

3
2^{ej.}

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

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

INSTITUTO DE FISIOLOGIA CELULAR

"INHIBICION DE LA $F_1F_0H^+$ -ATP SINTETASA MITOCONDRIAL
CON TRIFLUOROPERAZINA: PROTECCION CON $P_i + ADP$ "

POR

JOSE DE JESUS GARCIA TREJO

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE LICENCIADO
EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

MEXICO, D.F. 1992.

TESIS CON
FOLIO DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ABREVIACIONES Y SIMBOLOS.

XF_1F_0	X aparece como M, C, o E, y corresponden a los complejos F_1F_0 de mitocondria, cloroplasto y <i>E. coli</i> . respectivamente.
$\Delta\mu_{H^+}$	Potencial electroquímico de protones.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DCCD	Dicicloexilcarbodiimida.
PSM	Partículas submitocondriales.
TFP	Trifluoroperazina.
TFP^{r1}	Radical libre de trifluoroperazina.
TFP^{fm}	Trifluoroperazina fotomodificada.
ATP	Adenosíntrifosfato.
ADP	Adenosíndifosfato.
Pi	Fosfato inorgánico.
$K_{m_{ap}}$	Constante de Michaelis aparente.
UV	Luz ultravioleta.
NADH	Nicotinadeninucleótido reducido.

ABREVIACIONES Y SIMBOLOS.

XF_1F_0	X aparece como M, C, o E, y corresponden la los complejos F_1F_0 de mitocondria, cloroplasto y <i>E. coli.</i> respectivamente.
$\Delta\mu_{H^+}$	Potencial electroquímico de protones.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DCCD	Dicicloexilcarbodiimida.
PSM	Partículas submitocondriales.
TFP	Trifluoroperazina.
TFP^{rl}	Radical libre de trifluoroperazina.
TFP^{fm}	Trifluoroperazina fotomodificada.
ATP	Adenosíntrifosfato.
ADP	Adenosíndifosfato.
Pi	Fosfato inorgánico.
Km_{op}	Constante de Michaelis aparente.
UV	Luz ultravioleta.
NADH	Nicotinadeninucleótido reducido.

INDICE

Introducción.

El ATP como intermediario energético.	1
Mecanismos de síntesis de ATP intracelulares.	4
La $F_1F_0H^+$ -ATP sintetasa.	10
Función de las subunidades del complejo F_1 .	16
Función de las subunidades del complejo F_0 .	18
Características funcionales del complejo F_1F_0 .	21
Hipótesis del sitio catalítico de la F_1 como un microambiente hidrofóbico.	29
Objetivo	35
Métodos.	36
Resultados.	38
Discusión	55

INTRODUCCION

El ATP como intermediario energético.

Si alguien se preguntase los requisitos necesarios para calificar a algun ente como ser vivo, además de la autoreproducción, un criterio importante sería la existencia de un intercambio de materia y energía con el medio externo en un estado fuera del equilibrio termodinámico. Bajo estas restricciones las bacterias son entonces la esencial expresión de vida.

El alto grado de organización estructural y funcional de los seres vivos es una característica que anteriormente parecía una contradicción a la segunda ley de la termodinámica, ya que esto significaría en términos generales que la entropía de los seres vivos disminuiría con el paso del tiempo. Sin embargo, si se cuantifican los cambios entrópicos intra y extracelulares en realidad se espera un aumento en la entropía total del universo proveniente de los procesos irreversibles que ocurren dentro de la célula [1]. La posibilidad de realizar estos procesos irreversibles es dependiente del consumo de energía del medio externo en forma de nutrientes (metabolismo) o de luz (fotosíntesis).

Para la célula, la posibilidad de hacer reacciones irreversibles requiere que se mantenga fuera del equilibrio la reacción de hidrólisis del ATP. Desde los años 40, Lipmann [2] propuso un esquema para la síntesis y utilización del ATP, donde el

fosfato inorgánico (Pi) sufre un constante recambio en un ciclo energético que se inicia con la síntesis de compuestos fosfatados con enlaces de "alta energía"; estos enlaces al hidrolizarse aportarían energía para las diferentes funciones celulares. Esta visión se ha corregido por observaciones termodinámicas importantes [3]. La energía potencial la mide el ΔG de algún proceso, el cual se define para una reacción química

$$\Delta G = RT \ln \left(\frac{\prod [B_i]^{v_i}}{\prod [A_i]^{v_i}} \right) - RT \ln \left(\frac{\prod [B_{ieq}]^{v_i}}{\prod [A_{ieq}]^{v_i}} \right) \quad (1)$$

donde $[B_i]^{v_i}$ es la actividad de producto i en condiciones experimentales, elevado a su correspondiente coeficiente estequiométrico v_i , A se refiere a reactivos y eq a condiciones de equilibrio.

En esta ecuación, se observa que la máxima energía disponible para un acoplamiento es función de la diferencia que existe entre las condiciones *in vitro* o *in vivo* y la situación de equilibrio. Esto implica que la energía usada para cualquier reacción o proceso intracelular no proviene de la ruptura del enlace de "alta energía" del $Pi-\gamma$ del ATP, sino del desplazamiento del estado de equilibrio para hidrólisis de este enlace. Cabe mencionar que el ΔG° es solo una forma de expresar la K_{eq} y solo tiene valor como energía potencial en condiciones estándar, es decir a 1M de reactivos y productos. Por esta razón, para contemplar las posibilidades de acoplamiento energético se debe conocer el grado de desplazamiento fuera del equilibrio en que se encuentran cada una de las variables

del sistema. Para el caso de la hidrólisis del ATP, se puede calcular el ΔG para diferentes condiciones suponiendo una $K'_{(pH 7, [Mg]=10mM)}=1 \times 10^5$ [3]:

Tabla 1 Cambio en energía libre de Gibbs (ΔG) para la hidrólisis de ATP a ADP + Pi como función del alejamiento del equilibrio.

(RA).Radio de acción de masas	K'/RA	ΔG (kj/mol)	$[ATP]/[ADP]$ ([Pi]=10mM)
10^5	1	0	10^{-7}
10^3	10^2	-11.4	10^{-5}
10	10^4	-22.8	10^{-3}
1	10^5	-28.5	10^{-2}
10^{-1}	10^6	-34.2	10^{-1}
10^{-3}	10^8	-45.6	10
10^{-5}	10^{10}	-57.0	10^3

RA corresponde al primer miembro entre paréntesis de la ecuación (1), y K' al segundo. *In vitro* la mitocondria mantiene un RA de 10^{-5} , de modo que si existieran valores parecidos en la célula, se podría disponer de 57kj/mol provenientes de la hidrólisis de ATP.

Mecanismos de síntesis de ATP intracelulares.

Aunque a lo largo de la evolución biológica se han desarrollado complejas vías de síntesis y degradación de compuestos de acuerdo a las necesidades y entornos de cada especie, en realidad existen tres tipos de vías metabólicas por las cuales los seres vivos aseguran su suplemento de ATP: fermentación o fosforilación, refiriéndonos a la fosforilación del ADP a nivel de sustrato, respiración o fosforilación oxidativa por transporte de electrones, y fotosíntesis o fotofosforilación. En este último tipo de fosforilación también ocurre transferencia de electrones, pero la fuente primaria de energía es la luz, mientras que en la respiración es la oxidación de diferentes moléculas. De estas tres vías de síntesis de ATP, la fosforilación oxidativa y la fotofosforilación requieren de propiedades membranales para el acoplamiento de procesos escalares y vectoriales, mientras que en la fosforilación a nivel de sustrato ocurren acoplamientos de procesos escalares que no necesitan un medio anisotrópico y pueden darse en el citosol.

Para mantener un flujo unidireccional en la síntesis de ATP, la célula mantiene un constante consumo de material orgánico ó inorgánico (quimiótrofos), ó de luz (fotótrofos). La mayoría de los pasos metabólicos tienen equilibrios que favorecen las reacciones en el sentido fosforilante, y la estructura en cadena de las vías impide que el sistema se acerque a condiciones de equilibrio. Por otro lado, el constante consumo de ATP asegura también esta

direccionalidad. Si en algún momento existiese un exceso de ATP, la célula, aun en las bacterias, puede almacenar esta energía en forma de glucógeno, o lípidos como en el caso de animales y vegetales superiores. Además de esto, las enzimas claves de las vías metabólicas están reguladas positiva o negativamente por los diferentes nucleótidos de adenina, sustratos y/o productos respectivos, con el objeto de mantener concentraciones aproximadamente estacionarias de ATP intracelular.

La síntesis de ATP a nivel de sustrato por medio de la glucólisis o fermentación se realiza en el citosol con el uso de enzimas solubles que acoplan diferentes reacciones. La glucólisis es un mecanismo que utilizan las células a lo largo de toda la escala filogenética y funciona principalmente en condiciones donde a la célula o al tejido le es difícil respirar, o bien en organismos sin el sistema químico de la respiración. Algunas bacterias anaeróbicas fermentan además de azúcares, aminoácidos, bases nitrogenadas, alcoholes, etc. Estas rutas fermentativas se conocen en gran parte, y se sabe que la síntesis de ATP en todos estos casos se hace a nivel de sustrato [84].

La respiración y fotofosforilación son procesos que dependen de propiedades membranales. En el primer caso, la oxidación de diversos compuestos, como los mostrados en la Fig. 1 se hace por medio de una cadena de complejos proteicos membranales que llevan los electrones hasta un aceptor final. En la fotofosforilación, la luz absorbida por los pigmentos fotosintéticos se traduce en un transporte de electrones a nivel de complejos membranales. En ambos

casos el transporte de electrones se acompaña de una translocación vectorial de protones de un lado hacia otro de la membrana. En el caso de los procariotes la membrana plasmática es la que realiza la respiración o la fotofosforilación; en los eucariotes, la membrana interna de la mitocondria y la de los tilacoides de los cloroplastos, son las responsables de llevar a cabo la respiración y la fotofosforilación respectivamente.

El mecanismo de translocación de protones en cada uno de los complejos de la cadena respiratoria o fotosintética esta en vías de esclarecimiento. Aunque se tiene idea clara de la composición de cada complejo de la cadena respiratoria, los datos cristalográficos y de microscopía electrónica ofrecen solo una visión global de la estructura y de la disposición en la membrana. Exceptuando el caso del complejo *bc1*, el mecanismo de acoplamiento entre las reacciones de oxido-reducción y el transporte de protones es desconocido [3]

Para el caso del complejo *bc1*, este mecanismo de acoplamiento se ha podido establecer gracias a el modelo del ciclo Q propuesto por Mitchel [44], posteriormente corroborado con el uso de inhibidores del complejo *bc1* [45]. El complejo *bc1* transporta electrones del ubiquinol (QH_2) a dos moléculas de citocromo *c* translocando 4 protones al lado positivo de la membrana.

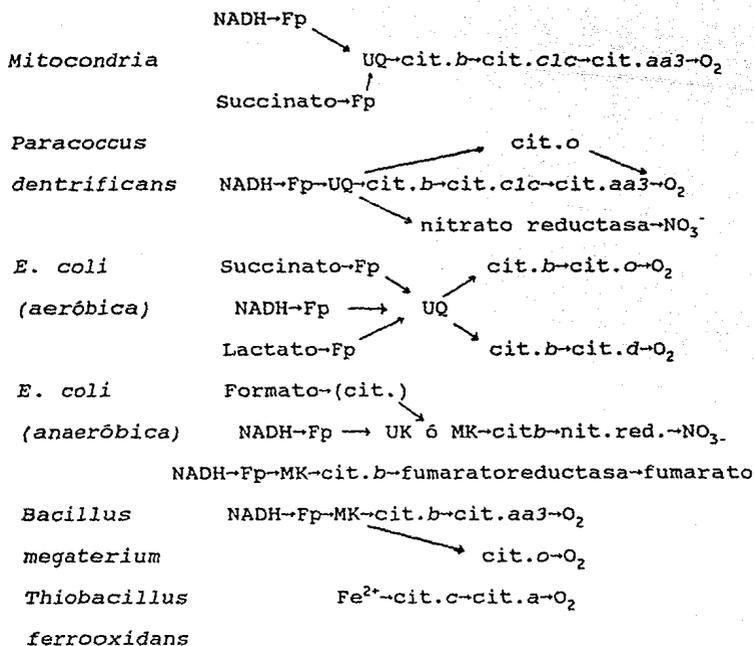


FIG 1. Ejemplos de cadenas respiratorias (de ref. 84).

Comunmente, la espontaneidad con la que ocurre la transferencia de electrones, y la eficiencia con la que apartir de este proceso se sintetiza ATP, se explican por medio de los cambios de potencial redox estándar $\Delta E^{\circ'}$, (pH=7). Por ejemplo, el cálculo de la energía libre para la transferencia de electrones desde el par NAD^+/NADH ($E^{\circ'} = -0.32 \text{ V}$) hasta el par $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ ($E^{\circ'} = +0.815 \text{ V}$) se puede dividir en dos pasos:

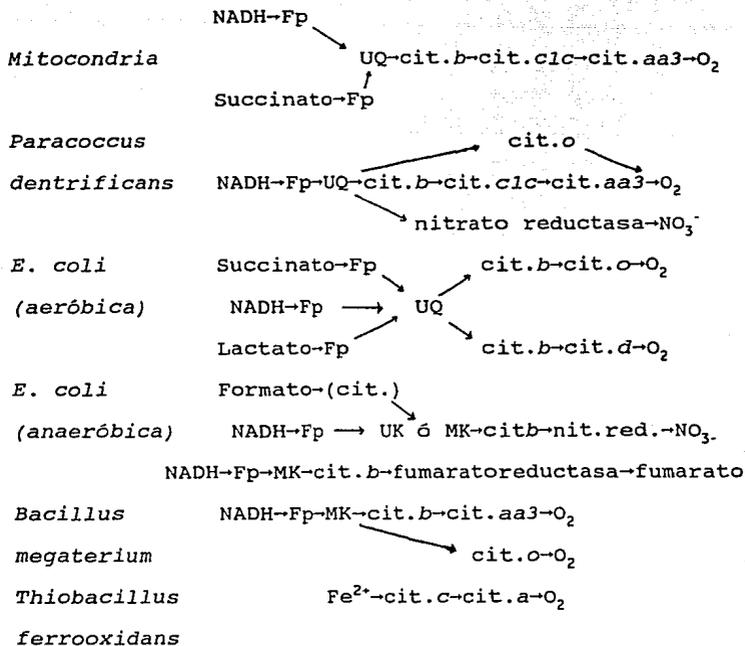
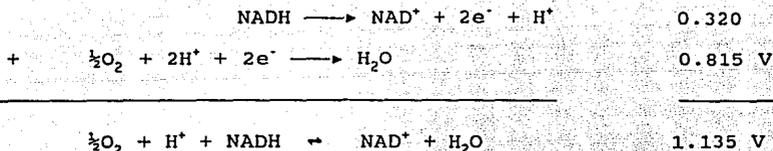


FIG 1. Ejemplos de cadenas respiratorias (de ref. 84).

Comunmente, la espontaneidad con la que ocurre la transferencia de electrones, y la eficiencia con la que apartir de este proceso se sintetiza ATP, se explican por medio de los cambios de potencial redox estándar ΔE° , (pH=7). Por ejemplo, el cálculo de la energía libre para la transferencia de electrones desde el par NAD^+/NADH ($E^{\circ} = -0.32 \text{ V}$) hasta el par $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ ($E^{\circ} = +0.815 \text{ V}$) se puede dividir en dos pasos:



y en base a la propiedad aditiva del ΔG° y la relación

$$\Delta G^{\circ} = -nF\Delta E^{\circ} = -RT \ln K_{eq} \quad (2)$$

se puede calcular un ΔE° final de 1.135 V, y por la ecuación anterior un $\Delta G^{\circ} = (-2)(23.061)(1.135V) = -52.2$ kcal/mol. Este último cálculo se interpreta como la energía aprovechable para la síntesis de ATP, sin embargo, como se hace notar en la ec. (2), el ΔE° es solo otra forma de expresar la K_{eq} , en este caso el valor de la K^*_{eq} es 1.8×10^{38} , lo cual indica que en el equilibrio las especies predominantes son el NAD⁺ y el agua, sin embargo para conocer la energía potencial aprovechable, es necesario calcular el cambio potencial redox real (ΔE) en función de cuánto se alejan del equilibrio la relación de las concentraciones de NADH, NAD⁺, O₂ y H⁺ de acuerdo con la siguiente relación:

$$\Delta E = \Delta E^{\circ} - \frac{RT}{nF} \ln \frac{\prod [B_i]^{v_i}}{\prod [A_i]^{v_i}} \quad (3)$$

donde B se refiere a productos y A a reactivos, y que en este caso:

$$\Delta E = 1.135 \text{ V} - (RT/nF) \ln \left(\frac{[\text{NAD}^+][\text{H}_2\text{O}]}{[\text{NADH}][\text{O}_2]^{1/2}[\text{H}^+]}\right)$$

de esta ecuación, se puede observar que en la medida que la concentración de NADH aumenta, se produce un valor progresivamente

mas pequeño e incluso negativo del logaritmo natural, esto se refleja en un signo positivo del ΔE° , y en consecuencia un ΔE positivo creciente. La relación entre el ΔG y el ΔE es exactamente la misma que entre el ΔG° y el ΔE° :

$$\Delta G = -nFE \quad (4)$$

Por lo tanto, a un $\Delta E > 0$ corresponde un $\Delta G < 0$, el cual es la medida correcta de la energía potencial aprovechable para la síntesis de ATP.

Parte de la energía transformada por estas cadenas transportadoras de electrones se usa en generar un $\Delta\mu_{H^+}$ transmembranal. Desde los años 40 se tenía la noción de que los procesos oxidantes en medio aerobio producían la síntesis de intermediarios energéticos fosforilados. En la actualidad, el modelo más aceptado del acoplamiento entre la respiración o la fotosíntesis y la fosforilación lo propuso P. Mitchel [4] en 1961. En este modelo se propone que la energía del $\Delta\mu_{H^+}$ es la que se utiliza para sintetizar ATP. Dentro de las pruebas experimentales que favorecen esta hipótesis, se ha comprobado que la disipación total del $\Delta\mu_{H^+}$ con protonóforos inhibe por completo la fosforilación en sistemas respiratorios y fotosintéticos. Sin embargo, una objeción aún permanente es que no se ha visto una proporcionalidad constante entre la magnitud del $\Delta\mu_{H^+}$ y la velocidad de fosforilación oxidativa [6]. La linealidad de la fosforilación en función del $\Delta\mu_{H^+}$ es dependiente de qué tanto las variables se encuentran alejadas de

sus posiciones de equilibrio, por lo que al menos fisiológicamente no se espera una linealidad clara entre ambas variables puesto que se calcula que existe un alejamiento del equilibrio de diez órdenes de magnitud en la concentración de ATP respecto a las de ADP y Pi.

Para que ocurra el acoplamiento entre el $\Delta\mu_{H^+}$ y la fosforilación oxidativa se necesita una estructura y un mecanismo molecular concretos. A la fecha no se han resuelto estas cuestiones a nivel atómico y molecular, sin embargo se ha identificado y caracterizado al complejo proteico encargado de tales funciones.

La $F_1F_0H^+$ -ATP sintetasa.

La ATP sintetasa de mitocondria, cloroplastos y bacterias, exceptuando a la de las arqueobacterias como por ejemplo la de *Halobacterium halobium*, tienen la misma base estructural. Fundamentalmente, la proteína está compuesta de un complejo polipeptídico integral de membrana (F_0) encargado del transporte de protones, y de un complejo extramembranal (F_1) que cataliza la reacción $ATP + H_2O \rightarrow ADP + Pi$. La composición y estequiometría obtenida hasta ahora de las diferentes subunidades en *E. coli*, cloroplastos y mitocondrias se muestra en la Tabla 2 con sus correspondientes nomenclaturas.

Los datos más aproximados sobre la estructura global del complejo F_1F_0 provienen de estudios de microscopía electrónica, en los cuales se observa la disposición membranal de F_0 y la periférica de F_1 [26]. También se ha descrito una disposición

hexagonal de las subunidades α y β en F_1 , y la localización central de las subunidades δ , τ y ϵ [25]. Algunos estudios preliminares con reactivos de entrecruzamiento en F_1 sugerían ya un arreglo cuaternario de este tipo [8].

El modelo más reciente de estructura cuaternaria toma en cuenta datos de entrecruzamiento de subunidades tanto de F_0 como de F_1 . En éste se propone que el "cuello" que une F_1 a F_0 está formado por las subunidades OSCP, F_6 , b (provenientes de F_0), τ , δ y ϵ (componentes de F_1) [30]. Estudios inmunquímicos y de electroforésis bidimensional con mutantes de las subunidades α y β de la F_1 de *E. coli* que afectan el ensamblaje, han mostrado que se puede obtener el complejo F_1F_0 en ausencia de las subunidades τ y ϵ [37], de esta manera se muestra que estas subunidades aunque sean miembros de F_1 , no son necesarias para la unión entre F_1 y F_0 .

Recientemente se ha podido modelar la estructura de la F_1 mitocondrial de bovino a una resolución de 3.6 Å a partir de datos de difracción de rayos X [38]. Con esta resolución aun no es posible detallar todo el curso de la cadena polipeptídica, ni la posición de todos los residuos, sin embargo, se pudieron identificar las posiciones relativas de las subunidades α y β . En la celda unitaria del cristal se acomodaron dos moléculas de F_1 conectadas por un eje de simetría triple. Esto implica que la unidad asimétrica de cada molécula de F_1 está formada por un par de subunidades α/β con un tercio de las subunidades τ , δ y ϵ . Lamentablemente, debido al arreglo del par de moléculas de F_1 en la celda unitaria, las subunidades pequeñas no se acomodaron conforme

a la simetría del cristal (su localización en la celda unitaria fué al azar), y por lo tanto, no se detectó densidad electrónica de estas subunidades.

Tabla II*. Composición y estequiometría de la F_1F_0 ATPasa de *E. coli*, cloroplasto y mitocondria.

<i>E. coli</i>	Cloroplasto	Mitocondria	mol/mol F_1F_0
F_1			
α	α	α	1
β	β	β	1
τ	τ	τ	1
δ	δ	OSCP*	1
ϵ	ϵ	δ	1
-	-	ϵ	1
-	-	Inhibidor	1
-	-	9kd (levadura)	1
-	-	15kd (")	1
F_0			
a	sub IV	sub 6	1
b	sub I	sub 4	2
c	sub III	sub 9	6-12
-	sub II	-	1
-	-	F_0^+	2
-	-	d	1
-	-	sub 8 (o A6L)	1
-	-	e^{++}	?

* Elaborada de una combinación de refs. 8 y 26.

+ Subunidades localizadas en el cuello.

++ Localización y estequiometría aun no definida.

Los estudios de difracción de rayos X se hicieron en presencia de algunos compuestos organomercurícos; en particular el mersalil es el que proporcionó la identificación de las subunidades α y β .

El Hg del mersalil se unió a tres sitios con una afinidad relativamente alta (0.1mM). Se conoce (a) que a estas concentraciones el mersalil se une preferencialmente a residuos de cisteína, (b) que en la F₁ de bovino solo las subunidades τ y α tienen cisteína, y (c) la secuencia de residuos en esta región de unión del metal. Por lo tanto, se identificaron a las subunidades que unieron mersalil como las α .

De este modo, se propuso un modelo del arreglo de los pares α/β en el cual se podría colocar un trímero de subunidades β en un plano físicamente separadas, y otro trímero de subunidades α en un plano paralelo al de subunidades β , con contactos α - α en el centro de la molécula vista desde cualquiera de los dos planos, existiendo contactos α - β en medio de ambos planos (Fig. 3b). Esta estructura es similar a la propuesta con base en el análisis rotacional de fotografías de microscopio electrónico [28] y resultados de entrecruzamiento [8]. De estos estudios se propuso un arreglo hexagonal de las subunidades α y β , como si la molécula tuviera un arreglo de 6 subunidades α o β repetida en la misma orientación (Fig 3a), mientras que la estructura cristalográfica muestra que la F₁ es un trímero de pares α/β . En el modelo hexagonal, los contactos α - β con sus respectivas regiones homólogas (por ejemplo sitios de unión a nucleótidos) serían posibles solo en el centro de la molécula por donde pasa el eje triple de simetría, mientras que en la estructura cristalográfica, este tipo de contactos podría hacerse en cualquier punto de interfase entre α y β . Estas observaciones son importantes, ya que como se mencionará

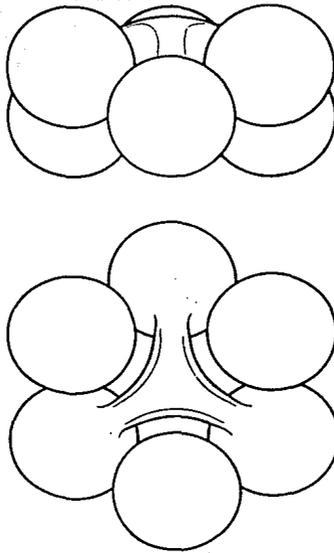


Fig. 3a. Modelo estructural de la F_1 Mitocondrial basado en el análisis rotacional de fotografías del microscopio electrónico . Las subunidades α y β muestran un arreglo hexagonal , posiblemente de forma alternada α/β . En la parte central se observa una masa tal vez proveniente de las subunidades ϵ , r y δ . Tomado de ref. 28.

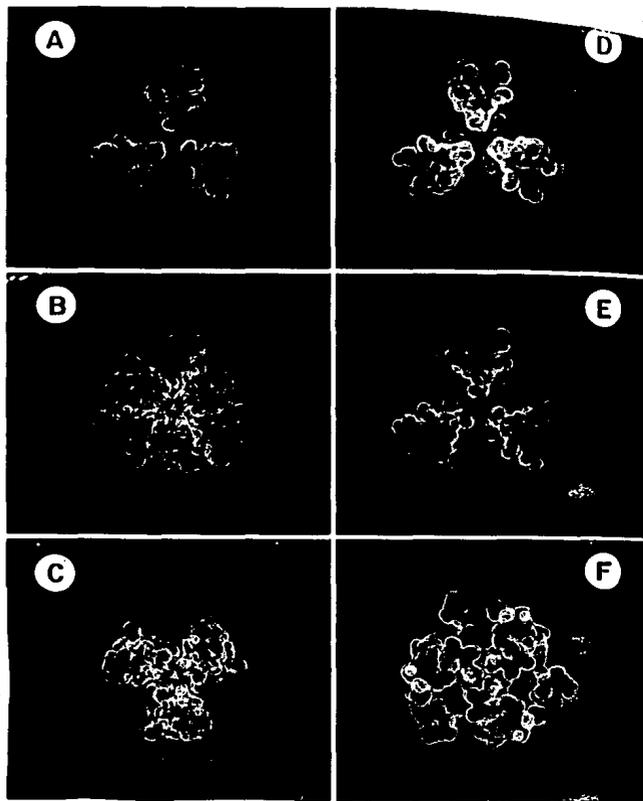


Fig. 3b. Estructura cuaternaria de la F₁ ATPasa a 3.6Å de resolución. Se muestran los átomos C α como esferas de 3.6Å de radio. A y C, sub. β y α respectivamente; B, complejo $\alpha_3\beta_3$ con las sub. β "sobre" las α ; D-F, tres cortes de 30Å de grueso de "arriba" hacia "abajo". Los círculos en amarillo corresponden a las posiciones del mersalil. Tomado de ref. 38.

posteriormente, es posible que el sitio catalítico se encuentre situado en una interfase α/β .

Función de las subunidades del complejo F_1 .

Tanto F_0 como F_1 pueden separarse físicamente y tener funcionalidad independiente. En el caso del canal para H^+ F_0 , por experimentos de reconstitución en proteoliposomas (8) y de genética (9), se demostró que se necesita de las subunidades a (IV o 6), b (I o 4) y c (III o 9) para que el complejo transporte protones. Las funciones de las demás subunidades de F_0 presentes en cloroplastos y mitocondrias no están claras. En F_1 se ha podido detectar actividad de ATPasa con la subunidad β aislada de *R. rubrum* [6], con heterodímeros $\alpha_1\beta_1$ y hexámeros $\alpha_3\beta_3$ preparados de la bacteria termofílica PS3 [7]. No se ha reportado actividad de ATPasa de la subunidad α pura, aunque se sabe que puede unir ADP [10], y que tanto la subunidad α como β tienen conservada en su secuencia el sitio que se ha designado como el de unión a nucleótidos de adenina. En general, se acepta que el sitio catalítico en F_1 se encuentra en la subunidad β , sin embargo, con base en experimentos de unión covalente de nucleótidos fotoactivables, se ha propuesto a la interfase entre subunidades α y β como la posible localización del sitio catalítico (11-13).

Respecto a las demás subunidades en la molécula de F_1 , la subunidad ϵ de CF1 (o δ de mitocondria) tiene propiedades inhibitorias [82] y secuencia semejantes [83] a la proteína

inhibidora de mitocondria. Los experimentos de reconstitución de MF₁, señalaban a la subunidad τ como componente indispensable para la actividad de ATPasa de complejos $\alpha_3\beta_3$, pero como se indicó anteriormente, esta actividad no requiere de la presencia de la subunidad τ . Actualmente se le ha asignado a esta subunidad una función en el ensamblaje de F₁, puesto que se ha observado en *E. coli* que algunas mutantes de terminación (que substituyen un codón normal por uno de terminación) en la región carboxiterminal, y mutantes de delección en la región aminoterminal de esta subunidad, muestran bajas actividades de ATPasa (<10% de la proteína control como resultado de un ensamblaje casi nulo) [37]. Estos datos resultan interesantes ya que se sabe que precisamente las partes amino y carboxiterminal de la subunidad τ están muy conservadas evolutivamente.

La denominación OSCP (Oligomycin Sensitivity Conferring Protein) de otra de las subunidades se debe al hecho de que durante la síntesis o la hidrólisis de ATP, su presencia en el complejo MF₁F₀ permite obtener sensibilidad al inhibidor oligomicina que interactúa uniéndose probablemente a la subunidad 6 de MF₀. Esto indica que esta subunidad influye, directa o indirectamente, en el flujo de protones entre F₁ y F₀. Por otro lado, los estudios de entrecruzamiento de subunidades, y de ensamblaje *in vivo* con técnicas de biología molecular, indican que OSCP interactúa con F₁ y que facilita la interacción entre F₁ y F₀ [8].

La proteína inhibidora de MF₁ es un factor que inhibe la actividad de ATPasa de la F₁, pero que en presencia del $\Delta\mu_{H^+}$ esta

propiedad disminuye permitiendo una síntesis más efectiva. No está claro si este proceso ocurre por el reacomodo o la disociación completa de este péptido de F_1 (para revisión ver ref. 21).

De la Tabla 2 y los datos mencionados es claro que la EF_1F_0 es el complejo funcional más simple de la ATP sintetasa, es decir, que sus subunidades constituyentes satisfacen los requisitos estructurales necesarios para el acoplamiento entre el $\Delta\mu_{H^+}$ y la síntesis o hidrólisis de ATP. Los polipéptidos adicionales que están presentes en cloroplastos y mitocondrias contribuyen a otras funciones adicionales como la estabilidad, la regulación, la biogénesis y la eficiencia de la molécula. Por ejemplo, se sabe que la velocidad de catálisis de MF1 es ≈ 40 veces la de EF1 [8], y que la constante de velocidad de liberación de P_i durante catálisis con ATP saturante es ≈ 15 veces mayor para la F_1 mitocondrial [37].

Función de las subunidades del complejo F_0 .

El funcionamiento de F_0 se ha estudiado menos que el de F_1 . Sin embargo, se han hecho estudios con mutantes en las tres subunidades EF_0 (a, b, y c) que identifican residuos importantes para la conducción de protones a través de la membrana (Tabla 3). Con estos datos se han propuesto modelos de conducción de protones por interacción de éstos con carboxilos de los residuos identificados en la Tabla 3 [23]. Entre los datos interesantes de esta tabla, se observa que las dos mutaciones supresoras de la mutación $bG1i-19$, se encuentran en las otras dos subunidades (a y c), esto implica

interacciones funcionalmente importantes entre las tres subunidades en los sitios mutados.

Tabla 3*. Mutaciones en F_0 de *E. coli*.

Subunidad	No. de residuos	Mutación	Fenotipo
a	271	Pro-143, Ser-206, Arg-210, His-245, -fin. Pro-240	Translocación de protones defectuosa. Suprime mutación <i>bGli-9</i> .
b	156	Gly-131, -fin. Gli-9	Trans. prot. def. Separación de F_1 . Trans. prot. def.
c	79	Ala-21, Asp-61, Gly-23, Gly 58, Gln-42, Ala-62 Ala-24	Trans. prot. def. Pérdida de sub c. Catálisis def. Supr. mut. <i>bGli-9</i> . Supr. mut. <i>cAsp-61</i> .

* Tomada de referencia 8.

La conducción de protones se inhibe con DCCD, un reactivo covalente que se une a la subunidad c de F_0 . Se ha demostrado que se requiere la interacción del reactivo con sólo una de las subunidades c para producir inhibición [24]. Esto sugiere que se necesita de todas las subunidades c en forma simultánea o concertada para que existala conducción de protones. En la subunidad c de *E. coli*, el DCCD reacciona con el Asp-61 (Tab. 3) que se localiza en la segunda hélice transmembranal (de N a C-

terminal) propuesta por métodos de predicción de estructura secundaria de proteínas membranales.

Recientemente se ha demostrado que la localización de este residuo (Asp-61) con respecto a la superficie membranal es un factor importante para el funcionamiento de F_0 . Con el uso de la mutagénesis dirigida (Asp-61-Gly) y el aislamiento de mutantes supresoras, se aisló una cepa doble mutante (Asp-61-Gly, Ala-24-Asp) que creció 60% en medio con succinato respecto al crecimiento de la silvestre. La actividad de translocación de protones de esta mutante, medida por apagamiento de la fluorescencia de un indicador fluorescente de pH (ACMA, 9-amino-6-cloro-2-methoxyacridina), fué de 25% respecto a la silvestre [40]. Estos datos hacen suponer la proximidad de los residuos 24 y 61 dentro de la membrana, en concordancia con el modelo más común del arreglo de dos hélices transmembranales en la subunidad c. Otro dato que favorece esta conclusión es que al secuenciar el gene de la subunidad c de mutantes de *E. coli* resistentes a DCCD, se encontró la mutación Ala-24-Ser. Es decir, la Ser-24 de la mutante redujo la reactividad del Asp-61 con el DCCD, además el gene de la mutante confirió resistencia al DCCD a cepas silvestres al ser sobreexpresado [42].

Por otro lado, con experimentos de reconstitución, se sabe que se necesita de un trímero $\delta\epsilon\tau$ para bloquear el paso de protones a través de F_0 [8]. Se supone que este triplete de subunidades confiere asimetría a la estructura de F_1 y al mismo tiempo obstruye el paso de protones por F_0 .

La composición y disposición en la membrana de las diferentes subunidades de F_0 es todavía tema de debate. En los últimos estudios con el complejo mitocondrial se han identificado de 7 a 8 subunidades diferentes [25,26,tabla 2], de las cuales al parecer ninguna tiene fragmentos que protruyan de la membrana interna hacia el espacio intermembranal, porque no son reconocidos ni por anticuerpos, ni por proteasas en mitoplastos [27]. En predicciones de la estructura secundaria de las subunidades a , b y c , se postuló que todas podrían tener cruces membranales (6, 1 y 2 respectivamente). Conforme al arreglo de estos cruces, se esperarían expuestos al espacio intermembranal los extremos amino y carboxilo de las subunidades a y c , el amino de la subunidad b y dos hazas (del inglés loop) de la subunidad a [23], sin embargo los datos con enzimas proteolíticas y anticuerpos contradicen el modelo, aunque podría ser el caso de que la accesibilidad de las porciones solubles de la subunidades membranales estuviera muy reducida y entonces la interacción entre proteasas o anticuerpos y estos fragmentos expuestos se viera limitada.

Características funcionales del complejo F_1F_0 .

En cuanto al funcionamiento concertado entre F_1 y F_0 , los estudios de afinidad por ADP y Pi en presencia de desacoplantes indican que el valor del $\Delta\mu_H$, afecta la afinidad del sitio catalítico por sus substratos. Aunque esto podría explicarse sin aducir cambios en la K_d por ADP o Pi [32], existe la posibilidad de

que haya un cambio conformacional que transmita la información desde F_0 hasta el sitio catalítico de la F_1 , y que sea la causa de los efectos mencionados. Esto está de acuerdo con la observación de que la presencia del $\Delta\mu_H$ induce la liberación de ATP de sitios de alta afinidad [17]. Este efecto podría ser entonces recíproco, es decir, si hay cambios en F_1 provocados por el funcionamiento de F_0 , se esperan cambios en F_0 provocados por la catálisis en F_1 . Esto ha sido observado detectando el inicio en la conducción a protones de CF_0 coincidente con la unión de un análogo no hidrolizable de ATP a CF_1 [46].

Además de los datos estructurales, se han desarrollado varios métodos de estudio sobre el mecanismo de catálisis y acoplamiento en este complejo. Uno de estos métodos se basa en la cuantificación y caracterización de la unión de nucleótidos a F_1 :

Se ha encontrado que en la F_1 existen seis sitios de unión de nucleótidos por mol de F_1 , de los cuales 3 son de alta afinidad por ADP o ATP, y que los otros tres pueden reemplazarse por AMP-PNP [14]. Durante la hidrólisis de ATP, tres de estos sitios pueden intercambiar nucleótidos con el medio más rápidamente que los otros tres [15,16]. Se piensa que los tres sitios que intercambian rápidamente nucleótidos del medio son los catalíticos y los otros tres de menor velocidad de recambio no son catalíticos. En los últimos años se ha demostrado que los sitios catalíticos tienen alta afinidad para ATP [17].

Estructuralmente se ha podido diferenciar entre sitios catalíticos y no catalíticos con el uso de análogos fotoactivables

de ADP y ATP, el marcaje covalente con estos análogos tanto de la subunidad α como de la β hacen suponer que ambos tipos de sitios de unión se encuentran en las interfaces α/β , como se había mencionado previamente. En otros estudios se localizó dentro de la estructura primaria de la subunidad β a los supuestos sitios catalíticos y no catalíticos [41]. Utilizando el marcaje con 2-azido-ANP (N=M,D, o T) se encontró el marcaje en un residuo de tirosina (Y en Tabla 4) en ambos tipos de sitios (catalíticos y no catalíticos), ambos residuos de tirosina están separados por 23 aminoácidos, y se encuentran en dos regiones conservadas en las subunidades β de bovino, cloroplasto, *E. coli*, e hígado de rata (Tabla 4).

El hecho de tener varios sitios de unión a los sustratos hace posible pensar en mecanismos cooperativos de catálisis en F_1 . De hecho, hay cooperatividad negativa para la cinética de unión de ADP [18] y cooperatividad positiva para la hidrólisis de ATP. Para este último caso existe la observación de que la hidrólisis de ATP en un solo sitio catalítico se acelera por la unión de nucleótidos a los otros sitios [19,20].

Previo a los estudios de unión de nucleótidos, el funcionamiento interdependiente de al menos dos sitios catalíticos había sido una importante predicción de los experimentos de recambio que cataliza la F_1 . Si se analiza en detalle la reacción que cataliza la enzima, se observa que por cada ciclo de reacción, un átomo de oxígeno se intercambia entre el Pi y el H_2O :



por lo tanto, la detección de incorporación de más de un oxígeno

del agua en el fosfato indica una síntesis reversible de ATP. Bajo esta premisa, se ha observado que la F1, en presencia de H¹⁸OH

Tabla 4*. Péptidos en sitios catalíticos y no catalíticos de la subunidad β marcados con 2-azido-ANP.

Fuente	Péptido marcado																				
Sitio catalítico																					
Corazón de bovino.	A	I	A	E	L	G	I	Y	P	A	V	D	P	L	D	S	T	S	R		
Clor. de espinaca.						G	I	Y	P	A	V	D	P	L	D	S	T	S	T	M	L
E. coli.	Q	I	A	S	L	G	I	Y	P	A	V	D	P	L	D	S	T	S	R		
Hígado de rata.	A	I	A	E	L	G	I	Y	P	A	V	D	P	L	D	S	T	S	R		
Sitio no catalítico																					
Corazón de bovino.	I	M	N	P	N	I	V	G	S	E	H	Y	D	V	A	R					
Clor. de espinaca.						I	V	G	E	E	H	Y	E	I	A	Q	R				
E. coli.	Q	L	D	P	L	V	V	G	Q	E	H	Y	T	A	R						
Hígado de rata.	I	M	D	D	N	I	V	G	S	E	H	Y	D	V	A	R					

* Tomada de referencia 41.

incorpora más de un oxígeno por ATP hidrolizado (las implicaciones de esta observación se discutirán mas adelante). La incorporación extra de oxígenos del agua durante la hidrólisis de ATP catalizado por la proteína se le denomina recambio. Este recambio, es una actividad que refleja procesos que ocurren dentro del sitio catalítico de la proteína y que son previos a la liberación de los productos o sustratos.

Si las velocidades de unión de sustratos, catálisis y

liberación de productos que ocurren en uno de los sitios activos son independientes (o no cooperativos) de los procesos análogos que pasan en otro sitio activo, se esperaría que la interacción de los sustratos o productos con los diferentes sitios no alteren el recambio. Sin embargo se encontró que a concentraciones bajas de ADP y Pi, la F_1F_0 en partículas submitocondriales cataliza un recambio mayor que a altas concentraciones de estos sustratos y de ATP [22]. Esto implica que existe un cambio importante en las constantes de velocidad de los pasos catalíticos en un sitio y que este es provocado por la interacción de ADP, ATP y Pi con otros sitios de la proteína. Con base en estos datos, se propuso un modelo de catálisis llamado "mecanismo de cambio de unión" en donde los pasos catalíticos de un sitio activo, dependen de los de otro en forma concertada [22]. Los datos de aceleración de la catálisis en un solo sitio debida a la interacción de nucleótidos en los demás sitios, y aquellos que indican que algunos análogos fotoactivables e inhibidores inactivan casi por completo al unirse en una relación 1:1 con F_1 , apoyan el modelo.

Los datos anteriores son importantes respecto al mecanismo de catálisis del sector F_1 de la proteína, pero no aportan información acerca del mecanismo molecular del acoplamiento entre la síntesis o hidrólisis del ATP y el $\Delta\mu_H$. En el modelo de cambio de unión [22], se propone que la F_1 alcanza un estado "energizado" después de unir ADP y Pi por la presencia del $\Delta\mu_H$. Este sería el estado de la proteína capaz de sintetizar y liberar el ATP del sitio catalítico. Sin embargo, existen experimentos que sugieren que la entrada del

Pi al sitio catalítico es un paso dependiente de la presencia del $\Delta\mu_{H^+}$. En particular, el hecho de que el recambio intermediario Pi-HOH catalizado por F_1F_0 en partículas submitocondriales (el cual no requiere la entrada de Pi del medio al sitio catalítico), no se inhibe con desacoplante, mientras que los demás recambios que necesitan de la entrada de fosfato del medio se bloquean completamente en estas condiciones, sugiere que la entrada de Pi externo al sitio catalítico es un paso dependiente de la energía del $\Delta\mu_{H^+}$. [31]. Otros datos que apoyan esta conclusión son, por ejemplo, que si se disminuye la magnitud del $\Delta\mu_{H^+}$ con protonóforos en partículas submitocondriales, se detecta una disminución en la afinidad de la proteína por el Pi (y por ADP) [32].

Actualmente, se cree que además de la entrada de Pi al sitio catalítico, la salida del ATP sintetizado hacia el medio también consume energía del $\Delta\mu_{H^+}$. Esta idea surge de dos observaciones independientes. En una de ellas se detectó la liberación de ATP unido a un sitio de alta afinidad de F_1F_0 en partículas submitocondriales; esta liberación se produjo por la formación de un $\Delta\mu_{H^+}$ y se bloqueó con desacoplantes e inhibidores de la cadena respiratoria [33]. La otra observación se discutirá mas adelante.

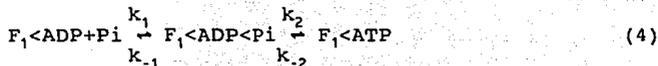
El hecho de detectar un recambio Pi-HOH en F_1 aislada implica que en el sitio catalítico, la reacción $ATP+HOH \rightarrow ADP+Pi$ puede ocurrir en ambos sentidos varias veces antes de que el ADP y el Pi sean liberados al medio. En otras palabras, en el sitio catalítico la síntesis de ATP puede realizarse sin consumo de energía del $\Delta\mu_{H^+}$. Para explicar esta síntesis de ATP espontánea, se requiere proponer

que en el sitio catalítico la constante de equilibrio para la hidrólisis sea significativamente menor que la observada en ambiente acuoso ($10^4 \leq K_{eq} \leq 10^7$, ref. 34). En tal caso sería factible medir la síntesis de ATP por la F_1 aislada a partir de ADP y P_i . Efectivamente, se ha logrado medir esta síntesis inicialmente en F_1 de cloroplasto [35], y posteriormente en la F_1 de la mitocondria y de bacteria [34], la constante de equilibrio para esta reacción en F_1 de cloroplasto es ≈ 0.4 .

Además de tener una $K_{eq} \approx 1$, esta síntesis tiene otras características importantes. Para detectar la reacción, es necesario añadir al medio grandes concentraciones de P_i , esto se explica si se toma en cuenta que la F_1 requiere del $\Delta\mu_{H^+}$ para aumentar su afinidad por P_i . Por otro lado, el ATP sintetizado no se puede liberar de la enzima, y permanece unido a F_1 . Este hecho es el factor adicional anteriormente mencionado, que hace suponer que la liberación de ATP del sitio catalítico de F_1 es el otro paso del ciclo que necesita energía. Además, se sabe que esta síntesis unisito de ATP no requiere de ADP en el medio, lo cual indica que el sustrato de esta reacción es un ADP unido a F_1 [35]. Por tanto, se piensa que la F_1 retiene uno de sus nucleótidos fuertemente unidos en un sitio catalítico.

Para calcular la K_{eq} de esta síntesis de ATP se ha usado un modelo cinético simple. El modelo contiene como variables a las concentraciones de las siguientes especies: F_1 con ADP unido ($[F_1 \cdot ADP]$), F_1 con ADP y P_i unidos ($[F_1 \cdot ADP \cdot P_i]$), F_1 con ATP unido ($[F_1 \cdot ATP]$), y la concentración de P_i en el medio ($[P_i]$), conforme

al siguiente esquema [35,36]:



En equilibrio,

$$K_1 = k_{-1}/k_1 = [F_1\text{<ADP}][\text{Pi}]/[F_1\text{<ADP<Pi}] \quad (5)$$

$$K_2 = k_{-2}/k_2 = [F_1\text{<ADP<Pi}]/[F_1\text{<ATP}] \quad (6)$$

Suponiendo que toda la proteína presente es activa y tiene un ADP unido en un sitio catalítico, la F_1 total (F_{1t}) es

$$F_{1t} = [F_1\text{<ADP}] + [F_1\text{<ADP<Pi}] + [F_1\text{<ATP}] \quad (7)$$

En otra forma,

$$F_{1t}/[F_1\text{<ATP}] = [F_1\text{<ADP}]/[F_1\text{<ATP}] + [F_1\text{<ADP<Pi}]/[F_1\text{<ATP}] + 1 \quad (8)$$

Si hacemos la siguiente operación: $K_1 K_2 / [\text{Pi}]$, el resultado es el primer sumando del segundo miembro de la ec. 8, mientras que el segundo sumando es K_2 . Sustituyendo,

$$F_{1t}/[F_1\text{<ATP}] = K_1 K_2 / [\text{Pi}] + K_2 + 1 \quad (9)$$

De una gráfica $F_{1t}/[F_1\text{<ATP}]$ vs. $1/[\text{Pi}]$, que da una línea recta, se pueden calcular K_2 , que es la K_{eq} de hidrólisis de ATP en el sitio catalítico, y K_1 , la constante de disociación entre Pi y $F_1\text{<ADP}$.

Hipótesis del sitio catalítico de la F_1 como un microambiente hidrofóbico.

¿Cuáles son las características del sitio catalítico de la proteína que permiten las propiedades descritas previamente durante la catálisis unisitio? En los últimos años, se ha propuesto que existen cambios de polaridad en el microambiente del sitio catalítico que producen cambios en la K_{eq} de la hidrólisis del ATP unido a F_1 . Esto permitiría que en un sitio catalítico temporalmente hidrofóbico esta constante de equilibrio alcanzara valores aproximados a 1, por otro lado, la hidrofobicidad del sitio catalítico funcionaría como una barrera energética para la unión del P_i , mientras que los cambios de polaridad permitirían estados de menor hidrofobicidad que facilitarían la hidrólisis, y disminuirían la velocidad de liberación del ATP [34].

Conforme a este esquema se han hecho varios experimentos enfocados a comprobarlo. Por ejemplo, si existe un ambiente apolar en el sitio catalítico que actúa como barrera energética para la unión de P_i , es de esperarse que una disminución de la polaridad del medio acuoso permitiría un mayor reparto del P_i hacia el sitio catalítico, y en consecuencia la velocidad de síntesis de ATP aumentaría. Con este objetivo, se ha medido la síntesis de ATP unido a F_1 en presencia de dimetilsulfóxido (DMSO) como una forma de disminuir la polaridad del medio. En estas condiciones se encontró que la síntesis de ATP unido es mayor a la encontrada en agua, y con una K_m 400 veces menor ($\approx 10^{-3}$ M) por P_i comparada con

la medida en agua, y que resulta prácticamente igual a la Km obtenida por Pi durante la síntesis multisitio en partículas submitocondriales [34]. El aumento en la velocidad de síntesis con DMSO se debe a un aumento en la k de unión de Pi de $3.5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ [39] a $7.0 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ [36], y no a un aumento en la velocidad de síntesis de ATP o a un cambio en la K_{eq} , ya que tanto en presencia como en ausencia de DMSO, la K_{eq} es ≈ 1.0 [36]. El DMSO también inhibe el recambio $\text{P}^{32}\text{-ATP}$ como consecuencia de disminuir la liberación del Pi del sitio catalítico [71]. Aunque estos datos apoyan fuertemente la hipótesis de un sitio catalítico parcialmente hidrofóbico, hay que ser cuidadosos y tomar en cuenta la posibilidad de que el DMSO pueda ejercer efectos sobre la estructura de la proteína y de esta manera provocar un aumento en la síntesis de ATP unido a F_1 . Por ejemplo, se ha demostrado que la presencia de DMSO en concentraciones similares a las usadas en los experimentos con F_1 afecta significativamente la estructura secundaria de otras proteínas [43].

Todas estas características y datos de la síntesis de ATP se han descrito específicamente para la síntesis e hidrólisis unisitio de la F_1 . Sin embargo, en condiciones fisiológicas la proteína funciona cooperativamente con 3 sitios catalíticos a una velocidad mucho mayor a la catálisis unisitio, por tanto, los datos de catálisis unisitio no son fácilmente extrapolables a los de multisitio. Esto se ve reflejado por ejemplo, en el hecho de que el recambio Pi-HOH que cataliza la F_1 a bajas concentraciones de ATP, no ocurre a altas concentraciones, lo cual puede explicarse

suponiendo que la entrada de ATP a un sitio acelera la liberación de ADP y Pi de otro sitio, y que el funcionamiento de ambos (o los tres) sitios se alterna de manera consecutiva [41]. Dentro de este modelo, la K_{eq} para la hidrólisis en el sitio catalítico (puesto que en un momento dado sólo funcionaría uno de los tres sitios catalíticos) puede considerarse como cercana a 1 durante la catálisis multisitio.

Siguiendo con los experimentos derivados de la hipótesis del sitio catalítico como una estructura hidrofóbica, una de las predicciones es que sería posible que algunas moléculas apolares tiendan a repartirse hacia este sitio hidrofóbico y producir una inhibición de tipo competitivo, o que sea parcialmente reversible por los sustratos. Con esta idea, se ha demostrado que la F₁, soluble y unida a la membrana de partículas submitocondriales se inhibe con moléculas hidrofóbicas, como la trifloroperazina (TFP), el calmidazolio, y el complejo Fe-batofenantrolina, cuando se miden sus actividades de ATPasa y recambio Pi-ATP. Esta inhibición ocurre a concentraciones micromolares de las drogas, y se revierte parcialmente con altas concentraciones de Pi [47]. La presencia de DMSO disminuye la potencia inhibitoria de las drogas, lo cual se esperaría si se supone un menor reparto de éstas al sitio catalítico [47]. Estos datos están de acuerdo con la idea de que estas moléculas pueden interaccionar con el sitio catalítico, y que al menos parte de esta interacción es debida a un efecto hidrofóbico.

Se han hecho otros estudios con moléculas de propiedades y

estructuras similares a las ya mencionadas, en la actividad de la F_1 y otras ATPasas pero con un enfoque diferente. Dentro de estos trabajos y con respecto a los efectos y sitios de acción de varios anestésicos locales y antipsicóticos, se ha encontrado que este tipo de drogas interactúan inhibitoriamente con proteínas de la membrana. Tratando de responder si estos efectos se debían a una interacción directa con la cadena polipeptídica o a través de modificaciones en la estructura membranal, se usó a la F_1F_0 como modelo experimental dado que es un complejo con porciones membranales y solubles físicamente separables.

Se ha demostrado la inhibición de la actividad hidrolítica de la F_1 con *n*-butanol y tetracaína a concentraciones milimolares [48] y con base en estudios de fluorescencia del fármaco, se ha encontrado una constante de disociación para la tetracaína de $480\mu M$, con ≈ 60 sitios de unión [49]. Inhibiciones similares se han podido reproducir con otros anestésicos locales, como la procaína, lidocaína y dibucaína, además de la tetracaína. Una propiedad importante de estas inhibiciones, es que se observó una correlación entre la concentración necesaria para un 50% de inhibición y la hidrofobicidad de la droga, determinada como el coeficiente de reparto entre octanol y agua, de modo que la potencia inhibitoria de las drogas es proporcional a su hidrofobicidad [50].

En el trabajo anterior, se observó una disociación de la F_1 en presencia de tetracaína, con base en la observación de cambios en el patrón electroforético y de sedimentación por ultracentrifugación. Los estudios de calorimetría diferencial de

partículas submitocondriales y F_1 aislada, demostraron que la tetracaína y la dubicaína a concentraciones milimolares producen una desestabilización de la F_1 a altas temperaturas [51], pero también se ha encontrado una estabilización a bajas temperaturas en presencia de flufenazina, un antipsicótico tricíclico [52]. La dependencia respecto al pH de la inhibición con estos compuestos indica que las especies cargadas son inhibidores más potentes de la actividad de la F_1 ATPasa, sugiriendo que tanto la parte apolar como la parte cargada de estas moléculas contribuyen a su interacción con la proteína [52].

Todos estos datos sugieren que estos inhibidores interactúan en varios sitios de la F_1F_0 ATPasa. Recientemente, en estudios de inactivación y marcaje irreversible en presencia de luz ultravioleta (UV), usando dos antipsicóticos tricíclicos, la cloropromazina y la TFP, se encontró un marcaje con ambas drogas radioactivas en casi todas las subunidades de la F_1 y de la F_0 mitocondrial, exceptuando a las subunidades 4 y 5 de F_0 , éstas últimas se marcaron unicamente si la unión covalente se realiza en presencia de dodecilsulfato de sodio [53]. Esto implica que éstas subunidades están probablemente en el centro de F_0 cubiertas por las demás. Las uniones covalentes de la TFP con F_1 y F_0 producen la inactivación irreversible de la ATPasa [54], esto se comprobó usando un complejo F_1F_0 reconstituido en liposomas que fué preirradiado en presencia de TFP, posteriormente se le separó la F_1 con NaBr, y se le adicionó una F_1 control. La comparación de la actividad de ATPasa control (complejo irradiado sin TFP), y el

experimental (irradiado con $12\mu\text{M}$ de TFP) mostró que en este último había una inhibición del 50%. La inhibición que se obtiene si la irradiación y la medida de actividad se hacen consecutivamente, es decir sin separar la F_1 del complejo F_1F_0 preirradiado, es de 85%. Comparando con el 50% de inhibición en el complejo reconstituido, se obtiene que el marcaje en F_1 produce $\approx 35\%$ de inhibición, y el marcaje en F_0 causa $\approx 50\%$ de inhibición [54].

Otros datos sugieren que uno de los varios sitios a los que se unen estas drogas es el sitio catalítico. Experimentos donde se mide la velocidad de inactivación de la F_1 mitocondrial con DCCD, demostraron que la tetracaína, la dubicaína y la cloropromazina (en este orden) disminuyeron la k de inactivación producida con 1.0 mM de DCCD. Con el antecedente de que el DCCD reacciona con un carboxilo en el sitio catalítico para producir esta inactivación, el dato puede sugerir que los fármacos interactúan en el sitio catalítico [55]. Si se compara la efectividad con la que disminuyen la k de inactivación con la hidrofobicidad de los fármacos, se observa que hay una correlación entre la hidrofobicidad de la droga, y la protección de la inactivación con DCCD. Este podría ser un dato que apoyaría la imagen del sitio catalítico como una estructura apolar. Con el uso de la quinacrina, un análogo de la cloropromazina, y un derivado de la quinacrina que se une covalentemente, se obtuvieron inhibiciones de la F_1 ATPasa. La inactivación con el derivado de quinacrina es irreversible, y la unión covalente se rastreó electroforéticamente por la fluorescencia del fármaco, dando un marcaje sólo de la subunidad β

de F_1 [56].

Las cinéticas de inhibición reversible con estos fármacos respecto al ATP muestran un comportamiento que se modifica con la concentración de la droga [55] y la concentración de Mg^{2+} libre [52,56], dando a veces inhibiciones de tipo competitivo o no competitivo.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fué el de estudiar las características de la inhibición de la actividad de la F_1F_0 ATP sintetasa mitocondrial con trifluoroperazina. El hecho de estudiar esta inhibición en condiciones de síntesis de ATP proporciona una comprobación adicional de la hipótesis de que la TFP interactúa en el sitio catalítico de la ATP sintetasa. Además, midiendo síntesis de ATP se puede estudiar la dependencia de la inhibición respecto a los dos sustratos de la proteína (Pi y ADP), y por lo tanto, se puede obtener información con respecto al mecanismo de inhibición de la síntesis de ATP en condiciones donde la proteína está unida a la membrana y en presencia del $\Delta\mu_{H^+}$, es decir en condiciones aproximadas a su situación *in vivo*. Por otro lado, dado que los estudios de inhibición se realizan en condiciones de unión reversible e irreversible de la TFP a la ATP sintetasa, se pueden hacer comparaciones de los mecanismos y sitios de interacción inhibitorios entre la TFP y la ATP sintetasa en ambas condiciones.

METODOS

Se prepararon partículas submitocondriales (PSM) de mitocondrias de corazón de res por sonicación, las mitocondrias se obtuvieron por licuación y centrifugación de acuerdo al método de Low y Vallin [58], y las PSM conforme al método de Lee y Ernster [57] en presencia de albúmina de bovino (1mg/ml) en uno de los lavados para eliminar los lípidos solubles durante la preparación.

La determinación de la fosforilación oxidativa se realizó a una concentración de 0.2 mg/ml de PSM, a 25°C, en una mezcla de reacción que contenía Tris-acetato 50 mM, sacarosa 50 mM, hexocinasa de levadura 0.5 mg/ml, succinato 20 mM, MgSO₄ 20 mM, ³²Pi con la actividad específica necesaria para cada experimento, glucosa 20 mM y las concentraciones de ADP y Pi indicadas en el texto, a un pH de 7.4. La reacción se inició agregando las PSM, el ADP o el Pi, incubando en un volumen de 0.5 ml en matraces Erlenmeyer con agitación enérgica y constante para permitir un máximo flujo de oxígeno. Todas estas determinaciones se realizaron en cuarto oscuro para evitar la fotoactivación de la TFP, excepto en algunos experimentos señalados. La actividad de la hexocinasa no se afectó por la presencia o preirradiación con TFP, esto se midió espectrofotométricamente en presencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y NADP, midiendo la aparición de NADPH a 340nm.

La actividad respiratoria de las PSM se midió con un electrodo de oxígeno Gilson a 25°C, en succinato 10 mM, Tris-HCl 20 mM, MgCl₂ 10 mM y PSM 0.2-0.3 mg/ml.

La concentración de proteína de las PSM utilizadas en cada experimento se midió con el método de Lowry [59] en presencia de 2% de desoxicolato de sodio, o 2% de dodecil sulfato de sodio, usando albúmina de bovino como estándar disuelta en el mismo medio de suspensión de las PSM (sacarosa 0.25 M, tris-HCl, 10 mM, pH 7.4).

Los experimentos de preirradiación con luz ultravioleta (UV) se realizaron con una lámpara de onda corta (epectroline, 115 volts, 60 Hz) a 254 nm a una distancia de 10cm sobre las muestras colocadas en cajas de Petri durante 15 min., ó tiempos indicados específicamente, mantenidas en agitación constante con un agitador orbital. La actividad respiratoria y fosforilante de las PSM se redujo 10-20% con este tratamiento, por lo tanto los controles de estos experimentos son las muestras expuestas a UV sin otras adiciones.

Las medidas de unión de H^3 -ADP se hicieron con un H^3 -ADP preparado incubando H^3 -ATP con hexocinasa, 0.1 mM de ADP y glucosa 10 mM durante 10 min. a 25°C; la reacción se detuvo por ebullición durante 40 seg., la solución se enfrió y centrifugó para eliminar la proteína precipitada. Las PSM (2.8 mg prot./ml) se añadieron a la mezcla de incubación (Tris-HCl 50 mM, sacarosa 50 mM, 3H -ADP 50 μ M, pH 7.4) en un volumen de 0.1 ml, la incubación se mantuvo 5 minutos y se terminó filtrando en columnas de Sephadex-G50 previamente equilibradas con una solución de Tris-HCl 50 mM y sacarosa 250 mM, pH 7.4, al efluente de las columnas se le determinó contenido de radioactividad por centelleo líquido. Además, se determinó la concentración de proteína del efluente para

obtener datos de unión de ADP referidos a la cantidad de proteína filtrada. Se usó un valor de 0.42 nmol de F_1 /mg prot. para los cálculos de unión obtenido de acuerdo al método de la referencia 72.

RESULTADOS

Como se mencionó en los métodos, la fosforilación oxidativa se midió usando succinato como substrato oxidable, esto es debido a que se encontró que la TFP ($20\mu\text{M}$) inhibe (70%) a la NADH deshidrogenasa de la cadena respiratoria, mientras que la respiración con succinato no se afectó a concentraciones de $\text{TFP} < 40\mu\text{M}$ en condiciones de oscuridad. Sin embargo, las PSM preirradiadas se inhibieron un 20% como máximo (Tabla V).

Tabla V. Efecto de TFP en la actividad respiratoria de PSM en oscuridad y preirradiación con UV.

[TFP] (μM)	Consumo de O_2 ($\text{nátg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)			
	oscuridad (%inh.)		UV (%inh)	
0	366	-	409	-
10	351	4.0	-	-
20	352	4.0	332	19
30	-	-	395	3
50	298	18	-	-

Los experimentos en la oscuridad mostraron una inhibición progresiva de la fosforilación en un intervalo de concentraciones de TFP de $5-40\mu\text{M}$, siendo menor esta inhibición en presencia de una

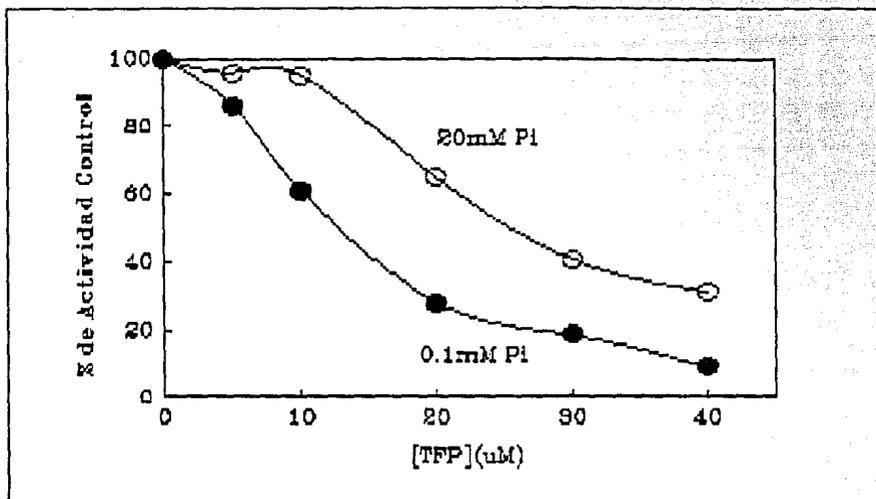


Fig. 5. Curva de [TFP] a 0.1mM (●—●, 100%=26nmol·min⁻¹·mg⁻¹) y 20mM (○—○, 100%=211nmol·min⁻¹·mg⁻¹) de Pi, con 1mM ADP.

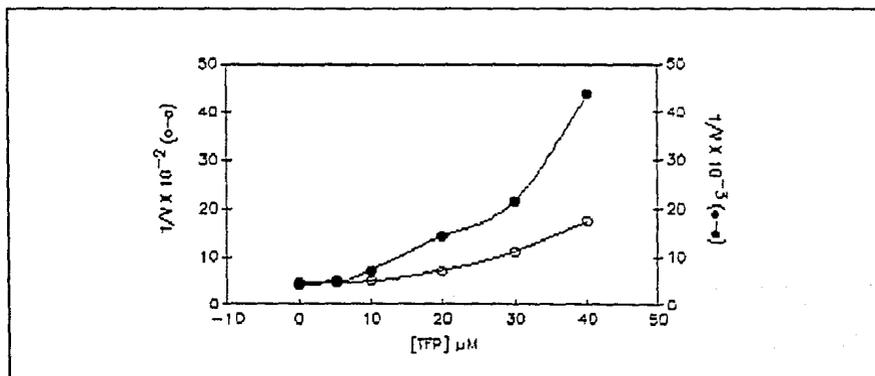


Fig. 6. Gráfico de Dixon para los datos de la Fig. 5. (pág. 39).

alta concentración de Pi (Fig 5). La protección observada con Pi podría deberse a la unión del fármaco en el sitio de unión del Pi. Si se grafican los datos de la Fig. 5 de acuerdo al gráfico de Dixon ($1/V$ vs $[TFP]$, Fig. 6) se obtienen líneas curvas hacia arriba de modo similar a lo reportado para la actividad de ATPasa en presencia de TFP, esto indica una posible asociación de la TFP en varios sitios [55], lo cual concuerda con el hecho de que la protección con Pi sea parcial. Es decir, a $[TFP] < 10 \mu M$ la interacción de la droga es preferencialmente en el sitio de Pi (Fig 5), mientras que a $[TFP] > 10 \mu M$ la droga interacciona con otros sitios importantes para además del sitio catalítico.

Las curvas de $[Pi]$ en presencia de una concentración fija de TFP y de ADP, muestran efectos tanto en $K_{m_{ap}}$ como en V_{max} . A $20 \mu M$ de TFP la $K_{m_{ap}}$ por Pi aumentó 2.9 veces (de $0.7mM$ a $1.9mM$), disminuyendo la V_{max} un 15% (Fig 7a). A $50 \mu M$ de TFP la $K_{m_{ap}}$ aumentó 3.6 veces (de $1.8mM$ a $6.4mM$) y la V_{max} disminuyó 42% (Fig. 7b).

Los mayores efectos en V_{max} con $50 \mu M$ TFP pueden deberse en parte al efecto sobre la respiración (Tabla 5). Los efectos en V_{max} a $20 \mu M$ podrían explicarse por la interacción del fármaco en sitios diferentes al catalítico, lo cual está de acuerdo con los resultados de la Fig. 5. Los efectos en $K_{m_{ap}}$ parecen indicar una unión de la TFP al sitio del Pi. Esta interpretación merece especial cuidado, ya que un aumento en $K_{m_{ap}}$ no demuestra de manera definitiva la interacción de la TFP con el sitio catalítico. Por

ejemplo, se han observado efectos en la $K_{m_{pp}}$ para el Pi en presencia de desacoplantes que ejercen su efecto sin interactuar

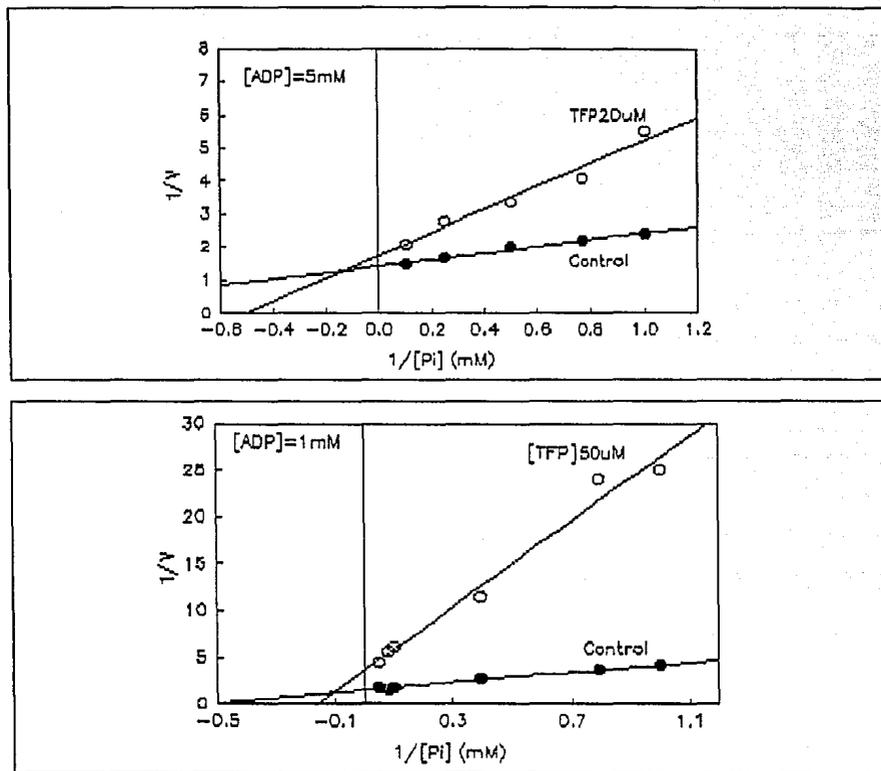


Fig. 7. Gráficos doble recíprocos para las curvas de Pi en presencia de TFP (o—o) 20µM (a) y 50µM (b). (●—●), controles.

con el sitio catalítico [32]; sin embargo, el efecto protector de Pi (Fig. 5) sugiere fuertemente esta interpretación.

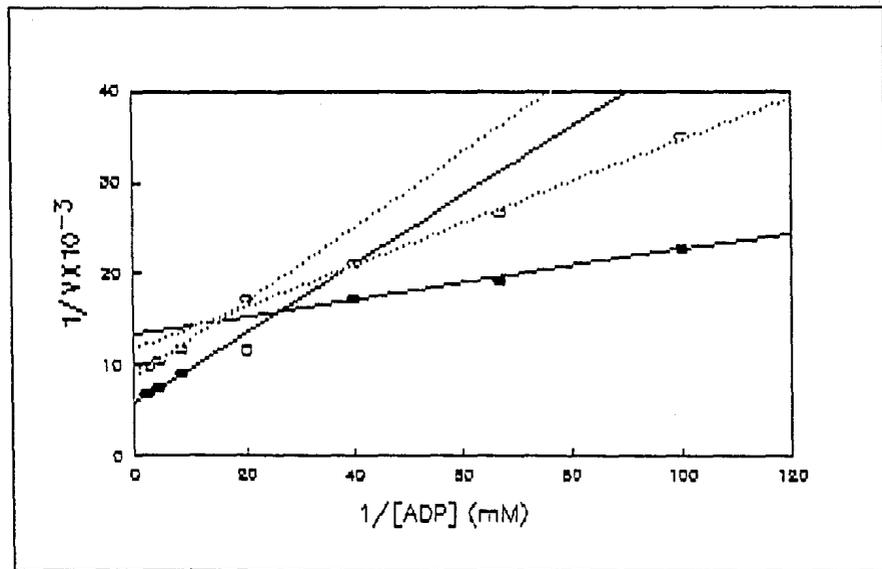
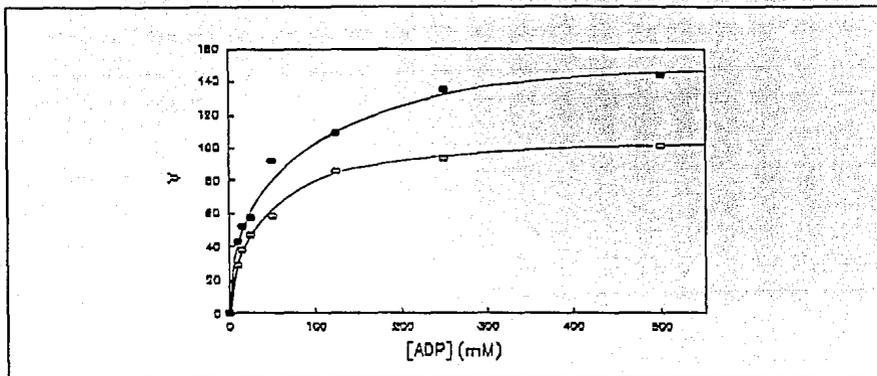


Fig.8. a) Curva de [ADP] con y sin $20\mu\text{M}$ TFP, $[\text{P}_i]=20\text{mM}$. (b) Gráfico doble recíproco para (a), (●—●) controles, (○····○) TFP $20\mu\text{M}$. Cada recta se descompuso en dos componentes. (pág. 42).

Con respecto al otro sustrato de la ATP sintetasa, en la curva de [ADP] se observó un efecto en V_{max} sin un efecto claro sobre $K_{\text{m}_{\text{ap}}}$ (Fig. 8a). La gráfica doble recíproca muestra un quiebre previamente reportado [59] que implica que dos sitios diferentes de ADP se afectan de manera distinta con TFP; el de mayor afinidad se afecta sólo en $K_{\text{m}_{\text{ap}}}$ (de 7 a $18\mu\text{M}$), y el de baja afinidad en $K_{\text{m}_{\text{ap}}}$ y V_{max} (K_{m} 62 y $46\mu\text{M}$; V_{max} 165 y $113\text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ para el control y con TFP respectivamente, Fig 8b).

Para resolver si realmente existe un efecto protector del ADP en la inhibición por la TFP, el enfoque utilizado fué el de agregar $20\mu\text{M}$ de TFP a PSM durante la fosforilación medida a concentraciones muy elevadas o muy bajas de P_i y ADP. En estas condiciones (Tabla 6) se encontró una inhibición máxima (55%) a concentraciones de P_i y ADP cercanas a su $K_{\text{m}_{\text{ap}}}$, la cual se revierte parcialmente aumentando drásticamente el P_i (36%). Aumentando solamente el ADP la inhibición es muy parecida a la máxima (48%), mientras que al aumentar ambos sustratos, la inhibición es mínima (12%).

Los datos de la Tabla 6 ilustran el efecto del ADP y del P_i a concentraciones variables, en primer lugar, resulta claro que la máxima protección de la inhibición con TFP requiere la presencia de ambos sustratos en altas concentraciones. Sin embargo, cuando se

aumenta individualmente la concentración de Pi, se obtiene una protección mayor que al aumentar solamente el ADP. Esto indicaría que la TFP se une mejor al sitio de Pi que al de ADP, lo cual está de acuerdo con la observación de que la inhibición en la curva de ADP es no competitiva (Fig. 8).

Tabla 6. Inhibición de la fosforilación oxidativa con 20 μ M TFP a diferentes concentraciones de Pi y ADP.

[Pi], [ADP] (mM)	V control (nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹)	% de inhibición
20 , 2.0	165	12.5
20 , 0.02	62	36.5
1 , 0.04	13	55.1
1 , 2.0	31	48.8

Por otro lado, el hecho de que la protección ejercida por un sustrato sea dependiente de la presencia del otro (Tabla 6), podría descartar la posibilidad de que la protección se deba a interacciones del Pi con la TFP ó del ADP con la TFP. Además, cuando se hicieron espectros de absorbancia de TFP en presencia y en ausencia de 20 mM Pi, los trazos se superpusieron perfectamente, sugiriendo que el Pi no interacciona con la TFP. Para descartar una posible interacción entre el ADP y la TFP no se puede usar esta metodología, ya que los picos de máxima absorción de ambas moléculas están demasiado próximos (259 y 257nm respectivamente), y dada la alta concentración de ADP necesaria en estos experimentos y su alto coeficiente de extinción molar (15.4 D.O./mmol) no se puede registrar la absorbancia de la TFP.

Para aclarar una posible interacción de la TFP con el sitio

del ADP, se hicieron experimentos de unión de ADP a F_1 en PSM en presencia de diferentes concentraciones de TFP. Como se observa en la Tabla 7, no se registró efecto significativo de la TFP en esta unión. Normalmente se considera que el ADP que permanece unido a F_1 después de la filtración en columnas de Sephadex G-50 se encuentra en sitios de alta afinidad, se sabe que uno de estos nucleótidos permanece en un sitio catalítico de alta afinidad [36]. En las condiciones del experimento es de interés señalar que no se observó ningún efecto de la TFP sobre la unión de ADP en un sitio catalítico, por lo que es posible suponer que la TFP no interactúa a este nivel.

Tabla 7. Unión de ^3H -ADP a F_1 en PSM, en presencia de TFP $20\mu\text{M}$ con y sin irradiación con luz U.V.

[TFP] (μM)	mol ADP unido/ mol de F_1	
	oscuridad	UV
0	2.3	1.7
5	1.7	-
10	2.1	1.7
20	2.1	-

En la introducción se mencionó que en presencia de la luz UV, la TFP ejerce un efecto inhibitorio irreversible sobre la actividad de ATPasa de la F_1 . Dada la protección por sustratos observada en la oscuridad, era importante comprobar si una protección similar podría observarse en condiciones de luz ultravioleta. Como se explica en métodos, estos experimentos en presencia de UV (254nm)

consisten en preincubaciones de 15' con TFP.

Al realizar curvas de TFP^{fm} (el superíndice fm indica TFP fotomodificada) en presencia y ausencia de Pi 20mM, de modo similar a la Fig. 5, se observa que la sensibilidad de la F_1F_0 a la TFP^{fm} es independiente de la presencia de Pi en el medio de preincubación (Fig. 9). Esto indica que el Pi no protege en estas condiciones, o que necesita de la presencia de ADP para proteger, como ocurre en oscuridad (Tabla 6).

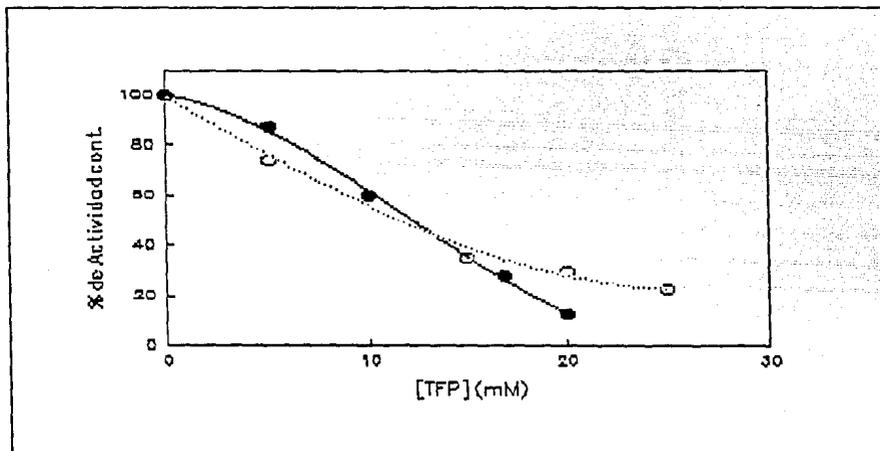


Fig. 9. Inhibición de fosforilación oxidativa de PSM preirradiadas con UV + TFP, en presencia (o····o) y en ausencia (●—●) de 20mM Pi.

El ensayo en presencia de ADP consistió en la comparación de dos cursos temporales de fosforilación. En la primera (Fig. 10a), las PSM se preincubaron 15 minutos con TFP y al t_0 se apagó la luz

UV y se agregaron simultáneamente los sustratos (ADP 2mM + Pi 20mM). En la segunda curva no hubo preincubación, al t_0 se agregaron los sustratos y se encendió la UV sobre el medio que contenía PSM y a los 5 minutos se agregó 20 μ M de TFP (Fig. 10b). Se observó una inhibición constante y menor en la muestra con ADP y Pi.

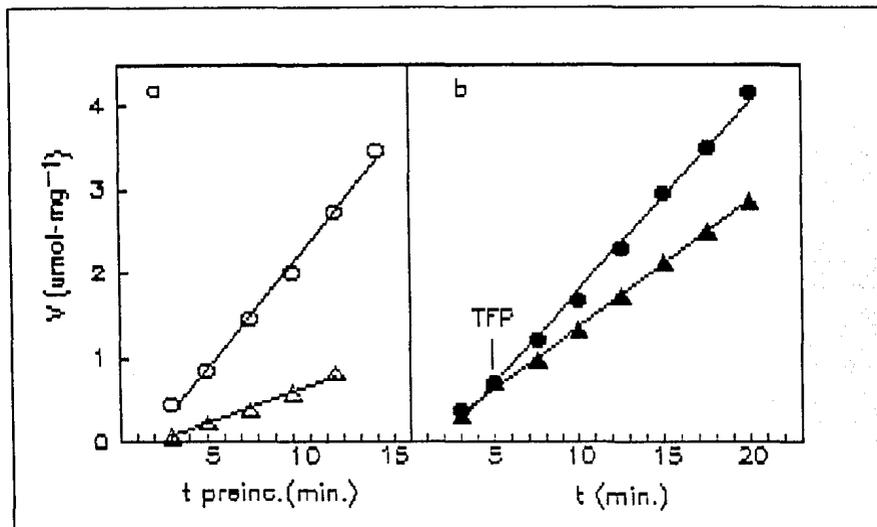


Fig. 10. Inactivación de la fosforilación de PSM después de preincubación con TFP+UV (a) y curso temporal de la inactivación en presencia de ADP 2mM y Pi 20mM (b). En (a), se preincubaron las PSM con TFP+UV 15', y se midió la fosforilación en la oscuridad. En (b), se encendió la UV y se agregaron los sustratos al t_0 , 20 μ M de TFP se agregó a los 5' en la muestra experimental. Círculos, controles irradiados sin droga; triángulos, muestras con TFP.

Una pregunta obligada era saber si esta menor inhibición era debida al Pi o al ADP. Si la preincubación con $20\mu\text{M}$ de TFP^{fm} se realiza en presencia de ADP 2 mM, la inhibición baja de 66% a 31% (Tabla 8). Sin embargo, la protección se obtiene también con AMP 5mM, el cual se sabe que no interactúa con el sitio catalítico de la F_1 , y no se logra con AMP-PNP 100 μM , un análogo de ATP no hidrolizable e inhibidor competitivo de la ATPasa. Tampoco se logra con la presencia de los substratos a bajas concentraciones en donde la enzima se mantiene activa durante la irradiación, análogamente a la Fig. 10b (Tabla 8).

Tabla 8. Preincubación de PSM con TFP+UV en diferentes condiciones.

Condición	% de inhibición con TFP 20 μM	% de inhibición con TFP 20 μM
Medio normal	65.8 \pm 2.7	33.0
AMP-PNP 100 μM	67.1	-
ADP 0.1 mM +	72.0	-
Pi 0.5mM		
ADP 2mM	31.4	-
AMP 5mM	-	8
AMP 5mM +	-	8
ADP 2mM		

- Valores no determinados.

El hecho de que el AMP protege de la inhibición de modo similar al ADP, sugirió que el efecto protector del ADP no era debido a su unión al sitio catalítico, sino a otro efecto independiente.

Una posibilidad era que el efecto protector del ADP se pudiera

deber a su gran absorbancia en esta región ($\lambda_{\text{máx}}=259\text{nm}$). Respecto a esta alternativa, se hicieron espectros de fluorescencia de TFP en presencia y en ausencia de ADP 2mM. Suponiendo que el ADP absorbe la luz necesaria para fotoactivar a la TFP, se espera que la fluorescencia disminuya en presencia de ADP 2mM. El resultado fué un bloqueo total de la fluorescencia de la TFP (Fig. 12). La posibilidad de una transferencia de energía directa de TFP a ADP queda descartada por el hecho de que el ADP no absorbe luz a $\lambda > 305\text{nm}$ aún en una concentración de 2mM, y el pico de emisión de la TFP está en 485nm.

El efecto inhibitorio de la TFP en la oscuridad es reversible, lo cual se comprobó preincubando a las PSM en oscuridad con TFP 20 μM , y diluyendo posteriormente a una concentración de TFP de 5 μM , con lo cual se eliminó la inhibición cuando se midió la fosforilación en presencia de 2mM ADP y 1mM de Pi. Un experimento similar, pero con la preincubación de 15 minutos bajo la luz UV, mostró que la inhibición es $\approx 35\%$ irreversible, una irreversibilidad menor a la reportada para la inhibición de la ATPasa en liposomas ($\approx 100\%$ irreversible, [54]). Por otro lado, la inhibición con TFP en oscuridad es independiente del tiempo, desde 5 hasta 20 minutos de preincubación, la inhibición con TFP 20 μM permaneció constante, esto hace suponer un equilibrio rápido entre TFP y sus sitios de unión. En presencia de luz UV, la inhibición es dependiente del tiempo (Fig. 11).

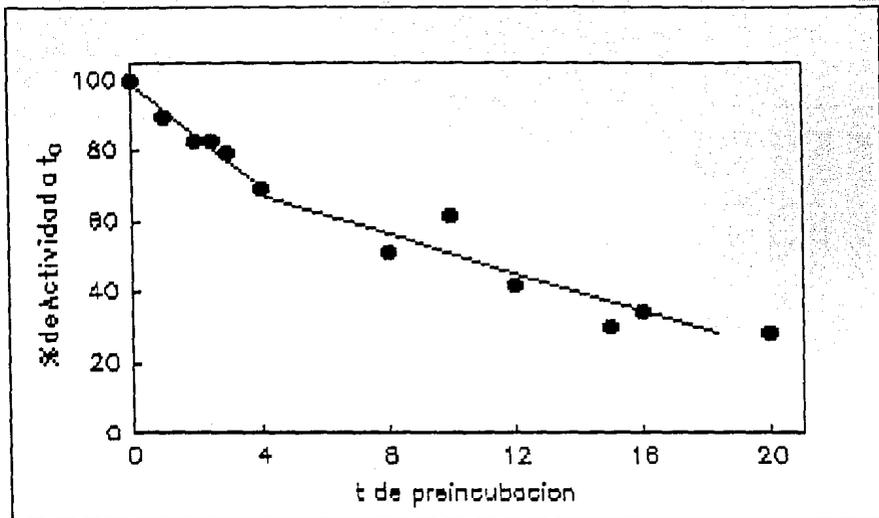


Fig. 11. Dependencia respecto al tiempo de preincubación (min.) de la inhibición de la fosforilación oxidativa con TFP $20\mu\text{M}$. Las PSM se preincubaron los tiempos indicados con TFP $20\mu\text{M}$ bajo UV. Inmediatamente después se midió fosforilación en oscuridad. El 100 % ($185\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) se refiere a la actividad al t_0 , la luz UV por sí sola disminuyó solo 7% la actividad en este caso.

El tiempo que requiere la inactivación en UV, ¿Es el tiempo en el que la TFP unida a F_1F_0 se fotoactiva para unirse covalentemente en esos sitios previamente ocupados, o es el tiempo en el que la TFP^{fm} libre se va uniendo covalentemente en sitios adicionales? Si la posibilidad correcta es la segunda, se espera que una TFP^{fm} preirradiada, al incubarse 15' con las PSM en oscuridad, tenga un

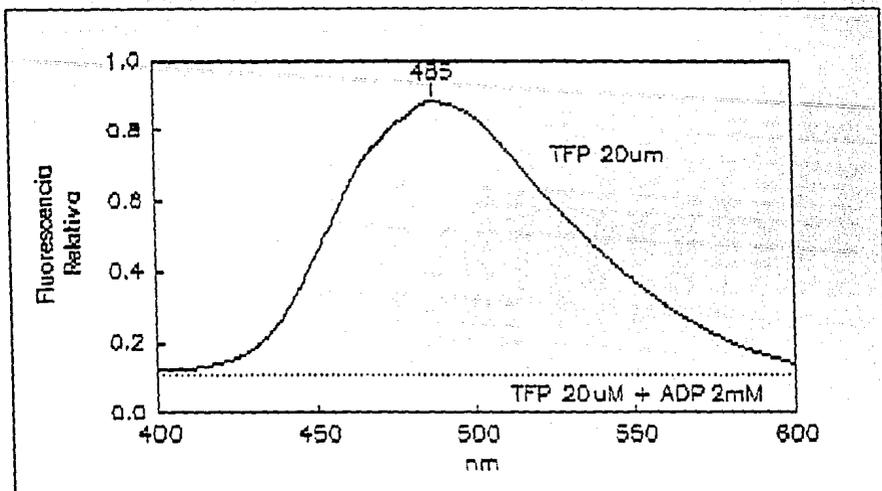


Fig.12. Efecto del ADP 2mM en el espectro de fluorescencia de TFP 20µM.

efecto inhibitorio similar ($\approx 65\%$) al que se observa cuando la irradiación se hace en presencia de PSM. El experimento mostró que la TFP^{fm} preirradiada inhibe 16% en preincubación en oscuridad sin Pi ni ADP, y 12 % en presencia de ADP, al medir la fosforilación con ADP 2mM y Pi 20mM. Esta es una inactivación muy similar a la obtenida con TFP en oscuridad (Tabla 6). Esto implica que la TFP^{fm} no se une progresivamente a sitios adicionales, y lo que sucede probablemente es la fotoactivación de un complejo nTFP/F₁, donde n es el número de moléculas de TFP previamente unidas a F₁.

La posibilidad de una reestructuración de la TFP^{fm} y en consecuencia el regreso del fármaco a su forma no activada, se

descartó midiendo los espectros de absorbancia después de irradiar al fármco 15 minutos. Tomando como el t_0 el final de los 15 minutos de preirradiación, y manteniendo al fármaco en oscuridad, no se observó recuperación en el pico de absorbancia a 257 nm después de 10 y 20 minutos de que el fármaco se mantuvo en oscuridad (Fig. 13). Solamente se observó una pequeña disminución adicional en absorbancia a 257nm después de 20 min.

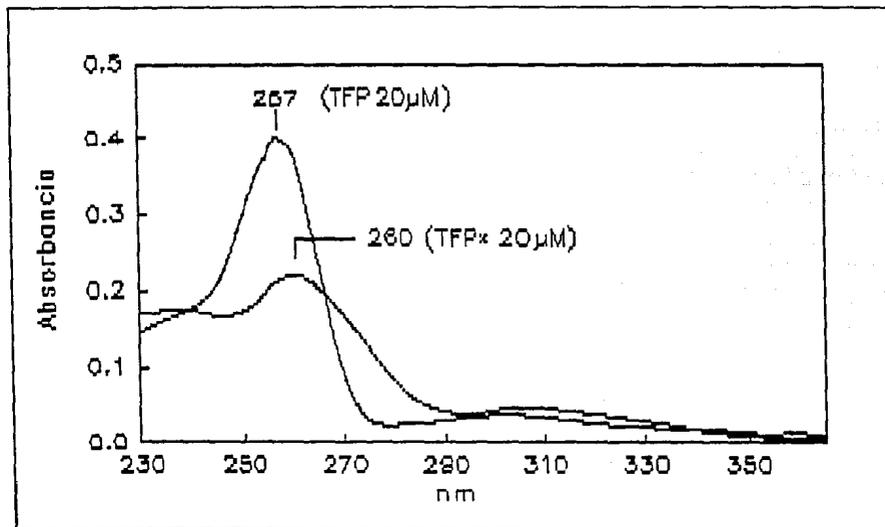


Fig. 13. Espectros de absorbancia de TFP 20µM y de TFP^{fm} (TFP*) 20µM después de la fotoactivación por 15min. Los trazos de la TFP^{fm} mantenida en oscuridad ≈30seg. y 10min. después de la fotoactivación se sobreponen.

Los datos anteriores permiten suponer que el paso dependiente del tiempo de la inactivación en UV es la fotoactivación del complejo $nTFP/F_1F_0$. Si esta interpretación es correcta, se espera que la fotoactivación de la TFP tenga una dependencia en el tiempo similar a la de la Fig. 11.

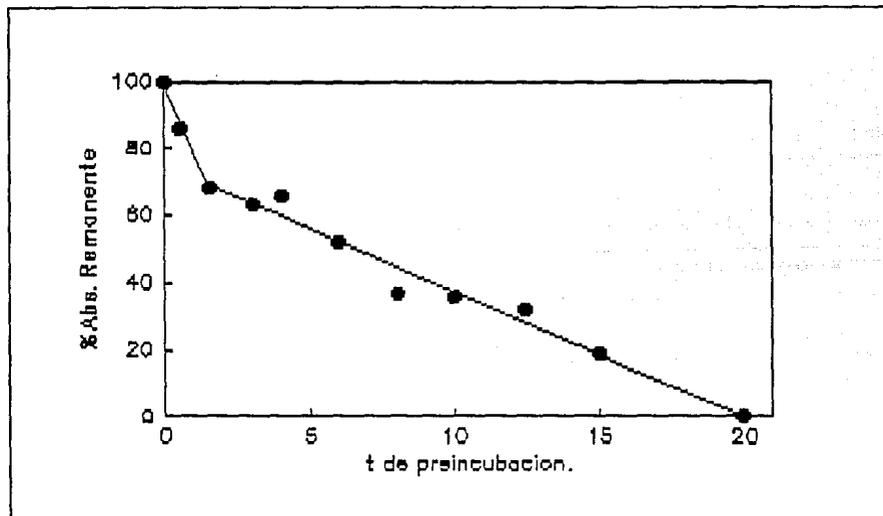


Fig. 14. Curso temporal (en minutos) de la fotoactivación de $20 \mu M$ de TFP medida por la disminución en Abs (257nm). $100\% = 0.377 \pm 0.03$, $0\% = 0.155 \pm 0.04$, $n=5$. La irradiación se realizó con las muestras en hielo, para evitar calentamiento y evaporación.

La fotomodificación de la TFP con respecto al tiempo se determinó midiendo la disminución del pico de absorbancia a 257nm (Fig. 14) de la TFP, tomando como 0% de TFP remanente (o 100% de

fotoactivación) el valor de absorbancia después de 20min de irradiación, después de este tiempo no hubo mayor disminución en este pico de absorbancia. Los datos se muestran en la Fig. 14, donde se observa un curso temporal similar al de la inactivación de la fosforilación mostrados en al Fig. 11. La velocidad de fotoactivación es un poco mayor que el de decaimiento de la actividad de la PSM, probablemente debido a dispersión de luz en el medio con PSM. Existe un quiebre en esta curva de tiempo que podría explicar el de la Fig. 11, aunque otros experimentos mostraron que el quiebre no se observa a $10\mu\text{M}$ TFP.

Suponiendo que la TFP^{fm} en UV y la TFP en oscuridad interactúan en el mismo sitio, ¿Porqué la inactivación con TFP^{fm} no se protege con Pi, y lo contrario ocurre con TFP en oscuridad? La explicación puede ser que ambos fármacos se estén uniendo a diferentes sitios en la F_1F_0 , o que como se había mencionado antes, la protección con Pi requiera de la presencia de ADP. Esto implicaría que algo de la protección en ultravioleta con $\text{ADP}+\text{Pi}$ se debe a un efecto competitivo.

Por último, siguiendo con la idea de buscar una interacción de la droga con el sitio de ADP, se midió la unión de ADP a F_1 en PSM preirradiadas con $20\mu\text{M}$ TFP + UV 15'. Como se observa en la Tabla 7, la unión permaneció intacta pese al tratamiento que baja $\approx 65\%$ la actividad, de modo que se puede suponer que la TFP y la TFP^* son poco afines por el sitio de ADP.

DISCUSION

En condiciones de oscuridad, la TFP $20\mu\text{M}$ no afecta la oxidación de succinato, aunque interactúa inhibitoriamente con la NADH deshidrogenasa. Bajo la luz UV se obtienen reducciones de hasta 20% en el consumo de oxígeno con succinato, indicando una interacción inhibitoria de la TFP^{fm} con alguno de los complejos de la cadena respiratoria (Tabla 5). Es probable que esta inhibición contribuya a la reducción de $\approx 70\%$ de la fosforilación oxidativa observada.

En la oscuridad, la TFP $20\mu\text{M}$ interactúa con el sitio catalítico del Pi, aunque también con sitios adicionales del complejo F_1F_0 que podrían ser los causantes de la reducción de $\approx 15\%$ en V_{max} (Fig. 5-7, Tabla 6). Los resultados de la curva de ADP, y de unión de ADP a F_1 en PSM, indican que la TFP no interactúa directamente con el sitio de unión de ADP (Tabla 7, Fig. 8). Sin embargo, ambos substratos protegen de la inactivación reversible con TFP de una manera mutuamente dependiente (Tabla 6). Estos resultados pueden indicar que la interacción de la TFP en el sitio catalítico ocurre preferencialmente en el sitio del Pi.

Si la TFP a $20\mu\text{M}$ interactúa preferencialmente con el sitio de Pi, ¿Por qué depende la protección por Pi de la presencia de ADP? Una posibilidad, es que el papel del ADP sea el de incrementar la afinidad por Pi, y que de este modo se facilite la unión del Pi en el sitio ocupado con TFP. En este caso se esperaría que la afinidad de la proteína por el Pi se viera aumentada, es decir que disminuyera la $K_{\text{m}_{\text{pp}}}$ por Pi, en presencia de concentraciones

crecientes de ADP. Sin embargo, cuando se probaron diferentes concentraciones de ADP, 0.5, 1.0 y 5mM, las $K_{m_{ap}}$ por Pi respectivas fueron 0.5, 1.7 y 0.7 mM, es decir, no hubo una variación significativa en estas concentraciones saturantes de ADP. Esta $K_{m_{ap}}$ es muy parecida a las reportadas previamente en PSM al medir el recambio $Pi \rightarrow ATP$ (1.7mM, ref. 81), en vesículas membranales de *P. denitrificans* midiendo fosforilación oxidativa (0.33mM, ref. 80), y en PSM midiendo fosforilación oxidativa (2.2mM y 1.1mM, refs. 79 y 32 respectivamente). Análogamente, al medir la $K_{m_{ap}}$ por ADP a diferentes concentraciones de Pi (1, 5 y 20mM), la $K_{m_{ap}}$ se mantuvo entre 30 y 60 μ M.

Una alternativa adicional, sería que la unión de la TFP en algún(os) residuo(os) catalíticamente importante(s) ocurriera de una manera competitiva con el estado de transición de la reacción. De este modo, el o los residuos en cuestión interaccionarían más fácilmente con la TFP solamente en ausencia simultánea de ambos sustratos. La comprobación de esta alternativa necesitaría de la medida de las constantes de velocidad del ciclo catalítico con y sin TFP.

Por otro lado, si existe una mayor interacción de la TFP con el sitio de Pi que con el de ADP, una posible explicación es que haya una mayor hidrofobicidad para el sitio de Pi. Esto estaría de acuerdo con los requerimientos energéticos para la interacción de ambos sustratos con el sitio catalítico descritos anteriormente, suponiendo que la interacción de la TFP con el sitio de Pi fuese por medio de interacciones hidrofóbicas. Sin embargo, al pH

experimental (7.4) la droga tiene una carga positiva, y ésta podría jugar un papel relevante en sus interacciones con la proteína como se ha propuesto con otras fenotiazinas tricíclicas [52]. No obstante, la interacción del Pi en el sitio catalítico de la F_1 , requiere de cargas positivas, como se discutirá más adelante, y éstas serían desfavorables para la unión de la TFP, de modo que la posibilidad de que el sitio de Pi tenga una mayor hidrofobicidad puede ser una explicación válida.

Bajo condiciones de luz UV, la inactivación por preincubación con TFP^{fm} es por lo menos 35% irreversible, pero insensible a la presencia de 20 mM Pi en ausencia de ADP (Fig. 9). La protección que se obtiene con ADP+Pi (Fig. 10), puede deberse parcial o totalmente a la gran absorción de luz de la adenina en la longitud de onda de irradiación (Tabla 8, Fig. 12). La posibilidad de protección por competencia por el sitio catalítico con la TFP no está del todo descartada, aunque el efecto protector del AMP (Tabla 8) sugiere fuertemente que la protección es debida únicamente a la absorción de la adenina

Dado el hecho de que una TFP^{fm} produce una mínima inactivación de la F_1F_0 cuando se preincuba con la PSM en oscuridad, se puede suponer una diferencia estructural entre la TFP^{fm} y la TFP. Esta diferencia estructural sería suficiente para disminuir casi totalmente la interacción de la TFP^{fm} en los sitios donde la TFP puede unirse de manera inhibitoria y reversible en oscuridad. Es por esto que se observa que para formar un complejo inhibitorio irreversible entre la TFP^{fm} y la proteína, se requiere de la previa

formación del complejo $n\text{TFP}/F_0$ en oscuridad, para que posteriormente la luz UV fotoactive a las moléculas de TFP unidas a la proteína, mientras que la TFP^{fm} en solución ya no puede ejercer efecto inhibitorio.

El hecho de que la fenotiazinas previamente fotomodificadas no tienen efectos inhibitorios en sistemas biológicos se ha observado previamente cuando se tratan a células *E. coli* con CPZ y luz UV [74], cuando se incubaba a la calmodulina con distintas fenotiazinas y UV [77] y cuando se observó el marcaje del receptor de acetilcolina con H^3 -trimetisoquina [78]. La conclusión general es que la especie reactiva durante la fotomodificación es un radical libre de la fenotiazina de baja vida media, y que los productos finales de la fotomodificación, son especies estables incapaces de formar uniones covalentes.

Los estudios de fotomodificación en fenotiazinas se han realizado principalmente en la cloropromazina (CPZ). Se sabe que en la fotomodificación de la CPZ se produce un radical libre positivo ($\text{CPZ}^{\text{+}}$) por fotooxidación, este radical libre es de poca estabilidad y puede producir diferentes productos dependiendo de la composición del medio. Por ejemplo, en metanol y con oxígeno disuelto, se produce 2-clorofenotiazina y 2-clorofenotiazina-5-óxido, con la liberación del sustituyente 3-dimetilaminopropil en la posición 10 (ver Fig. 15) del anillo de fenotiazina [73]. Si la fotomodificación se lleva a cabo en metanol pero en ausencia de oxígeno, las sustituciones ocurren en la posición 2 del anillo de fenotiazina produciéndose promazina (sustituyéndose Cl por H) ó 2-

metoxipromazina (substituyéndose Cl por OH), siendo éstas modificaciones independientes de la presencia de la cadena lateral N-alkilo en la posición 10 [74]. En condiciones un poco más fisiológicas, es decir en agua a $\text{pH} \approx 7.0$ el CPZ^{r1} reacciona a través del átomo de azufre con grupos amino o carboxilato que actúan como nucleófilos, después de esta reacción, una segunda molécula de CPZ reacciona con el producto anterior para formar dos moléculas de cloropromazina-S-óxido y liberar al nucleófilo [75].

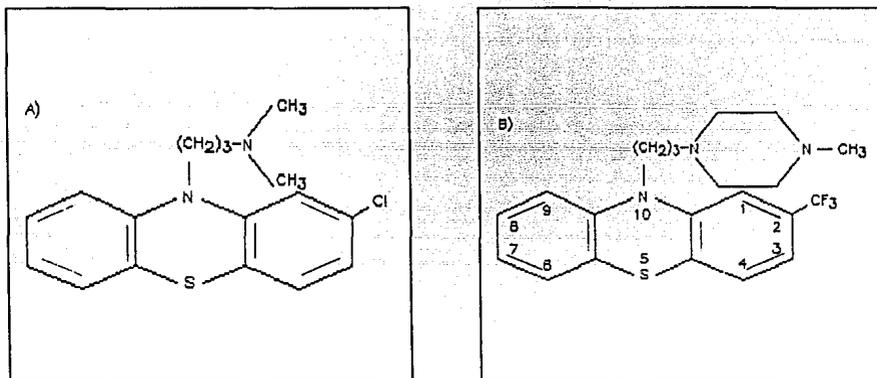


Fig. 15. Estructuras de la CPZ (A) y de la TFP (B). En la molécula de trifluoperazina están numeradas las posiciones de posible sustitución en el anillo fenotiazínico.

En el caso de la TFP, la fotomodificación produciría un radical libre que posteriormente reaccionaría con nucleófilos para sustituir covalentemente en tres sitios posibles: en la parte N-

alquilo de la posición 10 del anillo fenotiazínico, en el sustituyente trifluorometil en la posición 2, ó en el átomo de azufre en la posición 5, con la posible formación de trifluoroperazinasulfóxido. Si estas modificaciones ocurren fuera de la proteína, las sustituciones químicas serían la causa de la disminución de la potencia inhibitoria de la TFP^{fm}, mientras que si la fotoactivación ocurre cerca de algún nucleófilo de alguno de los residuos de la proteína, la unión covalente podría ocurrir en las posiciones 2, 5 ó 10 del anillo fenotiazínico.

En las condiciones experimentales de este trabajo, la fotomodificación se realizó después de mantener preincubadas en obscuridad la TFP y las PSM por lo menos 2 min., de modo que se espera que el complejo final $n\text{TFP}^{\text{fm}}-\text{F}_1\text{F}_0$ sea el resultado de la unión covalente de las moléculas de TFP previamente unidas a la proteína de manera reversible. La posibilidad de que exista una unión irreversible adicional de moléculas de TFP^{fl} fotoactivadas en solución al complejo $n\text{TFP}^{\text{fm}}-\text{F}_1\text{F}_0$ no se descarta del todo, aunque la posibilidad es baja, ya que se sabe que el CPZ^{fl} es muy poco estable en soluciones acuosas que contengan nucleófilos amino o carboxílicos, como el succinato, el Pi, el tris, etc. [75], los cuales están presentes en altas concentraciones en las soluciones de preirradiación de estos experimentos.

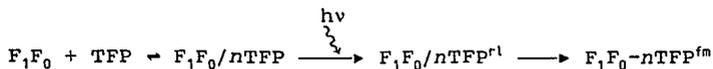
La misma conclusión se propuso con base en experimentos con la ATPasa en liposomas, pero con razonamientos diferentes. Comparando las $K_{i_{50\%}}$ para los pares TFP/TFP^{fm} y CPZ/CPZ^{fm} durante determinaciones de ATPasa en liposomas, se observó que las $K_{i_{50\%}}$ para cada par de

fármacos normal/fotomodificado son muy similares [54], lo cual es un indicio de que la interacción del fármaco normal y del fotomodificado es en los mismos sitios. Sin embargo, como la inactivación de la ATP sintetasa en estas condiciones es dependiente del tiempo (Fig. 11), es difícil aceptar algún cálculo de $Ki_{50\%}$ que en última instancia debe reflejar una constante de equilibrio.

Como otro dato que apoya la conclusión de que el radical libre en solución no produce inactivación adicional a la producida por el radical libre formado en unión a la F_1F_0 [54], se ha propuesto que la diferencia de potencia inhibitoria entre el TFP^{rl} y el CPZ^{rl} debería correlacionar con sus tiempos de vida media en solución, es decir, a mayor tiempo de vida media mayor potencia inhibitoria y viceversa. Como esto no ocurrió [54], se concluyó que el radical libre producido en solución no produce la inactivación observada de la proteína.

Observando la similitud en el patrón temporal de la fotomodificación de la TFP en tris 20mM (Fig.14) con la inactivación de las PSM con TFP y luz UV (Fig. 11) se puede suponer que el paso más lento en la inactivación es la fotomodificación del complejo $nTFP/F_1F_0$.

Estos datos pueden explicarse con la siguiente secuencia de reacciones:



En la primera reacción que está en equilibrio, ocurre la unión reversible de n moléculas de TFP al complejo F_1F_0 . La presencia de la luz UV ($h\nu$) induce la formación del radical libre unido todavía reversiblemente a la proteína, siendo este el paso más lento de la reacción completa. Por último, se forman los enlaces covalentes de los radicales libres unidos a la proteína, siendo este un paso más rápido. Hay que hacer notar que en estas reacciones no existe la intervención de radicales libres formados en el "exterior" de la proteína.

En estas reacciones, n debería mantenerse constante desde la unión reversible hasta la unión covalente final. Si alguna de estas uniones ocurre en residuos claves para la catálisis, la inactivación debería ser completamente irreversible como se ha reportado para la actividad de ATPasa [53,54]. Sin embargo, el hecho de que se encontró una irreversibilidad del 35% en estos estudios, sugiere que en estas condiciones la fotoactivación de la TFP no es del 100%, o que algunos de los radicales libres formados no logran unirse covalentemente a la proteína tal vez a causa de que falte en su proximidad un nucleófilo adecuado. Otra posibilidad es que la unión covalente formada con la proteína sea reversible, como en el caso de la formación de la cloropromazina sulfóxido mencionado previamente.

Las conclusiones anteriores implican que el marcaje con H^3 -TFP^{fm} en la mayoría de las subunidades de la F_1F_0 [33] es probablemente una representación de las interacciones de la TFP con la ATP sintetasa en la oscuridad. Los datos de protección con

indican que posiblemente la interacción que produce la mayoría de la inhibición en la oscuridad, es la de la TFP con el sitio catalítico. Otra alternativa, es que la unión de ambos sustratos provoque el desplazamiento de la TFP de casi todos sus sitios de unión inhibitorios, suponiendo que existen varios. Esto requeriría un movimiento global de F_1 y F_0 provocado por la unión de los sustratos. La existencia de una interacción inhibitoria entre TFP^{fm} y F_0 , se demostró por experimentos de reconstitución de la proteína, como se discutió en la introducción, de manera que la segunda alternativa mencionada podría ser más probable. Sin embargo, existe aún la posibilidad de que las interacciones de la TFP con la proteína adquieran un carácter inhibitorio solamente después de la unión covalente, y entonces la comparación de las propiedades inhibitorias de la TFP^{fm} con las de la TFP no podría establecerse.

Una observación en contra de la conclusión de que la TFP y la TFP^{fm} se unen a los mismos sitios de la F_1F_0 ATP sintetasa, es que la presencia de P_i 0.5mM y ADP 0.1mM en el medio de preincubación con TFP y UV no ofreció ninguna protección a la actividad de la proteína después de 15min. de irradiación. Estas condiciones son muy parecidas a las mantenidas en oscuridad excepto que la concentración de los sustratos es muy baja para evitar la absorción de luz por el ADP y mantener a la proteína catalizando. Sin embargo, estas concentraciones podrían ser insuficientes para proteger a la proteína en luz UV.

Existe una objeción para poder comparar los resultados entre

marcaje y la inhibición de la actividad con TFP, y es que los experimentos de marcaje se realizaron con concentraciones de TFP de 0.8 a 7.0 μM , obteniendo esencialmente el mismo patrón de marcaje [33]. La $K_{i50\%}$ para la inhibición de la ATPasa en liposomas es de 5.50 μM [34], esto implica que las interacciones observadas a 0.8 μM no son (o son muy poco) inhibitorias. Esta interpretación se apoya con los datos de la Fig. 5 donde se observa inhibición significativa con concentraciones de TFP > 5 μM . Con estos datos, se favorece la interpretación de que la mayoría de las interacciones de la TFP fuera del sitio catalítico tienen poca influencia sobre la actividad de la proteína.

Resultados similares se obtuvieron cuando se estudió el marcaje del receptor de acetilcolina con $\text{H}^3\text{-CPZ}$ en presencia de luz UV, en este caso se obtuvo un marcaje de las cuatro subunidades del receptor utilizando 0.5 μM del fármaco, siendo que la $K_{i50\%}$ fué de 15 μM [78].

¿Existen datos estructurales que apoyen la imagen del sitio de unión de Pi como un microambiente hidrofóbico? Los datos de unión de Pi a F_1 mitocondrial, muestran dos sitios de unión con diferentes afinidades. La unión al de mayor afinidad ($K_d=80 \mu\text{M}$), se bloquea con inhibidores de la ATPasa, lo que hace suponer que éste es el sitio de unión catalítico [60]. Un sitio de menor afinidad ($K_d=200\mu\text{M}$), y reversible con ATP, se identificó para la F_1 de *M. lisodeikticus* [62]. La unión covalente de un análogo fotoactivable de Pi (4-azido-2-nitrofenilfosfato), ocurre unicamente en la subunidad β de la F_1 de cloroplasto de manera dependiente de Mg^{2+} ,

y competitiva con Pi 5mM [61]. Experimentos de modificación química con dietilpircarbonato (DEPC), usando la subunidad β de la F_1 de *R. rubrum*, mostraron que la modificación de 1 ó 2 lisinas produce inhibición total de la unión de Pi ($K_d=270\mu\text{M}$) afectando la unión de ATP de baja afinidad, sin afectar la unión de ADP. El reactivo DEPC inactiva a la ATPasa uniéndose con una estequiometria similar [63]. Estos resultados muestran la posición del sitio de unión de Pi cercano al Pi- γ del ATP en el sitio catalítico de baja afinidad por ATP, en la subunidad β de la F_1 .

En la subunidad β de la F_1 (no así en la α), se encuentra una secuencia que se ha identificado en otras proteínas, como un fragmento que une Pi. Esta secuencia (GLFGGAGVGKTV) se encuentra conservada en 23 subunidades β de diferentes orígenes [64]. Datos de cristalografía [65] y de resonancia magnética nuclear [66,67] con la adenilato cinasa, y de cristalografía con la proteína Ras [68] muestran que este segmento forma una haza cercana a los grupos Pi del ATP. En particular, la lisina presente en la secuencia puede interactuar formando un puente de hidrógeno con el Pi- γ del ATP [65,67]. La modificación química de esta lisina (Lis-155) con trifosfopiridoxal de adenosina ($\text{AP}_3\text{-PL}$) en la F_1 inhibe la actividad de ATPasa de la F_1 de *E. coli* [69]. Lo mismo ocurre con la modificación con 7-cloro-4-nitrobenzofurazan (Nbf-Cl), y con la mutación a otro aminoácido [8]. La reacción del DEPC que inhibe la unión de Pi a la subunidad β mencionada previamente podría ocurrir en esta lisina.

Funcionalmente, la haza (llamada haza-P, o haza de glicina) de

la adenilato cinasa se acerca a los substratos al unirse estos en el sitio catalítico, adquiriendo este sitio una conformación mas oculta al solvente [67]. Un efecto similar ocurre con la triosa fosfato isomerasa, que también tiene conservada esta haza, al unirse a sus substratos. La delección de 4 residuos en esta haza, provoca una disminución de 10^5 veces la actividad de la enzima, y produce la desestabilización del intermediario de la reacción para producir una reacción lateral. Esta reacción lateral se favorece en agua, de modo que al parecer la función de la haza en esta enzima es la de cubrir al estado intermediario del solvente y estabilizar su estructura para disminuir la reacción lateral [70].

Si la haza de la subunidad β de la F_1 , tiene una función similar a la observada en estas otras proteínas, esta sería una forma de explicar estructuralmente la hipotética hidrofobicidad del sitio de Pi en la $F_1F_0H^+$ -ATP sintetasa.

La idea de hidrofobicidad en el sitio catalítico de la ATP sintetasa y en otras enzimas, surgió por la necesidad de explicar el cambio en la K_{eq} para la reacción de la hidrólisis del ATP, con respecto a la medida en agua [34]. Sin embargo ésta no es la única manera con la cual una enzima podría regular la K_{eq} de una reacción en su sitio catalítico. Por ejemplo, durante la síntesis de tirosil-tRNA catalizada por la sintetasa correspondiente, se ha encontrado un intermediario estable formado por enzima·tyrosil-AMP. La constante de equilibrio de la formación de tyrosil-AMP a partir de ATP está desviada 5×10^6 veces en el sitio catalítico respecto a su valor en agua, y la posible razón es un cambio en energía de

unión al intermediario por varios residuos en el sitio catalítico los cuales forman una unión más fuerte y estable entre el sitio catalítico y el tyrosil-AMP [76], de tal modo que al parecer el mecanismo en este caso no es un cambio importante en la polaridad del sitio catalítico, sino un cambio en el número y fuerza de las interacciones de los intermediarios de la reacción con los residuos del sitio catalítico.

REFERENCIAS

- 1.- Caplan, Roy S. and Essig, A. Bioenergetics and linear nonequilibrium thermodynamics. The steady state. Harvard University Press. USA. (1983).
- 2.- Lipmann, F. *Adv. enz.* 1:99-162. (1941).
- 3.- Nichols, David G. Bioenergetics. An introduction to the chemiosmotic theory. Academic Press Inc. London, sixth printing. (1990).
- 4.- Mitchel, P. *Nature (London)* 191:144-148. (1961).
- 5.- Rottenberg, H. *Biocmim. Biophys. Acta.* 1108:1-17. (1990).
- 6.- Harris, David A., Boork J. and Baltcheffsky M. *Biochemistry.* 24:3876-3883. (1985).
- 7.- Harada, M., Ohta, S., Sato, M., Ito, Y., Kobayashi, Y., Sone, N., Ohta, T. and Kagawa, Y. *Biochim. Biphys. Acta.* 1056:279-284. (1991).
- 8.- Futai, M., Noumi, T. y Maeda, M. *Annu. Rev. Biochem.* 58:111-136. (1990).
- 9.- Prochaska, H.J., Talay, P. y Sies, H. *J. Biol. Chem.* 262:1931-1934. (1987).
- 10.- Dunn, S.D., Futai, M., *J. Biol. Chem.* 255:113-118. (1980).
- 11.- Williams, N., Coleman, P.S. *J. Biol. Chem.* 257:2834-41. (1982).
- 12.- Lüben, M., Lücken, U., Weber, J., Schäfer, G. *Eur. J. Biochem.* 143:483-90. (1984).
- 13.- Noumi, T., Tagaya, M., Miki-Takeda, K., Maeda, M., Fukui,

- T., Futai, M. *J. Biol. Chem.* 262:7686-92. (1987).
- 14.- Cross, R.L., Nalin, C.M. *J. Biol. Chem.* 253:2874-81.
(1982).
- 15.- Kironde, F.A.S., Cross, R.L. *J. Biol. Chem.* 261:12544-
49. (1986).
- 16.- Weber, J., Lücken, U., Schäfer, G. *Eur. J. Biochem.*
148:41-47.
- 17.- Penefsky, H.S. *J. Biol. Chem.* 260:13735-41. (1985).
- 18.- Tiedge, H., Lücken, U., Weber, J. and Schäfer, G. *Eur. J.*
Biochem. 127, 291-299. (1982).
- 19.- Grubmeyer, Ch., Penefsky, H.S. *J. Biol. Chem.* 256:3728-
34. (1981).
- 20.- Penefsky, H.S. *J. Biol. Chem.* 263:6020-22. (1988).
- 21.- Schwersmann, K., Pedersen, P. *Arch. Biochem. Biophys.*
250:1-18. (1986).
- 22.- Boyer, P.D., Hackney, D.D. *J. Biol. Chem.* 253:3164-70.
(1978).
- 23.- Senior, A.E. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 19:7-41.
(1990).
- 24.- Fillingame, R.H., Joseph, H. *J. Biol. Chem.* 264:3896-903.
(1989).
- 25.- Cretin, F., Baggeto, L.G., Denoroy, L., Godinot, C.
Biochim. Biophys. Acta. 1058:141-146. (1991).
- 26.- Walker, J.E., Lutter, R., Dupius, A., Runswick, M.J.
Biochemistry. 30:5369-78. (1991).
- 27.- Heckman, C., Tomich, J.M., Hatefi, Y. *J. Biol. Chem.*

- 266:13564-71. (1991).
- 28.- Tiedge, H., Schäfer, G., Mayer, F. *Eur. J. Biochem.*
132:37-45. (1983).
- 29.- Lucken, U., Gogol, E.P., Capaldi, R.A. *Biochemistry.*
29:5339-43.(1990).
- 30.- Joshi, S. and Burrows, R. *J. Biol. Chem.* 265:14518-25.
(1991).
- 31.- Rosing, J., Kayalar, C., Boyer, P. D. *J. Biol. Chem.*
252:2478-85.(1977).
- 32.- Kayalar, C., Rosing, J, Boyer, P. D. *Biochem. Biophys.*
Res. Com. 72:1153-59. (1976).
- 33.- Penefsky, H. S. *J. Biol. Chem.* 260: 13735-41. (1985).
- 34.- De Meis, L. *Biochim. Biophys. Acta.* 973:333-349. (1989).
- 35.- Feldman, R. I. and Sigman, D. S. *J. Biol. Chem.* 257:1676-
83. (1982).
- 36.- Kandpal, R. P., Stempel, K. E. and Boyer, P. D.
Biochemistry. 26:1512-17. (1987).
- 37.- Futai, M., Noumi, T., Miki, J. and Maeda, M. Molecular
biological studies of H^+ -ATPase: from genes to essential
residues. En: Bioenergetics. Structure and function of
energy transducing systems. Edited by Ozawa, T. and Papa, S.
Japan Scientific Societies Press. (1987).
- 38.- Bianchet, M., Ysern, X., Hüllihen, J., Pedersen, P. L. and
Amzel, M. *J. Biol. Chem.* 266:21197-201. (1991).
- 39.- Al-Shawi, M., Parsonage, D. and Senior, A. *J. Biol. Chem.*
264:15376-15383 (1989).

- 40.- Miller, M., Oldenburg, M. and Fillingame, R. *P.N.A.S. USA.* 87:4900-4904. (1990).
- 41.- Boyer, P.D. *FASEB J.* 3:2164-2178. (1989).
- 42.- Fillingame, R., Oldenburg, M. and Fraga, D. *J. Biol. Chem.* 266:20934-20939. (1991).
- 43.- Jackson, M. and Mantsch, H. *Biochim. Biophys. Acta.* 1078:231-235. (1991).
- 44.- Mitchel, P. *J. Theor. Biol.* 62:327-367. (1976).
- 45.- Trumpower, B. *J. Biol. Chem.* 265:11409-11412. (1990).
- 46.- Wagner, R., Ponce, G. and Strotmann, H. *Eur. J. Biochem.* 161:205-209. (1986).
- 47.- De Meis, L., Tuena de Gómez-Puyou, M. and Gómez Puyou, A. *Eur. J. Biochem.* 171:343-349. (1988).
- 48.- Vanderkooi, G., Shaw, J., Storms, C., Vennerstrom, R. and Chignell, D. *Biochim. Biophys. Acta.* 635:200-203. (1981).
- 49.- Vanderkooi, G. and Adade, A. *Biochemistry.* 25:7118-7124. (1986).
- 50.- Chazotte, B., Vanderkooi, G. and Chignell, D. *Biochim. Biophys. Acta.* 680:310-316. (1982).
- 51.- Kresheck, G., Adade, A. and Vanderkooi, G. *Biochemistry.* 24:1715-1719. (1985).
- 52.- Palatini, P. *Mol. Pharm.* 21:415-421. (1982).
- 53.- Dabbeni-Sala, F., Schiavo, G. and Palatini, P. *Biochim. Biophys. Acta.* 1026:117-125. (1990).
- 54.- Dabbeni-Sala, F. and Palatini, P. *Biochim. Biophys. Acta.* 1015:248-252. (1990).

- 55.- Laikind, P., Goldenberg, T. and Allison, W. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 109:423-427. (1982).
- 56.- Laikind, P. and Allison, W. *J. Biol. Chem.* 258:11700-11704. (1983).
- 57.- Lee, C. P. and Ernster, L. *Methods in Enzymol.* 10:543-548. (1967).
- 58.- Low, H. and Vallin, I. *Biochim. Biophys. Acta.* 69:361-374. (1963).
- 59.- McCarthy, J. E. G. and Ferguson, S. J. *Eur. J. Biochem.* 132:425-431. (1983).
- 60.- Kasahara, M. and Penefsky, H. *J. Biol. Chem.* 253:4180-87. (1978).
- 61.- Pougeois, R., Lauquin, G. and Vignais, P. *Biochemistry.* 22:1241-45. (1983).
- 62.- Mollinedo, F., Larraga, V. and Muñoz, E. *Cienc. Biol.* (Portugal). 8:9-20. (1983).
- 63.- Khananshvili, D. and Gromet-Elhanan, Z. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:1886-90. (1985).
- 64.- Saraste, M., Sibbald, P. and Wittinghofer, A. *TIBS.* 15:430-434. (1990).
- 65.- Diederichs, K. and Schulz, G. *J. Mol. Biol.* 217:541-549. (1991).
- 66.- Fry, D., Kuby, S. and Mildvan, A. *Biochemistry.* 24:4680-94. (1985).
- 67.- Fry, D., Kuby, S. and Mildvan, A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:907-911. (1986).

- 68.- Wittinghofer, A. and Pai, E. *TIBS*. 16:382-387. (1991).
- 69.- Ida, K., Noumi, T., Maeda, M., Fukui, T. and Futai, M. *J. Biol. Chem.* 266:5424-29. (1991).
- 70.- Pompliano, D., Peyman, A. and Knowles, R. *Biochemistry*. 29:3186-94. (1990).
- 71.- Tuena de Gómez-Puyou, M., Ayala, G., Darszon, A. and Gómez-Puyou, A. *J. Biol. Chem.* 259:9472-78 (1984).
- 72.- Ferguson, S. J., Lloyd, W. J. and Radda, G. K. *Biochem J.* 159:347-353 (1976).
- 73.- Rosenthal, I. and Bercovici, T. *J. Heterocycl. Chem.* 14:355 (1977).
- 74.- Rosenthal, I., Ben-Hur, E. and Riklis, E. *Photochem. and Photobiol.* 28:591-594. (1978).
- 75.- Cheng, H., Sackett, P. and McCreery, R. *J. Med. Chem.* 21:948-952. (1978).
- 76.- Fersht, A., Leatherbarrow, R. and Wells, T. *TIBS*. 11:321-325. (1986).
- 77.- Prozialeck, W., Cimino, M. and Weiss, B. *Mol. Pharm.* 19:264-269. (1980).
- 78.- Oswald, R. and Changeux, J. *P.N.A.S.* 78:3925-3929. (1981).
- 79.- Mitchel, R. A., Chang, B. F., Huang, C. H. and DeMaster, E.G. *Biochemistry*. 10:2049-2054. (1971).
- 80.- McCarty, J. and Ferguson, S. *Eur. J. Biochem.* 132:425-431. (1983).
- 81.- Lee, Ch. and Ernster, L. *Eur. J. Biochem.* 3:385-390. (1968).
- 82.- Klionsky, D., Brusilow, W. and Simoni, R. *J. Bacteriol.*

160:1055-60. (1984).

83.- Yoshida, Y., Wakabayashi, S., Matsubara, H., Hashimoto, T.,
and Tagawa, K. *FEBS Letters*. 170:135-38. (1984).

84.- Harold, F. *The vital force: a study of bioenergetics*. New
York, 1986.