

225

24



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Aislamiento y Caracterización del Complejo  
F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-I ( ATPasa Mitocondrial ) de Corazón  
de Bovino.

T E S I S

Que para obtener el título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a :

EDGAR VAZQUEZ CONTRERAS

Noviembre, 1992



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

Todo el material contenido en esta tesis 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.

## INDICE GENERAL

	pag.
I. INTRODUCCION	1
A. GENERALIDADES	1
1. El mecanismo Quimiosmótico	5
2. Clasificación de las ATPasas	6
3. $F_0F_1$ -ATPasas	8
II. ESTRUCTURA DE LA ATP-sintasa	11
1. Las subunidades del canal $F_0$	14
2. Algunos modelos que explican la conducción de $H^+$ a través del canal $F_0$	18
3. Las subunidades del cuello	19
4. Las subunidades de $F_1$	21
III. LA ATP-sintasa TIENE UNA ESTRUCTURA ASIMETRICA	26
1. Asimetría estructural	26
2. Asimetría funcional	29
IV. ALGUNOS MECANISMOS PARA EXPLICAR LAS REACCIONES CATALIZADAS POR LA $H^+$ ATP-sintasa	30
V. EL INHIBIDOR NATURAL DE LA $H^+$ ATP-sintasa	32
VI. LA UTILIZACION DE DETERGENTES PARA EL ESTUDIO DE LA $F_0F_1$ -ATPasa	38
VII. OBJETIVO Y JUSTIFICACION	40
VIII. MATERIALES Y METODOS	43
A) PREPARACIONES BIOLÓGICAS	43

	pag.
1. Aislamiento de mitocondrias de corazón de res	43
2. Preparación de partículas submitocondriales de Klein	44
3. Preparación de partículas submitocondriales de Mg-ATP	45
4. Aislamiento del complejo $F_0F_1$	46
5. Aislamiento del complejo $F_0F_1$ -I	47
 B) PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	 50
1. Determinación de la concentración de proteína	50
a. Método de biuret	50
b. Método de Bradford o del azul de Coomassie	51
c. Método de Lowry modificado para proteínas membranales	51
d. Método del ácido bicinconínico	52
 C) CUANTIFICACION DE LA HIDROLISIS DE ATP	 53
a. Método espectrofotométrico	53
b. Método de Fiske y Subbarow	54
 D) ESTIMULACION DE LA HIDROLISIS DE ATP	 56
 E) ELECTROFORESIS EN GEL DE ACRILAMIDA-SDS	 57
 F) TINCION POR PLATA	 58
 G) IMMUNODETECCION DE $F_1$ EN EL COMPLEJO $F_0F_1$ -I CON ANTICUERPOS POLICLONALES	 60
 IX. RESULTADOS	 63
1. Preparación del complejo $F_0F_1$ -I	63
2. La preparación del complejo $F_1$ -proteína inhibidora	64
3. La preparación del complejo $F_0F_1$	66

	pag.
4. Cómo se desarrolló la metodología para el aislamiento del complejo $F_0F_1-I$	68
<b>A. CARACTERISTICAS DEL COMPLEJO <math>F_0F_1-I</math></b>	<b>77</b>
1. CARACTERISTICAS FUNCIONALES	77
1. Estimulación de la hidrólisis a 60°C	80
2. Efecto de la fuerza iónica sobre la hidrólisis de ATP	82
3. Efecto del pH en la hidrólisis de ATP	84
ii. COMPOSICION POLIPEPTIDICA	87
iii. INMUNODETECCION DE $IF_1$ EN EL COMPLEJO $F_0F_1-I$	91
iv. CARACTERIZACION DE LAS PROPIEDADES CINETICAS DEL COMPLEJO $F_0F_1-I$	93
<b>B. CARACTERISTICAS DEL COMPLEJO <math>F_0F_1</math></b>	<b>96</b>
1. CARACTERISTICAS CINETICAS DEL COMPLEJO $F_0F_1$	100
ii. COMPOSICION POLIPEPTIDICA	103
X. DISCUSION	105
XI. CONCLUSIONES	109
XII. PERSPECTIVAS	116
XIII. REFERENCIAS	118
XIV. APENDICE	126

## I INTRODUCCION

### A. GENERALIDADES.

Todas las actividades que realizan los seres vivos, como son el crecimiento, el desarrollo, la reproducción y la evolución, son procesos endergónicos cuya realización depende de una fuente de energía. Las fuentes primarias de energía para los seres vivos son la energía libre de muchas transformaciones químicas y la luz solar. La bioenergética es la rama de la Biología que se ocupa, precisamente, de estudiar los mecanismos por medio de los cuales la energía proveniente de la oxidación de sustratos o de la absorción de luz se conserva de manera aprovechable, principalmente en forma de la molécula de ATP, así como la forma en que los seres vivos pueden realizar diversos tipos de trabajos utilizando esta energía (1 y 2). La respuesta a estos mecanismos se ha buscado en las llamadas membranas transductoras de Energía, que son, componentes que intervienen en la interconversión de la energía química contenida en los enlaces de los sustratos respiratorios, en el adenosintrifosfato (ATP) o en la luz (en organismos luminiscentes), y en la energía eléctrica u osmótica contenida en los gradientes transmembranales (3 y 4). Estos procesos son llevados a cabo por las enzimas de la cadena de transporte de electrones, que debido a su localización vectorial en la membrana, son capaces de realizar

## RESUMEN.

La ATP-sintasa es una enzima multimérica que se encuentra en diversos tipos de membranas tanto eucariontes como procariontes y que cataliza la producción de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico utilizando el potencial electroquímico transmembranal ( $\Delta\mu H^+$ ). Hasta la fecha la más sencilla de las  $F_0F_1$  ATP-sintasas se ha encontrado en la eubacteria Escherichia coli. Esta tiene ocho diferentes subunidades; cinco de ellas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ , se encuentran en el dominio globular ( $F_1$ ), que se encuentra fuera de la membrana, y las otras tres a, b, y c, forman el sector membranal de la enzima ( $F_0$ ), al cual está unida la  $F_1$ .

La enzima mitocondrial es más compleja, contiene al menos tres subunidades extras y una proteína reguladora.

En este trabajo se describe el aislamiento de la  $F_0F_1$  ATP-sintasa de mitocondrias de corazón de bovino, que contiene a la proteína inhibidora nativa. La metodología utilizada es por medio de una columna cromatográfica hidrofóbica, que ha sido reportada para obtener a la  $F_1$  ATPasa así como también para la  $F_0F_1$  ATP-sintasa. Las condiciones del aislamiento permiten que el inhibidor natural de la enzima sea co-purificado con la enzima presumiblemente en su estado nativo.

Una caracterización de este complejo nativo has sido desarrollada y se discute en términos de la presencia de la proteína inhibidora así como de sus características cinéticas.

## ABREVIATURAS

ADP	Adenosin-5-difosfato.
ATP	Adenosin-5-Trifosfato.
ATPasa	Adenosin Trifosfatasa.
DCCD	Diciclohexilcarbodiimida.
$\Delta\mu\text{H}^+$	Gradiente electroquímico de protones.
$\Delta\psi$	Potencial eléctrico.
$\Delta\mu\text{H}$	Potencial químico.
DL	Deshidrogenasa Láctica.
DTT	Ditiotreitol.
D.O.	Densidad Optica.
ECP <sub>1</sub>	F <sub>1</sub> de <i>E. coli</i>
EDTA	Acido etilendiamino tetraacético.
E	Coefficiente de extinción molar.
F <sub>1</sub>	Porción periférica, catalitica de la ATP-sintasa.
F <sub>0</sub>	Porción membranal, canal de H <sup>+</sup> del complejo ATP-sintasa.
F <sub>1</sub> -I	Porción soluble de la ATP-sintasa que contiene al inhibidor natural.
H <sup>+</sup>	Protón. (H <sub>3</sub> O) <sup>+</sup>
IF <sub>1</sub>	Inhibidor natural de la ATP-sintasa.
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis.
LDAO	Oxido de laurildimetilamino.
MES	Acido (2(N-Morfolino) etensulfónico)
MG/ML	Miligramos por mililitro.
MIN	minutos.
$\mu\text{mol}$	Micromolas.
NADE	Nicotinamida Adenin Dinucleótido (reducido).
NM	Nanómetros.
PEP	Fosfoenolpiruvato.
P <sub>i</sub>	Ión fosfato.
PK	Piruvato Cinasa.
psm	Partículas submitocondriales.
r	Coefficiente de correlación lineal, para el método de mínimos cuadrados.
RPM	Revoluciones por minuto.
SDB	Dodecilsulfato de Sodio.
TCA	Acido Tricloroacético.
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
V <sub>max</sub>	Velocidad máxima de reacción.



## INDICE DE FIGURAS.

### INTRODUCCION.

	pag.
Figura 1. Complejos que participan en la fosforilación oxidativa	4
Figura 2. Micrografía electrónica de la $F_0F_1$ -ATPasa de <u>Escherichia coli</u>	10
Figura 3. Esquema Hipotético de la ATPsintasa	12
Figura 4. Representación de la estructura de la ATPsintasa de <u>E. coli</u>	17
Figura 5. Imágenes promedio de ECF, no teñidas mostrando un arreglo hexagonal	28
Figura 6. Reacción de hidrólisis de ATP por la ATPsintasa	31

### MATERIALES Y METODOS

Figura 7. Reacción acoplada de la hidrólisis del ATP y la desaparición del NADH	53
---	----

### RESULTADOS

Figura 8. Método para aislamiento del complejo $F_1$ -Proteína Inhibidora	65
Figura 9. Método para aislamiento del complejo $F_0F_1$	67

	pag.
Figura 10. Curva de solubilización con el detergente n-Dodecil $\beta$ -D-Maltósido	70
Figura 11: Determinación de la hidrólisis de ATP en los sobrenadantes y pastillas resultantes de la solubilización con el detergente n-Dodecil $\beta$ -D-Maltósido en psm Mg-ATP	71
Figura 12. Estimulación de la hidrólisis de ATP por temperatura (60°) en sobrenadante y pastilla resultantes de la solubilización de psm Mg-ATP con n-Dodecil $\beta$ -D-Maltósido 3mg de detergente/mg de proteína	72
Figura 13. Estimulación de la hidrólisis de ATP por temperatura (60°C) en sobrenadante y pastilla resultantes de la resolubilización con 3mg de n-Dodecil $\beta$ -D-Maltósido/mg de proteína	73
Figura 14. Porcentaje de proteína obtenido en la pastilla y sobrenadante de la solubilización y resolubilización con 3mg de n-Dodecil $\beta$ -D-Maltósido/mg de proteína	74
Figura 15. Método para la obtención del Complejo $F_0F_1$ -Proteína Inhibidora	75
Figura 16. Comparación simplificada de los métodos para obtener a los complejos $F_1$ -I, $F_0F_1$ y $F_0F_1$ -I	76
Figura 17. Curso temporal de hidrólisis de ATP por el complejo $F_0F_1$ -I. Efecto de Inhibidores	79
Figura 18. Estimulación de la hidrólisis de ATP del complejo $F_0F_1$ -I por temperatura	81
Figura 19. Efecto del aumento de la fuerza iónica en la hidrólisis de ATP por el complejo $F_0F_1$ -I	83
Figura 20. Efecto del pH en la hidrólisis de ATP por el complejo $F_0F_1$ -I	85
Figura 21. Efecto del pH en la estimulación de la hidrólisis de ATP por temperatura por el complejo $F_0F_1$ -I	86
Figura 22. Electroforesis en gel de poliacrilamida (16 %) en presencia de SDS	88

Figura 23. Barrido densitométrico del complejo $F_0F_1$ -I obtenido por el programa ultra gel-scan	pag. 89
Figura 24. Cálculo de curvas gaussianas para el complejo $F_0F_1$ -I	90
Figura 25. Inmunodetección del I- $F_1$ , en los complejos $F_1$ , $F_0F_1$ , $F_0F_1$ -I e I- $F_1$	92
Figura 26. Efecto de concentraciones crecientes de Mg-ATP, en la hidrólisis por el complejo $F_0F_1$ -I	94
Figura 27. Regráfico de 1/hidrólisis vs 1/concentración de Mg-ATP, por el complejo $F_0F_1$ -I	95
Figura 28. Efecto del pH en la hidrólisis de ATP por el complejo $F_0F_1$ , en presencia de temperatura	98
Figura 29. Efecto del aumento de la fuerza iónica en la hidrólisis de ATP por el complejo $F_0F_1$	99
Figura 30. Efecto de concentraciones crecientes de Mg-ATP (1:1) en la hidrólisis por el complejo $F_0F_1$	101
Figura 31. Regráfico de 1/hidrólisis vs 1/concentración de Mg-ATP, por el complejo $F_0F_1$	102
Figura 32. Cálculo de curvas gaussianas para el complejo $F_0F_1$	104

#### DISCUSION.

Figura 33. Posible explicación de la función de la proteína inhibidora en el sentido de la hidrólisis del ATP por el complejo $F_0F_1$ -I	108
---	-----

## INDICE DE TABLAS

### INTRODUCCION

	pag.
Tabla 1. Pesos moleculares de las principales subunidades de $F_0$	15
Tabla 2. Pesos moleculares de las subunidades que componen al cuello de la ATPsintasa mitocondrial	21
Tabla 3. Pesos moleculares que componen a la $F_1$	24

### RESULTADOS

Tabla 4. Algunas características del complejo $F_1-I$	64
Tabla 5. Algunas características del complejo $F_0F_1$	66
Tabla 6. Características funcionales de cada uno de los pasos de la purificación	82

### CONCLUSIONES

Tabla 7. Comparación de las características obtenidas de los complejos $F_0F_1$ y $F_0F_1-I$	115
--	-----

un desbalance en la concentración de protones a ambos lados de la misma. El equilibrio de este gradiente es aprovechado por la ATP-sintasa, que está también localizada vectorialmente, sólo que en sentido inverso a las enzimas de la cadena de transporte de electrones y sintetiza enzimáticamente al ATP.

Para entender cómo la energía proporcionada por la respiración o por la fotosíntesis se puede utilizar para formar la molécula de ATP y quedar almacenada para ser utilizada por los procesos metabólicos de la célula, Peter Mitchell, en 1961 formuló la Teoría Quimiosmótica (5). En esta teoría se propone que una bomba primaria, constituida por las enzimas de la cadena de transporte de electrones, respiratoria o fotosintética, acopla el paso de electrones a una translocación de protones ( $H^+$ ) a través de las membranas transductoras de energía; el resultado obtenido de esta primera bomba es la generación de un gradiente electroquímico de protones ( $\Delta\mu H^+$ ). Una segunda bomba transloca estos protones en sentido inverso a la bomba primaria y sintetiza ATP aprovechando la energía generada. Esta importante reacción está catalizada por la enzima ATP-sintasa.

La teoría quimiosmótica fue postulada originalmente para tratar de explicar el acoplamiento de energía que debe ocurrir entre la cadena de transporte de electrones y la ATP-sintasa. Actualmente es sabido que el  $\Delta\mu H^+$  es el intermediario energético de muchos y muy variados procesos celulares, tales como la formación de gradientes de diversos iones ( $Na^+$ ,  $K^+$  y  $Ca^{2+}$ ), la síntesis del ATP, del pirofosfato, la generación de calor, etc. (6).

La importancia de la existencia de  $\Delta\mu H^+$  explica el porqué de la amplia distribución de las membranas transductoras de energía: la membrana interna mitocondrial, la membrana plasmática de las eubacterias, la membrana de los cromatóforos de las bacterias fotosintéticas, la membrana tilacoidal de cianobacterias y cloroplastos, la membrana plasmática de las arqueobacterias (7), en muchas de las membranas no mitocondriales de los eucariontes, como lisosomas, aparato de Golgi, vesículas de Clatrina (8 y 9), y vacuolas de plantas y hongos (10). De hecho, la clasificación de membranas relacionadas con las conversiones de energía sólo excluye con seguridad a las envolturas externas de las mitocondrias, de los cloroplastos, de las bacterias y de los peroxisomas (3).

El sistema de fosforilación oxidativa mitocondrial está constituido por 5 complejos enzimáticos lipoproteicos: (a) la NADH-ubiquinona-oxidoreductasa o Complejo I; (b) la Succinato ubiquinona-oxidoreductasa o Complejo II; (c) la Ubiquinol-ferrocitocromo-c-oxidoreductasa o Complejo III; (d) la Ferrocitocromo-c-oxidoreductasa o Complejo IV y (e) la ATP-sintasa o Complejo V (11) (ver Figura 1). Este sistema constituye el 50 % de las proteínas asociadas a la membrana interna de mitocondrias de corazón de bovino, y el resto incluye, entre otras, varias proteínas transportadoras y enzimas que actúan como donadores de electrones de la cadena respiratoria (12).

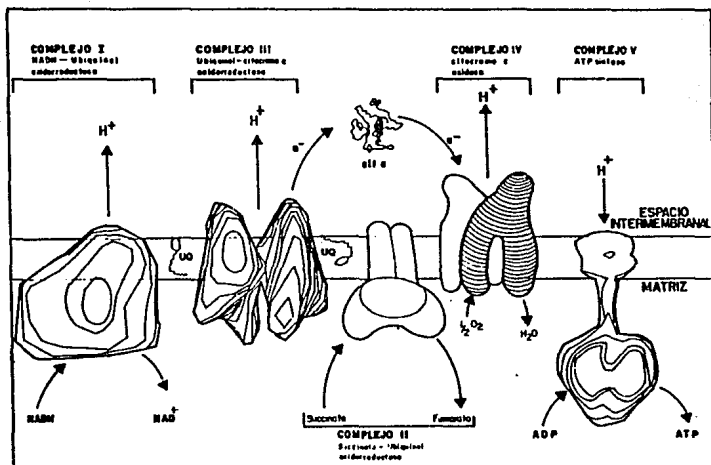


Figura 1. Complejos que participan en la fosforilación oxidativa. Se muestra la disposición en la membrana interna mitocondrial de los cinco complejos originalmente descritos por Hatefi (tomado de González, 1990 (11)).

## 1. El Mecanismo Quimiosmótico.

Como ya se mencionó, en 1961 Peter Mitchell enunció la hipótesis quimiosmótica (5), que propone que la energía derivada del transporte de electrones, es utilizada para traslocar protones a través de la membrana. Esta translocación, que va de la matriz mitocondrial hacia el citosol (de igual forma que en las bacterias, pero en sentido inverso a los cloroplastos), origina una diferencia de potencial electroquímico transmembranal ( $\Delta\mu H$ ), que tiene dos componentes: una diferencia de pH ( $\Delta pH$ ) y una diferencia de potencial eléctrico o de carga ( $\Delta\psi$ ) entre los compartimientos interior y exterior separados por una membrana impermeable a protones. La energía almacenada al generarse el gradiente de protones se utiliza por la ATP-sintasa para la formación del ATP.

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

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

La estequiometría de iones fosfato incorporados en el ATP, por par de electrones que viaja a través de la cadena transportadora,



se conoce como relación  $P/2e^-$ , que es equivalente a la relación  $P/O$ , debido a que cada par de electrones reduce un átomo de oxígeno. En mitocondrias la relación  $P/O$  es de 3 para el NADH y substratos que transfieren sus electrones al NADH, y la relación  $P/O$  es de 2 para substratos que transfieren electrones a flavoproteínas.

## 2. Clasificación de las ATPasas.

La ATP-sintasa también se conoce como complejo  $F_0F_1$ , y menos correctamente, como  $H^+$ -ATPasa, pues en sistemas aislados, y bajo ciertas condiciones, la enzima es capaz de realizar la reacción inversa, es decir, la hidrólisis del ATP. Existen tres tipos de ATPasas: P-, V- y F-ATPasas. Sus características se describen a continuación (13):

1.- Las P-ATPasas o enzimas del tipo  $E_1-E_2$ , son aquéllas que como parte de su ciclo catalítico incluyen a un intermediario fosforilado de la enzima. Las más conocidas de este tipo son la  $Na^+/K^+$ -ATPasa de la membrana plasmática de animales, y la  $Ca^{2+}$ -ATPasa del retículo sarcoplásmico del músculo. Estas enzimas tienen una estructura relativamente sencilla ya que poseen una sola subunidad de unos 100 KDa, siendo probablemente un dímero la forma

funcional.

2.- Las V-ATPasas o de tipo vacuolar son propias de las membranas internas (no mitocondriales ni tilacoidales) de los eucariontes. Son enzimas de unos 500 KDa, con dos porciones principales: una integrada a la membrana, y otra periférica que contiene los sitios catalíticos. Ambos tipos de enzimas generan gradientes de pH y eléctricos a través de las membranas utilizando la hidrólisis del ATP para generar la energía.

3.- Las F-ATPasas o de tipo  $F_0F_1$ , son las que se encuentran en las membranas plasmáticas de eubacterias, en la membrana interna mitocondrial y en la membrana tilacoidal de los cloroplastos. Al igual que los otros dos tipos de ATPasas, tienen la capacidad de hidrolizar ATP y generar gradientes transmembranales. Sin embargo su papel principal es, el de sintetizar ATP utilizando el gradiente transmembranal de protones ( $\Delta\mu H^+$ ) creado por las reacciones de óxido-reducción de las cadenas de transporte de electrones fotosintéticas o respiratorias. Vista globalmente, su estructura es muy similar a la de las V-ATPasas: un canal por donde pasan los protones, y un sector soluble donde se encuentran los sitios catalíticos. De hecho, en los últimos años se han ido esclareciendo las relaciones evolutivas entre los tres linajes de organismos: eubacterias, arqueobacterias y eucariontes a través de los estudios filogenéticos basados en la estructura de las V-ATPasa y las F-ATPasas (14).

### 3. $F_0F_1$ -ATPasas.

Las F-ATPasas son complejos enzimáticos oligoméricos que están presentes en las membranas transductoras de energía de mitocondrias, eubacterias y cloroplastos. Su función puede separarse en tres partes: 1) **Translocación de  $H^+$** , que permite a los protones generados por la cadena oxidativa cruzar la bicapa lipídica, que es impermeable a estos; 2) **Acoplante**, que dirige los protones vectorialmente, de tal manera que la energía almacenada en el gradiente electroquímico se utiliza en la síntesis de ATP y 3) **Catálisis**, durante la que se realiza la síntesis de ATP, a partir de ADP y de  $P_i$ .

Bajo ciertas condiciones la enzima puede ser reversible. Esta reacción se lleva a cabo en ausencia de sustratos oxidables en el caso de mitocondrias y bacterias anaeróbicas, o en la oscuridad si se trata de bacterias fotosintéticas o de cloroplastos. Este proceso puede inducir la formación de un gradiente electroquímico, el cual a su vez es capaz de revertir el flujo de electrones, regenerando el  $\Delta\mu H^+$ , haciendo posible el transporte de algunos metabolitos (15).

Las F-ATPasas (ver Figura 2) , están constituidas por una porción soluble, llamada  $F_1$ , que observada por medio de micrografías, parece un botón que mide 9 nm de diámetro que sobresale de la membrana. Este sector posee los sitios catalíticos para la síntesis e hidrólisis del ATP. El sector  $F_0$  está unido al

sector membranal  $F_0$  mediante la región llamada cuello, de aproximadamente 4.5 nm de largo por 3.5 nm de ancho. El sector  $F_0$  parece tener una forma globular, con un diámetro de 6-8 nm de ancho (16), es la porción hidrofóbica de la enzima a través de la cual pasan los protones para llegar a la  $F_1$  (17). El complejo ATP-sintasa mitocondrial está todavía lejos de ser totalmente caracterizado en lo que se refiere a la composición de subunidades, y en uno de los reportes más recientes, Walker et al 1991 (18), se dice que consta de 14 subunidades, algunas de las cuales ya están bien caracterizadas, pues aparecen de manera consistente a lo largo de diferentes metodologías para el aislamiento de la enzima.

La  $F_1$  mitocondrial es semejante a la de la bacteria Escherichia coli (19), y a la de cloroplastos (20), y pueden aislarse de la membrana por medio de diferentes técnicas. La  $F_1$  puede ser disociada de la  $F_0$  por sonicación en el caso de mitocondrias, y por disminución de la fuerza iónica del medio en el caso de E. coli; esta porción, aislada sólo cataliza la hidrólisis de ATP, y puede unirse nuevamente a la parte membranal  $F_0$  recuperando la función de síntesis de ATP. Por su parte, la  $F_0$  con la  $F_1$  disociada, se convierte en un canal pasivo de protones. El hecho de poder purificar a la  $F_1$  y reconstituirla en membranas carentes de ella, pero que mantienen a la  $F_0$ , ha sido de gran utilidad en el estudio de la estructura y de los mecanismos de acción de la enzima, lo cual se explicará más adelante en la sección de modelos para la conducción de protones a través del canal  $F_0$ .

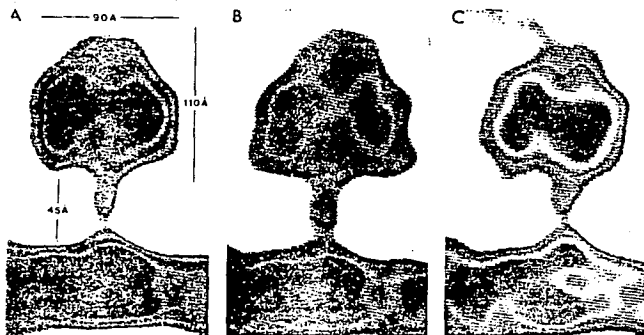


Figura 2. Micrografía electrónica de la F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPasa de *Escherichia coli* reconstituida en membranas. Estas imágenes se obtienen mediante el proceso de congelación rápida del complejo manteniendo una fina capa de hielo para evidenciarse en el microscopio electrónico sin teñir y sin ningún tratamiento químico. A) Vista lateral promedio de 30 moléculas; B) Vista lateral promedio de 10 moléculas. C) Muestra un dominio de diferente densidad electrónica en el interior de la enzima (Tomado de Gogol, 1987 (16)).

## II. La Estructura de la ATP-sintasa.

Como ya se ha mencionado, el complejo  $F_0F_1$ , está formado por dos estructuras principales, una de naturaleza hidrofílica,  $F_1$ , cuya subunidades son:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  con posibles estequiometrías de 3:3:1:1:1, y la otra de naturaleza hidrofóbica,  $F_0$ , compuesta principalmente de las subunidades  $a$ ,  $b$  y  $c$ , con una estequiometría de  $a(1)$ ,  $b(2)$  y  $c(10)$  (Ver Figura 3) (4). Es necesario mencionar que en el caso de mitocondrias hasta ahora no se ha podido determinar ni el número total de subunidades que componen a esta compleja enzima, ni su estequiometría exacta para cada una de las subunidades; para algunas ( $F_1$ ), se tiene consenso, pero falta resolver estos datos para el cuello y el canal  $F_0$ .

En cuanto a la localización en el genoma de los genes de la  $F_0F_1$ , se sabe que está codificado por un sólo operón denominado unc, para E. coli. Este operón está totalmente clonado y secuenciado para otros organismos y se conoce la secuencia de varios genes relacionados (21 y 22). Los genes que codifican para las subunidades de  $F_0F_1$  son, en orden secuencial: uncB ( $a$ ), uncE ( $c$ ), uncF ( $b$ ), uncH ( $\delta$ ), uncA ( $\alpha$ ), uncG ( $\gamma$ ), uncD ( $\beta$ ), y uncC ( $\epsilon$ ). Dentro del mismo operón, se encuentra también uncI, pero de éste se desconoce su función (22). Dado que existe un gene para cada subunidad y que de varias de ellas existe más de una copia por enzima, la estequiometría parece estar regulada a nivel traducción (23).

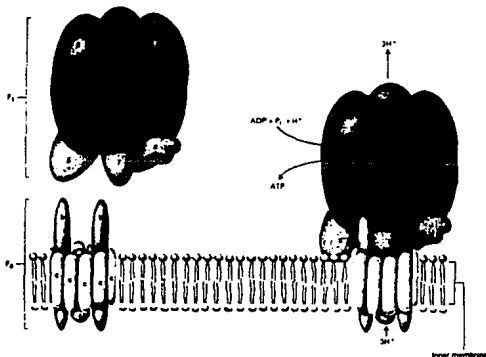


Figura 3. La ATP-sintasa de mitocondrias, en bacterias y cloroplastos, es una enzima compuesta por dos complejos oligoméricos F<sub>0</sub> y F<sub>1</sub>. F<sub>0</sub> es un complejo integrado en la membrana y consiste de al menos tres subunidades (a, b y c), que forman un canal de conducción para protones. F<sub>1</sub> contiene tres copias de cada una de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , y está unida en eubacterias a F<sub>0</sub> por medio de las subunidades  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ . En mitocondria se incluyen otras subunidades que ayudan a la unión del sector hidrofílico con el hidrofóbico, que forman la sección llamada cuello (tomado de Darnell, Lodish, y Baltimore, 1990. Molecular Cell Biology. (Scientific American Books) p. 598.).

Un punto de importancia en el caso de los organismos eucariontes es que algunas de las subunidades de la  $F_0F_1$ , están codificadas por los genomas de los organelos. Por ejemplo, el DNA mitocondrial de levaduras contiene los genes para la subunidad 9 (equivalente a la c de E. coli o de mamífero), para la subunidad 8 y la 6 (correspondiente a la subunidad a). El DNA mitocondrial de mamífero tiene los genes para la subunidad 6 y para la  $\lambda 61$  (subunidad 8 de levadura) (22). El hecho de que en los eucariontes funcionen los genomas nuclear y mitocondrial para el ensamblaje de la  $F_0F_1$  y otras muchas proteínas, es un argumento para apoyar la teoría de la endosimbiosis, que explica el origen de los organismos con estructuras membranales internas.

Se ha comprobado que durante la importación de las proteínas nucleares hacia el interior de los organelos, algunas de ellas se traducen como precursores con secuencias amino-terminales y así se dirigen hacia el organelo específico, donde son procesadas por proteasas específicas en el mecanismo de ensamblaje (cf. 24, 25 y 26).

En general, el proceso de importación de proteínas nucleares hacia la mitocondria requiere de tres procesos principales: 1) nucleósidos trifosfato que mantienen una conformación estable del precursor; 2) la presencia de la proteína general de inserción (GIP), que se encuentra en la membrana externa mitocondrial; y 3) la existencia de  $\Delta\psi$  para la interacción inicial del precursor con la membrana interna. Algunas subunidades, como la c de bovino y de humano, tienen dos precursores distintos, productos de dos genes



diferentes y con diferentes niveles de expresión génica en varios tejidos (27).

### 1. Las Subunidades del Canal, $F_0$ .

La porción  $F_0$  posee una naturaleza hidrofóbica, de tal suerte que para poder solubilizarla y purificarla es necesario utilizar detergentes o agentes caotrópicos. Por ello, es necesario que una vez que ha sido purificada, se pueda reconstituir en un liposoma, que transloque protones, y que esta translocación esté acoplada a la actividad enzimática de la  $F_1$  (28).

La  $F_0$  del complejo ATP-sintasa confiere a la enzima protección al frío. En *E. coli*  $F_0$  está formado por 3 diferentes subunidades denominadas a, b y c. Aunque el número de subunidades en la mitocondria es posiblemente mayor, de las que más se sabe es también de a, b y c. Una comparación de los pesos moleculares de estas subunidades entre diferentes organismos se presenta en la Tabla 1. La estequiometría de estas subunidades se ha calculado para *E. coli*, en presencia de [ $^{14}$ C]Glucosa o [ $^{35}$ S]Sulfato, mediante la cuantificación de la radioactividad incorporada en cada subunidad después de separarlas por geles de poliacrilamida-SDS (29).

La subunidad a, también llamada 6, no guarda mucha similitud entre las especies de donde se ha obtenido, aunque sus patrones de hidropatía son similares. No se sabe con certeza si la subunidad a está involucrada o no en el paso de los H<sup>+</sup>, pero si se cambian aminoácidos específicos de esta subunidad en la F<sub>0</sub> de *E. coli*, se observa una translocación de H<sup>+</sup> disminuida apesar de que el acoplamiento entre F<sub>0</sub> y F<sub>1</sub> no se modifica (22).

Tabla 1.  
Pesos Moleculares de las Principales Subunidades de F<sub>0</sub><sup>1</sup>

Fuente	a	b	c
<i>E. coli</i>	30,258 (uncB)	17,233 (uncF)	8,246 (uncE)
<i>Rs. rubrum</i>	12,460	10-11,000	9,400
mitocondria de corazón <i>Rastio</i> sp.	25,000 (ATPass-6)	10,000	8,000
cloroplasto	27,000	20,900	7,968

La subunidad c, tiene el mayor grado de hidrofobicidad de todas las que componen a la F<sub>0</sub>. Posee estructura en forma de

<sup>1</sup> Para mitocondria y cloroplasto, se tienen los pesos para las subunidades 4, siendo 700 (A6L) y 16,000 respectivamente. Los datos de esta tabla se obtuvieron de Cramer, W., and Knaff, D. 1989. Energy Transduction in Biological Membranes. (Springer-Verlang, New york).

**horquilla:** dos segmentos que atraviezan la membrana conectados por un asa hidrofílica (22 y 28). Las evidencias inmunológicas y genéticas indican que esta asa hace contacto con la  $F_1$ .

Una de las características más estudiadas de la subunidad **c** es que su residuo de **Asp-61** se une al reactivo diciclohexilcarbodiimida (DCCD), razón por la cual también se le ha dado el nombre de proteína que une DCCD. Esta unión covalente inhibe casi totalmente el paso de  $H^+$  (30). Esta subunidad es de carácter oligomérico, y se sabe que basta la unión de una sola molécula de DCCD en una de las subunidades **c** para impedir la conducción de los  $H^+$ . Es de interés considerable el estudio de la subunidad **c**, y más aun la posición y función del **Asp-61**, pues una mutación de este residuo (**Asp**  $\rightarrow$  **Gli** o **Asp**  $\rightarrow$  **Asn**), produce los mismos efectos que el DCCD en la  $F_0$  de *E. coli*. Además, este residuo es el único de carácter polar altamente conservado en las porciones transmembranales de la subunidad **c**. De ahí se concluye la importancia del residuo **Asp-61**, y la manera cooperativa con la que funciona el oligómero formado por las 10-12 copias de esta subunidad (15) (Figura 4).

Además de **a**, **b** y **c** se han reportado algunas otras subunidades en la porción  $F_0$  mitocondrial. Una de ellas es un polipéptido codificado por un gen en *Saccharomyces cerevisiae* denominado **aa<sub>1</sub>**; se ha encontrado una región homóloga en las mitocondrias de mamífero (**A6L**) (28), cuya función aún se desconoce. El factor **B** ( $F_2$ ), con un peso molecular de 11-15,000, puede estar involucrado en la transferencia de energía entre  $F_0$  y  $F_1$  (28). También se han

reportado otros posibles componentes del canal  $F_0$ ; sin embargo, muchas de estas proteínas no se encuentran en todas las preparaciones de  $F_0$  existentes, o existen dudas en cuanto a sus propiedades.

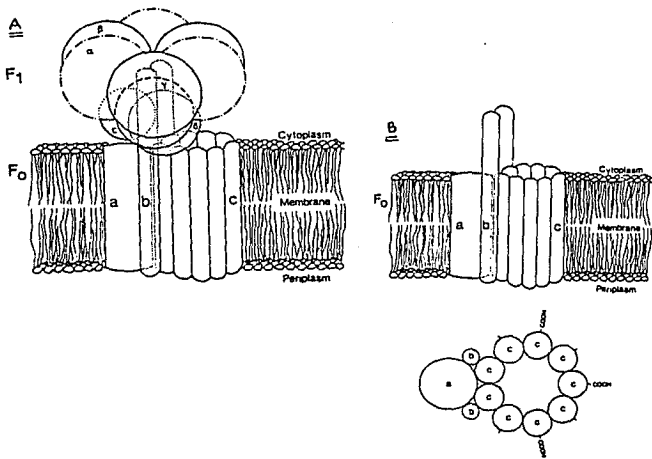


Figura 4. Representación de la estructura de la ATP-sintasa de *E. coli*. A) Esquema de todo el complejo  $F_0F_1$ , y su ubicación en la membrana plasmática. B) Arreglo de las subunidades *a*, *b* y *c* del sector  $F_0$ ; parte superior, vista lateral; parte inferior, vista desde arriba. Los grupos carboxilos indicados corresponden al residuo de Asp-61, donde se une el DCCD. (Tomado de Scheider y Altendorf, 1987 (28)).

reportado otros posibles componentes del canal  $F_0$ ; sin embargo, muchas de estas proteínas no se encuentran en todas las preparaciones de  $F_0$  existentes, o existen dudas en cuanto a sus propiedades.

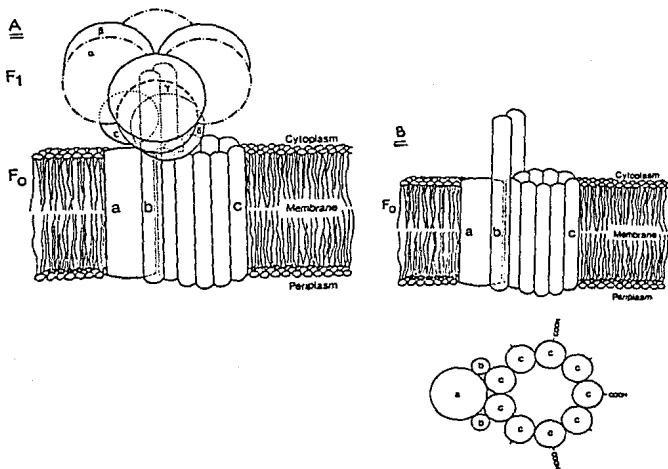


Figura 4. Representación de la estructura de la ATP-sintasa de *E. coli* A) Esquema de todo el complejo  $F_0F_1$  y su ubicación en la membrana plasmática. B) Arreglo de las subunidades a, b y c del sector  $F_0$ ; parte superior, vista lateral; parte inferior, vista desde arriba. Los grupos carboxilos indicados corresponden al residuo de Asp-61, donde se une el DCCD. (Tomado de Scheider y Altendorf, 1987 (28)).

## 2. Algunos Modelos Para la Conducción de H<sup>+</sup> a Través del Canal F<sub>0</sub>.

Siguiendo las evidencias experimentales, se ha propuesto que para la translocación de los H<sup>+</sup> a través del canal F<sub>0</sub>, son necesarios tres tipos de subunidades: a, b y c (22 y 28). Debido a que F<sub>0</sub> es un canal altamente selectivo a los H<sup>+</sup>, es posible especular acerca de la existencia de una red de puentes de hidrógeno transmembranales, que conduce a los H<sup>+</sup> a través del canal (40), o bien de grupos que se asocian de manera alternada a los protones y que pueden presentarse hacia el interior con altos pKa y hacia afuera con pKa bajos (15).

Basándose en el mecanismo propuesto para el movimiento del flagelo, se ha propuesto una hipótesis donde las subunidades a y b de F<sub>0</sub> y  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  de F<sub>1</sub>, pueden rotar e ir estableciendo interacciones con el oligómero formado por las subunidades c, en particular entre la hélice 4 de la subunidad a y el Asp-61 de la subunidad c (41). Tales interacciones permiten cambios conformacionales que se pueden traducir en la síntesis del ATP. No obstante, aún faltan evidencias experimentales para afirmar que el sector F<sub>0</sub> rote.

### 3. Las Subunidades del Cuello.

Tal vez la diferencia que más resalta entre los complejos  $F_0F_1$  mitocondrial y eubacteriano es la existencia, en el primero de subunidades especiales que permiten el acoplamiento entre el sector hidrofílico y el hidrofóbico. Actualmente se acepta que las subunidades que forman el cuello, son la OSCP, la  $F_6$  y  $F_8$ , aunque no se descarta la posible existencia de otros polipéptidos en esta región.

La OSCP (proteína que confiere sensibilidad a la oligomicina tipo B, antibiótico secretado por el hongo Streptomyces diastatochromogenes), es un polipéptido hidrofílico que interactúa con las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , y cuya principal función es la de unir al segmento  $F_0$  con  $F_1$  (33). Los experimentos que apoyan la idea de que la OSCP sirve para unir  $F_0$  con  $F_1$ , han estado enfocados a la tripsinización de pequeños segmentos de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de  $F_1$ , y con esto se pierden los puntos de contacto entre OSCP y  $F_1$  (34). Esta subunidad es indispensable para el reestablecimiento de las funciones dependientes del gradiente de protones en experimentos de reconstitución de  $F_0$  con  $F_1$ . La secuencia de aminoácidos de esta subunidad tiene un alto porcentaje de similitud con la subunidad  $\delta$  de la  $F_1$  y con la subunidad b de E. coli, por lo que se piensa que pueden tener una función parecida (32). No está claro cómo es que se lleva a cabo la inhibición de las actividades de la enzima en presencia de la oligomicina, pues no se debe a una

interacción de tipo covalente, pero es seguro que interactúa con esta subunidad.

El Factor 6 ( $F_6$ ) de levaduras está codificado por el gen *oli2*, y también se ha encontrado en los genes mitocondriales de mamíferos (28). Su función aún no está bien definida, y algunos autores (35) proponen que participa en la unión de  $F_1$  a  $F_0$  al igual que OSCP, y que junto con ésta confieren la sensibilidad a la oligomicina. Otras investigaciones apoyan la idea de que tanto  $F_6$  como OSCP se encuentran en la región del cuello, e indican que ninguna de las dos subunidades se requiere para la translocación pasiva de protones a través de la  $F_0$ , aunque sí para las reacciones en los sitios catalíticos (36).

El Factor B ( $F_B$ ), es una proteína que se encuentra unida a  $F_0$  del lado de la matriz mitocondrial. Se ha sugerido que además de estar involucrada en la reacción de intercambio de ATP- $^{32}$ P (37) y afectar la permeabilidad a protones cuando se adiciona a membranas carentes de él (38), participa en la organización del canal de protones mediante sus dos grupos tiol (39). Los pesos moleculares para las subunidades mitocondriales anteriormente mencionadas, se muestran a continuación en la Tabla 2.



**Tabla 2.**  
**Pesos Moleculares de las Subunidades que Componen al Cuello**  
**de la ATP-sintasa Mitocondrial<sup>2</sup> (en daltons)**

OSCP	F <sub>A</sub>	F <sub>1</sub>
20,967	8,000	13,000

#### 4. Las Subunidades de F<sub>1</sub>.

La porción hidrofílica de la ATP-sintasa, tiene 5 tipos de subunidades:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ , con una relación molar probable de 3:3:1:1:1. Los pesos moleculares para las subunidades de la F<sub>1</sub> mitocondrial, de *E. coli*, *Rhodospirillum rubrum* y cloroplasto se muestran en la Tabla 3. Para poder conocer las subunidades de la F<sub>1</sub>, se han diseñado experimentos de reconstitución, sobre todo en la enzima eubacteriana (*E. coli*), donde es posible separar las subunidades unas de otras, y después determinar qué clase de complejo es capaz de realizar actividades catalíticas. Aún cuando las subunidades  $\delta$  y  $\epsilon$  estén ausentes, el complejo  $\alpha\beta\gamma$  puede llevar a cabo la hidrólisis del ATP (43).

La subunidad  $\alpha$  posee un sitio de unión para nucleótidos, que

---

<sup>2</sup> Los datos de esta tabla se obtuvieron del libro de Cramer, W., Energy transduction in biological membranes, 1989 (Springer-Verlang, New York).

tiene una alta afinidad por ATP y ADP, y la unión de éstos a la subunidad  $\alpha$  produce un cambio conformacional importante (42).

Se ha reportado la existencia de un sitio de unión para magnesio, no intercambiable, que se recupera en el dímero  $\alpha\gamma$  al desnaturalizar a la  $F_1$  (47). Estos resultados, junto con el hecho de que la liberación del ATP de la subunidad  $\alpha$  es muy lenta, sugieren que este sitio de unión para nucleótido podría ser regulador o estructural (46). La subunidad  $\alpha$  parece ser especie específica, ya que a diferencia de las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  no forma híbridos con subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  de otros organismos (48).

Los experimentos con  $F_1$  de *E. coli*, mutadas en la subunidad  $\alpha$  producen la aceleración de la cooperatividad entre los sitios, y sugieren que la transmisión de cambios conformacionales entre subunidades es esencial para la máxima actividad de hidrólisis. Por experimentos de entrecruzamiento y de tripsinización de la subunidad  $\alpha$  se ha visto que se altera la unión de OSCP con el segmento de  $F_1$ , por lo que se sugiere que la subunidad  $\alpha$  interreactúa con la subunidad OSCP del cuello del complejo  $F_0F_1$  (49).

En cuanto a la subunidad  $\beta$ , se ha comprobado que las tres subunidades son indispensables para la actividad catalítica del complejo ATP-sintasa, ya que poseen los sitios catalíticos de la enzima. Estas subunidades son las más conservadas evolutivamente hablando y, por tanto, las más fáciles de substituir, para formar híbridos funcionales, ya que el porcentaje de similitud con otras especies es mayor de 60 % (31). Esta similitud se da principalmente en la zona de unión de nucleótidos (50).

A la subunidad  $\beta$  aislada de la bacteria fotosintética *Rb.* *rubrum*, se le ha atribuido actividad hidrolítica. Sin embargo, esta actividad es solamente del 0.1 % con respecto a la de la enzima intacta, a pesar de que la  $K_m$  para el ATP en la  $\beta$  es dos órdenes de magnitud menor que en la  $F_1$ . Tal parece que esto se debe a que el ATP en la subunidad aislada se libera a una velocidad muy alta. Recientemente, se ha aislado la subunidad  $\beta$  de cloroplasto de espinaca, capaz de hidrolizar Mg-ATP a velocidades semejantes a las de la enzima intacta, pero no puede hacerlo cuando se trata de Ca-ATP, que en la enzima intacta es un buen sustrato. Estos experimentos aportan información acerca de la importancia que tienen las interacciones entre las subunidades para que la enzima pueda realizar su actividad catalítica.

La subunidad  $\alpha$  también puede unir nucleótidos. Si se toma en cuenta que en cada una de estas subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ) existe un sitio de unión para nucleótidos, se tiene que en total por cada molécula de enzima existen seis (44).

En la subunidad  $\beta$  existe una región rica en glicina. Esta región es muy similar a proteínas que pueden unir nucleótidos (22). Se sabe también que existe en las P-ATPasas y en las

**Tabla 3.**  
**Pesos Moleculares de las Subunidades que componen a la  $F_1^3$**   
**(en daltons)**

Fuente	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$	$\epsilon$
<i>E. coli</i>	55,264 (uncA)	50,316 (uncD)	31,387 (uncG)	19,558 (uncH)	14,914 (uncC)
<i>Rs. rubrum</i>	55,026	50,852	32,437	19,543	14,307
Mitocondria (Corazón de Bovino)	55,164	51,164	30,141	15,065	5,652
Cloroplasto	55,457	53,831	35,857	20,512	14,701

V-ATPasas una pequeña secuencia de aminoácidos que contiene al sitio de unión de nucleótidos, y que comparte con éste un alto porcentaje de similitud. En la subunidad  $\beta$  de la  $F_1$  existe un residuo de lisina muy conservado, capaz de unir azido-ATP. Llama la atención que el residuo de ácido aspártico, que en el caso de las P-ATPasa es el que se fosforila, esté reemplazado por una treonina en la subunidad  $\beta$  (45).

La subunidad  $\gamma$  de diversas especies tiene solamente 33 residuos idénticos; la región carboxilo terminal en 8 especies está altamente conservada, por lo que se le ha atribuido un papel importante en la catálisis y en el ensamblaje del complejo.

Se ha propuesto que la subunidad  $\delta$  de bacterias corresponde a la OSCP de mitocondrias y que la subunidad  $\delta$  mitocondrial equivale

<sup>3</sup> Los datos de esta tabla se tomaron del libro de Cramer, Energy Transduction in Biological Membranes, 1989 (Springer-Verlang, New york).

a la  $\epsilon$  de bacterias (22). En cuanto a su función, se sabe que se requiere de la presencia de  $\delta$  y  $\epsilon$  para que la porción  $F_1$  pueda reconstituirse con las subunidades membranales (51).

La subunidad  $\gamma$  parece ser tan indispensable para el ensamblaje de las otras subunidades de la  $F_1$ , que en su ausencia, no hay ensamblaje entre  $\alpha$  y  $\beta$  (52). Estudios de entrecruzamiento del complejo  $F_1$  soluble, y otros más recientes sobre la estructura de la enzima (53) muestran que la subunidad  $\gamma$  se encuentra interactuando principalmente con las subunidades  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ .

Experimentos realizados con las subunidades de  $F_1$  de E. coli mostraron que la mínima combinación que presenta actividad hidrolítica es complejo  $\alpha_3\beta_3\gamma$  (54). Se ha propuesto también que la subunidad  $\gamma$  actúa como la compuerta del paso de los protones hacia las subunidades catalíticas (55).

Aunque en el caso de la enzima mitocondrial se desconoce la función de las subunidades  $\delta$  y  $\epsilon$ , se ha propuesto que pueden anclar la estructura  $\alpha_3\beta_3\gamma$  a la porción  $F_0$  de la enzima. Lo anterior se basa en que la subunidad  $\delta$  mitocondrial tiene como equivalente a la subunidad  $\epsilon$  en E. coli y en cloroplasto (56), donde se sabe que precisamente ancla al complejo  $\alpha_3\beta_3\gamma$ . Una aclaración pertinente es que la subunidad  $\epsilon$  de mitocondria no tiene equivalente en bacterias ni en cloroplasto.

Dentro de las proteínas que integran a la  $F_1$  mitocondrial se encuentra también la llamada proteína inhibidora, que es un péptido de bajo peso molecular que en levaduras se une directamente a una de las subunidades  $\beta$ . Su interacción es estabilizada por dos

proteínas, una de 9 kDa y otra de 15 kDa

(59). Resulta muy interesante que en la enzima de *E. coli* la subunidad  $\epsilon$  tenga la capacidad de inhibir la actividad de hidrólisis (60), lo cual concuerda con la homología entre ambas proteínas (59). Más adelante se retomará a la proteína inhibidora para mencionar los papeles funcionales que se le han asignado, así como algunas otras características que posee.

### III. LA ATP-sintasa TIENE UNA ESTRUCTURA ASIMETRICA.

#### 1. Asimetría Estructural.

Con base en estudios estructurales, de difracción de rayos X y en la estequiometría de la ATP-sintasa  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ , Amzel y col. propusieron en 1982 que la  $F_1$  presentaba una asimetría estructural, determinada por las subunidades pequeñas de este sector de la enzima. Lo que se observó en este caso y también por estudios de tinción negativa de moléculas de  $F_1$  fue un arreglo hexagonal formado por 6 lóbulos del mismo tamaño, aproximadamente 80 Å, que representan a las tres subunidades  $\alpha$  más las tres subunidades  $\beta$  (61). En 1986 Boekema y colaboradores lograron ver además una

séptima densidad electrónica en el centro de la estructura que parece estar formada por las subunidades  $\gamma\delta\epsilon$  (62). En 1989 Gogol y col. combinaron dos técnicas de reconstrucción tridimensional, de imágenes de cristales bidimensionales de ECF<sub>1</sub> teñidos negativamente, y el análisis de una partícula de ECF<sub>1</sub> preservada en su forma nativa mediante congelamiento, y usando criomicroscopia electrónica, lograron tener una imagen más completa de la enzima. Además del hexágono formado (95-100 Å) por las 6 zonas teñidas de aproximadamente 90 x 30 Å en el centro, observaron una cavidad acuosa (30-40 Å), que abarca prácticamente la longitud del complejo (63). Lo anterior apoya el hecho de que el segmento  $V_0$  de E. coli forma un poro de protones al reconstituirse en membranas, pues no se encuentra ninguna densidad proteica en esta región (64). También se visualizó una séptima densidad electrónica compacta, que se encuentra asociada estrechamente con las subunidades periféricas y que obstruye prácticamente toda la cavidad central (ver Figura 5). Los autores de este trabajo pudieron también confirmar la alternancia de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  en la enzima con un experimento elegante, usaron criomicroscopia electrónica con el complejo ECF<sub>1</sub> decorado con anticuerpos anti- $\alpha$  (54).

También se ha podido observar que la densidad en el interior de la estructura dada por las subunidades pequeñas está en posición asimétrica, adyacente a las masas periféricas no marcadas, indicando que su interacción principal es con la subunidad  $\beta$ . De la misma manera el análisis de la ECF<sub>1</sub> tripsinizada carente de  $\delta$  y  $\epsilon$  y de parte de la subunidad  $\gamma$ , permitió observar que la densidad

central disminuye debido a la ausencia de  $\delta$  y  $\epsilon$ . Finalmente, usando fragmentos  $F_{ab}$  contra epitopes accesibles de las subunidades pequeñas confirmaron que éstas son responsables de la masa asimétrica que interactúa con la subunidad  $\delta$  no marcada (65).

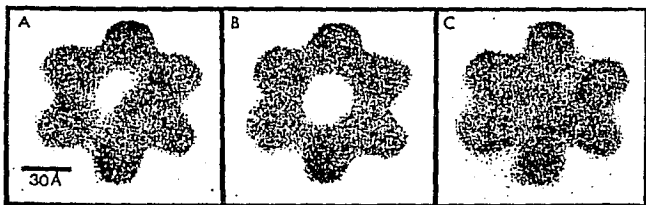


Figura 5. Imágenes promedio de ECF, no teñidas mostrando un arreglo hexagonal. A) Promedio de 63 imágenes con centro asimétrico. B) 31 imágenes con centro abierto, y C) 11 imágenes con el centro parcialmente cerrado. (Tomado de Gogol E.P. et al 1987 (16)).



central disminuye debido a la ausencia de  $\delta$  y  $\epsilon$ . Finalmente, usando fragmentos  $F_{ab}$  contra epítopes accesibles de las subunidades pequeñas confirmaron que éstas son responsables de la masa asimétrica que interactúa con la subunidad B no marcada (65).

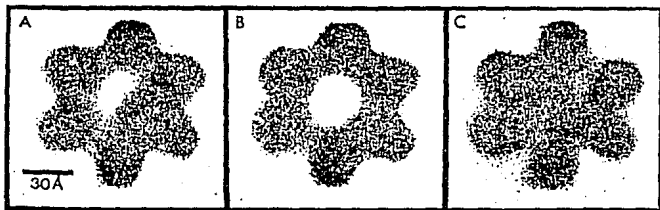


Figura 5. Imágenes promedio de ECF, no teñidas mostrando un arreglo hexagonal. A) Promedio de 63 imágenes con centro asimétrico. B) 33 imágenes con centro abierto, y C) 11 imágenes con el centro parcialmente cerrado. (Tomado de Gogol E.P. et al 1987 (16)).

## 2. Asimetría Funcional.

Por otra parte, los resultados de experimentos de desnaturalización por frío (66) y de modificación química de la  $F_1$  con DCCD, EEDQ, Nbf y FSBI, reactivos con los cuales la enzima muestra sólo una tercera parte de su actividad, son consistentes con los modelos propuestos para la  $F_1$  con subunidades  $\beta$  no equivalentes. Así tenemos también el ejemplo de la ECF, en la cual las tres subunidades  $\beta$  tienen diferente reactividad (67):  $\beta_1$  interactúa con la subunidad  $\epsilon$ ,  $\beta_2$  reacciona con DCCD, y  $\beta_3$  acepta la entrada de Nbf e IAANS, que es un reactivo específico para grupos -SH. Todo ello sugiere que además de la asimetría estructural la  $F_1$ -ATPasa posee una asimetría funcional. En este sentido, se sabe también que sólo uno de los 3 sitios de unión para nucleótidos clasificados como no catalíticos puede intercambiar nucleótidos en presencia de EDTA (68).

#### IV. ALGUNOS MECANISMOS PARA EXPLICAR LAS REACCIONES CATALIZADAS POR LA ATP-sintasa.

La reacción reversible catalizada por la ATP sintasa incluye un mínimo de tres pasos que se muestran a continuación, en el sentido de la hidrólisis (ver Figura 6). El primero de ellos consiste en la unión del ATP a la enzima, el segundo debido a la hidrólisis de ATP a la salida de agua y  $P_i$ , y el tercero en la salida del ADP. Se conocen los valores de las constantes de velocidad para la  $F_1$  de mitocondrias de corazón de res (71). A partir de estos datos se pueden resaltar algunos puntos importantes: el ATP que se une al primer sitio catalítico lo hace con una constante de asociación muy alta ( $10^{12} M^{-1}$ )  $K_1$  y, una vez unido, se establece un equilibrio entre el sustrato y los productos de la hidrólisis formados, de tal forma que la  $K_2$  tiene un valor cercano a uno. En cuanto al mecanismo de reacción, esto significa que el cambio de energía libre en el paso catalítico es cero (69). Consistente con lo anterior varios autores han logrado la síntesis neta de ATP unido a la  $F_1$  soluble sin que haya aporte alguno de energía (cf. 70). Si las reacciones de síntesis e hidrólisis de ATP están en equilibrio en el microambiente del sitio catalítico de la enzima ¿para qué se requiere entonces esta energía proporcionada por el  $\Delta\mu H$ ? Tomando en consideración la alta afinidad con la que se encuentra el ATP unido a la enzima, se ha sugerido que la energía se requiere para que el producto (ADP) sea

liberado al medio (20).

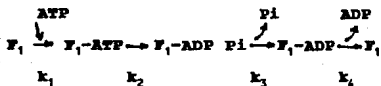


Figura 6. Reacción de hidrólisis de ATP por la ATP-sintasa. Las letras K indican las constantes de velocidad para la reacción de hidrólisis efectuada por la  $F_1$  de mitocondrias de corazón de bovino (71).

Quando la velocidad de hidrólisis es muy baja ( $10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ) (69), al agregar un exceso de ATP se saturan los dos sitios catalíticos restantes (71), y la  $V_{\text{max}}$  de hidrólisis adquiere un valor de aproximadamente  $10^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Este aumento de cien veces en la velocidad de hidrólisis implica que la  $F_1$  presenta una fuerte cooperatividad positiva entre sus sitios catalíticos (71).

## V. EL INHIBIDOR NATURAL DE LA ATP-sintasa.

El inhibidor natural de la ATP-sintasa ( $IF_1$ ), es una proteína ácida y estable al calor (73) que por secuencia pesa 9,578 Da (72). En 1963 Pullman y Monroy (76) observaron que las mitocondrias de corazón de res contenían un factor que inhibía la actividad hidrolítica de la  $F_1$ , pero que no afectaba su capacidad de acoplar el transporte de electrones de la cadena respiratoria a la síntesis de ATP. Tal aseveración está fundada en el gran incremento de la actividad hidrolítica que se obtiene al purificar a la  $F_1$ , capacidad que no es concomitante con un incremento en la capacidad de acoplamiento del transporte de electrones con la síntesis de ATP. Pullman y Monroy encontraron que durante la purificación de la  $F_1$ , al calentar, alcalinizar o aumentar la fuerza iónica del medio, se liberaba un péptido de bajo peso molecular (10.5 KDa), el cual al ser reconstituido en la enzima, confería estabilidad al frío a la  $F_1$  soluble e inhibía su actividad de hidrólisis. Debido a ello le dieron el nombre de inhibidor natural de la ATPasa. Desde ese entonces, dichos autores propusieron que el complejo  $F_1$ -Proteína Inhibidora podía ser la forma funcional natural del sector catalítico de la ATP-sintasa. Estudios posteriores revelaron que la proteína inhibidora también regula la síntesis del ATP, así como las reacciones parciales del ciclo catalítico. De ahí que se le denomine como inhibidor bidireccional (75 y 76). Desde su descubrimiento, la proteína inhibidora se ha aislado práctica-

mente de todas las fuentes de ATP-sintasa (cf. Pedersen y col., 1987 (45)). Puede ser marcada con [<sup>14</sup>C]Fenilisotiocianato (77), [<sup>14</sup>C] Metil-4-azidobenzimidato (81), o con <sup>125</sup>I (82), sin perder su actividad inhibitoria sobre la F<sub>1</sub>.

Para reconstituir a la proteína inhibidora en la F<sub>1</sub>, es necesaria la presencia de Mg-ATP, y aún así el péptido se disocia fácilmente bajo las condiciones antes mencionadas. En los complejos obtenidos de levaduras, se encuentran dos tipos de proteínas (9 y 15 KDa), que confieren gran estabilidad al complejo F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-proteína inhibidora reconstituido, aún en ausencia de Mg-ATP.

Esta proteína interactúa con el extremo carboxilo terminal de una de las tres subunidades β del complejo F<sub>1</sub> (77, 81, 83 y 84), a la cual se le ha llamado β', para diferenciarla de las otras dos subunidades β. Sólomente 1 mol de proteína inhibidora se une por mol de F<sub>1</sub> (77), o de F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> (78), lo que significa que una de las subunidades β tiene mayor afinidad que las otras dos por este péptido. Este fenómeno constituye una de las evidencias para explicar la asimetría intrínseca de la ATP-sintasa. La interacción de la proteína inhibidora con la F<sub>1</sub> también ocurre en E. coli, en la cual la subunidad ε desempeña el papel de proteína inhibidora (85).

¿Cuál es la función de la proteína inhibidora durante el ciclo catalítico de la enzima? Cuando el inhibidor está presente en la enzima, la fosforilación oxidativa en estado estacionario, que se lleva a cabo en partículas submitocondriales, tiene una fase de retardo que no se observa en partículas carentes de la proteína

inhibidora (79). Se ha probado que la existencia de gradientes electroquímicos en partículas submitocondriales inducen un cambio en la posición de la proteína inhibidora en relación con la  $F_1$ , teniendo como resultado la recuperación de la actividad catalítica de la enzima (80). Aunque no modifica la velocidad de la fosforilación oxidativa en estado estacionario, la existencia de la fase de retardo indica que el péptido inhibidor no solamente ejerce un efecto en el sentido de la hidrólisis del ATP, sino también de la síntesis. La reacción de recambio  $ATP-^{32}P_i$  se considera una reacción parcial de la síntesis del ATP (ya que consiste de todos los pasos de ésta, incluyendo los pasos en dirección de la hidrólisis, excepto la liberación del producto ATP unido a la  $F_1$ , (Figura 6); la reacción consiste básicamente en la incorporación de  $^{32}P$  a una molécula de ATP frío, y el paso limitante de la reacción es la liberación del ADP). La reacción de recambio  $ATP-^{32}P_i$  es menos sensible que la hidrólisis a la acción de la proteína inhibidora. Se ha propuesto que la proteína inhibidora ejerce su efecto a nivel de la liberación del producto ADP (75).

Además de controlar las actividades catalíticas, la proteína inhibidora puede estar involucrada en la translocación de protones a través de la ATP-sintasa. Las partículas submitocondriales tratadas con urea pierden al sector  $F_1$ ; cuando éste es reconstituido es posible recuperar la actividad hidrolítica sensible a la oligomicina y bloquear el paso pasivo de los protones. Si además se reconstituye a la proteína inhibidora, disminuye tanto la actividad de hidrólisis como la conductividad

a los protones.

Se ha observado que otra de las propiedades de la proteína inhibidora es la de disminuir el recambio de los nucleótidos unidos a la  $F_1$  con los del medio (81). Utilizando a una  $F_1$  con un bajo contenido de nucleótidos se observó que bajo la influencia de la proteína inhibidora hay cinco moles de éstos unidos por mol de  $F_1$ , uno de los cuales es un nucleótido trifosfatado. La capacidad de recambio de los nucleótidos difosfato está muy disminuida en la  $F_1$  con la proteína inhibidora reconstituida. Se ha determinado también que durante la hidrólisis del ATP los nucleótidos permanecen unidos a la enzima, mientras la unión de la proteína inhibidora permanezca estable (86). En contraste, cuando el inhibidor está ausente hay un rápido recambio de la mayor parte de los nucleótidos, independientemente de que exista actividad hidrolítica o no (87).

De lo anterior se infiere que la inhibición producida por este péptido es de tipo competitiva (88). Para que la unión del inhibidor en la  $F_1$  produzca un complejo  $F_1$ -proteína inhibidora de baja actividad hidrolítica, es requisito indispensable la preincubación con Mg-ATP, de tal manera que la  $F_1$  realiza varios ciclos catalíticos para unirse a la proteína inhibidora. De ahí se concluye que afecta a la hidrólisis multisitio. Los experimentos de Kalashnikova y col. en 1988 (89) se enfocaron a conocer el papel de la proteína inhibidora en la hidrólisis unisitio (es decir, utilizando una concentración de ATP tan baja que sólo funcione un sitio catalítico): utilizan ATP 100  $\mu$ M y obtienen una inhibición del 85% de la actividad hidrolítica, al adicionar a la proteína



inhibidora. Esta inhibición se mantenía aún en concentraciones subestequiométricas de ATP (condiciones unisitio). Kalashnikova y col. determinaron que durante la hidrólisis de [ $^{14}\text{C}$ ]ATP en estado estacionario la  $F_1$  une 1.2 moles de [ $^{14}\text{C}$ ]nucleótidos de adenina por mol de enzima; en cambio, cuando se determinaron los nucleótidos unidos en la  $F_1$  con el inhibidor reconstituido, se observó que este complejo era prácticamente incapaz de unir nucleótidos en el sitio catalítico. Con esos experimentos se concluyó que la  $F_1$  con su inhibidor natural es inactiva durante la catálisis uni- y multisitio.

Hay estudios que sugieren que el inhibidor natural reconstituido y el endógeno, no necesariamente interaccionan de igual manera con la  $F_1$  (90 y 91) y, por tanto, pueden tener diferentes efectos sobre las funciones de la  $F_1$ . Valdés y Dreyfus (91), observaron que los patrones de inmunoprecipitación con anticuerpos policlonales anti- $F_1$  de la enzima en psm con inhibidor reconstituido o con inhibidor endógeno, son muy diferentes. Esta diferencia no solamente es estructural, sino que repercute sobre las actividades catalíticas. Los anticuerpos estimulan la actividad hidrolítica en psm con inhibidor endógeno y la disminuyen en partículas con el inhibidor reconstituido. Para la reacción de recambio los resultados son a la inversa. Lo anterior sugiere que la enzima puede establecer interacciones diferentes con la proteína inhibidora, y que esto puede tener consecuencias a nivel estructural y funcional.

La importancia fisiológica de la proteína inhibidora en la

regulación de la hidrólisis del ATP se demostró in vivo en músculo cardiaco isquémico (92).

Hay que mencionar que la mayor parte de los experimentos que se refieren a la proteína inhibidora de la ATP-sintasa se han efectuado en preparaciones con el inhibidor exógeno reconstituido en la  $F_1$  soluble o membranar; de hecho, la única preparación de la  $F_1$  soluble que contiene a la proteína inhibidora fue reportada por Adolfsen y col. en 1975 (93). Esta preparación tiene el 1 % de la actividad de hidrólisis de la  $F_1$  sin inhibidor (i.e.,  $1 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ), y por esa razón se le llama  $F_1$  latente. La incubación de esta preparación a  $60^\circ\text{C}$  libera la acción de la proteína inhibidora, obteniéndose una preparación de  $F_1$  con una alta actividad de hidrólisis (i.e. al rededor de  $80 \mu\text{molmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$ ). Hasta ahora no se conoce con seguridad el mecanismo que subyace esta observación: la proteína inhibidora puede moverse de su lugar, o puede ser liberada de su sitio original. La  $F_1$  latente se parece más en su actividad a las enzimas de eubacterias y de cloroplastos, pues estas últimas son ATPasas que tienen una baja actividad hidrolítica, y son estimulables por agentes de diferente naturaleza (85, 94 y 95). Emprendiendo nuevos procedimientos experimentales en los cuales esté presente la proteína inhibidora, podremos obtener más información acerca de la forma nativa de la ATP-sintasa.

VI. LA UTILIZACION DE DETERGENTES PARA EL ESTUDIO  
DE LA  $F_0F_1$ -ATPasa.

El uso de detergentes para el estudio del complejo  $F_0F_1$ -ATPasa, no solamente se ha enfocado a su aislamiento y purificación, sino también se ha utilizado como una herramienta más para comprender su estructura y tratar de obtener más información acerca de su regulación catalítica. Se han llegado a obtener interesantes resultados estudiando las interacciones entre diferentes detergentes con la enzima. En general, se sabe que muchas proteínas con cierto grado de hidrofobicidad poseen sitios de unión de alta afinidad que se saturan con concentraciones bajas de algún detergente. Al aumentar la concentración la interacción del detergente con la proteína se torna cooperativa y desencadena cambios conformacionales en la enzima. Dichos cambios provocan que algunos grupos de carácter hidrofóbico que naturalmente (en medio acuoso) no estaban expuestos, en presencia del detergente, se hagan evidentes (91).

Como ejemplo de los experimentos realizados con la enzima en presencia de detergentes tenemos los trabajos de Norling (97), Andreu (98) y Mollinedo (99), que han sugerido que el efecto de los detergentes sobre la  $F_1$  puede deberse a posibles cambios en las interacciones hidrofóbicas. Norling (97) mostró que los detergentes colato y desoxicolato pueden activar a la  $F_1$ -ATPasa de la eubacteria termófila PS3, que tiene la particularidad de no

alcanzar su actividad máxima sino hasta los 75°C. Estos detergentes aniónicos a 30°C, pueden activar a la enzima de esta bacteria, hasta actividades similares a las que posee reaccionando a 75°C; se propone que estos detergentes inducen una conformación en la enzima que le permite alcanzar estas actividades hidrolíticas.

Montero-Lomeli y Dreyfus (94) observaron que el detergente LDAO cambia los requerimientos de los cationes de la ATP-sintasa, de la eubacteria Rhodospirillum rubrum. Mientras la enzima está en solución se comporta preferentemente como una Ca-ATPasa, pero en presencia del detergente, expresa su actividad de Mg-ATPasa.

Vázquez-Laslop y Dreyfus (122) estudiaron el efecto del mismo detergente (LDAO) sobre la actividad de la ATPasa de partículas de Mg-ATP y Klein, obteniendo un incremento en la actividad de hidrólisis a concentraciones elevadas del detergente (50 mM). Estos experimentos demuestran que el detergente activa la hidrólisis del ATP en sistemas que tienen un alto contenido de proteína inhibidora (psm Mg-ATP) y en ATPasa solubilizada con Triton X-100 de las mismas partículas. Vázquez-Laslop y Dreyfus también observaron que en estos sistemas membranales (psm) la presencia de colato de sodio no tiene ningún efecto sobre la actividad de hidrólisis de las preparaciones mitocondriales.

## VII. OBJETIVO Y JUSTIFICACION:

El objetivo principal de este trabajo es el de aportar nuevos resultados que contribuyan al conocimiento de las propiedades estructura-función de la ATP-sintasa de mitocondrias de corazón de bovino. Esta es una enzima compleja que, a pesar de haber sido sometida a un amplio número de estudios estructurales y funcionales desde cualquier punto de vista, aún guarda muchos parámetros por conocer.

Para poder conocer más acerca de la ATP-sintasa es necesario el desarrollo de nuevas técnicas de aislamiento y purificación capaces de acercarse a las condiciones nativas de la enzima. Los trabajos anteriormente reportados para esta enzima han permitido una caracterización parcial de sus relaciones estructura-función y se refieren en su inmensa mayoría a: (a) las características catalíticas o estructurales de cada uno de sus componentes por separado ( $F_0$ ,  $F_1$  o  $F_0F_1$ ), (b) de su función dentro de la cadena de transporte de electrones tanto fotosintética como respiratoria (c) a la reconstitución de las funciones de la enzima después de haber sido depletada de alguno de sus componentes, como por ejemplo reconstituir a la proteína inhibidora en complejo  $F_0F_1$  en psm o en liposomas que no la contienen, o a la reconstitución del  $F_1$  en canales  $F_0$  en psm o en liposomas. De estos experimentos se ha concluido que las funciones de la enzima cambian después de ser separadas, y posteriormente reconstituidas. Existen menos trabajos

referentes a la enzima íntegra en psm, y aún mucho menor número de aquellos dedicados al aislamiento de la enzima íntegra (complejo  $F_0F_1$ ). Por otra parte, existe sólo un trabajo que reporta el aislamiento de un complejo como el aquí descrito (101), y el cual se refiere a la secuenciación de las porciones amino terminales de las subunidades de la enzima. El método de purificación del complejo y las características del mismo no ha sido publicado aún.

De acuerdo con lo anterior, este trabajo está enfocado a buscar un nuevo método de aislamiento y purificación que permita tener un complejo enzimático con las características aproximadas con las que se encuentra en la célula, es decir un complejo

$F_0F_1$ -I.

Por ello en esta tesis se pretende diseñar una metodología para obtener un complejo V mitocondrial de manera unitaria. Es decir, que contenga al sector hidrofóbico  $F_0$  unido por medio de las subunidades del cuello a la parte hidrofílica  $F_1$ , y que en ésta última, se encuentre funcional la proteína inhibidora. Lo que requiere de la preservación durante el aislamiento de la enzima, de las características por medio de las cuales en la preparación permanescan unidos el complejo  $F_0$  al sector  $F_1$ , sin perder sus propiedades, así como del mantenimiento de las propiedades adecuadas por medio de las cuales la porción  $F_1$  puede contener a la proteína inhibidora sin perder sus características.

Para lograr este cometido, la metodología desarrollada surge como una mezcla de dos diferentes técnicas principalmente, la desarrollada por Adolfsen (del grupo de Moudrianakis en 1975

(102)), que contiene algunas modificaciones tomadas del método de Tuena de Gómez-Puyou en 1977 (72 y 103), unido al método de Dreyfus y col. publicado en 1984 (104). La primera técnica se refiere al aislamiento de una  $F_1$  soluble, que contiene al inhibidor natural, y la segunda a la purificación de un complejo  $F_0F_1$ , ambas de mitocondrias de corazón de res.

Una vez obtenido este complejo, se pretende conocer su funcionamiento catalítico, su composición polipeptídica y sus características cinéticas en el sentido de la hidrólisis del ATP. Las propiedades que presente el complejo deben guardar un comportamiento semejante al de las preparaciones de las cual deriva.

## VIII. MATERIALES Y METODOS.

### A) PREPARACIONES BIOLOGICAS.

#### 1. Aislamiento de Mitocondrias de Corazón de Res.

Se parte de corazones de bovino frescos obtenidos del rastro. Se siguió el método descrito por Löw y Vallin en 1963 (105). Todo el procedimiento se realiza a 4°C. La preparación comienza con la eliminación del tejido conjuntivo y grasa, para posteriormente moler el músculo. Por cada 400 g de carne molida se añaden 1.2 l de un amortiguador de Sacarosa 0.25M, EDTA 0.015M y Tris-Cl 0.005 M, pH 7.4. Utilizando una solución saturada de Tris se ajusta el pH de la solución a 8.0, y se homogeneiza en periodos de 5 s durante 1 minuto en una licuadora comercial Waring. Inmediatamente después se reajusta el pH a 8.0 con Tris saturado.

El homogeneizado se centrifuga a 3,000 revoluciones por minuto durante 10 minutos, en un rotor Sorvall GS3. El sobrenadante se filtra a través de 2 capas de gasa y se vuelve a centrifugar, esta vez a 10,000 rpm por diez minutos, en un rotor Sorvall GSA.

Se elimina el sobrenadante; la pastilla precipitada se resuspende en amortiguador de Sacarosa 0.25 M, Tris-Cl 0.005 M pH 7.4 y se homogeniza con la ayuda de un homogeneizador. Se vuelve a



centrifugar a 10,000 rpm por diez minutos. La pastilla resultante está compuesta por dos fracciones: la superior o mitocondrias ligeras, y la inferior o mitocondrias pesadas, lo cual únicamente se refiere a qué tan bien selladas están sus membranas. Con una solución de Sacarosa 0.25 M, Tris-Cl 0.005 M, pH 7.4 se ajusta la concentración de proteína a aproximadamente 60 mg/ml para las mitocondrias pesadas, mientras que las ligeras se resuspenden en el volumen que las contiene. La cuantificación de proteína se llevó a cabo por el método de biuret (106). Las mitocondrias se almacenan a -70°C hasta su utilización.

## **2. Preparación de Partículas Submitocondriales de Klein.**

Se utilizó el método descrito por Klein y col. en 1982 (112), el cual consiste en resuspender mitocondrias ligeras a 20 mg/ml en un amortiguador que contiene: Sacarosa 250 mM/KCl 75 mM/ Tris-SO<sub>4</sub> 30 mM, pH 8.0/EDTA 2 mM (pH 8.0 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). A continuación se sonica en lotes de 20 ml por 45 s tres veces en un sonicador Branson 250, con intervalos de 15 s de descanso, en un baño de agua-hielo. El sonicado se centrifuga durante 20 min a 15,000 rpm a 4°C. Se incuba el sobrenadante durante 60 min a 30°C, y se vuelve a centrifugar pero ahora a una velocidad de 30,000 rpm durante 90 min a 25°C. El sobrenadante resultante de esta centrifugación se guarda a -70°C,

pues a partir de él se aísla la proteína inhibidora. El precipitado se resuspende en Sacarosa 250 mM/Tris 5 mM pH 7.4. Se determina la concentración de proteína por el método de biuret (109), y se determina la actividad de hidrólisis por método espectrofotométrico (109). Se almacenan las partículas en alícuotas de 1 ml en nitrógeno líquido, hasta su utilización.

Si se inicia la preparación con 2.0 a 2.5 g de mitocondrias se obtienen aproximadamente 700 mg de partículas submitocondriales. La actividad de hidrólisis de las psm-Klein está en su máxima expresión, por lo cual su actividad específica debe ser de alrededor de  $10 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ .

### **3. Preparación de Partículas Submitocondriales Mg-ATP.**

Se utilizó el método descrito por Lee y Ernster en 1967 (107). Este consiste en resuspender las mitocondrias pesadas a 10 mg/ml con un medio que contiene Sacarosa 0.25 M, ATP 0.006 M y Acetato de Magnesio 0.006 M. El pH se ajusta entre 6.9 y 7.1 con una solución de NaOH concentrada. Posteriormente, la suspensión se sonica en alícuotas de 20 ml durante 5 periodos de 45 segundos y 15 segundos de descanso, en un sonicador Branson 250, procurando no elevar la temperatura arriba de 10°C, en un baño agua-hielo. El sonicado se centrifuga a 15,000 rpm por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante que

contiene a las psm Mg-ATP se centrifuga a 40,000 rpm por 45 minutos a 4°C. El precipitado que contiene a las psm, se resuspende en el volumen inicial con Sacarosa 0.25 M, procedimiento que se repite una vez más. Las psm lavadas se resuspenden en el mínimo volumen posible con Sacarosa 0.25 M, y se cuantifica la concentración de proteína por el método de biuret (106). Finalmente se almacenan hasta su utilización en nitrógeno líquido.

Si se inicia la preparación con 2.0 a 2.5 g de mitocondrias se obtienen aproximadamente 600 mg de partículas submitocondriales. La actividad de hidrólisis de las psm Mg-ATP debe ser menor a 1  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ , hecho que se debe a la presencia de la proteína inhibidora.

#### 4. Aislamiento del complejo $F_0F_1$ .

Se utilizó el método reportado por Dreyfus y col. (104). Se parte de 13.5 mg de psm-Klein y se llevan la concentración a 3 mg/ml con un amortiguador que contiene sacarosa 150 mM/EDTA 2 mM a pH 7.5 en un volumen de 4.5 ml. Se prepara una solución del mismo volumen de LDAO 15 mM. Se agita la solución por un tiempo de 30 min para solubilizar a las proteínas membranales, y se centrifuga a 4°C durante 60 min a 100,000xg. El sobrenadante se pasa por una columna cargada con la resina de afinidad, Sefarosa-hexilamonio,

previamente equilibrada con un amortiguador que contiene Tris-Cl 20 mM pH 7.5/EDTA 2mM/Colato de Sodio 10 mM/ y fosfatidil colina 3 mg/ml (sonicada para dispersar). El flujo de elución es de 3 ml/15 min. Una vez que ha pasado el sobrenadante se procede a lavar con 40 ml del mismo amortiguador. Se eluye con el mismo amortiguador más KCl 1M, y se precipita con un volúmen de sulfato de amonio saturado a pH 7.5, se deja incubando por 30 min a 4°C y se centrifuga durante 15 min a 10,000 rpm. Finalmente se resuspende en un amortiguador que contiene Tris-Cl 20 mM pH 7.5/EDTA 2 mM/ Colato de Sodio 10 mM/Sacarosa 0.25 M/ y fosfatidil Colina 30 mg/ml (sonicada para dispersar). Una vez resuspendida la preparación, se procede a cuantificar la proteína por el método de Lowry o por el método del BCA.

#### 5. Aislamiento del complejo $F_0F_1$ -I.

Se parte de aproximadamente 13.5 mg de psm Mg-ATP, las cuales se llevan a una concentración de 3 mg/ml con un amortiguador que contiene Sacarosa 0.15 M, MES-Tris 0.02 M, pH 6.8, más ADP 0.1 M. Para la solubilización se agrega a la solución de psm un volúmen igual de n-Dodecil- $\beta$ -D- Maltósido 3 mg/mg de proteína. La mezcla de psm y detergente se centrifuga a 40,000 rpm durante 60 min a 4°C. Del sobrenadante obtenido, se guarda una alícuota para cuantificar

Amonio, equilibrada previamente con 20 ml de Amortiguador # 1: MES-Tris 0.02 M, EDTA 0.002 M, Colato de sodio 0.01 M, ADP 0.005 M y fosfatidil colina de Soya 3 mg/ml (sonicado para dispersar). El sobrenadante se eluye de la columna a un flujo de 3ml por 15 min, utilizando una bomba peristáltica y colectado con un colector Gilson en fracciones de 3 ml. Para verificar que el complejo solubilizado esté en buen estado, se le determina la actividad de hidrólisis por el método espectrofotométrico de Pullman y col. (109). Se procede a lavar la columna con 40 ml del Amortiguador # 1 con un flujo de 3 ml por 10 min. Se eluye con 12.5 ml de Amortiguador # 1, más KCl 1 M a un flujo de 2.5 ml por 15 min.

Las fracciones que contienen a la proteína (generalmente 2 y 3, previa verificación por método de Bradford), se precipitan con un volúmen igual de sulfato de amonio saturado, pH 6.8 y se incuban a 4°C durante 30 min. Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifuga a 15,000 rpm durante 15 min a 4°C. Se descarta el sobrenadante y la pastilla se resuspende con 50µl de Amortiguador # 2: Sacarosa 0.25 M, MES-Tris 0.02 M, EDTA 0.002 M, Colato de sodio 0.002 M, ADP 0.0001 M, pH 6.8, más fosfatidil colina de soya 30 mg/ml (sonicada para dispersar). Se procede a cuantificar la concentración de proteína ya sea por el método de Lowry (110), tomando en cuenta el amortiguador # 2 en el blanco por posible interferencia, o por el método del Acido Bicinconinico (BCA) (111).

Nuevamente se determina la actividad hidrolítica de la preparación por el método espectrofotométrico y de igual modo la sensibilidad a la oligomicina y al DCCD, tomando en cuenta el

interferencia, o por el método del Acido Bicinconinico (BCA) (111).

Nuevamente se determina la actividad hidrolítica de la preparación por el método espectrofotométrico y de igual modo la sensibilidad a la oligomicina y al DCCD, tomando en cuenta el control con Etanol.

## B) PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES.

### 1. Determinación de la Concentración de Proteína.

#### a) Método de biuret (106).

Este método se utilizó, con modificaciones para proteínas membranales para cuantificar la concentración de proteína de las suspensiones de mitocondrias y las partículas submitocondriales.

A una fracción que contenga de 0.1-2.0 mg de proteína, se le agregan 0.8 ml de agua, 0.2 ml de desoxicolato de sodio al 2 % y 2.0 ml del reactivo de biuret que consiste de 1.5 g de  $\text{CuSO}_4$ , 6.0 g de tartrato de sodio y potasio en 500 ml de agua. Se agregan después 300 ml de NaOH al 10 %, y se afora a un litro. Toda la solución se prepara con agua destilada y hervida para evitar la presencia de  $\text{CO}_2$ . Se agita y se incuba 15 minutos, y se lee a 540 nm contra un tubo blanco sin proteína. Para la curva estándar se utiliza albúmina de suero de bovino 100 mg/ml; 1 mg de albúmina en el ensayo produce una absorbancia de 0.085.

b) Método de Bradford o del Azul de Coomassie (108).

Se utilizó para cuantificar las proteínas del material soluble y es válido hasta para 10 µg proteína en la muestra. La solución colorante se prepara agregando 100 mg de Azul de Coomassie a 50 ml de Etanol al 95 %, se mezcla con 100 ml de Acido Fosfórico al 85 % v/v y se afora a 1 l con agua destilada. Se filtra y se conserva en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

Dos minutos después de agregar dos mililitros de la solución a la muestra de proteína, se lee a 595 nm, contra un tubo blanco carente de proteína. Para la curva estándar se utiliza albúmina de suero de bovino 1 mg/ml. Para las muestras que contienen detergentes, se agrega la concentración correspondiente en los tubos de la curva estándar para evitar las posibles interferencias.

c) Método de Lowry modificado para proteínas membranales (110).

Para poder llevar a efecto la cuantificación de la concentración de proteína por medio de este método se debe contar con las siguientes soluciones:

Solución 'A':  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2 %, NaOH al 0.4 %, tartrato de  $\text{Na}_2$  al 0.16 % y SDS al 1 %.

Solución 'B':  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 4 %.



**Solución "C":** 100 volúmenes de solución A/1 volumen de solución B.

**Solución "D":** 1 volumen de reactivo de Folin-Ciocalteu/1 volumen de H<sub>2</sub>O.

Las soluciones C y D deben utilizarse recién preparadas. El volumen de una fracción que contenga entre 1 y 100 µg de proteína se completa a un mililitro con agua, y se le añaden 3 ml de solución "C", se agita e incuba a temperatura ambiente durante 10 min. Una vez transcurrido ese tiempo, se agregan 0.3 ml de solución "D". Luego de 45 min a temperatura ambiente, o 30 minutos a 30°C, se lee a 560 nm contra un tubo blanco sin proteína. La curva estándar se realiza con albúmina de suero de bovino a 1 mg/ml. En el ensayo 10 µg de proteína, absorben 0.045.

d) Método del Ácido Bicinconínico (BCA) (111).

Paralelamente al método de Lowry, se utilizó el método del ácido bicinconínico para evitar las posibles interferencias provocadas por los detergentes. BCA method (Pierce and Warriner Ltd., Chester, U. K.).

Este método se basa en el acoplamiento de las actividades enzimáticas de la ATPasa, de la Piruvato Cinasa (PK) y de la Deshidrogenasa Láctica (DL) (Figura 7).

Se determina la velocidad de desaparición del NADH, sabiendo que el coeficiente de extinción molar para el NADH a 340 nm es:

$$\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}.$$

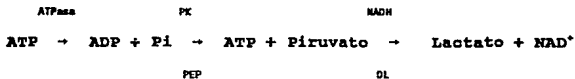


Figura 7. Reacción acoplada de la hidrólisis del ATP y de desaparición del NADH.

La muestra de ATPasa se agrega en 2 ml de un medio de reacción, cuya absorbancia se ha ajustado previamente a 1.0 y que contiene 2 ml de Sacarosa 0.05 M, ATP 0.003M, Tris 0.05 M pH 8.0, KCl 0.03 M, MgCl<sub>2</sub> 0.003 M, fosfoenolpiruvato 0.0015 M, 5.5 U de Piruvato Cinasa, 30 U de Deshidrogenasa Láctica y 0.027 mM de NADH.

La muestra de ATPasa se agrega en 2 ml de un medio de reacción, cuya absorbancia se ha ajustado previamente a 1.0 y que contiene 2 ml de Sacarosa 0.05 M, ATP 0.003M, Tris 0.05 M pH 8.0, KCl 0.03 M, MgCl<sub>2</sub> 0.003 M, fosfoenolpiruvato 0.0015 M, 5.5 U de Piruvato Cinasa, 30 U de Deshidrogenasa Láctica y 0.027 mM de NADH.

La actividad de hidrólisis se calcula mediante la fórmula:

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

( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ )

b) Método de Fiske y SubbaRow (113)

Una muestra de proteína (30  $\mu\text{g}$  de partículas submitocondriales, 1  $\mu\text{g}$  de F<sub>1</sub> o de 5 a 30  $\mu\text{g}$  de los complejos F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> o F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-I) se lleva a un volumen de 0.1 ml con Sacarosa 0.25 M, Tris-Cl 0.005M, pH 7.4. Se añaden 0.25 ml de un medio de reacción que contiene: Tris-SO<sub>4</sub> 0.1 M, pH 7.8, ATP 3 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, fosfoenolpiruvato 4 mM (concentraciones finales) y 3.65  $\mu\text{l}$  de piruvato cinasa/ml. Se incuba a 30°C (5 a 10 min para las partículas submitocondriales, y 10 a 15 min para los complejos F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> o F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-I), y se detiene por la adición de 0.1 ml de ácido

tricloroacético (TCA) al 30% dejando los tubos en hielo. Paralelamente, se agrega 0.1 ml de la enzima en sacarosa directamente en 0.1 ml de TCA, antes de añadir el medio de reacción (blancos con TCA). Se centrifuga durante 5 min en una centrifuga clinica, y del sobrenadante se toman 0.2 ml que se agregan a 0.8 ml de agua. A esta mezcla se añaden 0.25 ml de una solución de molibdato (a 800 ml de agua destilada se agregan lentamente, en frio, 111 ml de  $H_2SO_4$  36 N y posteriormente, 50 g de molibdato de amonio). El volumen se completa a 1 l con agua) y 0.25 ml de una solución de Elon (Kodak) (10 g de Sulfato de Elon y 30 g de metabisulfito de sodio se aforan a 1 l con agua). Luego de 10 min de incubación a temperatura ambiente se mide la absorbancia a 660 nm contra un tubo blanco (1 ml de agua, 0.25 ml de molibdato y 0.25 ml de Elon). La curva estándar se hace a partir de una solución de 2.5 mM de  $H_3PO_4$ . 250 nanomolas de  $H_3PO_4$ , producen una absorbancia de 0.34 a 660 nm. Para calcular la actividad de hidrólisis se aplica la siguiente fórmula:

Actividad de hidrólisis ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ) =  $(D.O. \text{ muestra} - D.O. \text{ blanco con TCA}) \times (\text{Vol de reacción } (0.45 \text{ ml}) / \text{vol sobrenadante } (0.2 \text{ ml})) \times [250 \text{ nmoles Pi} / D.O. \text{ } 660 \text{ nm } (0.34)] \times [1/ \text{ tiempo (min)}] \times [1/\text{proteína (mg)}]$

#### D) ESTIMULACION DE LA HIDROLISIS DE ATP.

Es posible liberar a la enzima de la acción de la proteína inhibidora (19 y 93) incubando a la preparación en un medio en presencia de ATP, en ausencia de magnesio y a una temperatura de 60°C. El resultado de este proceso es una estimulación de la actividad de hidrólisis, y representa un criterio que indica que la baja actividad hidrolítica de la  $F_1$ -latente se debe a su interacción con la proteína inhibidora. El medio de activación contiene: Tris-acetato 0.05 M, ATP 0.01 M, EDTA 1.3 mM y sacarosa 0.25 M. Una vez que el medio de reacción está a 60°C, se agregan 0.02mg/ml del complejo  $F_0F_1$ -I (concentración final). Se toman alícuotas de 0.24 ml a diferentes tiempos y se colocan en tubos que contienen 0.01 ml de  $MgCl_2$  0.125 M (concentración final 5mM). La reacción de hidrólisis que se inicia así se incuba a 30°C por 10 ó 15 min, y se detiene por la adición de 0.1 ml de ácido tricloroacético al 30 %. Para cada tiempo de incubación en el medio de activación se toma una alícuota que se añade directamente a 0.1 ml de ácido tricloroacético. Se cuantifica la actividad de hidrólisis por medio del método de Fiske-SubbaRow para conocer la cantidad de Pi liberado por la reacción.

**E) ELECTROFORESIS EN GEL DE ACRILAMIDA-SDS (Von Jagow) (114).**

Este método se utilizó para conocer la composición polipeptídica de las subunidades que componen al complejo de la ATP-sintasa, tanto del complejo  $F_0F_1$  como del  $F_0F_1-I$ . Las soluciones utilizadas son:

Amortiguador del cátodo: Tris 0.1 M/ Tricina 0.1 M/ SDS 0.1 %.

Amortiguador del ánodos: Tris-HCl 0.2 M pH 8.9.

Amortiguador para el Gel: Tris 3 M/HCl 1 M/ SDS 0.3 %.

Acrilamida:Bisacrilamida 30:0.938 p/p.

Overlay: Tris 1 M/HCl 0.33 %/SDS 0.1 %.

Mezcla Digestora: SDS 5 %/Glicerol 15 % / Tris 0.05M/

2-mercaptoetanol 2 % pH 6.8 (HCl)/Azul de bromo fenol 0.03 %.

Para un gel de 0.5 mm de grosor de 16 x 16 cm se utilizan las siguientes cantidades:

	<u>Separador.</u>	<u>Concentrador</u>
Concentración final de Acrilamida	(16 %)	(4 %)
Acrilamida:Bisacrilamida	16 ml	1.6 ml
Amortiguador Gel	10 ml	3.0 ml
Glicerol (79.5 %)/H <sub>2</sub> O	4 ml	---
Persulfato de Amonio (10 %)	100 µl	100.0 µl
TEMED	10 µl	10.0 µl

Se ponen aproximadamente entre 5 y 10  $\mu\text{g}$  de proteína en 10  $\mu\text{l}$  de mezcla digestora. Se corre entre 80 y 100 V durante 14-16 hr. Se fija en: Metanol 50 %/Ac. Acético 10 % durante 1 hr. Se tiñe en: Ac. Acético 10 %/Azul de Coomassie G 250 0.1 % durante 10 min en un horno de microondas. Se destiñe con Ac. Acético al 10 %.

Como marcadores de peso molecular, se utilizan fosforilaza b, albúmina de suero de bovino, ovoalbúmina, anhidrasa carbónica, inhibidor de tripsina de soya y lisosima (BIO-RAD).

#### F) TINCIÓN POR PLATA (116).

Esta técnica se utilizó para evitar las posibles interferencias de algunas sustancias con la tinción por azul de Coomassie, y así como para evidenciar la posibilidad de la existencia de bandas proteicas dentro de la preparación que no pueden ser fácilmente evidenciadas por la tinción con azul de Coomassie. El método consiste en una tinción proteica por nitrato de plata, sustancia mucho más afin que el reactivo convencional azul de Coomassie.

Una vez efectuado el método de tinción por el azul de Coomassie, se incubó al gel durante 30 min en una solución de glutaraldehído al 10 % (diluyendo la solución comercial de 49 %).

Se deja lavando al gel en una cantidad abundante de agua durante toda la noche y se preparan las siguientes soluciones:

**Solución A:** Disolver 0.8 g de nitrato de plata en 4 ml de agua destilada.

**Solución B:** Mezclar 21 ml de Hidróxido de Sodio 0.36 % y 1.4 ml de Hidróxido de Amonio (de la solución comercial al 29.7 %)

**Solución C:** Gota a gota colocar la solución A en la solución B con agitación constante y llevar la solución resultante a 100 ml con agua destilada.

**Solución D o Revelador:** Mezclar 5 ml de ácido cítrico al 1 % con 0.25 ml de Formaldehído (de la solución comercial al 38 %) y llevar a 500 ml con agua: solución fresca.

Teñir el gel en la solución C por 15 min en agitación constante en un contenedor Pyrex. Posteriormente cambiarlo a un contenedor plástico, y lavar dos veces por 5 min con agua destilada. Se revela el gel con la solución D en un contenedor Pyrex limpio. Las bandas aparecen en menos de 5 min. La reacción se detiene agregando Metanol al 50 %. Después de este tratamiento, se debe guardar el gel en la obscuridad.



Para localizar al péptido inhibidor en la preparación, se utiliza una técnica de inmunotransferencia con anticuerpos específicos. En una solución de adyuvante de FREUD, se inoculó al conejo con 500 µg de proteína inhibidora cada 15 días y se aplicaron 4 refuerzos. Una vez sangrado el conejo, se separa el paquete celular del suero, y a partir de esta fracción, se precipitan las gammaglobulinas específicas.

Para la inmunorréplica se necesitan preparar las siguientes soluciones:

Amortiguador de transferencia:	TBS (Tris Buffer Saline)	TTBS (Tween-Tris Buffer Saline)
25 mM Tris	20 mM Tris-Cl pH 7.5	20 mM Tris-Cl pH 7.5
192 mM Glicina	0.5 M NaCl	0.5 M NaCl
20 % Metanol		0.05 % Tween-20
(3 litros)	(500 ml)	(500ml)

El procedimiento consiste en la transferencia de la proteína del gel a una membrana de nitrocelulosa por electroforesis. El papel de nitrocelulosa se inmunodecora con el antisuero específico, y posteriormente con un segundo anticuerpo, el cual se revela por medio de peroxidasa o fosfatasa alcalina.

Se corre un gel de poliacrilamida con una cantidad suficiente de proteína. Una vez que ha corrido, se corta en las tiras necesarias, y cada una de ellas se debe incubar por separado en amortiguador de transferencia durante 30 min. Se corta el papel de

Se corre un gel de poliacrilamida con una cantidad suficiente de proteína. Una vez que ha corrido, se corta en las tiras necesarias, y cada una de ellas se debe incubar por separado en amortiguador de transferencia durante 30 min. Se corta el papel de nitrocelulosa al tamaño deseado, y se moja en el amortiguador de transferencia. A continuación se monta el emparedado para la transferencia de la siguiente manera: sobre la rejilla se coloca una esponja mojada con amortiguador de transferencia, sobre ésta, un papel filtro también mojado con el amortiguador, luego las tiras de gel y finalmente el papel de nitrocelulosa. Se termina el emparedado, invirtiendo los pasos antes mencionados, se cierra la rejilla y se pone en la cámara de transferencia, que previamente ha sido llenada con amortiguador de transferencia. El emparedado se debe colocar en la cámara de transferencia de tal manera que el papel esté colocado hacia el cátodo.

Se transfiere durante 4.5 hrs a 0.25 Amperes, a una temperatura de 8°C y con agitación constante. Una vez efectuada la transferencia, para verificar la efectividad de la misma se tiñen las tiras de papel durante 15 min con Ponceau S al 0.5 % en ácido acético al 7.5 % en agitación constante, lo cual permite evidenciar la presencia de la proteína transferida sin afectar la detección específica por los anticuerpos. Se bloquea 1 hr en gelatina al 3 % en agua con agitación constante. Se incuban las tiras en 15 ml de TTBS más 40 µl de suero normal de cabra, durante toda la noche. A la mañana siguiente, se lava 3 veces cada 5 min con TTBS y se agita constantemente en presencia del anticuerpo contra la proteína

deseada, en este caso I-F<sub>1</sub>, en una solución de gelatina al 1 % en TTBS a una dilución que dependerá del título del anticuerpo (esta solución es reutilizable). Se lava 3 veces con TTBS y se procede a utilizar los reactivos en el orden descrito por el kit de Vectastain que revela a los anticuerpos por medio de peroxidasa.

## IX. RESULTADOS.

Los resultados del proyecto, se pueden enmarcar dentro de tres grupos principalmente: (a) la primera parte se enfoca a la preparación del complejo  $F_0F_1$ -Inhibidor Endógeno; (b) de cómo se llegaron a determinar las condiciones óptimas para obtener una preparación con las propiedades buscadas. Esta segunda parte se refiere a las pruebas realizadas para comprobar que las características que se pretenden obtener en esta preparación se encuentren presentes. Finalmente (c) la determinación de algunas propiedades cinéticas del complejo  $F_0F_1$ -Proteína inhibidora.

### 1. Preparación del Complejo $F_0F_1$ -I.

Como ya se mencionó para llegar al método que aquí se reporta, se tomaron algunas de las características de dos métodos principalmente por medio de las cuales se mantienen las propiedades que se desean tener en la nueva preparación. Dichos métodos son los reportados para aislar a una  $F_1$ -Proteína Inhibidora, de Gómez-Puyou y col. en 1986 (72) y el de Dreyfus y col. en 1984 (104) para purificar un complejo  $F_0F_1$ . Ambos métodos se realizan a partir de

mitocondrias de corazón de bovino. En seguida se discute la forma de preparar cada uno de ellos junto con algunas de sus características.

## 2. La Preparación del Complejo $F_1$ -Proteína Inhibidora.

En el año de 1975 el grupo de Moudrianakis (93) propuso un método mediante el cual se puede obtener una  $F_1$  soluble que contiene a la proteína inhibidora funcional. Este método fue modificado por Gómez-Puyou y col. en 1986 (72), tomando como base la técnica para aislar a la  $F_1$  propuesta por Tuena y col. en 1977 (103). Las características que tiene la preparación se muestran en la Tabla 4. Como se mencionó en la sección anterior, se tomaron de esta preparación las características que creemos son necesarias para la conservación de la proteína inhibidora durante la purificación, hecho que se discutirá más adelante.

Tabla 4.

### Algunas de las Características del Complejo $F_1$ -I

Estable al frío.  
Insensible a la Oligomicina y al DCCD.  
Actividad Hidrolítica de  $1 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ .  
Activable por Temperatura y por Sales ( $\text{KCl}$  o Sulfato de  $\text{NH}_4$ ), a velocidades semejantes a las de una  $F_1$  soluble ( $85 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ).

El método se puede resumir en el siguiente diagrama de flujo:

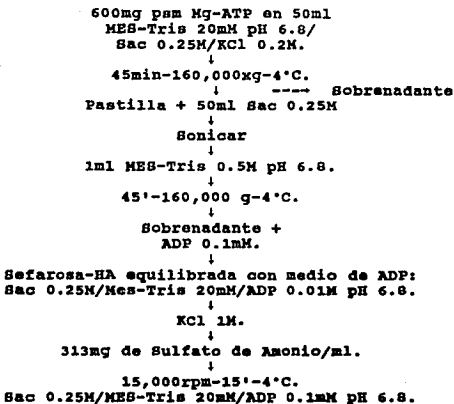


Figura 8. Método para aislamiento del complejo F<sub>1</sub>-Proteína Inhibidora de Gómez-Puyou y col. 1986, tomado de Adolfsen y col. (1975) con modificaciones tomadas del método para aislar F<sub>1</sub> soluble de Tuena de G.-P. y col. (1977).

### 3. La Preparación del Complejo $F_0F_1$ .

En el año de 1984 Dreyfus y colaboradores (104), describieron un método por medio del cual se puede aislar un complejo  $F_0F_1$ , cuyas características se muestran en la Tabla 5. De esta se tomaron las características que permiten que el sector  $F_0$  permanezca unido al sector  $F_1$ .

Tabla 5.

#### Algunas de las Características del Complejo $F_0F_1$ .

Estable al frío.

Sensible a la Oligomicina y al DCCD.

Realiza recambio de  $ATP \rightarrow ^{32}Pi$ .

Actividad Hidrolítica de  $4 \mu mol \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ .

El método se puede resumir en el siguiente diagrama de flujo:

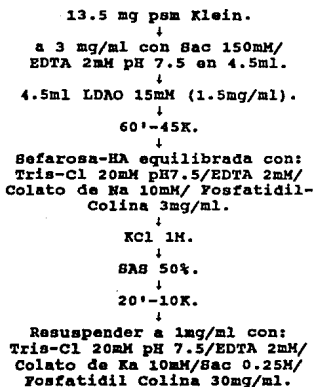


Figura 9. Método para aislamiento del complejo  $F_0F_1$ , de Dreyfus, Celis y Ramirez (1984).



#### 4. Cómo se Desarrolló la Metodología para el Aislamiento del Complejo $F_0F_1$ -I.

Las características que se tomaron de cada método se basan en las propiedades que le dan a la preparación a la cual pertenecen. Se tomó del método para la preparación de la  $F_1$ -I, el tipo de psm, en este caso de Mg-ATP, ricas en proteína inhibidora y adecuadas para poder obtener a partir de ellas un complejo que contenga al I- $F_1$ . Otro factor tomado de este método es el pH, que es muy importante durante la purificación de  $F_1$ -I, pues en presencia de sales o de temperatura, se obtiene la mayor estimulación de la hidrólisis de ATP. Ello se debe a la interacción alcali-labil que ocurre entre la proteína inhibidora y el sector  $F_1$ . Por otra parte, la combinación de los dos amortiguadores a dicho pH, MES y Tris, es favorable. De este método se tomó también la presencia de ADP, que es capaz de conservar a la proteína inhibidora unida al sector  $F_1$ .

A partir de la técnica de aislamiento del complejo  $F_0F_1$  se tomaron las siguientes características: (a) la concentración inicial de partículas utilizada (13.5 mg/ml), que permite un rendimiento del complejo aislado elevado; (b) la forma de solubilizar a la enzima, es decir en un baño de hielo y en agitación constante en presencia del detergente; (c) la presencia de la fosfatidil colina, el colato de sodio y el EDTA, a las mismas concentraciones las cuales crean un ambiente capaz de conservar las características de unión del complejo.

Usando el método de Tuena y col. para aislar a la  $F_1$  soluble de mitocondrias de corazón de bovino (103) y para aislar al complejo  $F_1-I$  (72) se adoptó para este trabajo la columna cromatográfica cargada con una resina de afinidad, la Amoniohexil-Sefarosa. Esta columna se utiliza en ambas técnicas, y es de vital importancia ya que separa selectivamente al complejo  $F_0F_1-I$  de otras posibles proteínas contenidas en el sobrenadante del solubilizado.

Según el método para solubilizar al complejo  $F_0F_1$  de Dreyfus y col. (104), el detergente empleado para la solubilización de la enzima es el Laurildimetilamino óxido. Los primeros experimentos se realizaron con este mismo detergente, pero las concentraciones finales que se obtenían del complejo  $F_0F_1-I$  eran extremadamente bajas (2% de la ATP-sintasa total), por lo cual nos enfocamos a buscar un nuevo detergente que permitiera obtener una mayor cantidad de enzima. Tomando en consideración el repórt de Walker y col. (101), donde se aísla a un complejo como el reportado en este trabajo, se encontró que el n-dodecil  $\beta$ -D-maltósido (lauril maltósido), reúne las características apropiadas. Ambos detergentes tienen una cadena hidrocarbonada de 12 átomos de carbono, solo que uno de ellos posee en la región polar un alcano sustituido (metilamino), y el otro un derivado de una azúcar (grupo maltósido).

Se realizaron las pruebas de solubilización con concentraciones crecientes de detergente (Figura 10) y se cuantificó la actividad hidrolítica de cada uno de los sobrenadantes resultantes. Como se puede observar en la Figura 11

a una concentración de 3 mg de detergente por mg de proteína, se obtiene la mayor actividad de hidrólisis.

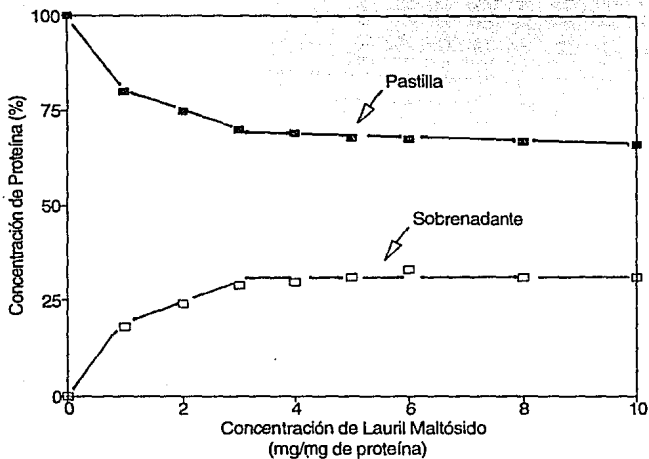


Figura 10. Curva de solubilización con el detergente n-Dodecil B-D-Maltósido en partículas submitocondriales Mg-ATP.

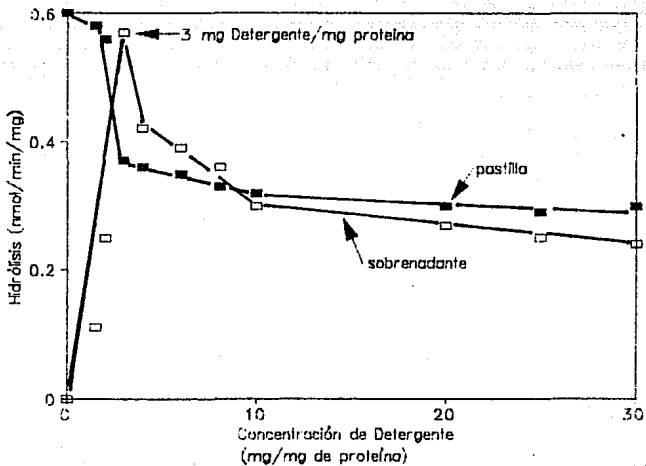


Figura 11: Determinación de la Actividad Hidrolítica en los sobrenadantes y pastillas resultantes de la solubilización con el detergente n-Dodecil  $\beta$ -D-Maltósido en presencia de Mg-ATP.

De manera simultánea se llevó a cabo la estimulación de la hidrólisis de ATP por preincubación con temperatura (60°C), tanto del sobrenadante como de la pastilla resultantes de la solubilización con lauril maltósido. Se encontró que existía el comportamiento esperado en ambas fracciones, es decir se estimuló la velocidad de hidrólisis de ATP en la pastilla (Figura 12) por lo cual se procedió a realizar una resolubilización de ésta a la misma concentración del detergente. Como se puede observar en la Figura 13 después de la resolubilización, no queda actividad de hidrólisis en la pastilla, de lo cual se concluye que la mayoría de las ATPasas o cuando menos las enzimas funcionales se encuentran en el sobrenadante después de la resolubilización.

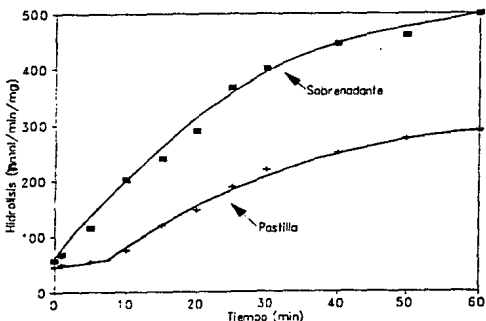


Figura 12. Estimulación de la hidrólisis de ATP por temperatura (60°) en sobrenadante y pastilla resultantes de la solubilización de psm Mg-ATP con n-Dodecil B-D-Maltósido 3mg de detergente/mg de proteína.

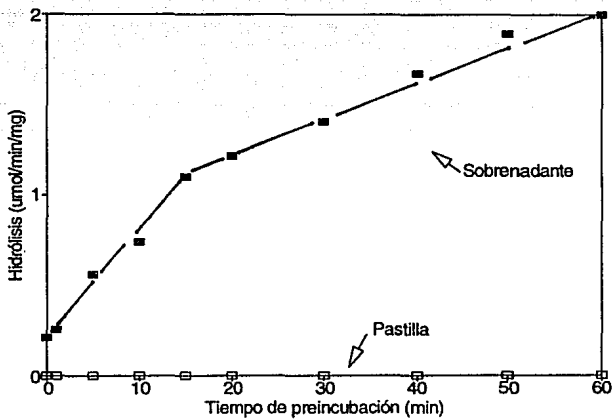


Figura 13. Estimulación de la hidrólisis de ATP por temperatura ( $60^{\circ}\text{C}$ ) en sobrenadante y pastilla resultantes de la resolubilización con  $3\text{mg}$  de  $n\text{-Dodecil } \beta\text{-D-Maltósido}/\text{mg}$  de proteína.

En la Figura 14 se muestra la fracción de proteína que se obtiene después de efectuar la solubilización y resolubilización. Se logra solubilizar alrededor del 20 % del total de proteína de las partículas submitocondriales.

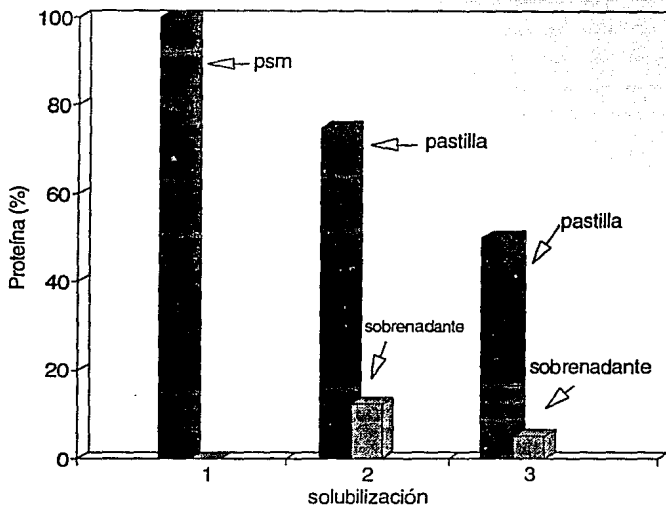


Figura 14. Porcentaje de proteína obtenido en la pastilla y sobrenadante de la solubilización (2) y resolubilización (3) con 3 mg de n-Dodecil  $\beta$ -D-Maltósido/mg de proteína.

El método propuesto se puede resumir en el siguiente diagrama de flujo:

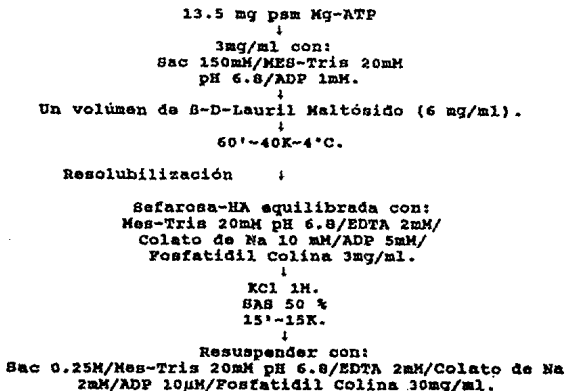


Figura 15. Método para la obtención del complejo  $F_0F_1$ -Proteína Inhibidora.

Una comparación simplificada de los tres métodos se muestra en la Figura 16.



Método para $F_1-I$	Método para $F_0F_1$ de	Este
Adolfson et al 1975 con modificaciones tomadas de Tuena de G.-P. et al 1977	Dreyfus/Celis/Ramirez 1984	trabajo
600mg pms Mg-ATP en 50 ml de Mes-Tris 20mM pH 6.8/ Sac 0.25M/KCl 0.2M.	13.5mg pms Klein ↓ 3mg/ml con Sac 150mM/ EDTA 2mM pH 7.5 en 4.5 ml	13.5mg pms Mg-ATP ↓ 3mg/ml con Sac 250mM/Mes-Tris
↓	↓	20mM pH 6.8/ADP 1mM.
45°- 160,000g- 4°C.		↓
↓ --- Sobrenadante	4.5ml LDAO 15mM (1.5mg/ml)	un Volumen de LM (6 mg/ml)
Pastilla + 50ml Sac 0.25M	↓ 60° 45K	↓ 60°-40K-4°C
↓ Sonicar	↓ Sefarosa-4A con:Tris-Cl 20mM pH 7.5 EDTA 2mM/Colato de Na 10mM/Fosfatidil Colina 3mg/ml	↓ Sefarosa-4A equilibrada: Mes-Tris 20mM pH 6.8/EDTA 2mM/Colato 10mM/ADP 5mM/ Fosfatidil Colina 3mg/ml
↓ 1ml Mes-Tris 0.5M pH 6.8	↓	↓
45°- 160,000g- 4°C		Fosfatidil Colina 3mg/ml
↓		↓
Sobrenadante + ADP 0.1mM	KCl 1M SAS 50% 20°- 10K ↓ Resuspender a 1 mg/ml	KCl 1M SAS 50% 15°- 15K ↓ Resuspender con Tris-Cl
20mM pH 7.5/ ↓	con: EDTA 2mM/Colato de Na 10mM/Sacarosa 0.25M/	Sac 0.25M Mes-Tris Fosfatidil
Colina 20mM/EDTA 2mM 30 mg/ml	Colato 2mM/	ADP 10mM/ pH 6.8 Fosfatidil Colina 30mg/mlADP
Sefarosa-4A equilibrada con Medio de ADP: Sac 0.25M/Mes-Tris 20mM/ 0.01M pH 6.8	↓	
↓	DIALISIS	
315 mg Sulfato de Amonio/ml Protefina 15K-15°-4°C		
Sac 0.25M/Mes-Tris 20mM/ADP 0.1mM pH 6.8		

Figura 16. Comparación simplificada de las metodologías reportadas para el aislamiento de los complejos  $F_0F_1$  y  $F_1-I$ , así como el método de aislamiento del complejo  $F_0F_1-I$ .

## **λ. CARACTERISTICAS DEL COMPLEJO $F_0F_1$ -I.**

Una vez establecida la metodología por medio de la cual se obtiene al complejo  $F_0F_1$ -I se procedió a realizar algunas pruebas que permiten caracterizar parcialmente tanto el comportamiento catalítico de la enzima, como su composición polipeptídica y sus características cinéticas.

### **1. CARACTERISTICAS FUNCIONALES.**

La primera prueba a la que se sometió el complejo aislado, fue la de la determinación de su actividad hidrolítica del ATP. Para ello se midió la desaparición colorimétrica del NADH acoplada a la hidrólisis del ATP (ver Materiales y Métodos). Se cuantificó esta actividad calculando la pendiente obtenida de la gráfica de desaparición del NADH en función del tiempo, y se observó que la actividad hidrolítica espectrofotométrica para el complejo es de alrededor de  $1.2 \mu\text{mol Pi min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ . Posteriormente se verificó este valor utilizando el método de Fiske-SubbaRow (113), y el resultado fue el mismo ( $1.2 \mu\text{mol Pi min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ ).

Como se mencionó en la introducción, la oligomicina es un

antibiótico que interacciona de manera aun no conocida con alguna subunidad del cuello de la enzima bloqueando el paso de protones a través de la enzima. Agregando una concentración de antibiótico de 5  $\mu\text{g}/\text{mg}$  enzima, se determinó la sensibilidad del complejo a la oligomicina cuando éste estaba hidrolizando ATP. Durante un curso temporal de hidrólisis de ATP, la cantidad consumida de sustrato en cualquier punto del experimento es mucho mayor (casi 100 veces) la actividad de la enzima en presencia del antibiótico (Figura 17). Es importante hacer aquí un paréntesis y mostrar cómo se calcula la sensibilidad a la oligomicina:

La Oligomicina está disuelta en etanol, a una concentración de 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . De ahí que los cálculos para conocer su efecto inhibitorio sobre la preparación no se efectúan con los datos obtenidos de la actividad testigo, sino de la actividad de la preparación en presencia de un volumen de alcohol igual al agregado de la solución de oligomicina/etanol, pues se desea cuantificar única y exclusivamente el efecto del antibiótico y no el del etanol.

Se encontró que al menos a estas concentraciones el alcohol no tiene ningún efecto sobre la hidrólisis. Se determinó la actividad en presencia del etanol absoluto y se le asignó un valor de 100 %; a partir de esta relación se calculó a cuanto equivale la actividad en presencia de oligomicina. Para este caso particular, la cantidad de etanol utilizada no tiene ningún efecto sobre la actividad hidrolítica.

El resultado obtenido fue una inhibición de la actividad de hidrólisis de ATP por la oligomicina entre 85 y 95 % (Figura 17).

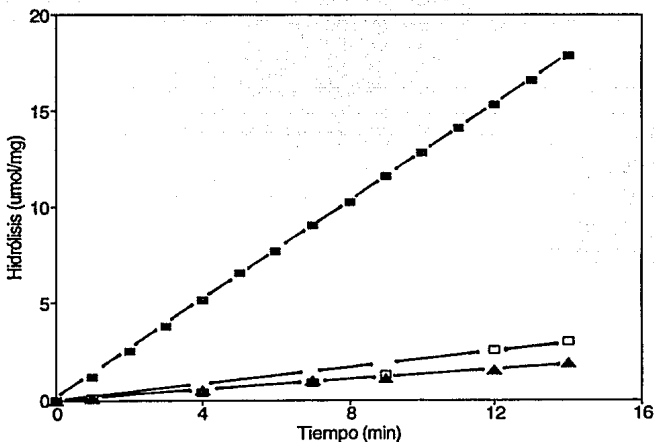


Figura 17. Curso temporal de hidrólisis de ATP por el complejo  $F_0F_1$ -I (■), en presencia de DCCD (200µg) (□) y Oligomicina/Etanol (5µg/mg de proteína) (▲).

Se determinó el efecto del reactivo DCCD sobre la hidrólisis del ATP, que como se explicó anteriormente, se une covalentemente a un residuo de ácido aspártico en la subunidad  $\alpha$  del canal  $F_0$ . A la concentración utilizada (200 µg), se observó una inhibición de la actividad de hidrólisis entre un 80 y un 90 % (Figura 17),

## 1. Estimulación de la Hidrólisis a 60°C

Otro parámetro estudiado fue la estimulación de la actividad de hidrólisis a 60°C, que como se mencionó anteriormente es una característica que presenta la preparación de F<sub>1</sub>-I. Ello se llevó a cabo mediante la cuantificación de la hidrólisis de ATP, utilizando el método de Fiske-SubbaRow para conocer la cantidad de Pi liberado por la reacción. Luego de someter a la enzima a una preincubación a la temperatura mencionada durante un curso temporal, se midió la actividad de hidrólisis en las mismas condiciones que se cuantificó la actividad basal de la preparación, es decir en presencia de sistema regenerador de ATP, y a 30°C (ver Materiales y Métodos). Después del tratamiento con temperatura, la actividad hidrolítica se incrementa conforme aumenta el tiempo de preincubación del complejo. La estimulación obtenida por el efecto de la preincubación a 60°C es entre 8 y 9 veces mayor que la actividad basal del complejo a una temperatura de 30°C (Figura 18).

Para verificar que durante el aislamiento de la enzima, se conservan las características que se pretende que contenga el complejo final, se efectuaron las cuantificaciones de estas propiedades para cada uno de los pasos de la purificación. En la Tabla 6 se muestran las características funcionales de cada uno de los complejos intermedios de la purificación.

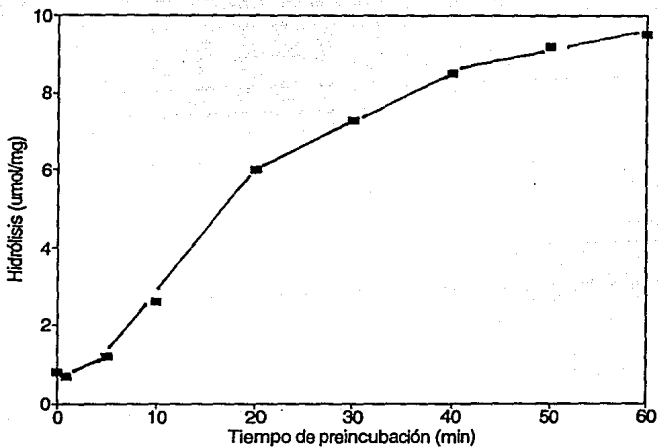


Figura 18. Estimulación de la hidrólisis de ATP del complejo  $F_0F_1$ -I por temperatura ( $60^\circ\text{C}$ ), pH 6.8.

Tabla 6.	PSM	Sobrenadante	1ª Pastilla	F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> -I
Actividad μmol/min/μg	0.6	0.1	0.2	1.2
Oligomicina (inhibición)	80-90%	70-80%	80%	85-95%
DCCD (inhibición)	80-90%	70-80%	80%	80-90%
Estimulación por Temperatura μmol/min/μg	3	0.5	0.3	10

Tabla 6. Características de actividad y sensibilidad a inhibidores de la ATP-sintasa mitocondrial.

## 2. Efecto de la Fuerza Iónica Sobre la Hidrólisis de ATP.

El incremento de la fuerza iónica modifica la interacción entre la proteína inhibidora y la F<sub>1</sub>. Se realizó la determinación del efecto del aumento de la fuerza iónica sobre la hidrólisis de ATP por el complejo F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-I. El experimento se realizó preincubando a la preparación durante 5 minutos en presencia de concentraciones crecientes de KCl, y posteriormente se cuantificó el efecto de este

incremento sobre la reacción de hidrólisis por medio del método de Fiske-SubbaRow para conocer la cantidad de Pi liberado por la reacción. El resultado de este procedimiento condujo a una estimulación de la hidrólisis de ATP hasta en 5 veces la velocidad de este proceso en ausencia de KCl (Figura 19).

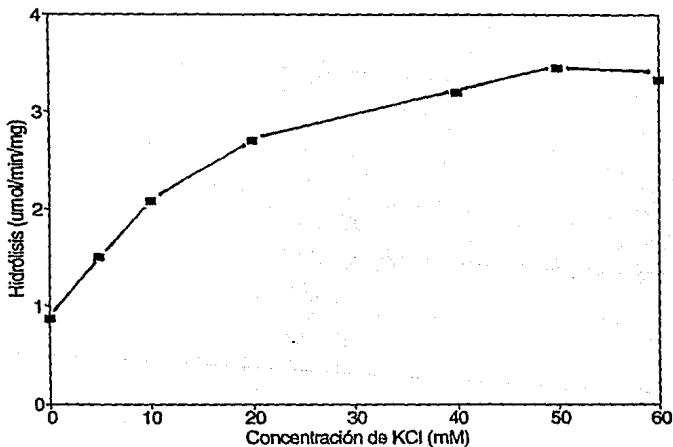


Figura 19. Efecto del aumento de la fuerza iónica sobre la reacción de hidrólisis de ATP por la preincubación del complejo  $F_0F_1$ -I en concentraciones crecientes de KCl



### 3. Efecto del pH en la hidrólisis de ATP.

Según el reporte que se tiene para el efecto del pH en la hidrólisis de ATP por la preparación de  $F_1-I$ , se sabe que la interacción de la proteína inhibidora con la  $F_1$  se ve afectada por pH alcalinos, lo cual se ve reflejado en un aumento de la actividad hidrolítica. De acuerdo a ello se procedió a determinar el efecto del pH sobre la actividad de hidrólisis de ATP por el complejo  $F_0F_1$ -proteína inhibidora. Se verificó de acuerdo con los reportes previos para el complejo  $F_1-I$  (que sugieren que las interacciones entre la proteína inhibidora con el carboxilo terminal de la subunidad  $B'$  son alcali-lábiles), que el complejo  $F_0F_1-I$  tiene el mismo comportamiento (Figura 20). Aunque después de un pH de 9.0 (óptimo para la actividad de hidrólisis a 30°C), la actividad decrece rápidamente.

Se ha reportado que el complejo  $F_1-I$  tiene un pH óptimo para realizar la hidrólisis de ATP a 30°C, pero que no corresponde al pH óptimo para la estimulación cuando se preincuba con temperatura (60°C) (93). Se realizaron experimentos de estimulación de la actividad de hidrólisis por preincubación a 60°C y diferentes pH. Se encontró que la estimulación de la actividad de hidrólisis de ATP a 60°C por el complejo  $F_0F_1$ -proteína inhibidora está favorecida a un pH 6.8, al cual se lleva el aislamiento de la enzima, lo cual concuerda con el pH reportado para la estimulación de la actividad de hidrólisis del complejo  $F_1-I$  por preincubación a esa

temperatura. Si se efectúa el experimento a un pH de 9.0, al cual se obtiene la mayor actividad hidrolítica a 30°C, la estimulación de la hidrólisis se alcanza rápidamente, pero disminuye también en muy corto tiempo, como se observa en la Figura 21.

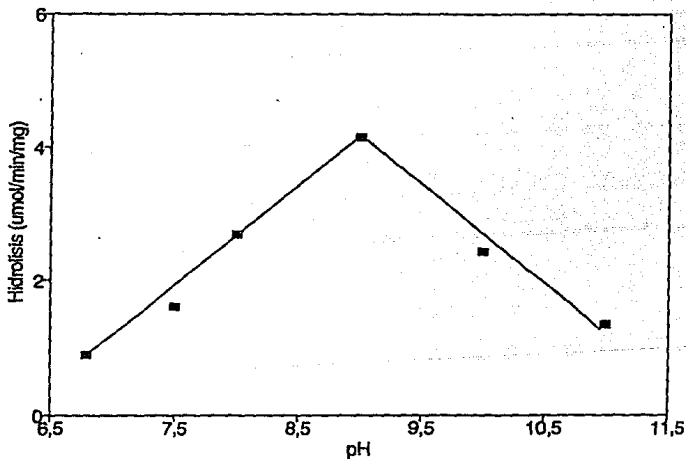


Figura 20. Efecto del pH en la hidrólisis de ATP por el complejo  $F_0F_1$ -I.

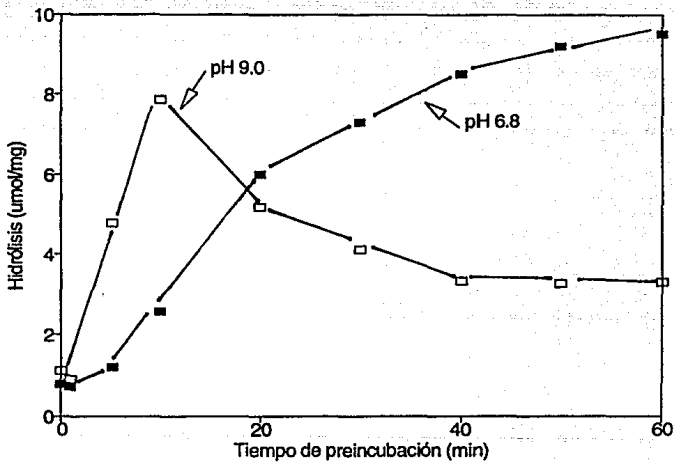


Figura 21. Efecto del pH en la estimulación de la hidrólisis de ATP por temperatura (60°C), por el complejo  $F_0F_1$ -I.

## ii. COMPOSICION POLIPEPTIDICA.

Para evidenciar la composición polipeptídica del complejo  $F_0F_1$ -proteína inhibidora, se efectuó una electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (16%) en presencia de SDS (ver Figura 22).

Los pesos moleculares de los polipéptidos que componen a la preparación se obtuvieron, por medio del barrido densitométrico, utilizando el programa Ultra Gel Scan (ver Figura 23). La preparación está compuesta de alrededor de 17 bandas, a las que se les asignó por medio del mismo programa un peso molecular de:  $\alpha$ : 55,200,  $\beta$ : 51,090,  $\gamma$ : 30,170,  $\delta$ : 15,000,  $\epsilon$ : 5,551, OSCP: 20,789,  $F_6$ : 7,980,  $F_8$ :13,090, a: 26,900, b: 10,089, c: 8,012 e  $I-F_1$ , 9,780. Para descartar el ruido efectuado por la tinción del gel, el programa de Ultra Gel Scan, calcula las integrales de los picos obtenidos por el barrido densitométrico, las curvas gaussianas, así como los pesos moleculares de cada una de las bandas del gel (Figura 24).

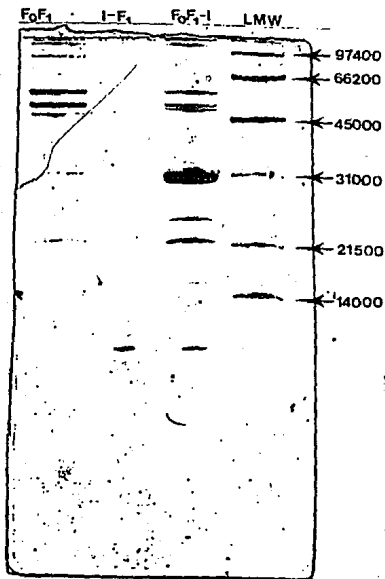


Figura 22. Electroforesis en gel de poliacrilamida (16 %) en presencia de SDS. Teñido con azul de Coomassie, para los complejos  $I-F_1$ ,  $F_0F_1$  y  $F_0F_1-I$ .

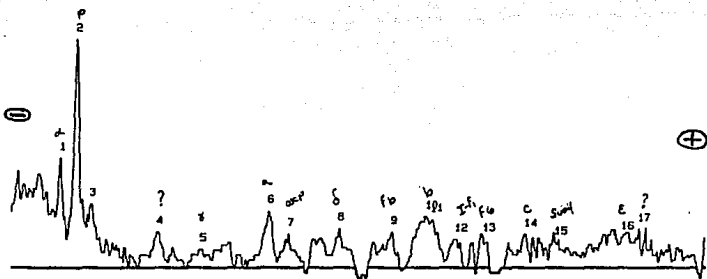


Figura 23. Barrido densitométrico del complejo  $F_0F_1$ -I obtenido por el programa Ultra Gel Scan.

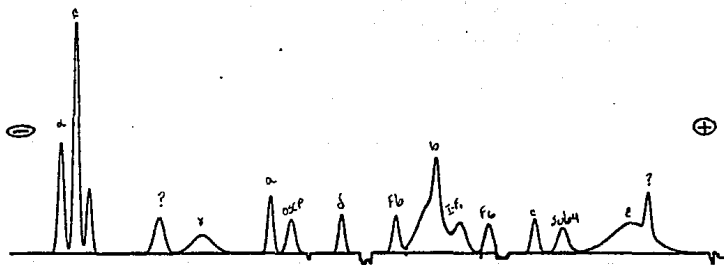


Figura 24. Cálculo de curvas gaussianas para el barrido densitométrico del complejo  $F_0F_1-I$ .

### iii. INMUNODETECCION DE I-F<sub>1</sub> EN EL COMPLEJO F<sub>0</sub>F<sub>1-1</sub>

Se verificó la presencia de la proteína inhibidora en el complejo aislado por medio de anticuerpos policlonales contra este polipéptido, y haciendo uso de la técnica de inmunotransferencia tipo Wertern. En las preparaciones de F<sub>1</sub> (103) y de F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> (104), no se encuentra presente la proteína inhibidora, lo que concuerda con las características que posee cada una de estas preparaciones. Por el contrario, en el complejo F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-proteína inhibidora existe una banda que corresponde la presencia del péptido inhibidor en la preparación. Este resultado apoya contundentemente las características que posee la preparación aquí descrita (Figura 25).



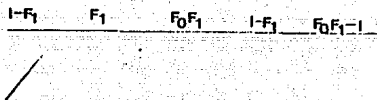


Figura 25. Inmunodetección del I-F<sub>1</sub>, en los complejos F<sub>1</sub>, F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>, F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-I e I-F<sub>1</sub>. Se utilizaron anticuerpos anti IF<sub>1</sub>, en un análisis tipo Wertern blot, a una dilución de 1:5,000.

#### iv. CARACTERIZACION DE LAS PROPIEDADES CINETICAS DEL COMPLEJO $F_0F_1$ -I.

A pesar de que la ATP-sintasa es una enzima que presenta una cinética cooperativa a muy bajas concentraciones de sustrato, presenta también cinéticas de tipo michaeliano (hipérbolas rectangulares), lo cual indica una saturación por el sustrato. Una vez estandarizada la preparación y, que se habían determinado algunos de sus parámetros funcionales, se procedió a investigar sus propiedades cinéticas, su velocidad máxima de hidrólisis del complejo Mg-ATP ( $V_{max}$ ), y su constante de afinidad por su sustrato Mg-ATP ( $K_m$ ). La presencia de la proteína inhibidora podría afectar el mecanismo cinético en la reacción de hidrólisis de ATP.

El experimento se realizó cuantificando la velocidad de hidrólisis de Mg-ATP, en presencia de concentraciones crecientes del mismo en una relación de 1:1, por medio del método de Fiske-SubbaRow para conocer la cantidad de  $P_i$  liberado por la reacción. Estos datos se obtuvieron para velocidades iniciales, lo que quiere decir que no se ha consumido más del 10% de la cantidad del total de sustrato presente en el ensayo.

En la Figura 26, se muestra que la preparación describe un comportamiento michaeliano clásico, es decir tiene una saturación por su sustrato.

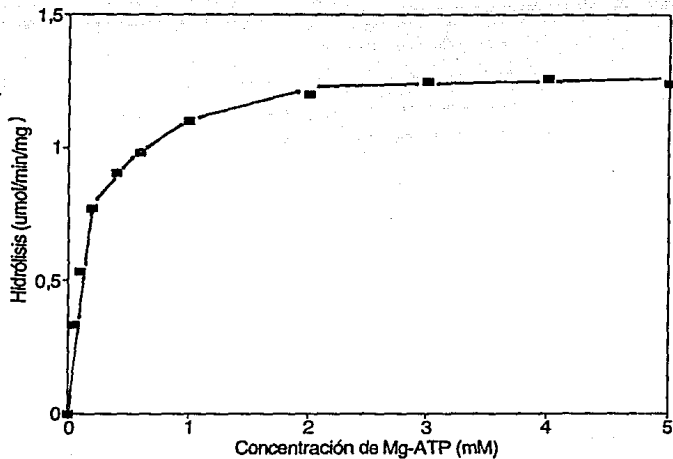


Figura 26. Efecto de concentraciones crecientes de Mg-ATP (1:1), en la hidrólisis por el complejo  $F_0F_1$ -proteína inhibidora.

Los datos fueron analizados siguiendo la metodología de

Lineweaver-Burk (1/velocidad de hidrólisis vs 1/concentración de Mg-ATP). A partir de este regráfico, se obtienen los valores para la  $K_m$  y la  $V_{max}$  de la preparación. La  $K_m$  obtenida fue de  $148 \mu M$  y la  $V_{max}$  de  $1.28 \mu mol \text{ Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  (Figura 27).

Dentro del mecanismo cinético de la enzima se ha reportado un efecto inhibitorio del magnesio libre sobre la hidrólisis del ATP (123). Este efecto se verificó en la preparación cuantificando la hidrólisis de Mg-ATP (1:1) en velocidades iniciales más concentraciones crecientes del catión, y se obtuvo inhibición por magnesio libre a partir de una concentración de  $5 \text{ mM}$ .

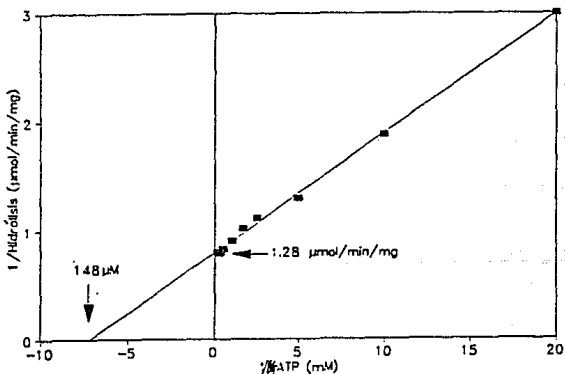


Figura 27. Regráfico de Lineweaver-Burk para la hidrólisis de Mg-ATP (1:1) por el complejo  $F_0F_1-I$ ,  $r=0.998$ .

Una vez que se tenía una descripción amplia de las características del complejo, surgió la pregunta de ¿Contra qué

caracterización de ATP-sintasa se deben comparar las propiedades encontradas en la preparación descrita hasta el momento?

Debido a que las características que se habían encontrado en la preparación tienen que ver con la presencia de la proteína inhibidora y su función dentro de la enzima, una posibilidad adicional es comparar con la preparación de  $F_0F_1$ . Por ello se procedió a efectuar el montaje de la técnica propuesta por Dreyfus y col. (104), para realizar los experimentos bajo los cuales se habían estudiado los diferentes parámetros en el complejo  $F_0F_1$ -I.

#### B. CARACTERISTICAS DEL COMPLEJO $F_0F_1$ .

La primera característica estudiada en este complejo fue su actividad hidrolítica. Ello se realizó por medio del método de Fiske-SubbaRow para cuantificar el Pi liberado por la hidrólisis del ATP, y resultó de alrededor de  $4 \mu\text{mol Pi min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ . Este valor concuerda con la actividad hidrolítica reportada en el trabajo original (104).

También se realizó la cuantificación de la sensibilidad a los inhibidores clásicos. Para la oligomicina se obtuvo una inhibición entre 80 y 90%, y para el DCCD resultó ser de entre 80 y 90 % de inhibición. Estos datos concuerdan también con lo reportado en el

trabajo original (104 y 123).

La siguiente prueba a la que se sometió esta preparación fue el efecto de la temperatura en la actividad de hidrólisis de ATP bajo las mismas condiciones experimentales en que se realiza para el complejo  $F_1-I$  o el complejo  $F_0F_1-I$ . Simultáneamente se verificó el efecto del pH en este proceso. En la Figura 28 se puede observar que no hay ningún efecto de estimulación en la actividad de hidrólisis de ATP en esta preparación; y que por el contrario, la actividad disminuye conforme pasa el tiempo. Destacando que el pH alcalino (8.0) permite una protección temporal de la hidrólisis, mientras que un pH ácido (6.8) lleva a una desaparición de la actividad casi inmediatamente. El pH óptimo para la hidrólisis del ATP de este complejo  $F_0F_1$ , es de aproximadamente 7.5 a 30°C.

Se determinó también el efecto del aumento de la fuerza iónica del medio en la actividad de hidrólisis del ATP por el complejo  $F_0F_1$ . Este experimento se realizó preincubando la preparación durante 5 minutos, en presencia de concentraciones crecientes de KCl, y siguiendo posteriormente la reacción de hidrólisis por el método de Fiske-SubbàRow para cuantificar el Pi liberado (Figura 29). Se encontró que concentraciones hasta 60 mM de cloruro de potasio no tienen efecto sobre la hidrólisis de ATP.

Una vez caracterizados los parámetros anteriores, se procedió al análisis del comportamiento cinético de la preparación  $F_0F_1$ ; este experimento se realizó debido a que en el trabajo original (123), las condiciones bajo las cuales se llevó a cabo el estudio de este comportamiento, son diferentes, en el medio de reacción no hay

sistema regenerador de ATP. La presencia ADP y Pi en el medio de reacción tiene efectos activadores o inhibidores en la relación hidrólisis/recambio del complejo  $F_0F_1$  (123).

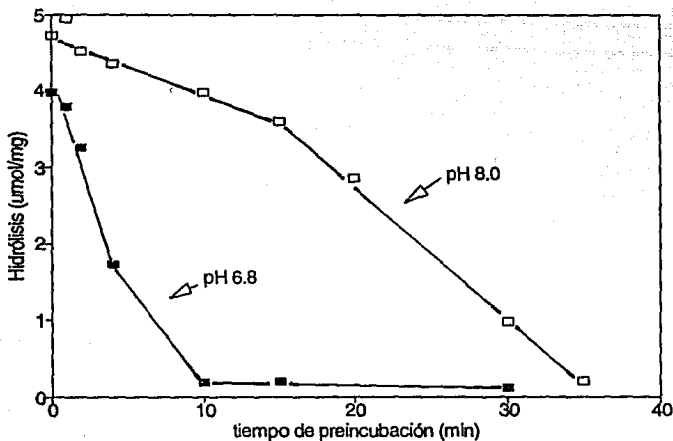


Figura 28. Efecto del pH en la hidrólisis de ATP por el complejo  $F_0F_1$ , a  $60^\circ\text{C}$ .

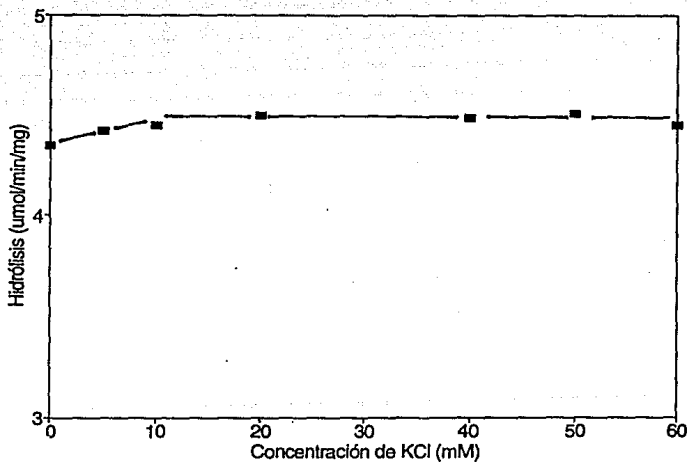


Figura 29. Efecto del aumento de la fuerza iónica por concentraciones crecientes de KCl en la hidrólisis de ATP por el complejo  $F_0F_1$ . El experimento se realizó a 30°C, preincubando a la enzima con KCl durante 5 minutos.



## 1. CARACTERISTICAS CINETICAS DEL COMPLEJO $F_0F_1$

Se investigaron las siguientes características cinéticas: (a) la velocidad máxima de hidrólisis del Mg-ATP ( $V_{max}$ ); y (b) la constante de afinidad por su sustrato ( $K_m$ ). El experimento se realizó cuantificando la hidrólisis del ATP en presencia de concentraciones crecientes de Mg-ATP (1:1), para velocidades iniciales. En la Figura 30, se muestra la curva descrita al graficar hidrólisis de ATP vs Concentración de Mg-ATP (1:1).

Realizando los regráficos de Lineweaver-Burk ( $1/\text{velocidad}$  de hidrólisis vs  $1/\text{concentración}$  de ATP) se obtuvo una línea recta con un coeficiente  $r = 0.989$ . A partir de este regráfico, se obtuvieron los valores para la  $K_m$  y la  $V_{max}$  de la preparación. La  $K_m$  resultó ser de  $142 \mu\text{M}$  y la  $V_{max}$  de  $3.87 \mu\text{mol Pi min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  (Figura 31).

Se verificó el efecto del magnesio libre de la siguiente manera: cuantificación de la hidrólisis de Mg-ATP (1:1) en velocidades iniciales, en presencia de concentraciones crecientes del catión, y se obtuvo un efecto inhibitorio por magnesio libre a partir de una concentración de 5 mM.

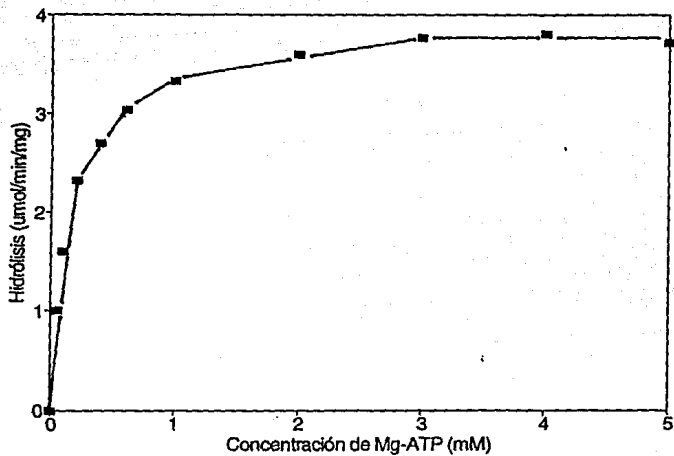


Figura 30. Efecto de concentraciones crecientes de Mg-ATP (1:1) en la hidrólisis por el complejo  $F_0F_1$ .

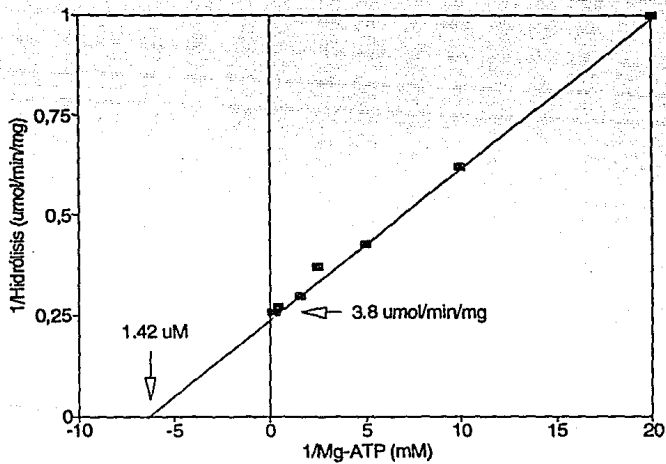


Figura 31. Regráfico de  $1/\text{hidrólisis}$  vs  $1/\text{concentración de Mg-ATP}$  (1:1),  $r = 0.989$ .

## ii. COMPOSICION POLIPEPTIDICA.

Para estudiar la composición polipeptídica del complejo  $F_0F_1$ , se efectuó una electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (16%) en presencia de SDS (Figura 22).

Se recurrió a un análisis por medio de un barrido densitométrico. La preparación está compuesta de 15 bandas, dentro de las cuales se pueden homologar los pesos moleculares aproximados de las subunidades obtenidas por este método con los calculados para ellas en otros trabajos, anteriormente descritos (ver la sección: las subunidades de la ATP-sintasa) (Figura 32).

También esta preparación se sometió a una inmunoréplica tipo Western, y se inmunodecoró con anticuerpos policlonales contra el polipéptido inhibidor. Como se observa en la Figura 25, la proteína inhibidora no está presente en esta preparación.

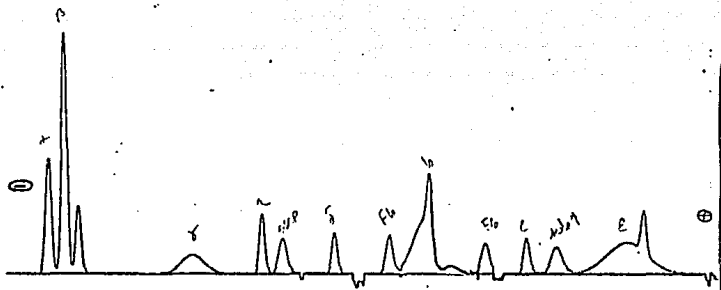


Figura 32. Cálculo de curvas gaussianas para el barrido densitométrico del complejo  $F_0F_1$ .

## X. DISCUSION.

La remoción de la proteína inhibidora de la ATP-sintasa ha sido estudiada en sistemas solubles y en partículas submitocondriales, pero como se mencionó anteriormente se carece de un método que permita aislar al complejo V mitocondrial de manera unitaria, es decir, que se encuentre en cuanto a su composición polipeptídica, como en el estado fisiológico.

Al realizar experimentos en los que intervienen dos de los factores que estimulan la hidrólisis del ATP en presencia de la proteína inhibidora, como el pH y la temperatura (60°C), se observa un efecto muy interesante; al estimular al complejo  $F_0F_1$ -I con temperatura (60°C) en un amortiguador a pH 9.0, que aquel en el que se observa a la mayor velocidad de hidrólisis a 30°C, al principio hay un incremento acelerado de esta velocidad, pero conforme pasó el tiempo de la incubación, la actividad decrece rápidamente (Figura 21). Ello podría sugerir lo siguiente: la interacción de la proteína inhibidora con la subunidad B' se ve debilitada en presencia de un pH alcalino, lo cual favorece el incremento de la velocidad de hidrólisis. Al mismo tiempo la temperatura favorece la remoción de la proteína inhibidora. Estos efectos pueden estar actuando acumulativamente, y tal vez retiren al inhibidor definitivamente de su interacción con la subunidad B', ocasionando que ocurra un fenómeno de disgregación de las subunidades o de pérdida de la estructura terciaria por el efecto

de la suma de la temperatura y el pH, hay que recordar que la mayoría de las enzimas son termolábiles. Aquí es importante destacar que la estimulación de la hidrólisis del ATP, tanto por el pH como por la temperatura, se dá exclusivamente por la presencia de la proteína inhibidora.

Se sabe que en partículas submitocondriales la relación entre el  $IF_1$  con la  $F_1$ , es regulada por el estado de energización de las mismas (117 y 118). Estudios equivalentes realizados en cloroplasto sugieren que mediante iluminación y en presencia de un agente reductor, la interacción del inhibidor con  $CF_1$ , es debilitada, y en ese momento aparece la hidrólisis del ATP. (119). Se ha reportado además que el estado de energización del sistema, dado por una variedad de agentes químicos utilizados en la incubación de psm (por ejemplo succinato o NADH), puede inducir la remoción de la proteína inhibidora (120 y 121). Se ha demostrado también que el efecto inhibitorio del  $IF_1$  en la hidrólisis de ATP del complejo V mitocondrial es revertido por la incubación a un pH mayor que 7.0.

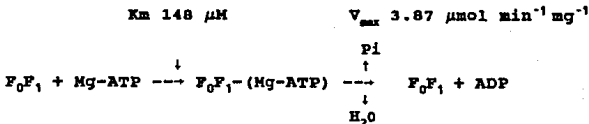
El propósito de este trabajo está encaminado a conocer más aún sobre las interacciones de la proteína inhibidora y el complejo  $F_0F_1$ , pero en un sistema aislado, libre de otras proteínas, contrariamente a lo que ocurre en sistemas de psm, así como también aportar más datos sobre las propiedades catalíticas debidas a la presencia de este péptido en el complejo  $F_0F_1$ .

Un hecho que es de especial interés es que la constante de afinidad (Km) de la preparación  $F_0F_1$ , y la de  $F_0F_1-I$ , por el sustrato Mg-ATP, es la misma, lo que indica que la presencia de la proteína

inhibidora en la preparación no modifica la afinidad por el sustrato de la reacción de hidrólisis del ATP, y su efecto es precisamente la disminución de la velocidad con la que se lleva a cabo esta reacción. Este fenómeno puede ser explicado del todo si se considera que el ADP resultante de la reacción de hidrólisis del ATP se queda detenido durante un cierto número de ciclos catalíticos en la enzima, lo que se ve reflejado en la velocidad con que el complejo hidroliza al ATP. Existe un número considerable de trabajos que apoyan esta idea (cf. 20, 75, 78, 83 y 124), uno de los más reciente es el de Martins y col. 1992 (124) en el cual se cuantificó el número de nucleótidos adheridos al complejo V mitocondrial en psm despues de llevar a cabo la hidrólisis de los mismos. El experimento se realizó por medio de la cuantificación de la hidrólisis de  $[\alpha^{32}\text{P}]\text{ATP}$  y  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ . En el caso de la hidrólisis del ATP marcado en el fosfato  $\gamma$  el resultado consistió en un decremento de la radioactividad unida a las psm y un aumento de la radioactividad en el medio de reacción. Pero por el contrario al hidrolizar el ATP marcado en el fosfato  $\alpha$ , la radioactividad permanece unida a las psm, lo que indica que uno de los producto de la reacción, es decir el ADP radioactivo queda detenido en la ATP-sintasa, mientras que el otro producto ( $\text{P}_i$ ) es liberado al medio sin marca radioactiva. Esta situación se puede esquematizar en la Figura 33.



Para el complejo  $F_0F_1$ :



Para el complejo  $F_0F_1-I$ :

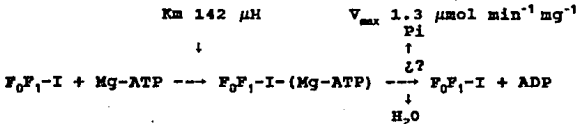


Figura 33. Posible explicación de la función de la proteína inhibidora en el sentido de la hidrólisis del ATP por el complejo  $F_0F_1-I$ , en donde  $\zeta?$  significa el número de ciclos catalíticos que tarda la enzima en liberar al producto de la reacción de la hidrólisis del ATP, el ADP.

## XI. CONCLUSIONES.

A partir del trabajo realizado se pueden concluir los siguientes puntos de interés, enmarcados dentro de dos grupos distintos. Uno de ellos se refiere a las características del complejo que contiene a la proteína inhibidora, y el otro a las características cinéticas de la preparación  $F_0F_1$ -Proteína inhibidora, comparadas con las obtenidas para el complejo  $F_0F_1$ .

Se encontró un método para aislar un complejo  $F_0F_1$ -I funcional de mitocondrias de corazón de bovino, con alto rendimiento en proteína y un grado de pureza bastante elevado. Considerando que alrededor del 10 % de la proteína que constituye a la membrana interna mitocondrial es el complejo ATP-sintasa, la eficiencia en el rendimiento de esta preparación es considerablemente elevada (6% del complejo final). Este complejo trabaja de acuerdo a lo reportado para cada una de las preparaciones a partir de las cuales se derivó; es decir, tiene actividad hidrolítica basal del ATP, que es de aproximadamente el 1 % de la actividad hidrolítica para una preparación de  $F_1$  soluble, y que concuerda con lo reportado para la preparación de  $F_1$ -I. Presenta un alto grado de inhibición por los inhibidores clásicos para una ATPasa de tipo F (entre 80 y 90% para DCCD y entre 85 y 95% para oligomicina), lo que indica que la subunidad c se encuentra presente y funcional. De igual manera, se puede inferir la presencia en el sector del cuello de la subunidad OSCP funcional. Lo más innovador de la preparación reportada en

este trabajo es la presencia de la proteína inhibidora funcional, por lo que la mayoría de los experimentos se enfocan a las características de esta preparación.

Una característica esencial para describir al complejo  $F_0F_1$ -I es la estimulación de la hidrólisis de ATP por la incubación a 60°C. Este hecho sugiere que la presencia de la proteína inhibidora afecta la velocidad de hidrólisis del ATP, pues al aumentar la temperatura la interacción entre la subunidad B' y la proteína inhibidora disminuye, y ello permite que la velocidad con que la enzima cataliza la reacción de hidrólisis de ATP se lleve a niveles más altos que los que presenta en un ensayo a 30°C y por la influencia directa del péptido inhibidor.

Algo muy semejante a lo anterior ocurre cuando se aumenta la fuerza iónica del medio de reacción al estarse llevando al cabo el proceso de hidrólisis de ATP por el complejo  $F_0F_1$ -I. Al aumentar la concentración de sales (KCl), se modifica la interacción entre la subunidad B' y la proteína inhibidora lo cual lleva a un incremento en la velocidad de hidrólisis de ATP. Este resultado concuerda con el reporte para la  $F_1$ -I, y también con la concentración a la cual se obtiene la mayor velocidad de hidrólisis, que es alrededor de 55 mM (74).

Para tratar de entender mejor aun la interacción de la proteína inhibidora con la  $F_1$ , se realizaron pruebas de cuantificación de hidrólisis de ATP en presencia de amortiguador a diferentes pH. Estos experimentos revelaron un hecho ya conocido para la  $F_1$ -I: un pH alcalino permite velocidades de hidrólisis

elevadas, lo cual sugiere que la interacción de la proteína inhibidora con la subunidad B' es del tipo álcali-lábil. Ello indica que los aminoácidos que intervienen en la interacción de ambas proteínas o de alguna de las dos (por ejemplo la porción carboxilo terminal de la subunidad B', o bien al analizar la secuencia de aminoácidos de la proteína inhibidora, se obtiene un alto porcentaje de aminoácidos cargados positivamente), son ácidos y al encontrarse inmersos en un ambiente básico se neutralizan y la interacción entre las proteínas se debilita, hecho que se ve reflejado en el aumento de la velocidad de hidrólisis del ATP. Lo anterior sugiere que las interacciones entre las dos proteínas están dadas por medio de fuerzas electrostáticas. Esto es dentro de un cierto intervalo de pH, porque si éste se aumenta en varias unidades, el efecto es el contrario; la velocidad de hidrólisis decrece rápidamente, efecto que se debe a la pérdida de la estructura terciaria, pues pH extremos desnaturalizan a las enzimas. El pH para el cual se encontró una velocidad de hidrólisis mayor fue de 9.0, lo cual concuerda con lo reportado para el complejo  $F_1-I$  (93).

En cuanto a la composición polipeptídica del complejo  $F_0F_1-I$ , se encontró un patrón semejante al reportado para las subunidades de  $F_0$ , cuello y  $F_1$ , más la proteína inhibidora. Comparando los pesos moleculares reportados para cada una de las subunidades de la enzima por secuencia, con los obtenidos de las integrales del barrido densitométrico y las curvas gaussianas, se observó un enorme parecido entre ellos. Es decir se dispone de una

preparación que contiene todas las subunidades que se han reportado para el complejo V mitocondrial, aunque esto sólo se podría confirmar si se contara con anticuerpos que reconozcan por separado a cada una de las subunidades reportadas.

En cuanto a la composición polipeptídica no se sabe todavía con certeza las subunidades que la forman, pero existe un consenso en lo que se refiere a las subunidades anteriormente reportadas. Existen preparaciones que junto con el complejo buscado, llevan alguna proteína adicional como contaminante. Por ejemplo esto ocurrió en el caso del complejo  $F_0F_1$ , reportado por Serrano y col. (116), que lleva consigo al acarreador de aniones. En la preparación aquí descrita existe una banda consistente en las diferentes preparaciones del complejo  $F_0F_1-I$  que migra entre la subunidad B y la subunidad  $\gamma$ , pero no se ha podido caracterizar su origen.

Las características cinéticas del complejo obtenidas a partir de experimentos en los cuales se buscó la velocidad de saturación de la enzima con su sustrato describen un comportamiento michaeliano clásico. Se encontró la velocidad máxima y la Km para el sustrato el Mg-ATP.

Los resultados obtenidos hasta este momento permiten conocer algunos de los parámetros importantes de la preparación, los cuales sirven para darle una caracterización parcial y para buscar semejanzas con las funciones del complejo  $F_1-I$ . El complejo aquí descrito posee, con diferencia en magnitud, todas las propiedades que presenta la preparación de  $F_1-I$ , ¿pero qué tanto se parecía o

diferenciaba del complejo  $F_0F_1$ ? Para responder a esta pregunta se realizaron pruebas para encontrar las características que unificaran o separaran a ambos complejos.

Las características que se sabía que ambos complejos tenían en común era la actividad hidrolítica, con diferencias en magnitud y la sensibilidad a los inhibidores clásicos. Se buscó entonces las características del complejo  $F_0F_1-I$  en el complejo  $F_0F_1$ , o viceversa, pues la mayoría de las características del nuevo complejo se deben a la presencia de la proteína inhibidora.

Es importante hacer notar que la sola presencia de la proteína inhibidora en la preparación le da características distintivas a cualquier complejo  $F_0F_1$ , reportado en la literatura. El efecto de la temperatura sobre la velocidad de hidrólisis sólo tiene una estimulación cuando la proteína inhibidora está presente. En el complejo sin proteína inhibidora, el efecto es el contrario, ya que hay una disminución de la velocidad de hidrólisis conforme pasa el tiempo de preincubación, y la velocidad con que decrece la actividad de hidrólisis es función del pH. Este proceso ocurre más lentamente a un pH básico.

El aumento de la fuerza iónica del medio de reacción para la hidrólisis de ATP por el complejo  $F_0F_1$ , no afecta la velocidad de la misma a ninguna de las concentraciones para las cuales se probó en el complejo  $F_0F_1-I$ , en el cual si hay un efecto de estimulación.

Una de las características más importantes que se determinó en ambas preparaciones se refiere al mecanismo cinético. Al realizar experimentos para conocer los parámetros cinéticos de las

preparaciones se encontró un dato que apoya la teoría que existe para la función de la proteína inhibidora en la ATP-sintasa (20, 75, 76, 83 y 124): su posible función es la de retener la salida del ADP resultante de la hidrólisis del ATP, y conviene recordar que la función fisiológica de la enzima es en el sentido de la síntesis de ATP. Esto está apoyado en el resultado del cálculo de la  $K_m$ , la constante de afinidad por el sustrato, pues no varía o lo hace no significativamente en ambas preparaciones.

Otro dato interesante en cuanto a las diferencias entre el complejo  $F_0F_1$ -I y el complejo  $F_0F_1$ , es evidenciada en la composición polipeptídica. Al realizar electroforesis en gels desnaturalizantes de poliacrilamida en presencia de SDS o inmunodetección de la proteína inhibidora por anticuerpos policlonales contra éste péptido, y sólo se encontró en el complejo aquí reportado.

En la Tabla 7 se muestran comparativamente las características obtenidas para los complejo  $F_0F_1$ -I y  $F_0F_1$ .

Característica:	$F_0F_1-I$	$F_0F_1$
Actividad ( $\mu\text{molmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$ )	1.2	4
Sensibilidad a Oligomicina	85-95 %	80-90 %
Sensibilidad al DCCD	80-90 %	80-90 %
Rendimiento en proteína	6 %	8 %
Estimulación por Temperatura ( $\mu\text{molmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$ )	Hasta 10	No hay efecto
Estimulación por KCl ( $\mu\text{molmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$ )	Hasta 4	No hay efecto
Parámetros Cinéticos para el ATP	$V_{\text{max}} = 1.3$ ; $K_m = 148\mu\text{M}$	$V_{\text{max}} = 3.87$ ; $K_m = 142\mu\text{M}$
Efecto del Magnesio	Inhibe a Altas Concentraciones	Inhibe a Altas Concentraciones
Efecto del pH en la Estimulación por Temperatura	pH Acido Permite una Mejor Estimulación	La Actividad Decrece más rápidamente con pH Acido.

Tabla 7: Comparación de las características funcionales de los complejos  $F_0F_1$  y  $F_0F_1-I$ .



## XII. PERSPECTIVAS.

Para avalar la teoría de la función de la proteína inhibidora apoyada por este trabajo, es necesario cuantificar los nucleótidos de adenina presentes en la enzima cuando esta está hidrolizando al ATP. Esto se puede lograr ya sea por la utilización de nucleótidos marcados isotópicamente, o mediante la reacción de luciferín-luciferaza. El conocimiento de las cantidades de estos compuestos, así como el tiempo que perduren dentro de los sitios catalíticos de la enzima o bién el número de ciclos catalíticos que tarden en ser desalojados de la enzima, puede generar resultados que concluyan definitivamente que ésta es la función de la proteína inhibidora en el sentido de la hidrólisis del ATP.

Se ha reportado en la literatura que la composición de los lípidos que estén interactuando con la ATP-sintasa pueden ayudar a mejorar sus características catalíticas en el sentido de la hidrólisis del ATP (125 y 126). Por ello, será interesante conocer cómo contribuyen los lípidos en las características de la preparación descrita en éste trabajo. Para ello se podrían realizar purificaciones que contengan una cantidad de lípidos baja, necesaria solamente para dar las condiciones hidrofóbicas para que se mantenga funcional el canal de protones, y probando también diferentes lípidos y diferentes composiciones de ellos en la solución que contenga a la enzima, tratando de regresarla al estado en el cual se encontraba en la membrana interna mitocondrial.

La parte más interesante de este trabajo estará enfocada, ahora que se dispone del complejo  $F_0F_1$ -I aislado y funcional, hacia la síntesis del ATP, la cual se puede comprobar por medio de la reacción de recambio de  $ATP-^{32}P$ , que se realiza después de reconstituir a la enzima en un liposoma. Este experimento se ha intentado en repetidas ocasiones y bajo diferentes condiciones, pero no se ha podido reconstituir la actividad de hidrólisis después del tratamiento de la diálisis. En un futuro se intentarán experimentos de reconstitución por medio de otras metodologías para tratar de obtener los proteoliposomas que contengan al complejo funcional en ambos sentidos: hidrólisis de ATP y recambio  $ATP-^{32}P$ .

Estos experimentos permitirán obtener una serie de resultados muy interesantes, los cuales generarán datos relevantes sobre las propiedades estructura-función del complejo V mitocondrial.

## XII. REFERENCIAS

- 1.- Nichols, D. G. Bioenergetics. Academic Press. 1982, 1-24 p.
- 2.- Harold, F. M. The Vital Force: A Study of Bioenergetics. W. H. Freeman. 1987. 577 pp.
- 3.- Skulachev, V. P. 1988. Membrane Bioenergetics. Springer Verlag. Germany: 1-18 y 157-186
- 4.- Vázquez-Laslop, N. C. y Dreyfus, G. 1989. Ciencia. 40: 147-155.
- 5.- Mitchell, P. 1961. Nature. 191: 144-148.
- 6.- Skulachev, V., P. 1984. Trends. Biochem. Sci. April 182-185.
- 7.- Dharmavaran, R., M. and Konisky, J. 1989. J. Biol. Chem. 264: 14085-14089.
- 8.- Moriyama, Y. and Nelson, N. 1988. J. Biol. Chem. 263: 8521-8527.
- 9.- Südhof, T., C., Fried, V., A., Stone, D., K., Johnston, P., A., and Xie, X., S. 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 6067-6071.
- 10.- Manolson, M., F., Rea, P., A., and Poole, R., J. 1985. J. Biol. Chem. 260: 12273-12279.
- 11.- González, H., D. 1990. Ciencia. 41: 133-152.
- 12.- Hatefi, Y. 1985. Annu. Rev. Biochem. 54: 1015-1069.
- 13.- Nelson, N. and Taiz, L. 1989. Trends Biochem. Sci. 14: 113-116.
- 14.- Gogarten, J. P., Kibak, H. Dittrich, P., Taiz, L., Bowman, E., J., Bowman, B., J., Manolson, M., F., Poole, R., J., Date, T., Oshima, T., Konishi, J., Denda, T. and Yoshida, M. 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 6661-6665.
- 15.- Senior, A., E. 1988. Physiol. Rev. 68: 177-231.
- 16.- Gogol, E., P., Lücken, U. and Capaldi, R., A. 1987. FEBS Lett. 219: 274-278.

- 17.- Senior, A., E. and Wise, J., G. 1983. *J. Membr. Biol.* 73: 105-124.
- 18.- Walker, E., J., Lutter, R., Dupuis, A. and Runswick, J. 1991. *Biochemistry.* 30: 5369-5378.
- 19.- Feinstein D., L. and Moudrianakis, E., N. 1984. *J. Biol. Chem.* 259: 4230-4236.
- 20.- Binder, A., Jagendorf, A. and Ngo, E. 1978. *J. Biol. Chem.* 253: 3094-3100.
- 21.- Futai, M., Noumi, T., Miki, J., and Maeda, M. 1987. *Chemica Scripta* 27B, en "Membrane Proteins: Structure, Function, Assembly. J. Rydstrom (ed.) The Royal Swedish Academy of Sciences. Cambridge University Press 89-96.
- 22.- Futai, M., Noumi, T. and Maeda, M. 1989. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 111-136.
- 23.- Futai, M. and Kanazawa, H. 1983. *Micobiol. Rev.* 47: 285-312.
- 24.- Pfanner, N. and Neupert, W. 1990. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 331-3353.
- 25.- Schleyer, M. and Neupert, W. 1985. *Cell.* 43: 339-350.
- 26.- Hurt, C., E., Pesol-Hurt, B., Suda, K., Oppliger, W. and Scatz, G. 1985. *EMBO J.* 4: 2061-2068.
- 27.- Dyer, M., R., Gay, N., J., and Walker, J., E. 1989. *Biochem J.* 260: 249-258.
- 28.- Schneider, E., and Altendorf, K. 1987. *Microbiol. Rev.* 51: 477-497.
- 29.- Foster, D., L. and Fillingame, R., H. 1982. *J Biol. Chem.* 257: 2009-2015.
- 30.- Sebald, W. and Hoppe, J. 1981. *Curr. Top. Bioenerg.* 12: 1-64.
- 31.- Walker, J., E., Sarastre, M. and Gay, N., J. 1984. *Biochim. Biophys. Acta* 768: 164-200
- 32.- Grinkevich, V., Aldanova, N., Kostetsky, P., Trubetskaya, O., Modyanov, N., Hundal, T. and Ernster, L. 1984. p 155-162 en *H<sup>+</sup>-ATPase (ATPsynthase); Structure, Function, Biogenesis. The F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> Complex of Coupling Membranes.* S. Papa, K., Altendorf, L. and Parker, L. (ed.). ICSU Press, Adriatica Editrice, Bari, Italy.

- 33.- Dupuis, A., Lunardi, J. Issartel, J., P. and Vignais, P., V. 1985. *Biochemistry* 24: 734-739.
- 34.- Dupuis, A. and Vignais, P., V. 1897. *Biochemistry* 26: 410-418.
- 35.- Vadienau, A., Berden, J., A. and Slater, E., C. 1976. *Biochim, Biophys. Acta* 501: 424-439.
- 36.- Joshi, S., and Pringle, M., J. 1989. *J. Biol. Chem.* 264: 15548-15551.
- 37.- Liang, A., M. and Fisher, R., L. 1983. *J. Biol. Chem.* 258: 4784-4788.
- 38.- Huang, Y., Kantham, L. and Sanady, D., R. 1987. *J. Biol. Chem.* 262: 3007-3010.
- 39.- Sanadi, D., R. 1982. *Biochim. Biophys. Acta* 683: 39-56.
- 40.- Nagle, J., F. and Tristram-Nagle, S. 1983. *J. Membr. Biol.* 74: 1-14.
- 41.- Cox, G., B., Fimmel, A., L., Gibson, F. and Hatch, L. 1986. *Biochim. Biophys. Acta* 849: 62-69.
- 42.- Dunn, S., D. and Futai, M. 1980. *J. Biol. Chem.* 255: 113-118.
- 43.- Harris, D., A., Boork, J. and Baltscheffsky, M. 1985. *Biochemistry* 24: 3876-3883.
- 44.- Cross, R., L. 1988. *J. Bioener. Biomembr.* 20: 295-405.
- 45.- Pedersen, P., L. and Carfoli, E. 1987. *Trends Biochem. Sci.* 12: 186-189.
- 46.- Dunn. S., D. 1980. *J. Biol. Chem.* 255: 11857-11860.
- 47.- Williams, N., Nullihen, J., M. and Pedersen, P., L. 1987. *Biochemistry* 26: 162-169.
- 48.- Futai, M., kanasawa, H., Takeda, T. and Kagawa, Y. 1980. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96: 227-234.
- 49.- Noumi, T., Futai, M. and Kanasawa, H. 1984. *J. Biol. Chem.* 259: 10076-10079.
- 50.- Nelson N. and Cidon, S. 1984. *J. Bioenerg. Biomemb.* 16: 11-36.
- 51.- Senior, A., E. 1985. *Curr. Top. Bioenerg.* 23: 135-151.

- 52.- Kanasawa, H., Noumi, T., Futai, M. and Nitta, T. 1983. Arch. Biochem. Biophys. 223: 521-532.
- 53.- Gogol, E., P., Aggeler, R., Sagermann, M and Capaldi., R., A. 1989. Biochemistry 28: 4717-4724.
- 54.- Kagawa, Y. and Nukiwa, N. 1981. Biochim. Biophys. Res. Commun. 100: 1370-1376.
- 55.- Enns, K. and Criddle, R., S. 1977. Arch. Biochem. Biophys. 183: 742-752.
- 56.- Kimura, T., Nakamura, K., Kajiura, H., Hattori, H., Nelson, N. and Asahi, T. 1989. J. Biol. Chem. 264: 3183-3186.
- 57.- Futai, M. 1977. Biochim. Biophys. Res. Commun. 79: 1231-1237.
- 58.- Walker, J., E., Fearnley, I., M., Gay, N., J., Gibson, B., W., Nothrop, F., D., Powell, S., J., Runswick, M., J., Sarastre, M. and Tybulewicz, V., L., J. 1985. J. Mol. Biol. 184: 677-701.
- 59.- Yoshida, Y., Wakabayashi, S. Matsubara, H., Hashimoto, T. and Tagawa, K. 1984. FEBS Lett. 170: 135-138.
- 60.- Dreyfus, G. and Sartre, M. 1984. Arch. Biochem. Biophys. 229: 212-219.
- 61.- Amzel, L., M., Mckinney, M., Natanahan, P. and Pedersen, P., L. 1982. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 5582-5586.
- 62.- Boekema, E., J., Berden, J., A. and van Heel, M., G. 1986 Biochim. Biophys. Acta 851: 353-360.
- 63.- Gogol, E., Lücken, U., Bork, T. and Capaldi, R., A. 1989. Biochemistry 28: 4709-4716.
- 64.- Schneider, E. and Altendorf, K., H. 1985. EMBO J. 4: 515-518.
- 65.- Gavilanez-Ruiz, M., Tommasino, M. and Capaldi, R., A. 1988. Biochemistry 27: 603-609.
- 66.- Williams, N., Nullihen, J., M. and Pedersen, P., L. 1984. Biochemistry. 21: 780-785.
- 67.- Stan-Lotter, H. and Bragg, P., D. 1986 Eur. J. Biochem. 154: 321-327.
- 68.- Kironde, F. and Cross, R., L. 1987. J. Biol. Chem. 262: 3488-3495.

- 69.- Grubmeyer, C., Cross, R. L. and Penefsky, H., S. 1982. *J. Biol. Chem.* 257: 12092-12100.
- 70.- Gómez-Puyou, A., Tuena de Gómez-Puyou, M. and de Meis, L. 1986. *Eur. J. Biochem.* 159: 133-140.
- 71.- Cross, R. L., 1988. *J. Bioenerg. Biomemb.* 20: 295-405.
- 72.- Frangione, B., Rosenwasser, E. Penefsky, H., S. and Pullman, M., E. 1981. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 7403-7407.
- 73.- Brooks, J., C. and Senior, A., E. 1971. *Arch. Biochem. Biophys.* 147: 467-470.
- 74.- Pullman, M., E. and Monroy, G., C. 1963 *J. Biol. Chem.* 238: 3762-3769.
- 75.- Tuena de Gómez-Puyou, M., Dreyfus, G., Muller, U., Ayala, G. and Gómez-Puyou, A. 1983. *J. Biol. Chem.* 258: 13680-13684.
- 76.- Beltrán, C., Tuena de Gómez-Puyou, M., Darszon, A. and Gómez-Puyou, A. 1986. *Eur. J. Biochem.* 160: 163-168.
- 77.- Klein, G., Satre, M., Dianoux, A., C. and Vignais, P., V. 1980. *Biochemistry* 19: 2919-2925.
- 78.- Wong, S. Y., Galante, Y., M. and Hatefi, Y. 1982. *Biochemistry* 21:5781-5786.
- 79.- Harris, D., A., von Tschärner, V., and Radda, G., K. 1979. *Biochim. Biophys. Acta* 548: 72-84.
- 80.- Dreyfus, G., Gómez-Puyou, A. and Tuena de Gómez-Puyou, M. 1981. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 100: 400-406.
- 81.- Klein, G., Lunardi, J. and Vignais, P., V. 1981. *Biochim. Biophys. Acta* 636: 185-192.
- 82.- Power, R., Cross, R., L. and Harris, D., A, 1983. *Biochim. Biophys. Acta* 742:128-141.
- 83.- Beltran, C., Gómez-Puyou, A. and Tuena de Gómez-Puyou, M. 1988. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 152: 867-873.
- 84.-Jackson, P., J. and Harris, D., A. 1983. *Biosci. Reports* 3: 921-926.
- 85.- Dreyfus, G. and Satre, M. 1984. *Arch. Biochem. Biophys.* 229: 212-219.

- 86.- Di Pietro, A., Penin, F., Julliard, J., H., GGodinot, C. and Gautheron, D., C. 1988 Biochim. Biophys. Res. Commun. 152: 1319-1325.
- 87.- Penin, F., Di Pietro, A., Gidonot, C. and Gautheron, D., C. 1988. Biochemistry 27: 8969-8974.
- 88.- Klein, G. and Vignais, P., V. 1983: J. Bioenerg. Biomemb. 15: 347-362.
- 89.- Kalashnikova, T., Y., Milgrom, Y., M. and Postanogova, N., V. 1988. FEBS Lett. 230: 163-166.
- 90.- Warsaw, J., B., Lam, . K., W., Nagy, B. and Sanadi, D., R. 1968. Arch. Biochem. Biophys. 123: 385-396.
- 91.- Valdés, A., M. and Dreyfus, G. 1987. Biochem. Int. 15: 459-466.
- 92.- Rouslin, W. 1987. J. Biol. Chem. 262: 3472-3476.
- 93.- Adolfsen, R., Mac Clung, J., A. and Moudrianakis, E., N. 1975. Biochemistry 14: 1727-1735.
- 94.- Montero-Lomeli, M. and Dreyfus, G. 1987. Arch. Biochem. Biophys. 257: 345-351.
- 95.- Lötscher, H., R., de Jong, C. and Capaldi, R., A. 1984. Biochemistry 23: 4140-4143.
- 96.- Helenius, A. and Simons, K. 1975. Biochim. Biophys. Acta 415: 29-79.
- 97.- Norling, B. 1986. Biochim. Biophys. Res. Commun. 136: 899-905.
- 98.- Andreu, J. and M. Muñoz, E. 1979. Biochemistry 18: 1836-1844.
- 99.- Mollinedo, F., Munoz, E. and Andreu J., M. Biochim. Biophys. Acta 848: 230-238.
- 100.- Norling, B., Kelemen, G. and Ernster, L. 1986. Biochim. Biophys. Res. Commun.
- 101.- Walker, J. E., Lutter, R., Dupuis, A. and Runzwick, M. 1991. Biochemistry. 30: 5369-5378.
- 102.- Adolfsen, R., Mc Clung, J. A. and Moudrianakis, E. N. 1975. Biochemistry. 14: 1727-1735.



- 103.- Tuena de G.-P. M. and Gómez-Puyou A. 1977. Arch. Biochem. Biophys. 182: 82-86.
- 104.- Dreyfus, G., Célis, H. and Ramírez, J. 1984. Anal. Biochem. 142: 215-220
- 105.- Löw, H. and Vallin, I. 1963. Biochim. Biophys. Acta 69: 361-374.
- 106.- Gornall, A. G., Bardawill, C. J. and David, M. M. 1949. J. Biol. Chem. 177: 751-766.
- 107.- Lee, C. P. and Ernster, L. 1967. Meth. Enzymol. X: 543-548.
- 108.- Bradford, M. 1976. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- 109.- Pullman, M. E., Penefsky, H. S., Datta, A., and Racker, E. 1960. J. Biol. Chem. 253: 3322-3329.
- 110.- Markwell, M. A. K., Haas, S. M., Bieber, L. L. and Tolbert, N. E. 1978. Anal. Biochem. 87: 206-210.
- 111.- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. 1985. Anal. Biochem. 150: 76-85.
- 112.- Klein, G., Sartre, M., Zaccari, G. and Vignais, P. 1982. Biochim. Biophys. Acta. 681: 226-232.
- 113.- Fiske, C. H. and Subbarow, Y. 1925 J. Biol. Chem. 66: 375-400.
- 114.- Von-Jagow, F. 1987. Anal. Biochem. 166: 368-375.
- 115.- Oakley, B. R., Kirsh, D. R. and Morris, N. R. 1980. Anal. Biochem. 105: 361-363.
- 116.- Serrano, R. Kanner, B. I. and Raker, E. 1976. J. Biol. Chem. 251: 4253-2461.
- 117.- van de Stand, R. J., de Boer, B. L. and van Dam, K. 1973. Biochim. Biophys. Acta 292: 338-349.
- 118.- Harris, D. A., von Tschärner, V. and Radda, G. K. 1979. Biochim. Biophys. Acta. 548: 72-84.
- 119.- Raker-Grundwald, T. and van Dam, K. 1974. Biochim. Biophys. Acta 347:290-298.
- 120.- Bruni, A., Friger, L. and Brigon, E. 1977. Biochim. Biophys. Acta 462: 323-332.

- 121.- van de Stand, R., J. and van Dam, K. 1974. *Biochim. Biophys. Acta* 347: 240-252.
- 122.- Vázquez-Laslop, N., and Dreyfus, G. 1986. *J. Biol. Chem.* 261: 7807-7810.
- 123.- Dreyfus, G. 1984. *J. Biol. Chem.* 260:12112-12117.
- 124.- Martins, O., Salgado-Martins, I., Grieco, M., Gómez-Puyou, A., and Tuena de Gómez-Puyou, M. 1992. *Biochemistry.* 31: 5784-5790.
- 125.- Dabbeni-Sala, F., Vázquez-Laslop, N. C., Fachinetti, A., Devars, S., and Dreyfus, G., 1989. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 158: 1030-1020.
- 126.- Laird, M., Parce, W., Montgomery, R., and Cunningham, C. 1986. *J. Biol. Chem.* 14851-14856.

#### XIV. APENDICE.

Los experimento preliminares a este trabajo, es decir lo referente al aislamiento del complejo  $F_0F_1$ -I con el detergente Laurildimetilamino óxido y su caracterización parcial, se presentaron en el VII Congreso Nacional de Bioenergética y Biomembranas (1991) bajo el titulo de: Aislamiento y Caracterización del Complejo ATPsintetasa-Inhibidor Mitocondrial. Vázquez Contreras Edgar y Georges Dreyfus C.

El trabajo aquí descrito, es decir el aislamiento y caracterización del complejo  $F_0F_1$ -I con el detergente n-Dodecil  $\beta$ -D-Maltósido, se presentó este año en el XIX Congress of the Mexican Biochemical Society, bajo el titulo de: Isolation and Characterization of the Native  $F_0F_1$ -Inhibitor Protein From Beef Heart Mitochondria. Vázquez Contreras Edgar and Georges Dreyfus.