H.S. (1977). *J. Biol. Chem.* 252:2891-2899.
- Penefsky, H.S. (1979). *Adv. in Enzymol y Rel Areas of Mol. Biol.* 49:223-280.
- Penefsky, H.S. y Warner, R.C. (1965) *J. Biol. Chem.* 240:4694-4702.
- Peters, K. y Richards, F.M. (1977). *Ann. Rev. Biochem.* 46:523-551.
- Pougeois, R. (1983). *FEBS Lett.* 154:47-.
- Pougeois, R., Satre, M. y Vignais, P.V. (1978). *Biochemistry* 17:3018-3023.
- Pougeois, R., Satre, M. y Vignais, P.V. (1979). *Biochemistry* 18:1408-1413.
- Poulter, L. (1987). *J. Mol. Biol.* 197:89-97.
- Power, R., Cross, R.L. y Harris, D.A. (1983). *Biochim. Biophys. Acta* 724:128-141.
- Pullman, M.E. y Monroy, G.C. (1963). *J. Biol. Chem.* 238:3762-3769.
- Pullman, M. E., Penefsky, H. S., Datta, A. y Racker, E. (1960). *J. Biol. Chem.* 235:3322-3329
- Racker, E. (1981). en *Mitochondria and Microsomes* (Lee, C.P. *et al* eds.). pp. 337-356.
- Rosing, J., Kalayar, C. y Boyer, P.D. (1977). *J. Biol. Chem.* 252:2478-2485.
- Rouslin, W. (1987). *J. Biol. Chem.* 262:3472-3476.
- Russel, L.K., Kirkley, S.A., Kleyman, T.R. y Chang, S.H.P. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 73:434-443.
- Sakamoto, J. y Tonomura, Y. (1983). *J. Biochem (Tokyo)*. 93:1601-.
- Sakamoto, J. (1984). *J. Biochem (Tokyo)*. 96:475-481.

- Sanadi, D.R. (1982). *Biochim. Biophys. Acta* 683:39-56.
- Satre, M., Dupuis, A. Bof, M. y Vignais, P.V. (1983). *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 114:684-689.
- Satre, M., Klein, G. y Vignais, P.V. (1976). *Biochem. Biophys. Acta* 453:111-120.
- Satre, M., Lunardi, J., Pougeois, R. y Vignais, P.V. (1979). *Biochemistry* 18:3134-3140.
- Schneider, E. y Altendorf, K.H. (1985) *EMBO J.* 4:515-518.
- Schuster, S.M., Ebel, R.E. y Lardy, H.A. (1975). *J. Biol. Chem.* 250:7848-7853.
- Schuewzmann, K. y Pedersen P.L. (1986). *Arch. Biochem. Biophys.* 250:1-18.
- Sebald, W. y Hoppe, J. (1981). *Current. Topics in Bionerg.* 12:1-64.
- Senior, A.E. (1973). *Biochemistry* 12:3622-3627.
- Senior, A.E. (1973). *Biochim. Biophys. Acta* 801:249-277.
- Senior, A.E. (1979). *J. Biol. Chem.* 254:11319-11322.
- Senior, A.E. (1979). en *Membrane Proteins in Energy Transduction* (Capaldi, R.A., ed.). New York:Dekker, (1979). pp. 233-278.
- Senior, A.E. (1981). *J. Biol. Chem.* 256:4763-4767.
- Senior, A.E. (1988). *Physiol. Rev.* 68:177-231.
- Senior, A.E., Shoshan, V. y Selmon, B.R. (1980). *J. Biol. Chem.* 255:384-389.
- Senior, A.E. y Wise, J.G. (1983). *J. Memb. Biol.* 73:105-124.
- Smith, J.B. y Sternweis, P.C. (1975). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 62:764-771.
- Snyder, B. y Hammes, G.G. (1984). *Biochemistry* 23:5787-5795.
- Snyder, B. y Hammes, G.G. (1985). *Biochemistry* 24:2324-2331.
- Soong, K.S. y Wang, J.H. (1984). *Biochemistry* 23:136-141.
- Stan-Lotter, H. y Bragg, P.D. (1986)a *Arch. Biochem. Biophys.* 248:116-120.
- Stan-Lotter, H. y Bragg, P.D. (1986)b *Eur. J. Biochem.* 154:321-327.
- Steinmeier, R.C. y Wang, J.H. (1979). *Biochemistry* 18:11-18.
- Sternweis, P.C. (1978). *J. Biol. Chem.* 253:3123-3128.
- Sternweis, P.C. y Smith, J.B. (1980). *Biochemistry* 19:526-531.
- Sugiyama, Y. y Mukohata, Y. (1979). *FEBS Lett.* 98:276-280.
- Takeda, K., Hirano, M., Kanazawa, H. Nukiwa, N., Kagawa, Y. y Futai, M. (1982). *J. Biochem.* 91:695-701.

- Tamura, J. K. y Wang, J-H. (1983). *Biochemistry* 22:1947-1954.
- Tiedge, H., Lücken, U., Weber, J. y Schafer, G. (1982). *Eur. J. Biochem.* 127:291-299.
- Ting, L.P. y Wang, J.H. (1980). *J. Bioenerg. Biomemb.* 12:79-93.
- Tommassino, M. y Capaldi, R.A. (1985). *Biochemistry* 24:3972-3976.
- Towbin, H., Slachelin, T. y Gordon, J. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350-4354.
- Tsuprun, U.L., Orlova, E.V. y Mesyanzhinova, I.V. (1989). *FEBS Lett.* 244:279-282.
- Tuena de Gómez-Puyou, M., Dreyfus, G., Muller, U., Ayala, G. y Gómez-Puyou, A (1983) *J. Biol. Chem.* XXX:13680-1368X.
- Tuena de Gómez-Puyou, M. y Gómez-Puyou, A. (1977). *Arch. Biochem. Biophys.* 182:82-86.
- Tzagoloff, A. (1970). *J. Biol. Chem.* 258:4784-47887.
- Tzagoloff, A., MacLennan, D.H. y Byinglon, K.H. (1968). *Biochemistry* 7:1596-1602.
- Vadineau, A., Berden, J.A. y Slater, E.C. (1976). *Biochim. Biophys. Acta* 501:424-439.
- Valdes, A.M. y Dreyfus. G. (1987) *Biochem. Int.* 15:459-466.
- Van de Stadt, R.J., DeBoer, A.L. y Van Dam K. (1973). *Biochim. Biophys. Acta* 292:328-345.
- Van de Stadt, R.J., Kraaiipoel, R.J. y Van Dam, K. (1972). *Biochim. Biophys. Acta* 267:2536.
- Van de Stadt, R.J. y Van Dam K. (1974). *Biochim. Biophys. Acta* 347:240-252.
- Vázquez-Laslop, N. y Dreyfus, G. (1986) *J. Biol. Chem.* 261:7807-7810.
- Vignais, P.V. y Satre, M. (1984). *Mol. Cell. Biochem.* 60:33-70.
- Walker, J.E., Fearnley, I.M., Gay, N.J., Gibson, B.W., Nothrop, F.D., Powell, S.J., Runswick, M.J., Saraste, M. y Tybulewicz, V.L.J. (1985). *J. Mol. Biol.* 184:677-701.
- Walker, J.E., Saraste, M. y Gay, N.J. (1984). *Biochim. Biophys. Acta* 768:164-200.
- Walker, J.E., Runswick, M.J. y Saraste, M. (1982). *FEBS Lett.* 146:393-396.
- Wang, J-H. (1984). *Biochemistry* 23:6350-6354.
- Wang, J-H.. (1980). *J. Bioenerg. Biomemb.* 20:407-422.
- Weber, J. Lücken, V. y Schafer, G. (1985). *Eur. J. Biochem.*

- 148:41-47.
- Williams, N. y Coleman, P.S. (1982). *J. Biol. Chem.* 257:2834-2841.  
23:780 783.
- Williams, N., Nullihen, J.M. y Pedersen, P.L. (1984). *Biochemistry*  
Williams, N., Nullihen, J.M. y Pedersen, P.L. (1987). *Biochemistry*  
26:162-169.
- Wise, J.G. y Senior, A.E. (1985). *Biochem.* 24:6949- 6954.
- Wold, F. (1972). en *Meth. Enzymol.* XXV:623-651.
- Wu, J.C. y Wang, J. H. (1987)
- Xue, Z., Zhou, J-M., Melese, T., Cross, R.L. y Boyer, P.D. (1987).  
*Biochemistry* 26:3749-3753.
- Yoshida, M., (1983). *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 114:907-912.
- Yoshida, M., Allison, W.S., Esh, E.S. y Futai, M. (1982). *J. Biol.*  
*Chem.* 257:10033-.
- Yoshida, M., Okamoto, H., Sone, N., Hirata, H. y Kagawa, Y. (1977).  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 936-9940.
- Yoshida, M. Poser, J.W. Allison, W.S. y Esh, F.S. (1981). *J. Biol.*  
*Chem.* 256:148-153.
- Yoshida, M., Sone, N., Hirata, H. y Kagawa, Y. (1975). *J. Biol.*  
*Chem.* 240:2660-2667.
- Ysern, X., Amzel, L.M. y Pedersen, P.L. (1988). *J. Bioenerg.*  
*Biomemb.* 20:423-450.