



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

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

PROPIEDADES FUNCIONALES DE LA
 F_1F_0 -ATPasa MITOCONDRIAL DE BOVINO
EN PRESENCIA DE TRIFLUOROPERAZINA

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA
P R E S E N T A:
LIC. EN IBB JOSE DE JESUS GARCIA TREJO

MEXICO, D.F.

1995

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.

El presente trabajo se realizó gracias a la paz-ciencia, asesoria, colaboración, curiosidad, impetu, presupuesto (sin pre-supuestos), respeto, inteligencia, confianza, calidez, cordialidad, y atributos etcéteras desde quienes trabajan en los laboratorios de los Dres. Marietta Tuena Sangri y Armando Gómez Puyou.

Agradecimientos:

Gracias a todos mis amigos y todas mis amigas (por orden de aparición que no altera el producto):

Sra. Concepción García por rebasar a su propio nombre, las tres Marias, Agustín, Ángel, Julio, Arturo, Héctor, Víctor, Carlos, Bon, Santiago, Roberto, Alejandro, Manuel, Leticia, Georgina, Dres. Marietta Tuena y Armando Gómez Puyou, Blanca y Arturo, Rosalinda, Bertha, Ceceña, Ito, Edgar, Ernesto, Ana Luisa y a quienes faltan.

ABREVIATURAS

ADP	Adenosíndifosfato
AMP-PNP	Adenililimidodifosfato
ATP	Adenosintrifosfato
Da	Daltons
DCCD	Dicicloexilcabodiimida
Nbf-Cl	7-cloro-4-nitrobenzofurazan
Pi	Fosfato inorgánico
TNP-ATP	Trinitrofenil-ATP

INDICE

INTRODUCCION	1
Funcionamiento y estructura del sector F_1 .	3
Función y estructura de F_0 .	13
Posible mecanismo de acoplamiento entre F_1 y F_0 .	14
Estudios de inhibición en F_1 soluble y en el complejo F_1F_0 : inhibidores tricíclicos.	15
OBJETIVO	17
RESULTADOS	17
CONCLUSIONES	20
REFERENCIAS	20

INTRODUCCION

El complejo F_1F_0 mitocondrial es responsable del último paso de la fosforilación oxidativa y se encarga de acoplar el gradiente electroquímico de protones con la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi. Entender el mecanismo por el cual este acoplamiento se lleva a cabo dentro de la estructura de esta enzima, es una de las preguntas fundamentales para explicar su funcionamiento. La respuesta a esta pregunta se desconoce pero se ha llegado a avances considerables respecto a su mecanismo de reacción y estructura. Gracias a que se han podido separar en forma funcional la parte soluble (F_1) de la parte membranal (F_0) del complejo (Pullman y col., 1960), se sabe que en F_1 ocurre la reacción de hidrólisis o síntesis de ATP, y que por F_0 se transportan los protones de uno al otro lado de la membrana (Negrin y col., 1980). Este hecho favoreció inicialmente el estudio de ambos complejos por separado, especialmente el de F_1 . Por lo tanto, se conoce mucho de la regulación, cinética, energética y estructura de F_1 . También existe información respecto al funcionamiento y la posible estructura de F_0 . Con este conocimiento de F_1 y F_0 por separado, actualmente se están realizando experimentos para entender como se acoplan ambos sectores de la enzima.

Por otro lado, una de las estrategias más favorecidas para estudiar a esta enzima ha sido el uso de inhibidores reversibles e irreversibles. Entre estos inhibidores los más importantes han sido la dicitclohexilcarbodiimida (DCCD) (Hermolin y Fillingame, 1989), el 7-cloro-4-nitrobenzofurazan (Nbf-Cl) (Ferguson y col., 1976; Cross y col., 1982), la azida de sodio (Noumi y col., 1987), la aurovertina-D (Ebel y Lardy, 1975; Vázquez-Laslop y col., 1989), y diversos análogos del ATP y del ADP que se unen a los sitios de unión a nucleótidos: adenililimidodifosfato (AMP-PNP) (Penefsky, 1974), 2-azido-ANP (en donde N = D o T) (Melese y Boyer, 1985; Cross y col., 1987; Weber y col., 1993) y trinitrofenil-ANP (Grubmeyer y Penefsky, 1981; Murataliev y Boyer, 1994). De manera semejante a la mutagénesis al azar o dirigida, estos inhibidores han aportado información

funcional y estructural (a nivel de estructura primaria) dado que gracias a su uso se han identificado residuos de aminoácidos que son importantes para determinadas funciones de la enzima. Algunos de estos inhibidores, como la azida y el TNP-ANP, han dado información funcional importante respecto a la cooperatividad de la parte F_1 aunque se desconocen los residuos de la proteína con los que interactúan.

Obviamente, los sitios catalíticos de la parte F_1 han sido escogidos para introducir inhibidores o mutaciones que aporten información acerca del mecanismo de la enzima. Con estos estudios se han localizado residuos importantes para la unión de sustratos, productos y estados activados durante la reacción de hidrólisis de ATP (Bullough y Allison, 1986; Garin y col., 1986; Cross y col., 1987; Al-Shawi y col., 1990). Desde un punto de vista fisicoquímico de la estructura de los sitios catalíticos, se han probado moléculas apolares bajo la suposición de que dentro de estos sitios activos existe un microambiente hidrofóbico en algunas fases del ciclo catalítico. (de Meis y col., 1988). La trifluoroperazina (TFP) se ha usado como uno de estos inhibidores apolares. La TFP pertenece a un grupo conocido de inhibidores de la F_1 -ATPasa, que fundamentalmente son moléculas tricíclicas usadas como antipsicóticos o anestésicos locales. Algunos ejemplos de estos inhibidores son: clorpromazina, quinacrina, tetracaína, dibucaina, propanolol, flufenazina, flufentixol, etc..

Para obtener más información acerca del mecanismo de acción de la ATPasa, el interés principal de este trabajo es el de describir las propiedades funcionales de la ATPasa cuando se inhibe con TFP. Con los resultados que se exponen adelante, se establece la cinética de inhibición y la posible localización de la TFP en la parte F_1 de la enzima. Además, a partir de estos estudios con la TFP, se identificó al $H_2PO_4^-$ como la especie del fosfato inorgánico (P_i) que se usa como sustrato preferencial en la fosforilación oxidativa.

Funcionamiento y estructura del sector F_1 .

Funcionamiento de F_1 .

El sector F_1 del complejo F_1F_0 contiene tres sitios catalíticos encargados de catalizar la síntesis o hidrólisis de ATP (Cross y Nalin, 1982). La F_1 contiene además 3 sitios de unión a nucleótidos que no son catalíticos, sino reguladores del ciclo catalítico (Bullough y col., 1988; Martins y col., 1992; Jault y Allison, 1993). Los sitios catalíticos en F_1 muestran cooperatividad positiva por ATP durante la hidrólisis (Gubmeyer y Penefsky, 1981b; Fig. 1a) y por ADP durante la síntesis (Matsuno-Yagi y Hatefi, Y, 1990), cooperatividad negativa para la unión de ADP (Tiedge y col., 1982), y muy posiblemente funcionan de manera alternada bajo el mecanismo propuesto por Boyer de "cambio de unión" (Fig. 1b; revisado en Boyer, 1989). Los tres sitios catalíticos muestran heterogeneidad funcional reflejada en la afinidad por diferentes nucleótidos (Grubmeyer y Penefsky, 1981a), en la velocidad de reacción en cada uno de ellos (Grubmeyer y Penefsky, 1981a; Bullough y col., 1987) y en su sensibilidad al pH (Matsuno-Yagi y Hatefi, 1990).

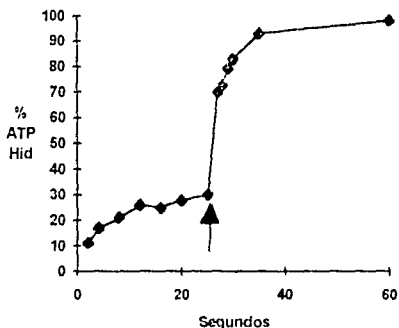


Fig. 1a. *Cooperatividad de la F_1 -ATPasa.* La F_1 -ATPasa ($1\mu\text{M}$) se incubó con $0.3\mu\text{M}$ de $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP al t_0 . En estas condiciones, solo el sitio catalítico número uno (el de mayor afinidad por ATP) se ocupa e hidroliza muy lentamente al $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP. La gráfica muestra el % de $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP que se hidroliza a los diferentes tiempos. A los 26 segundos (\uparrow) se agregó 10 mM de Mg^{2+} -ATP para ocupar los sitios catalíticos dos y tres con ATP "frío", y se siguió la hidrólisis del $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP por la extracción del $^{32}\text{P}_i$ liberado. Después de ocupar los otros dos sitios catalíticos de F_1 , la hidrólisis del $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP unido al sitio 1 se incrementa considerablemente, mostrándose así la cooperatividad positiva entre los sitios catalíticos de F_1 .

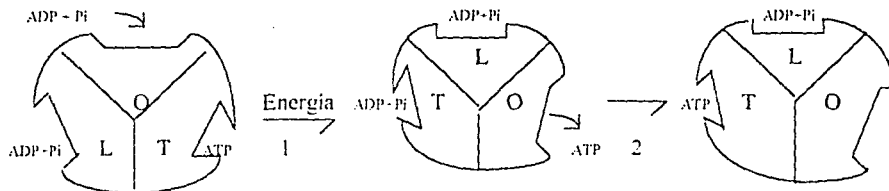
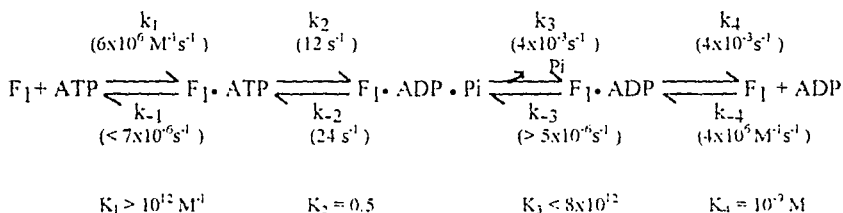


Fig. 1b. **Mecanismo de "cambio de unión" para la síntesis de ATP a nivel de F₁.** En un instante dado, los tres sitios catalíticos se encuentran en tres diferentes estados conformacionales (O = abierto, L = débilmente unido y T = fuertemente unido). La energía proveniente del flujo de H⁺ por F₀ (fase 1) se utiliza para abrir el sitio T con ATP unido para liberarlo, simultáneamente al sitio L se cambia a T con ADP y Pi unidos y el sitio O aumenta su afinidad por ADP y Pi al pasar al estado L. En la fase 2 del ciclo, al ATP se sintetiza espontáneamente (ver fig. 2) en el sitio T, y al repetir la fase 1 se completa el ciclo (Tomado de Cross, R. L., 1994)

Los nucleótidos que usa la enzima mitocondrial son los complejos Mg²⁺-ANP, aunque las enzimas de *Rhodospirillum rubrum* (Johansson y col., 1973) y de cloroplasto (Vambutas y Racker, 1965) pueden hidrolizar Ca²⁺-ATP, y se ha observado que el H₂PO₄⁻ es un ligando preferencial en la F₁ soluble (Kasahara y Penefsky, 1977). La enzima puede funcionar con un sitio catalítico (catálisis unisitario), en presencia de concentraciones subestequiométricas de ATP ([F₁]/[ATP] ≥ 3). En estas condiciones el ciclo catalítico es el siguiente:



Ecuación 1. **Ciclo catalítico unisitario de la F₁-ATPasa mitocondrial de bovino.** Los valores de las constantes de velocidad y de equilibrio se tomaron de Penefsky y Cross (1991) y fueron medidas para la F₁ soluble mitocondrial, corrigiendo los valores reportados inicialmente por Grubmeyer y col. (1982).

Como se puede observar en la ecuación 1, las constantes de velocidad de liberación de ADP y de Pi son muy lentas ($\approx 10^{-3}$), y constituyen los pasos limitantes en el sentido

hidrolítico, mientras que en el sentido sintético, la liberación de ATP y la entrada de Pi constituyen los pasos más lentos. Es importante señalar que la constante de equilibrio de la reacción hidrolítica (K_2) es cercana a uno, lo cual implica que el ΔG^0 es cercano a cero, y no consume energía del flujo de protones por F_0 , mientras que los valores de ΔG^0 para la salida de ATP y entrada de Pi tienen un valor positivo, por lo cual se piensa que estos pasos son los que consumen energía del flujo de H^+ por F_0 (Fig. 2):

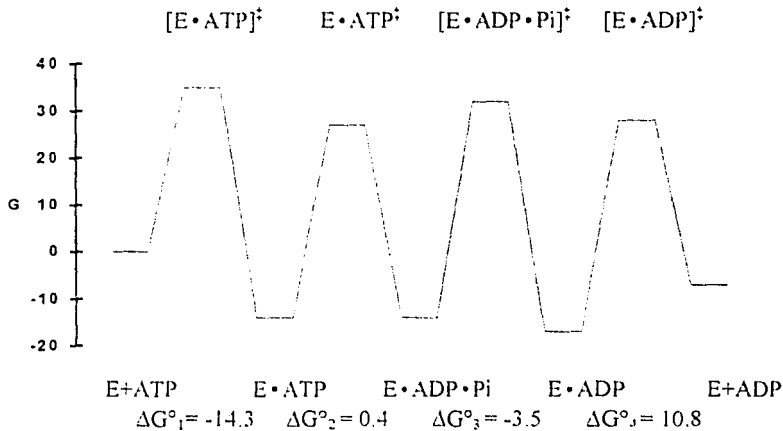


Fig. 2. Perfil de energía libre estándar para la hidrólisis unisítio de ATP por la F_1 mitocondrial. Con las constantes de velocidad reportadas en la ecuación 1, se calcularon los valores del ΔG^0 para cada estado de transición a partir de: $\Delta G^0 = -RT \ln ((h/kT)k)$, en donde R es la constante de los gases, T es la temperatura en grados Kelvin, h es la constante de Planck, k es la constante de Boltzmann y k es la constante de velocidad por calcular (Fersht, 1977). La enzima (E) y el ATP libres en solución se tomaron como estado inicial, asignándoles un valor de energía libre igual a cero. Los valores de ΔG^0 se calcularon a partir de las constantes de equilibrio, con la expresión $\Delta G^0 = -RT \ln K_{eq}$. Todos los valores se reportan en Kcal/mol. El presente diagrama es una versión corregida del calculado por Al-Shawi y col. (1990). Aunque con algunas diferencias, ambos diagramas muestran que los pasos endergónicos son la entrada de Pi y la salida de ATP, en el sentido de síntesis de ATP (derecha a izquierda).

Estructura de F_1 .

En el caso de la enzima mitocondrial, la F_1 contiene 5 subunidades con la siguiente estequiometría: $\alpha_3\beta_3\gamma_1\delta_1\epsilon_1$, conteniendo 510, 482, 272, 146 y 50 residuos de

aminoácidos, respectivamente, con un peso total de 371 000 Da. Los seis sitios de unión a nucleótidos se localizan en las interfases $\alpha\equiv\beta$ (Williams y Coleman, 1982; Lüben y col., 1984; Noumi y col., 1994; Abrahams y col., 1994). Los sitios catalíticos y los no catalíticos se localizan en diferentes interfases $\alpha\equiv\beta$ arregladas alternadamente (Abrahams, 1994), en medio de F_1 (Fig. 5). La subunidades γ y ϵ intervienen en la comunicación conformacional para el acoplamiento $F_1\leftrightarrow F_0$ (Turina y Capaldi, 1994), posiblemente junto con la subunidad δ , que forma parte del cuello que une F_1 con F_0 (Joshi y Burrows, 1990), y que confiere actividad de ATPasa al complejo reconstituido $\alpha_3\beta_3$ (Dunn y Futai, 1979). La F_1 mitocondrial contiene además un péptido inhibidor (Pullman y Monroy, 1963) que se une a una subunidad β (Jackson y Harris, 1988) y disminuye la velocidad de liberación de ADP del sitio catalítico (Milgrom, 1991). Como esta liberación es el paso limitante en la hidrólisis de ATP (ecuación I), el resultado es que la velocidad de hidrólisis de ATP disminuye de 30 a 100 veces cuando este péptido se une a F_1 , mientras que la síntesis de ATP no se ve afectada, porque el péptido se desplaza (Gómez-Puyou y col., 1979) o se separa (Husain y Harris, 1983) de su sitio de inhibición en condiciones de fosforilación oxidativa.

Estudios estructurales por microscopía electrónica y difracción de rayos X muestran a las subunidades α y β alternándose para formar un hexágono semi-simétrico (Tiedge y col., 1983; Bianchet y col., 1991), con una cavidad central donde se localizan las subunidades pequeñas γ , δ y ϵ (Boekema y col., 1990; Fujiyama y col., 1990; Boekema y Bötcher, 1992). En esta parte central, las subunidades pequeñas forman una protuberancia de 40 Å que forma parte del cuello entre F_1 y F_0 (Fig. 4; Abrahams y col., 1994), en donde se mantienen contactos cercanos entre las subunidades δ - γ , ϵ - γ , β - γ y ϵ - α (Capaldi y col., 1992; Turina y col., 1992).

Recientemente se han obtenido las estructuras cristalográficas de las partes F_1 de hígado de rata (Bianchet y col., 1991) y de corazón de bovino (Abrahams y col., 1994). La enzima de hígado de rata difractó los rayos X a una resolución máxima de 3.6 Å y más

recientemente hasta 2.8 Å, conteniendo dos moléculas de F_1 por celda unitaria. La unidad asimétrica dentro de la celda unitaria de estos cristales contiene a un dímero α/β , y un tercio no definido de las subunidades δ , γ y ϵ . Los centros de las tres subunidades α forman un triángulo equilátero. Las subunidades β forman otro triángulo equilátero homólogo, con un plano paralelo al triángulo formado por las subunidades α y rotado 60° (Fig. 3), tal como se observó por microscopía electrónica para la F_1 de bovino previamente (Tiedge y col., 1983). Esta estructura de la F_1 de hígado de rata muestra a los sitios catalíticos con una estructura simétrica y muy semejante a la estructura supersecundaria del sitio catalítico de la adenilato cinasa (Bianchet y col., 1993). Por otro lado, en los cristales obtenidos con la F_1 de corazón de bovino, gracias al uso de un sincrotrón como fuente de rayos X, la resolución que se ha alcanzado es de 2.8 Å. En este estudio se puede definir claramente la estructura secundaria del 90% de las subunidades α y β , y del 50% de la subunidad γ , aunque no se distinguen las subunidades δ y ϵ . Además, se puede observar la distribución de los nucleótidos en los sitios catalíticos y en los no catalíticos. Los nucleótidos catalíticos y no catalíticos se encuentran de manera alternada en todas las interfases $\alpha\equiv\beta$ (excepto una interfase catalítica vacía, $\beta\epsilon$; en Fig. 4). Las subunidades β contribuyen mayoritariamente a los sitios catalíticos, mientras que las subunidades α proporcionan la mayoría de la superficie de unión para nucleótidos en los sitios no catalíticos. En estos cristales el patrón de estructura secundaria de los sitios de unión a nucleótidos resultó ser más parecido a la recombinasa de DNA (RecA) que a la adenilato cinasa. Se observa también una asimetría estructural en los sitios catalíticos respecto al tipo de nucleótido unido y las interacciones con la subunidad γ , congruente con la heterogeneidad funcional ya mencionada. Por otro lado se distinguen los residuos de las subunidades α y β que interactúan con los nucleótidos en los sitios catalíticos y no catalíticos. En general, los aminoácidos de unión de nucleótidos que se observan coinciden con los predichos a partir de experimentos de modificación química y mutagénesis dirigida (Abrahams y col., 1994). Sin embargo, algunos residuos que no son componentes del sitio

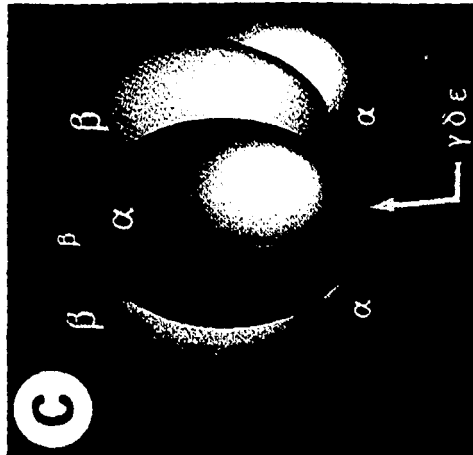
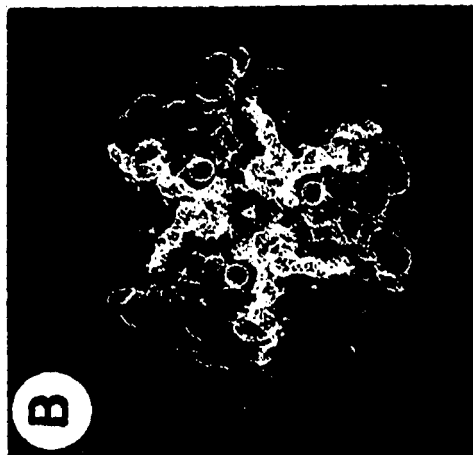
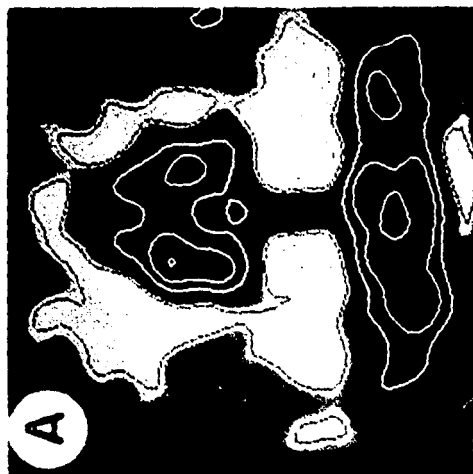


Fig. 3. Estructura cuaternaria de F_1F_0 de *E. coli* y de la F_1 de hígado de rata. A) análisis por computadora de la vista lateral del complejo F_1F_0 de *E. coli* obtenida por criomicroscopía electrónica. En esta imagen, F_1 es la parte superior y F_0 se encuentra en la parte inferior en donde se localiza perpendicularmente el plano de la membrana. B) Vista superior de un corte central de la densidad electrónica de F_1 de hígado de rata obtenida por difracción de rayos X. En azul se muestran las subunidades β y en rojo las subunidades α . Los círculos amarillos representan átomos de mercurio unidos a la cisteína α -201 localizada cerca de los sitios de unión a nucleótidos. C) Modelo de F_1 basado en los datos cristalográficos, se muestra que las subunidades β forman un triángulo equilátero con un plano desplazado y rotado 60° respecto al triángulo paralelo formado por las subunidades α (Tomado de Pedersen y Amzel, 1993).

catalítico de la F_1 mitocondrial se han propuesto como integrantes del sitio catalítico de la F_1 *E. coli* (Futai y col., 1994).

Las diferentes condiciones de cristalización, principalmente respecto al contenido de nucleótidos y la naturaleza del solvente, pueden ser razones suficientes para determinar las diferencias estructurales observadas entre los cristales de la F_1 hígado de rata y la de corazón de bovino. Es posible que ambas estructuras muestren diferentes estados conformacionales representativos de estados funcionales específicos. Aunque no existe ninguna prueba directa que justifique esta suposición, como por ejemplo la medida directa de actividad enzimática dentro del cristal (Singer, 1993), existen evidencias que sugieren fuertemente esta suposición: a) los cristales de la F_1 de hígado de rata muestran actividad de ATPasa cuando se mantienen en medio acuoso. Además, los datos de difracción se tomaron en condiciones donde la enzima cristalizada no era inactivada por las radiaciones (Amzel, M. comunicación personal); y b) la F_1 de corazón de bovino se cristalizó en presencia de ADP y AMP-PNP, dos inhibidores conocidos de la actividad de ATPasa de esta enzima (Garret y Penefsky, 1975; Rosing y col., 1975; Martins y col., 1988). Debido a esto, es posible que la conformación de la F_1 en estos cristales sea el estado inhibido por ADP. Por otro lado, la estructura de esta F_1 concuerda con muchos datos experimentales y con el modelo de cambio de unión de Boyer (comparar Figs. 1b y 5).

En la estructura cristalográfica de la F_1 de mitocondria de bovino se puede distinguir una diferencia importante entre los sitios catalíticos y los no catalíticos: la presencia de la arginina α -373 en los sitios catalíticos. Los sitios no catalíticos carecen de una arginina

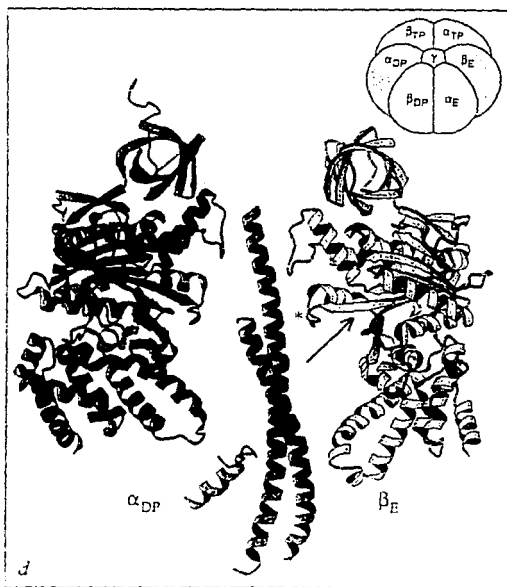
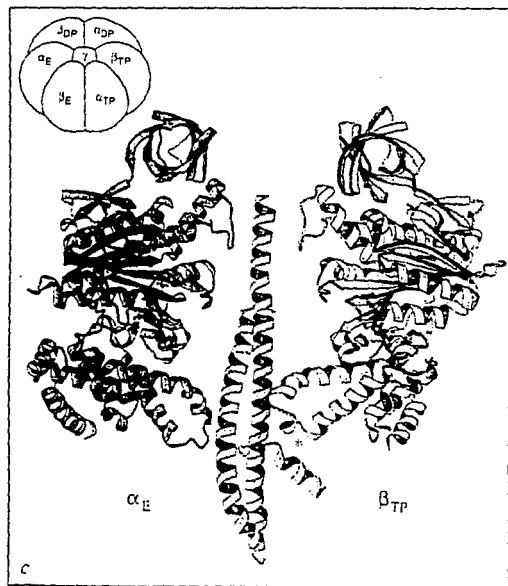
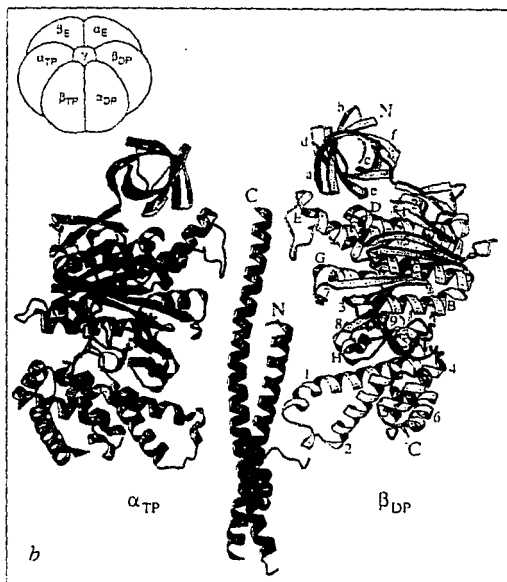
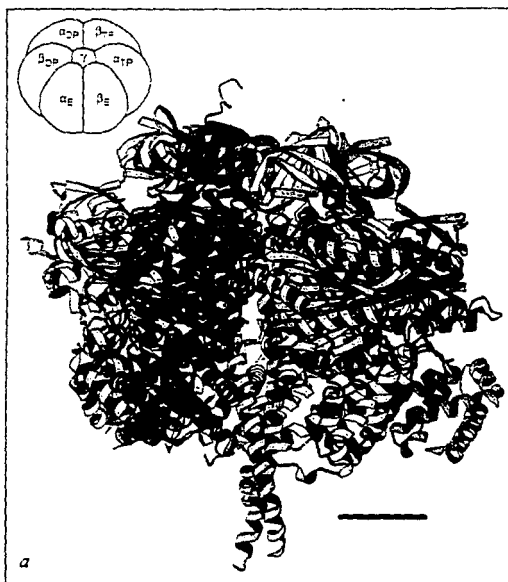
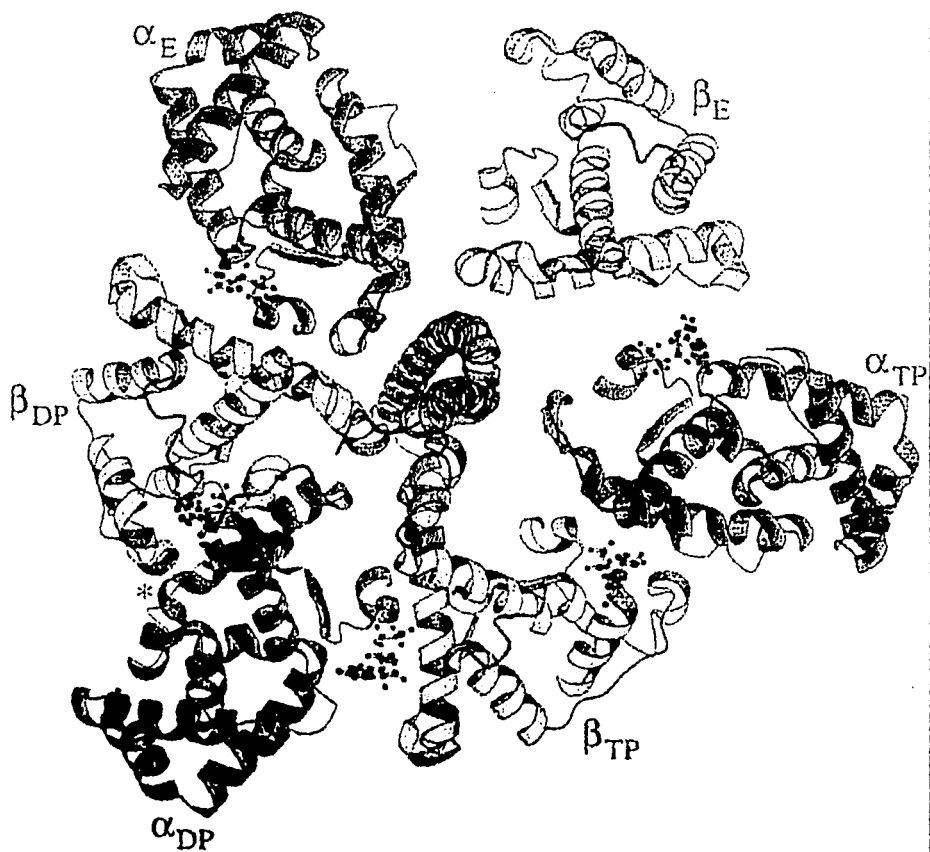


Fig. 4. Estructura terciaria de la F₁-ATPasa de corazón de bovino a 2.8 Å de resolución.

a) Estructura de F₁ mostrando a las subunidades β en amarillo y las α en rojo, 3 α-hélices de la subunidad γ se muestran en morado, las hélices de los extremos carboxilo (90 Å) y amino (≈65 Å) de la subunidad γ ocupan el espacio central entre las subunidades α y β, las partes de estas hélices que protruyen afuera de las subunidades grandes forman parte del cuello que comunica a F₁ con F₀. Las tres subunidades α y la subunidad β_{TP} tienen unido al análogo de ATP, AMP-PNP, mientras que la subunidad β_{PP} tiene unido ADP y β_E esta vacía. La barra inferior indica una longitud de 20 Å. b) Se muestran las subunidades α_{TP} y β_{PP}. La estructura secundaria y terciaria de las subunidades α y β es muy similar, ambas muestran un dominio superior de barril-β en el extremo amino, un dominio intermedio α/β de unión a nucleótidos y un dominio inferior todo α en el carboxilo terminal. c) Subunidades α_E y β_{TP} mostrando una interacción (*) entre el C-terminal de β_{TP} y la hélice intermedia de γ, este contacto no existe entre las otras subunidades. La parte del C-terminal de β_{TP} que interacciona con γ es la secuencia DELSEED, que es muy conservada y es sitio de unión de la quinaacrina mostaza, inhibidor tricíclico parecido a la trifluoroperazina. d) Subunidades α_{PP} y β_E, mostrando la pérdida de la estructura de β_E en la región de unión a nucleótidos (N), así como un contacto específico (*) entre un asa del dominio central de β_E y la hélice C-terminal de la subunidad γ.

homóloga proveniente de la subunidad β, de modo que es posible que esta arginina participe en la química de la reacción de hidrólisis de ATP. Por lo tanto, la falta de esta arginina daría el carácter no catalítico a los sitios de unión de nucleótidos localizados en las subunidades α. Seguramente, esta predicción será estudiada en breve con experimentos de mutagénesis dirigida.

Otro aspecto importante que surge de la estructura global de la F₁ es que la subunidad γ forma un posible eje de rotación en el centro de las subunidades α y β. Los diferentes estados catalíticos de cada sitio podrían deberse a las diferentes interacciones que tiene cada subunidad β con la subunidad γ (señaladas con asterisco en la Fig. 4). La rotación sería el mecanismo por el cual los sitios intercambian simultáneamente su estado catalítico bajo el mecanismo de cambio de unión señalado en la Fig. 1b. Esta hipótesis rotacional se había propuesto previamente y se apoya con el resultado de que el entrecruzamiento β-γ impide el funcionamiento de F₁ (revisado en Capaldi, 1994).



C

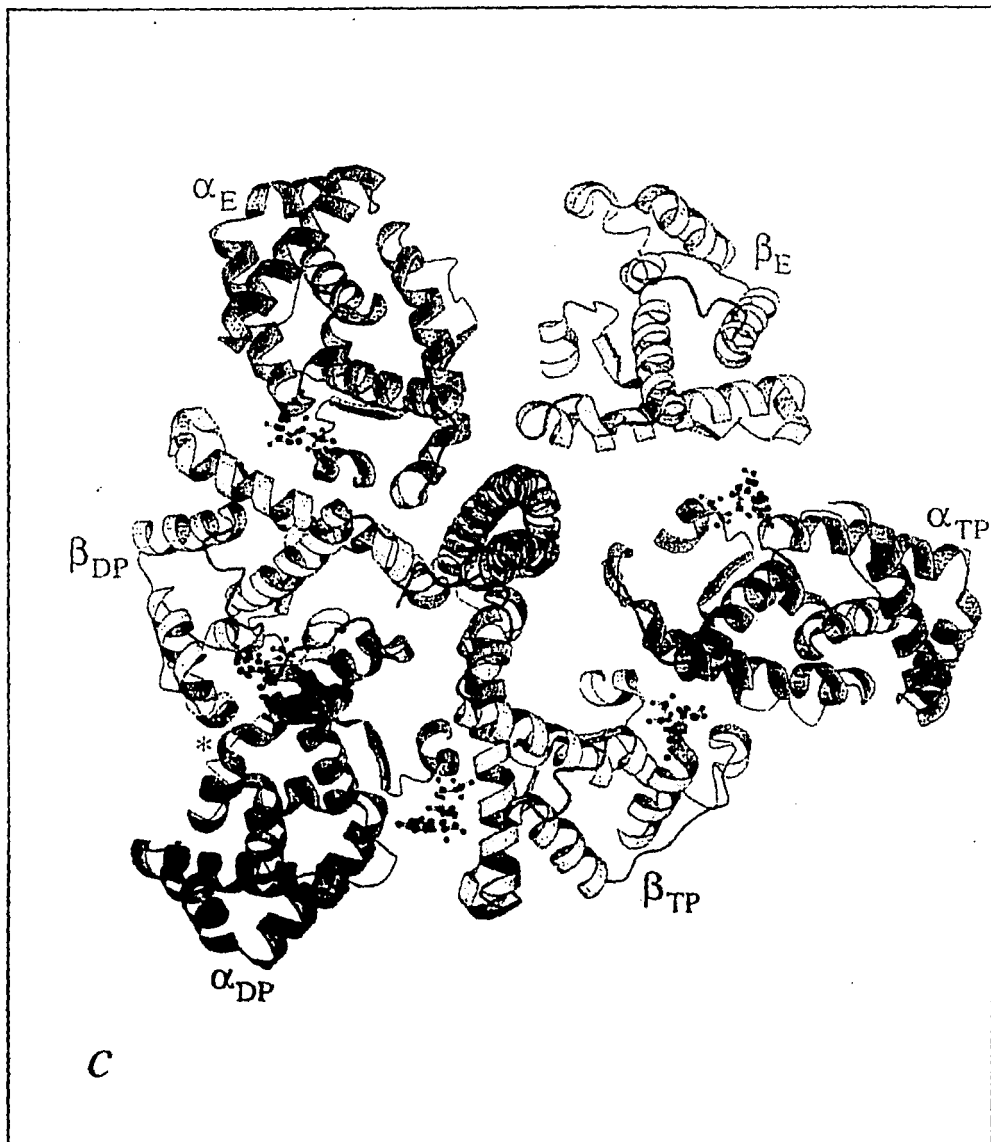


Fig. 5 *Distribución de nucleótidos en la estructura cristalográfica de la F₁ mitocondrial.* Con el mismo código de colores y nomenclatura de la figura 4a, se muestra la distribución de nucleótidos en los dominios carboxilo terminal de las subunidades α y β , vista desde la parte inferior de F₁. La figura muestra la asimetría de los sitios catalíticos. A semejanza del esquema de la figura 1b, la interfase vacía $\alpha_E \equiv \beta_E$ representaría el sitio vacío (O); la interfase $\alpha_{TP} \equiv \beta_{TP}$ conformaría el sitio débilmente unido (L) y la interfase $\alpha_{PP} \equiv \beta_{PP}$ formarían el sitio fuertemente unido (T) marcado con asterisco. Los otros tres nucleótidos ocupan sitios de unión no catalíticos.

Función y estructura de F₀.

En comparación con F₁, la estructura de F₀ en las diferentes especies se conoce menos. La enzima mitocondrial de bovino tiene 8-9 subunidades diferentes en el sector F₀, por lo cual es el más complejo que se ha descrito. La estructura mínima capaz de transportar protones en forma acoplada con la síntesis de ATP en F₁, es el sector F₀ de *E. coli*, que contiene solo tres subunidades diferentes con las siguientes estequiometrías: $a_1:b_2:c_{10-12}$. Las subunidades adicionales presentes en los otros complejos F₀ tienen posiblemente otras funciones no esenciales para la conducción de protones. Análisis de mutantes muestran que las tres subunidades se requieren para la conducción de protones por F₀ (revisado en Futai y col., 1989). Existen modelos de las subunidades membranales de F₀ obtenidos con métodos de predicción de estructura secundaria e hidrofobicidad, tomando en cuenta datos de mutagénesis y accesibilidad a proteasas. Respecto a análisis estructurales, la subunidad más estudiada es la subunidad c, puesto que contiene un aspártico esencial totalmente conservado. La modificación de este aspártico con DCCD en una sola subunidad c de las 10-12 presentes en F₀ produce un bloqueo total en el flujo de H⁺, de modo que también F₀ funciona de manera cooperativa y/o alternante entre sus subunidades (Hermolin y Fillingame, 1989). Este carboxilo esencial puede ser funcional al ser colocado por mutagénesis dirigida en cualquiera de las dos hélices siempre y cuando se conserve su distancia respecto al plano de la membrana (Miller y col., 1990). Recientemente se determinó por resonancia magnética nuclear la estructura de la subunidad c solubilizada en solventes no acuosos, mostrando una estructura de horquilla con dos hélices transmembranales tal y como se había predicho (Norwood y col., 1992;

Girvin y Fillingame, 1994). Algunos residuos no membranales de la subunidad *c* expuestos del lado de F_1 son importantes para el acoplamiento y/o la unión de F_1 , de manera similar a lo que ocurre con algunos residuos en la subunidad *b* localizados en un asa extramembranal que tiene un alto contenido de α -hélice cuando este segmento es expresado en forma soluble (Dunn, 1992).

Posible mecanismo de acoplamiento entre F_1 y F_0 .

Algunos complejos F_1F_0 bacterianos transportan iones Na^+ al hidrolizar ATP (Laubinger y Dimroth, 1989; Reidlinger y Müller, 1994). Además, se ha demostrado que algunos de estos complejos son capaces de substituir el flujo de H^+ por un flujo de iones Na^+ a través de F_0 para sintetizar ATP (Hoffman y col., 1990; Efiook y Webster, 1992; Avetisyan y col., 1993; Becher y Müller, 1994). De estos resultados se concluye que el mecanismo de acoplamiento está dado por cambios conformacionales comunicados entre F_1 y F_0 a través del cuello, descartándose la hipótesis directa de Mitchell en donde los protones (o hidroxilos) transportados vectorialmente por F_0 serían componentes estructurales del ATP recién sintetizado (Mitchell, 1961). Por otro lado, resultados de mutagénesis y obtención de mutantes supresoras en *E. coli* indican que la subunidad γ interviene directamente en el acoplamiento entre F_1 y F_0 (Nakamoto y Futai, 1994; Futai y col., 1994). Con una elegante combinación de mutagénesis dirigida, modificación química, análisis de fluorescencia y reconstitución de la subunidad ϵ de *E. coli*, se demostró que la subunidad ϵ es un intermediario del acoplamiento conformacional entre los sitios catalíticos y la subunidad γ (Turina y Capaldi, 1994). Resulta entonces posible que a nivel de F_1 , parte del mecanismo de acoplamiento entre F_1 y F_0 consista en que los contactos que hacen las subunidades γ y ϵ con las subunidades α y β sean una señal conformacional que transforme simultáneamente a los tres sitios catalíticos en O, L o T (según la nomenclatura de la Fig. 1b), consumiendo energía del flujo de protones por F_0 .

Además de γ , δ y ϵ , existe otra subunidad en el cuello que forma parte importante en la comunicación $F_1 \leftrightarrow F_0$ y que se requiere para poder reconstituir al complejo F_1F_0 mitocondrial funcionalmente acoplado (MacLennan y Tzagoloff, 1968), sensible a oligomicina (un inhibidor que actúa solamente a nivel de F_0). Esta subunidad se conoce como OSCP (oligomycin sensitivity conferring protein).

Seguramente las interacciones entre las subunidades γ , OSCP, δ y ϵ en el cuello son la base estructural del acoplamiento entre F_1 y F_0 . De hecho se sabe que la subunidad ϵ se localiza en el centro de F_1 en contacto directo con la subunidad γ , sin embargo se requieren datos estructurales más detallados para entender cómo interaccionan estas subunidades del cuello entre sí, con F_0 y con F_1 para entender completamente el mecanismo molecular del acoplamiento.

Estudios de inhibición en la F_1 soluble y en el complejo F_1F_0 : inhibidores tricíclicos.

El uso de varios inhibidores reversibles e irreversibles ha aportado información funcional y estructural importante respecto al mecanismo de acción de la ATPasa. Por ejemplo, destacan el uso de análogos de nucleótidos y de Pi capaces de unirse covalentemente a F_1 . De estos estudios se determinó la presencia de los seis sitios de unión a nucleótidos con la diferenciación entre sitios catalíticos y no catalíticos (Cross y Nalin, 1982), la identificación de los residuos de las subunidades β que interactúan con los nucleótidos en sitios catalíticos y no catalíticos (Cross y col., 1987), la cooperatividad entre los sitios catalíticos (Grubmeyer y Penefsky, 1981b), el papel regulatorio de los sitios no catalíticos en la catálisis (Bullough, 1988; Jault y Allison, 1993) y la identificación de la subunidad β como la subunidad que une Pi (Lauquin y col., 1980).

Aparte del uso de análogos de sustratos, se ha obtenido información valiosa con modificadores químicos e inhibidores reversibles que no guardan semejanza estructural

con los sustratos de la enzima. La información más relevante se puede resumir en la identificación de un carboxilo esencial en la subunidad β que une DCCD (Esch y col., 1981), la cercanía de la lisina-155 y la tirosina-297 en el sitio catalítico de la subunidad β de *E. coli* que une al Nbf-Cl (Andrews, 1984), y la cooperatividad entre los sitios catalíticos sensible a azida (Noumi y col., 1987).

Por otro lado, existe otro grupo de inhibidores inespecíficos que se ha usado desde hace algún tiempo en la ATPasa. Este grupo de fármacos se caracteriza por tener un anillo tricíclico en su estructura que les da un carácter hidrofóbico. Los inhibidores más usados son algunos anestésicos locales (tetracaina, dibucaina, procaína, flufenaxol, flufenazina, propanolol, etc.) y fenotiazinas (clorpromazina, quinacrina, trifluoroperazina). En general, este tipo de inhibidores comparten las siguientes características: a) son inhibidores parciales, no competitivos, de la hidrólisis de ATP por F_1 y por el complejo F_1F_0 (Revisado en Adade y col., 1984); b) su afinidad para inhibir a la F_1 soluble se incrementa proporcionalmente a su hidrofobicidad (Chazotte y col., 1982); c) se ha propuesto que las especies protonadas de estos inhibidores tienen una mayor afinidad por la F_1 (Palatini, 1982). El presente trabajo muestra que la TFP es una excepción de esta regla. Por otro lado, estos inhibidores tienen efectos sobre las propiedades estructurales de la ATPasa: a) protegen a F_1 de la inactivación por baja (Palatini, 1982) o alta (Kresheck y col., 1985) temperatura; b) en el caso de la quinacrina, se observa competencia respecto al ADP (Laikind y Allison, 1983); c) en el complejo F_1F_0 pueden unirse e inhibir a F_0 y d) a concentraciones milimolares llegan a separar las subunidades del complejo F_1 (Chazotte y col., 1982). Todos estos datos indican que este tipo de inhibidores tienen dos mecanismos generales para disminuir la actividad de la ATPasa: por un lado, algunos podrían ser capaces de interactuar con los sitios catalíticos en F_1 , y por otro lado, se unen en otras regiones de F_1 y/o de F_0 disminuyendo su movilidad, puesto que incrementan su estabilidad térmica y disminuyen su velocidad de catálisis. Los resultados del presente trabajo sugieren fuertemente que la TFP inhibe la actividad de la ATPasa por su unión en

los sitios catalíticos de F_1 . Además se encontró que la TFP tiene otros sitios de acción en el complejo F_1F_0 , que posiblemente se localizan en F_0 . Por otro lado, con el análisis de la inhibición de la ATPasa con TFP se obtuvieron nuevos resultados que apoyan más directamente la hipótesis de que el fosfato monobásico ($H_2PO_4^-$) es el sustrato preferencial en la síntesis de ATP que cataliza esta enzima (Kasahara y Penefsky, 1978; Al-Shawi y Senior, 1992).

OBJETIVO

El presente trabajo está enfocado a entender mejor el mecanismo por el cual la TFP inhibe a la ATPasa mitocondrial.

Con este fin se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- i)* Hacer un análisis cinético de la inhibición de la F_1 -ATPasa con TFP para determinar que tipo de inhibidor es la TFP y poder calcular la K_i de la TFP en la F_1 soluble.
- ii)* Comparar el efecto que ejerce la TFP en la actividad de ATPasa de F_1 con el que produce en el complejo F_1F_0 durante la hidrólisis y la síntesis de ATP.
- iii)* Estudiar el efecto del pH en la inhibición de la ATPasa con TFP para determinar si el estado de protonación de la TFP y/o el de la ATPasa son importantes para la interacción TFP-ATPasa.

RESULTADOS

En el trabajo adjunto se muestran los resultados obtenidos con el análisis de la inhibición de la ATPasa soluble F_1 y del complejo F_0F_1 por TFP. En la F_1 soluble se demostró que la TFP inhibe de manera parcial y no competitiva respecto al ATP. Sin embargo, se encontró una competencia clara entre la TFP y una de las especies de P_i , el $H_2PO_4^-$. Esta competencia se observó también en el complejo F_0F_1 durante la síntesis e hidrólisis de ATP en partículas submitocondriales. Por otro lado, con la medida de la afinidad del complejo F_0F_1 por P_i durante la fosforilación oxidativa a diferentes valores de

pH, se obtuvieron resultados que apoyan fuertemente la propuesta de que el H_2PO_4^- es el sustrato preferido para sintetizar ATP por el complejo F_0F_1 . Esta propuesta provino inicialmente de experimentos de unión de Pi a la parte F_1 aislada, en ausencia de F_0 , potencial electroquímico de protones, ADP y Pi (Kasahara y Penefsky, 1978; Al-Shawi y Senior, 1992). La importancia de los resultados de síntesis de ATP en esta tesis, radica en que los experimentos consistieron en la medida directa de la fosforilación oxidativa en partículas submitocondriales a diferentes valores de pH y distintas concentraciones de Pi. Es decir, en condiciones donde se tiene al complejo F_1F_0 acoplado y en presencia de sus sustratos fisiológicos: potencial electroquímico de protones, ADP y Pi.

Desde el punto de vista del uso de la TFP como inhibidor de la F_1 , se mostró que a partir del análisis de los resultados obtenidos con la TFP se puede obtener información importante acerca del mecanismo propio de la enzima, en este caso se logró la identificación de uno de los sustratos preferenciales para la fosforilación oxidativa. Por otro lado se encontró que el estado de protonación de la TFP no es importante para su potencia inhibitoria o afinidad para inhibir o unirse a F_1 . Este resultado es diferente a lo que se ha propuesto para las otras fenotiazinas y anestésicos locales, con lo cual se amplía el conocimiento del mecanismo de inhibición de la ATPasa por estas moléculas.

Además de la competencia entre la TFP y el H_2PO_4^- en la F_1 soluble, se encontraron efectos adicionales de la TFP sobre el complejo F_0F_1 , atribuibles a la existencia de otros sitios de unión para la TFP. Estos otros sitios podrían localizarse en F_0 , como sugieren los resultados de reconstitución del complejo F_1F_0 , usando un factor F_0 fotomodificado con ^3H -TFP (Dabbeni-Sala y Palatini, 1990) y los resultados de este trabajo en donde se observa que: a) el H_2PO_4^- protege mejor a la F_1 soluble que al complejo F_1F_0 de la inhibición con TFP; b) la inhibición de la hidrólisis de ATP por el complejo F_1F_0 con TFP tiene forma sigmoide y no hiperbólica como en el caso de la F_1 soluble; y c) el efecto del pH en el grado de inhibición por TFP es opuesto entre la F_1 soluble y el complejo F_1F_0 .

sintetizando ATP: la alcalinización del medio *disminuye* la inhibición de la F_1 soluble, y por otro lado, *incrementa* la inhibición de la síntesis de ATP por el complejo F_1F_0 .

Aunque estos datos concuerdan con la idea de que la TFP inhibe también el funcionamiento de F_0 aparte del de F_1 , otra manera de explicar los efectos adicionales de la TFP en el complejo F_1F_0 es que la TFP se una de manera inhibitoria a sitios de F_1 o del cuello que se exponen solamente cuando F_1 y F_0 están unidos.

Inhibition by Trifluoperazine of ATP Synthesis and Hydrolysis by Particulate and Soluble Mitochondrial F₁

COMPETITION WITH H₂PO₄⁻

José de Jesús García¹, M. Tuena de Gómez-Puyou¹ and A. Gómez-Puyou¹.

¹Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, D. F. México.

To whom correspondence should be addressed: M. Tuena de Gómez-Puyou, Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-243, D.F 04510 México.

Tel.: (525) 622-56-29; FAX: (525) 622-56-11

Running Title: H₂PO₄⁻ and Trifluoperazine Compete in F₁-ATPase.

ABSTRACT

The effect of trifluoperazine (TFP) on the ATPase activity of soluble and particulate F_1 -ATPase and on ATP synthesis driven by succinate oxidation in submitochondrial particles from bovine heart was studied at pH 7.4 and 8.8. At the two pH, TFP inhibited ATP hydrolysis. Inorganic phosphate protected against the inhibiting action of TFP. The results on the effect of various concentrations of phosphate in the reversal of the action of TFP on hydrolysis at pH 7.4 and 8.8 showed that $H_2PO_4^-$ is the species that competes with TFP. The effect of TFP on oxidative phosphorylation was studied at concentrations that do not produce uncoupling or affect the aerobic oxidation of succinate ($<15 \mu M$). TFP inhibited oxidative phosphorylation to a higher extent at pH 8.8 than at pH 7.4; this was through a diminution in the V_{max} , and an increase in the K_m for phosphate. Data on phosphate uptake during oxidative phosphorylation at several pH showed that $H_2PO_4^-$ is the true substrate for oxidative phosphorylation. Thus, in both, synthesis and hydrolysis of ATP, TFP and $H_2PO_4^-$ interact with a common site. However, there is a difference in the sensitivity to TFP of ATP synthesis and hydrolysis; this is more noticeable at pH 8.8 i.e. ATPase activity of soluble F_1 remains at about 40 % of the activity of the control in a concentration range of TFP of 40 to 100 μM , whereas in oxidative phosphorylation 14 μM TFP produces a 60 % inhibition of phosphate uptake.

KEY WORDS: Mitochondrial ATP synthase; Trifluoperazine; oxidative phosphorylation; $H_2PO_4^-$; soluble F_1 .

Abbreviations: ADP, adenosine 5'-diphosphate; ATP, adenosine 5'-triphosphate; AMP-PNP, adenylyl imidodiphosphate; DCCD dicyclohexylcarbodiimide; IMP-PNP, 5'-(β,γ -Imido)triphosphate; FCCP, carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone; TFP, trifluoperazine; Tris, Tris(hydroxymethyl)aminomethane.

INTRODUCTION

The F_0F_1 complex of the inner mitochondrial membrane catalyzes the synthesis of ATP using the energy of electrochemical H^+ gradients. The enzyme is formed by a membrane portion referred to as F_0 and a soluble multisubunit portion known as F_1 (for reviews see Walker et al., 1982; Martins et al., 1988; Futai et al., 1989; Capaldi et al., 1992; Pedersen and Amzel, 1993). The most obvious catalytic property of soluble F_1 is to hydrolyze ATP (Pullman et al., 1960). The F_1 portion of the complex has six adenine nucleotide binding sites. Three of these are considered catalytic; the other three sites exert regulatory functions (Cross et al., 1982; Weber et al., 1985; Martins et al., 1992; Jault and Allison, 1993). Several lines of evidence indicate that the enzyme has a high degree of cooperativity (Hackney and Boyer, 1978; Grubmeyer and Penefsky, 1981; Penefsky, 1988), and there are reports showing that the three catalytic sites may be heterogeneous (Bullough et al., 1987; Fromme and Gräber, 1989).

Inhibitors such as oligomycin (McLennan and Tzagoloff, 1968), dicyclohexyl carbodiimide (Hermolin and Fillingame, 1989), auraverin (Cross, et al., 1982; Vázquez-Laslop et al., 1989), and nitrobenzofurazan (Ferguson et al. 1976; Cross, et al., 1982) have been extensively used to ascertain important features of the membrane and soluble portions of the ATPase complex. In addition, there is a class of inhibitors whose action has been studied in relation to their molecular structure. These are relatively hydrophobic molecules that affect the function of F_1 i.e. fluphenazine (Palatini, 1982), chlorpromazine (Laikind et al., 1982; Palatini, 1982), quinacrine (Laikind and Allison, 1983; Bullough et al., 1989; Jault and Allison, 1993), trifluoperazine (TFP) (de Meis et al., 1988; Dabbeni-Sala and Palatini, 1990; Dabbeni-Sala et al., 1990) and local anæsthetics such as

lidocaine, dibucaine and tetracaine (Vanderkooi et al., 1981; Laikind et al., 1982; Chazotte et al., 1982). Interestingly, for the case of TFP, there are data that indicate that its inhibitory action is reversed by phosphate (de Meis et al., 1988). It has also been shown that some of these hydrophobic molecules interact with the F_0 portion of the mitochondrial complex (Dabbeni-Sala and Palatini, 1990; Dabbeni-Sala et al., 1990). Regarding the characteristics of these inhibitors, it has been reported that their inhibitory potency decreases with increasing pH (Palatini, 1982), and that an increase in the hydrophobicity of the molecules favors its interaction with F_1 (Chazotte et al., 1982).

This work further examines the inhibitory action of TFP on the hydrolytic activity of soluble and particulate F_1 , and on oxidative phosphorylation by bovine heart submitochondrial particles. The results show that TFP inhibits synthesis and hydrolysis of ATP through a process that is affected by pH. The results also show that mono-ionized phosphate ($H_2PO_4^-$) competes with TFP for a common site. In addition, it is shown that at pH 8.8, TFP produces a partial inhibition of hydrolysis at concentrations that produce a higher inhibition of phosphate uptake driven by succinate oxidation.

MATERIALS AND METHODS

Nonradioactive chemicals were obtained from Sigma. [^{32}P] phosphate was obtained from ICN and purified as described elsewhere (de Meis, 1984). Bovine heart mitochondria were prepared according to Low and Vallin (1963). Submitochondrial particles and soluble F_1 were prepared as described elsewhere (Beltrán et al., 1986). Submitochondrial particles were stored at $-70^\circ C$ and F_1 at $4^\circ C$ as an ammonium sulfate suspension until the time of the experiment. Before each experiment, stored F_1 was centrifuged and

resuspended in 20mM Tris-acetate, 0.05mM ATP and 0.5 mM EDTA at pH 7.4. TFP dihydrochloride was used; it was dissolved in water before each experiment. Under UV light TFP binds covalently to proteins, including various subunits of the ATPase complex (Dabbeni-Sala and Palatini, 1990; Dabbeni-Sala et al., 1990). This side reaction was avoided by carrying all experiments in the dark.

ATPase Activity.

ATPase activity was assayed spectrophotometrically with an ATP regenerating system by following the decrease in absorbance at 340 nm at 25°C. The standard reaction media at the indicated pH contained 50 mM Tris-acetate, 30 mM K-acetate, 3 mM phosphoenolpyruvate, 6 mM Mg-acetate, 8 units of pyruvate kinase and 6 units of lactate dehydrogenase and the indicated ATP concentrations. When the ATPase activity of submitochondrial particles was assayed, the standard reaction media also contained 0.20 M sucrose and 1 μ M rotenone. Variations in the standard mixture are detailed in the Results section. ATPase activity of soluble F₁ was assayed with 1 μ g/mL; submitochondrial particles were used at a protein concentration of 0.1 mg/mL.

Oxidative Phosphorylation.

Submitochondrial particles (0.1 mg protein per mL) were incubated at 25°C in Erlenmeyer flasks under constant shaking in 0.4 or 0.65 mL of a mixture that contained 0.15 M sucrose, 50 mM tris-acetate, 6 mM Mg-acetate, 20 mM succinate, 2 mM ADP, [³²P]Pi (as indicated), 20 mM glucose, and 46 units/mL of hexokinase at the pH indicated. The reaction was stopped by mixing 0.25 or 0.5 mL of the reaction media with trichloroacetic

acid to yield a final concentration of 5 % in 1.5 mL. After formation of phosphomolybdate, [^{32}P]Pi was extracted five times with butyl acetate as described before (Beltrán et al., 1986). Non-extractable [^{32}P]Pi was considered equivalent to the amount of ATP formed.

ATP-dependent Transhydrogenase Reaction.

This was measured as described by Ernster and Lee (1967). The reaction mixture (1 mL) at the indicated pH contained 50 mM tris-acetate, 6 mM Mg-acetate, 20 mM phosphate, 1 mM KCN, 57 mM ethanol, 17 μM NAD, 0.2 mM NADP, 83 μg alcohol dehydrogenase, 0.1 mg/mL of submitochondrial particles, and the concentrations of ATP indicated under Results. Temperature was 25°C.

Distribution of Bound and Free TFP in Submitochondrial Particles.

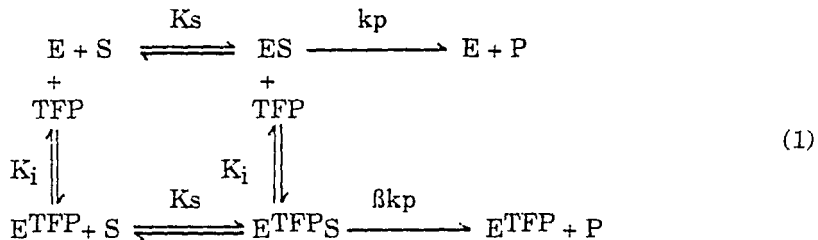
TFP (50 μM) was incubated with submitochondrial particles in a final volume of 1 mL at room temperature. The mixture was centrifuged at 105,000 g for 40 min. To determine free TFP, the supernatants were withdrawn and their absorbance at 258 nm was measured. Bound TFP was calculated from the difference in total and free TFP.

Protein was determined according to Lowry et al (1951) in presence of 0.25 % sodium deoxycholate using bovine serum albumin as standard.

Calculation of K_i for TFP in Soluble F_1 .

TFP proved to be a noncompetitive partial inhibitor of ATP hydrolysis by soluble F_1 (See Results). This inhibition was modeled assuming noncompetitive binding of TFP at a single class of sites with a common dissociation constant (K_i). In the following reaction sequence, the binding of

substrate and TFP are considered independent, thus the complex TFP-enzyme-substrate retains a fraction (β) of the control activity.



In this case the velocity of reaction is

$$V = kp[ES] + \beta kp[E\text{TFP}S] \quad (2)$$

this may be expressed in relation to the V_{max} after substituting the free enzyme concentration as follows

$$V = \frac{[S] (1 + \beta[\text{TFP}/K_i]) V_{max}}{K_s(1 + [\text{TFP}/K_i]) + [S](1 + [\text{TFP}/K_i])} \quad (3)$$

This equation was used for a nonlinear regression analysis (Leatherbarrow, 1987) of the experimental data obtained from the effect of various concentrations of TFP on ATP hydrolysis by soluble F_1 . Excellent fittings were obtained between experimental points and theoretical curves. From the equation, K_i and the residual activity factor (β) were obtained. The K_m for Mg^{2+} -ATP used was 0.2 mM (as determined from experiments in this work); the V_{max} varied between 50 and 60 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ in different experiments.

RESULTS

Effect of TFP on ATP Hydrolysis by Particulate and Soluble F₁.

It has been described that the inhibition of ATPase activity of soluble F₁ by tricyclic molecules such as chlorpromazine, and by local anaesthetics, i. e. fluphenazine and flupenthixol decreases with increasing pH. From the changes of CI_{50%} (concentration required for half inhibition) at different pH, the lower inhibition of F₁ at alkaline pH was ascribed to the changes in the protonation state of the inhibitors (Palatini, 1982). To determine if the inhibition by TFP of ATP hydrolysis follows this pattern, its effect on the ATPase activity of submitochondrial particles and soluble F₁ was assayed at pH 7.4 and 8.8. In particles, the inhibition curves were similar at the two pH (Fig. 1, A and B). In accordance with previous data (de Meis et al., 1988), Figure 1 also shows that at pH 7.4, 40 mM inorganic phosphate (Pi) protected against the inhibiting action of TFP, but it was now found that at pH 8.8, protection by this concentration of Pi was much lower.

TFP also inhibited ATP hydrolysis by soluble F₁ (Fig.2, A and B). The sensitivity of the inhibiting effect of TFP to Pi was also lower at pH 8.8. From the kinetic model described under Methods, the K_i for TFP in F₁ was calculated (Table I). The values at the two pH were almost the same (15 and 11 μM respectively). This indicates that regardless of the protonation state of TFP (pK_{a1}=3.9, pK_{a2}=8.1), the affinity of the enzyme for TFP did not vary in this pH range. On the other hand, at pH 7.4, 40 mM Pi increased the K_i for TFP to 50 μM.

In the data of Figures 1 and 2 there are some additional features. The inhibiting effect of TFP on hydrolysis was partial; this was more noticeable at pH 8.8 with the soluble enzyme. In the range of 60 to 100 μM TFP, activity remained at about 40 % of the control (Fig. 2 B, Table I). Figures 1 and 2 also

show that protection against TFP action by Pi was higher in the soluble than in the particulate enzyme. Another finding was that at pH 7.4, the inhibition by increasing concentrations of TFP in soluble F₁ was hyperbolic, whereas in the particulate enzyme, the titration curve was sigmoidal.

Protection of TFP Induced Inhibition of Hydrolysis by H₂PO₄⁻.

To account for the lower protective effect of Pi at pH 8.8 than at pH 7.4 (Figs. 1 and 2), it was thought that this could be due to the different concentrations of H₂PO₄⁻ or HPO₄⁼ that exist at the two pH values. To test this possibility, the effect of TFP on the ATPase activity of soluble F₁ incubated with various Pi concentrations was determined at pH 7.0 and 8.0 (Fig. 3). The results were plotted as function of overall Pi or H₂PO₄⁻ concentrations. Lower Pi concentrations were required to prevent the action of TFP at pH 7.0 than at pH 8.0 (inset Fig. 3). On the other hand, when the inhibiting action of TFP was plotted as function of the concentration of H₂PO₄⁻, there was a marked overlapping of the curves obtained at pH 7.0 and 8.0 (Fig. 3). Accordingly, it may be concluded that H₂PO₄⁻ is the active, or the more active species in the displacement of TFP from its inhibitory site. The data also indicate that the inhibition of TFP action by Pi is not due to a lowering of its effective concentration in the media as a consequence of electrostatic interactions between positively charged TFP and negatively charged Pi, i.e. in such case it would be expected that HPO₄⁼ would be more effective.

Molecules similar to TFP exert a noncompetitive inhibition of ATP hydrolysis (Palatini, 1982; Laikind et al., 1982). Likewise Lineweaver-Burke plots obtained from the activity of soluble F₁ incubated with TFP, at pH 7.4 and 8.8 and various Mg²⁺-ATP concentrations, showed that the main effect

of TFP was on the V_{max} (Table II). Only a small modification of the K_m for Mg^{2+} -ATP was observed. The noncompetitive type of inhibition of ATP hydrolysis by TFP is indicative that TFP does not perturb, at least to a large extent, the affinity of the enzyme for ATP, albeit $H_2PO_4^-$ protects against the inhibition (Fig. 3).

Effect of TFP on Electron Transport and the Transhydrogenase Reaction, and its Distribution Between the Particulate and Water Spaces in Submitochondrial Particles.

Prior to studies on the effect of TFP on oxidative phosphorylation of submitochondrial particles, it was first necessary to determine its effect on the respiration and electrochemical H^+ gradients of such preparations. Also, the distribution of TFP between submitochondrial particles and the external water space was determined. TFP produced a marked inhibition of the aerobic oxidation of NADH (25 μM inhibited by about 50 %). The oxidation of succinate was also inhibited, but to a much lower extent i.e. 25 μM TFP diminished oxygen uptake by about 10 % (not shown).

Attempts were made to determine the effect of TFP on the electrical potential with oxonol VI. No reliable measurements were obtained with this methodology due to complex formation between TFP and oxonol. To circumvent the problem, the effect of TFP on the ratio of ATP hydrolyzed per NADP reduced in the ATP supported transhydrogenase reaction (Ernster and Lee, 1967) was determined. The rationale was that a lack of effect of TFP (or any other agent) in the ratio of ATP hydrolyzed per NADPH formed would be indicative that energy is not dissipated. On the other hand, energy leaks would produce a lower availability of H^+ gradients for reduction of NADP, and in consequence, an increase in the ratio of ATP hydrolyzed per

NADP reduced. The reliability of the method is shown in Figure 4 A. When the transhydrogenase reaction and ATP hydrolysis were measured under identical conditions at various rates of ATP hydrolysis as controlled by substrate concentration, the ratio of ATP hydrolyzed per NADP reduced was constant. This indicated that the rate of the transhydrogenase reaction was governed by the rate of ATP hydrolysis. The effect of increasing concentrations of TFP on the energy-dependent transhydrogenase reaction supported by ATP hydrolysis at pH 7.4 and 8.8 is shown in Figures 4, B and C. The ratio of NADPH formed per ATP hydrolyzed was higher at pH 8.8 than at pH 7.4. However, at the two pH TFP decreased the ATP driven reduction of NADP (Fig. 4 A). Up to 15 μ M TFP, this was mostly a consequence of inhibition of ATP hydrolysis, since there was a nearly constant ratio of ATP hydrolyzed per NADPH formed. At TFP concentrations higher than 15 μ M, the ratio increased. Thus, depending on its concentration, TFP exerts two effects: i) at concentrations lower than 15 μ M, TFP inhibits ATP hydrolysis, and in consequence there is a diminution in NADPH formation. ii) at TFP concentrations higher than 15 μ M, TFP also exerts an uncoupling effect; this was evidenced by the increase in the ratio of ATP hydrolyzed/NADP reduced. It is noted that these two effects of TFP are reversible by dilution (not shown).

The partition of several anaesthetic drugs into lipid bilayers increases with increasing pH (Miyasaki et al., 1992); this has been attributed to an enrichment of the membranous space with the nonprotonated molecules. To explore if the effects of TFP on the ATPase complex could be related to its concentration in the membrane or in the water space of submitochondrial particles, the distribution of a fixed concentration of TFP was determined at pH 7.4 and 8.8 at several concentrations of particles (Fig. 5). It was found

that at the two pH, the differences in the distribution of TFP in the two spaces were not statistically significant (Fig. 5, A and B). Note that as particle concentration was increased, there was a dilution of TFP in the particulate space, and in consequence, TFP concentration in the two spaces decreased. This is of importance in studies on the inhibition of ATP synthesis by TFP. In fact, the inhibition of oxidative phosphorylation by 40 μM TFP diminished as the concentration of the particles increases (Fig. 5 C).

Effect of TFP on Oxidative Phosphorylation.

The results described in the previous section were used for standardizing the conditions for studying the effect of TFP on oxidative phosphorylation. This was determined with succinate as substrate at a concentration of particles of 100 μg per mL. In addition, to avoid an uncoupling action of TFP, the experiments on oxidative phosphorylation were carried out at TFP concentrations lower than 15 μM .

Figure 6 shows the effect of TFP on oxidative phosphorylation by submitochondrial particles at pH 7.4 with 1.25 and 20 mM Pi, and at pH 8.8 with 20 mM Pi. At pH 7.4, inhibition of oxidative phosphorylation by TFP was higher with 1.25 mM than with 20 mM Pi. At pH 8.8 and 20 mM Pi, TFP inhibited oxidative phosphorylation more effectively than at pH 7.4. In experiments not shown it was observed that at pH 8.8, the percent inhibition of oxidative phosphorylation by various concentrations of TFP was markedly similar with 1 and 20 mM Pi in the reaction media. In this respect, it is pointed out that at pH 7.4, 1.25 and 20 mM total Pi have 0.49 and 7.85 mM H_2PO_4^- respectively, whereas at pH 8.8, the respective H_2PO_4^- concentrations are 0.02 and 0.49 mM. Thus, it is possible that the absence of an effect of H_2PO_4^- on the inhibition of oxidative phosphorylation produced

by TFP at pH 8.8 is due to the relatively low concentrations of H_2PO_4^- that were achieved at this pH.

An additional point in the data in Figure 6 is that with 0.49 mM H_2PO_4^- (with 1.25 mM total Pi at pH 7.4, and 20 mM total Pi at pH 8.8), inhibition was higher at pH 8.8. Thus at pH 8.8, irrespectively of the overall concentration of Pi or H_2PO_4^- , TFP inhibited oxidative phosphorylation more effectively than at pH 7.4.

Studies of the kinetics of the effect of TFP on oxidative phosphorylation at various concentrations of Pi showed that TFP exerted a mixed type of inhibition. At pH 8.8, the main modification was on the V_{max} ; at pH 7.4, the change in V_{max} was much lower. However, at pH 7.4 and 8.8, TFP increased the K_m for Pi (or H_2PO_4^-) by a factor of two (Table III). Hence, a common feature of TFP at the two pH is that TFP competes with H_2PO_4^- in particulate F_1 .

H_2PO_4^- as Substrate for Oxidative Phosphorylation.

In view of the relation between TFP and H_2PO_4^- , it was of interest to explore if this species is the true substrate for oxidative phosphorylation. In the experiment of Figure 7, Pi uptake in oxidative phosphorylation was measured at pH 7.4, 8.0 and 8.8 and various Pi concentrations. When Pi uptake was plotted as function of the overall concentration of Pi, the curves at the three pH were markedly different (Fig. 7A). From Lineweaver-Burk plots, the calculated K_m for total Pi at pH 7.4, 8.0 and 8.8 were 0.6, 1.5 and 4.9 mM respectively. In contrast, when Pi uptake at pH 7.4 and 8.0 was plotted against H_2PO_4^- concentration, there was an overlapping of the points of the curves at pH 7.4 and 8.0 (Fig. 7B). The points obtained at pH 8.8 fell on a different curve. However at pH 7.4, 8.0 and 8.8, the K_m for H_2PO_4^- were in

the same range i.e. 0.2, 0.2 and 0.1 mM respectively. These results are strongly suggestive that H_2PO_4^- is the species of preference in oxidative phosphorylation.

DISCUSSION

Effect of pH on the Inhibitory Action of TFP.

The studies on the effect of TFP on ATP synthesis and hydrolysis at various pH show that pH affects the action of TFP. For instance, inhibition of ATP synthesis in submitochondrial particles by TFP is lower at pH 7.4 than at pH 8.8. Furthermore, at pH 7.4 inhibition of synthesis and hydrolysis in submitochondrial particles run in parallel, whereas at pH 8.8 synthesis is more sensitive than hydrolysis. Also, it is noted that an increase in pH produces a higher inhibition of ATP synthesis in submitochondrial particles, but a lower inhibition of soluble F_1 . Since at the two pH the K_i of TFP for soluble F_1 is nearly the same, the lower inhibition by TFP of F_1 at pH 8.8 would not seem to be due to differences in the protonation state of TFP; rather the differences in inhibition would be due to changes in the protonation of the enzyme. Also it was found that partition factors cannot account for the different sensitivity to TFP, since in submitochondrial particles the concentrations of TFP in the particles and the external water space did not vary with pH. In consequence, it would appear that the F_0F_1 complex has different characteristics at the two pH, and that these affect the response of the enzyme to TFP.

Relation Between TFP and H_2PO_4^- in hydrolysis and synthesis of ATP.

Albeit there are differences in the action of TFP on the F_0F_1 complex at

pH 7.4 and 8.8, the interplay between Pi and TFP is maintained at the two pH: i) at the two pH, equal concentrations of H_2PO_4^- produce almost identical protection against TFP action in ATP hydrolysis by soluble F_1 , and ii) at the two pH, TFP increases by about two-fold the K_m for H_2PO_4^- in oxidative phosphorylation. Taken together these findings strongly suggest that TFP and H_2PO_4^- interact with the same locus of the F_1 portion. From measurements of Pi binding to soluble F_1 from bovine mitochondria (Kasahara and Penefsky, 1978) and *E. coli* (Al-Shawi and Senior, 1992), it has been proposed that H_2PO_4^- is the preferred substrate for oxidative phosphorylation. Further evidence for this proposal is now provided by the direct measurement of oxidative phosphorylation in submitochondrial particles at several pH (Fig. 7). Thus, these data suggest that TFP acts on the catalytic sites of soluble and particulate F_1 , and that these sites are involved in both, synthesis and hydrolysis of ATP. In this respect it is also noted that some amphipatic cations diminish derivatization by DCCD of the glutamate 199 which is at the catalytic site (Laikind et al., 1982; Bullough et al., 1985; Bullough et al., 1989), and that quinacrine mustard, one of these amphipatic cations, also interferes with ADP binding at the catalytic site (Laikind and Allison, 1983). However, Kasahara and Penefsky (1978) showed that in F_1 there are two clearly distinguishable Pi binding sites, one of which does not appear to be catalytic. In consequence, it is possible that by binding to the latter site, TFP affects the catalytic properties of F_1 . In this respect, it is worth noting that the recently described (Abrahams et al., 1994) crystal structure of F_1 shows that in the C-terminal region of the β -subunit which is in close contact with the γ -subunit and far from the catalytic site, lies a region that may bind amphipatic cations.

Effect of TFP on ATP Synthesis and Hydrolysis.

The site with which TFP interacts becomes of particular relevance if it is considered that the inhibition of hydrolysis by TFP is not total, the partial effect being more apparent in soluble F_1 at pH 8.8. Furthermore, at pH 8.8, equivalent concentrations of TFP produce a partial inhibition of ATPase activity and a higher inhibition of synthesis. It is possible that the inhibition of oxidative phosphorylation by TFP results from its interaction with sites other than those in F_1 . Indeed, the sigmoidal type of inhibition as a function of TFP concentration of ATP hydrolysis and synthesis in submitochondrial particles at pH 7.4 (Figs. 1 and 6), the lower protection achieved by P_i in F_0F_1 (Figs. 1,6; Table III) than in soluble F_1 (Figs. 2, 3), together with findings (Dabbeni-Sala and Palatini, 1990; Dabbeni-Sala, et al., 1990) that show that photomodified TFP covalently bound to the F_0 portion of a reconstituted system inhibits hydrolysis, argue in favor of this possibility. However, the questions that remain are why the inhibition of ATPase activity by TFP is partial, and why in submitochondrial particles a partial inhibition of ATP hydrolysis is accompanied by a higher inhibition of synthesis at pH 8.8.

A different sensitivity of phosphorylation and hydrolysis to increasing concentrations of various inhibitors has been described (Robertson et al., 1968; Linnett and Beechey, 1979; Matsuno-Yagi and Hatefi, 1984; Van Der Bend et al., 1985). However, with the exception of AMP-PNP and IMP-PNP (Penefsky, 1974; Schuster et al., 1976) high concentrations of the inhibitors produce almost full inhibition of ATP synthesis and hydrolysis. This is not the case for TFP i.e. at pH 8.8, inhibition of hydrolysis in soluble F_1 levels off at about 40% of the activity of the control. Thus it would appear that the interaction of TFP with the F_0F_1 complex results in an enzyme in which the

events that lead to ATP synthesis are more seriously impaired than those involved in hydrolysis. Further studies on the mechanism of action of TFP should shed light on the interrelation between the catalytic sites of F₁.

AKNOWLEDGMENTS: This work was supported by a grant from the Dirección General de Apoyo al Personal Académico, UNAM, México.

REFERENCES

- Abrahams, J.P., Leslie, A. G., Lutter, R. and Walker, J. E. (1994) *Nature* **370**, 621-628.
- Al-Shawi, M. K and Senior, A. E. (1992) *Biochemistry* **31**, 878-885.
- Beltrán, C., Tuena de Gómez-Puyou, M., Darszon, A. and Gómez-Puyou, A. (1986) *Eur. J. Biochem.* **160**, 163-168.
- Bullough, D. A., Kwan, M, Laikind, P. K., Yoshida, M and Allison, W. S. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.* **236**, 567-575.
- Bullough, D. A., Verburg, J. G., Yoshida, M. and Allison, W. S. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 11675-11683.
- Bullough, D. A., Ceccarelli, E. A., Verburg, J. G. and Allison, W.S. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 9155-9163.
- Capaldi, R. A., Aggeler, R., Gogol, E. P. and Wilkens, S. (1992) *J. Bioenerg. Biomemb.* **24**, 435-439.
- Cross, R. L. and Nalin, C. M. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 2874-2881.
- Chazotte, B., Vanderkooi, G. and Chignell, D. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* **680**, 310-316.
- Dabbeni-Sala, F. and Palatini, P. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1015**, 248-252.
- Dabbeni-Sala, F., Schiavo, G. and Palatini, P. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*

1026, 117-125.

de Meis, L. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 6090-6097.

de Meis, L., Tuena de Gómez-Puyou, M. and Gómez-Puyou, A. (1988)
Eur. J. Biochem. **171**, 343-349.

Ernster, L. and Lee, C. P. (1967) *Methods Enzymol.* **10**, 738-744.

Ferguson, S. J, Lloyd, W. J. and Radda, G. K. (1976) *Biochem. J.* **159**, 347-353.

Fromme, P. and Gräber, P. (1989) *FEBS Letters* **259**, 33-36.

Futai, M., Noumi, T. and Maeda, M. (1989) *Annu. Rev. Biochem* **58**, 111-136.,

Grubmeyer, Ch. and Penefsky, H. S. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 3718-3727.

Hackney, D. D. and Boyer, P. D. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 3164-3170

Hermolin, J. and Fillingame, R. H. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 3896-3903.

Jault, J. M. and Allison, W. S. (1993) *J. Biol. Chem* **268**, 1558-1566.

Kasahara, M. and Penefsky, H. S. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 4180-4187.

Kresheck, G. C., Adade, A. B. and Vanderkooi, G. (1985) *Biochemistry* **24**,
1715-1719.

Laikind, P. K. and Allison, W. S. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 11700-11704.

Laikind, P. K., Goldenberg, T. M. and Allison, W. S. (1982) *Biochem. Biophys.*
Res.Com. **109**, 423-427.

Leatherbarrow, R. J. (1987) ENZFITTER. Nonlinear Regression Data
Analysis Program. Elsevier Science Publishers BV.

Linnet, P. E. and Beechey, R. B. (1979) *Methods Enzymol.* **55**, 472-518.

Low, H. and Vallin, I. (1963) *Biochim. Biophys. Acta.* **69**, 361-374.

Lowry, O. H.; Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Rondull, R. J. (1951) *J. Biol.*
Chem. **193**, 265-275.

Martins, O. B., Gómez-Puyou, A. and Tuena de Gómez-Puyou, M. (1988)
Biophys.Chem. **29**, 111-117.

- Martins, O. B., Salgado-Martins, I., Grieco, M. A., Gómez-Puyou, A. and Tuena de Gómez-Puyou, M. (1992) *Biochemistry* **31**, 5784-5790.
- Matsuno-Yagi, A. and Hatefi, Y. (1984) *Biochemistry* **23**, 3508-3514.
- McLennan, D. H. and Tzagoloff, A. (1968) *Biochemistry* **7**, 1603-1610.
- Miyasaki, J., Hideg, K. and Marsh, D. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1103**, 62-68.
- Palatini, P. (1982) *Mol. Pharm.* **21**, 415-421.
- Pedersen, P. L. and Amzel, L. M. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 9937-9940.
- Penefsky, H. S. (1974) *J. Biol. Chem.* **249**, 3579-3585.
- Penefsky, H. S. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 6020-6022.
- Pullman, M. E., Penefsky, H. S., Datta, A. and Racker, E. (1960) *J. Biol. Chem.* **235**, 3322-3329.
- Robertson, A. M., Holloway, C. T., Knight, I. G. and Beechey, R. B. (1968) *Biochem. J.* **108**, 445-456.
- Schuster, S. M., Gerstchen, R. J. and Lardy, H. A. (1976) *J. Biol. Chem.* **251**, 6705-6710.
- Van Der Bend, R. L., Duetz, W., Colen, A. M., Van Dam, K. and Berden, J. A. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.* **241**, 461-467.
- Vanderkooi, G. and Adade, A. (1986) *Biochemistry* **25**, 7118-7124.
- Vanderkooi, G., Shaw, J., Storms, C., Vennerstrom, R. and Chignell, D. (1981) *Biochim. Biophys. Acta.* **635**, 200-203.
- Vázquez-Laslop, N., Ramírez, J. and Dreyfus, G. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 17064-17068.
- Walker, E., Saraste, M. and Gay, N. J. (1982) *Nature* **26**, 867-869.
- Weber, J., Lücken, U. and Schäfer, G. (1985) *Eur. J. Biochem.* **148**, 41-47.

TABLE I. Dissociation Constants for TFP as Inhibitor of ATP Hydrolysis by Soluble F_1 ^a

Activity	pH	Kd (μ M)	residual activity factor (β)
F_1 -ATPase	7.4	15	0.17
F_1 -ATPase	7.4	50	0.40
+ Pi 40 mM			
F_1 -ATPase	8.8	11	0.34
F_1 -ATPase	8.8	11	0.53
+ Pi 40 mM			

a Experimental data from Figure 2 were fitted by nonlinear regression analysis in the model of noncompetitive partial inhibition described under Methods. In the presence of Pi the values are apparent.

Table II. Kinetic Constants for Soluble F₁-ATPase With Different Concentrations of TFP at pH 7.4 and 8.8. ^a

pH	[TFP] (μ M)	K _m for ATP (mM)	V _{max} (μ mol/min mg)
7.4	0	0.2	52
7.4	5	0.2	41
7.4	20	0.1	25
7.4	40	0.1	19
7.4	50	0.1	18
8.8	0	0.2	56
8.8	5	0.2	45
8.8	20	0.1	30
8.8	40	0.2	26

^a ATPase activities were measured as described under Methods at the indicated pH and TFP concentrations, and Mg²⁺-ATP concentrations that ranged between 0.1 to 1.0 mM. K_m and V_{max} were calculated from Lineweaver-Burk plots.

Table III. Effect of TFP on the Kinetic Constants for Pi and H₂PO₄⁻ in Oxidative Phosphorylation at Different pH. ^a

pH	[TFP] (μ M)	K _m for Pi (mM)	K _m for H ₂ PO ₄ ⁻ (mM)	V _{max} (nmol/min mg)
7.4	0	0.5	0.2	116
7.4	14	1.2	0.5	103
8.8	0	4.4	0.1	67
8.8	14	9.6	0.2	35

^a Oxidative phosphorylation was assayed as described under Methods at the indicated pH in a Pi concentration range that varied between 0.5 and 20 mM at pH 7.4, and between 2 and 40 mM at pH 8.8. K_m and V_{max} values were calculated from Lineweaver-Burk plots.

LEGENDS TO FIGURES.

FIGURE 1 Inhibition of ATPase activity of submitochondrial particles by TFP at pH 7.4 and 8.8. Protection by Pi. A: ATPase activity was measured at pH 7.4 with increasing concentrations of TFP, in the presence (o-o, 100% = 0.165 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$) and in the absence (●-●, 100% = 0.21 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$) of 40 mM Pi. B: ATPase activity measured at pH 8.8, with (o-o, 100% = 0.337 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$) and without (o-o, 0.244 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$) 40 mM Pi.

FIGURE 2. Inhibition of ATPase activity of soluble F_1 by TFP at pH 7.4 and pH 8.8. Protection with Pi. A: ATPase was assayed at pH 7.4 and the indicated concentrations of TFP, with (o-o, 100% = 34 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$) and without (●-●, 100% = 48 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$) 40 mM Pi. B: ATPase activity was assayed at pH 8.8 in the presence (o-o, 100% = 38 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$) and in the absence (●-●, 100% = 51 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$) of 40 mM Pi.

FIGURE 3. Reversal of the inhibition of F_1 ATPase activity by TFP with Pi at pH 7.0 and 8.0. F_1 -ATPase activity was measured in the presence of 25 μM of TFP at pH 7.0 (●-●, 100% without TFP = 53 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$) or at pH 8.0 (o-o, 100% = 59 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$) with increasing concentrations of Pi. The plot depicts the percent of inhibition of ATPase activity by 25 μM TFP against the concentration of H_2PO_4^- at both pH. Inset: percent inhibition plotted against the total Pi concentration.

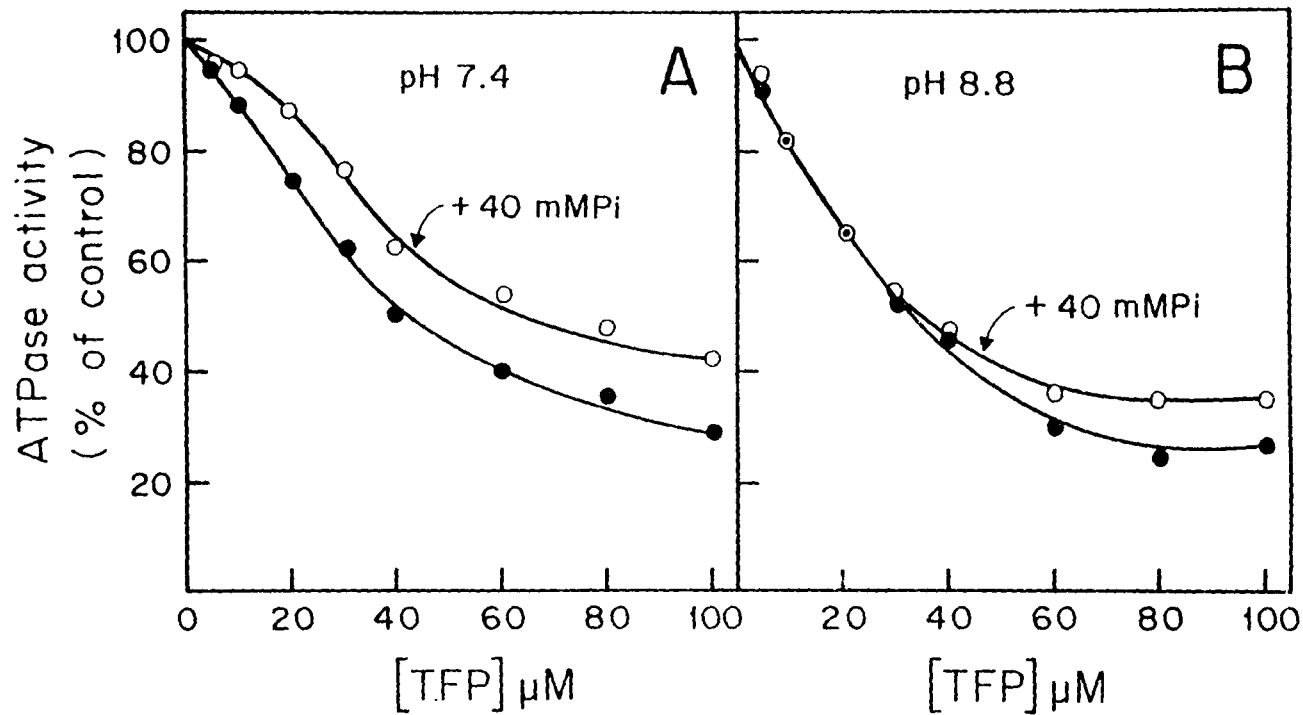
FIGURE 4. Degree of coupling between ATPase and ATP dependent transhydrogenase activities in submitochondrial particles at various ATP and TFP concentrations. A: ATPase and ATP-dependent transhydrogenase (TH)

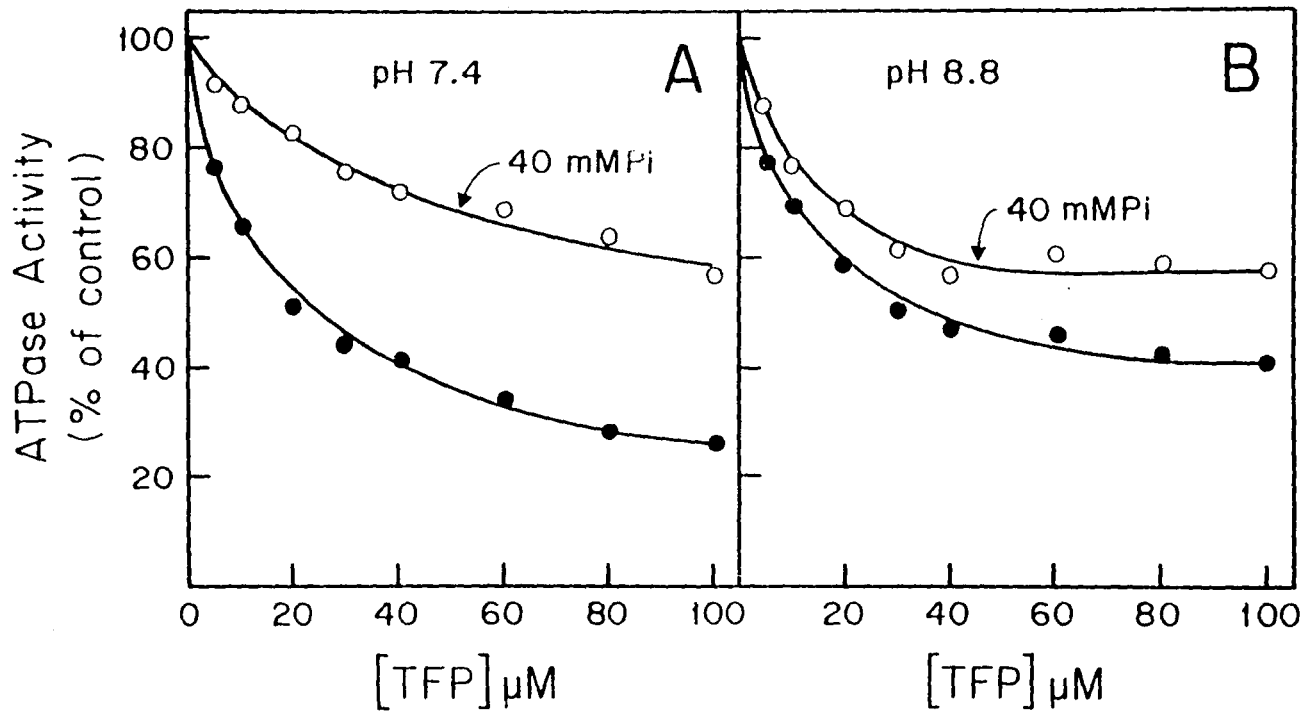
activities were measured as described in methods, at different Mg^{2+} -ATP concentrations, at pH 8.8. B: ATPase (●-●, 100% = 0.21 μ mol/min mg) and transhydrogenase (o-o, 100% = 10.2 nmol/min mg) activities were measured at pH 7.4, with 3 mM Mg^{2+} -ATP at the indicated TFP concentrations. C: ATPase (●-●, 100% = 0.373 μ mol/min mg) and transhydrogenase (o-o, 100% = 8.8 nmol/min mg) were measured at pH 8.8 with increasing TFP concentrations. All activities were measured in the presence of 20 mM Pi. The ATP independent transhydrogenase activities (with FCCP 1 μ M) were subtracted from the total activities. Thus the reported transhydrogenase activities are ATP dependent.

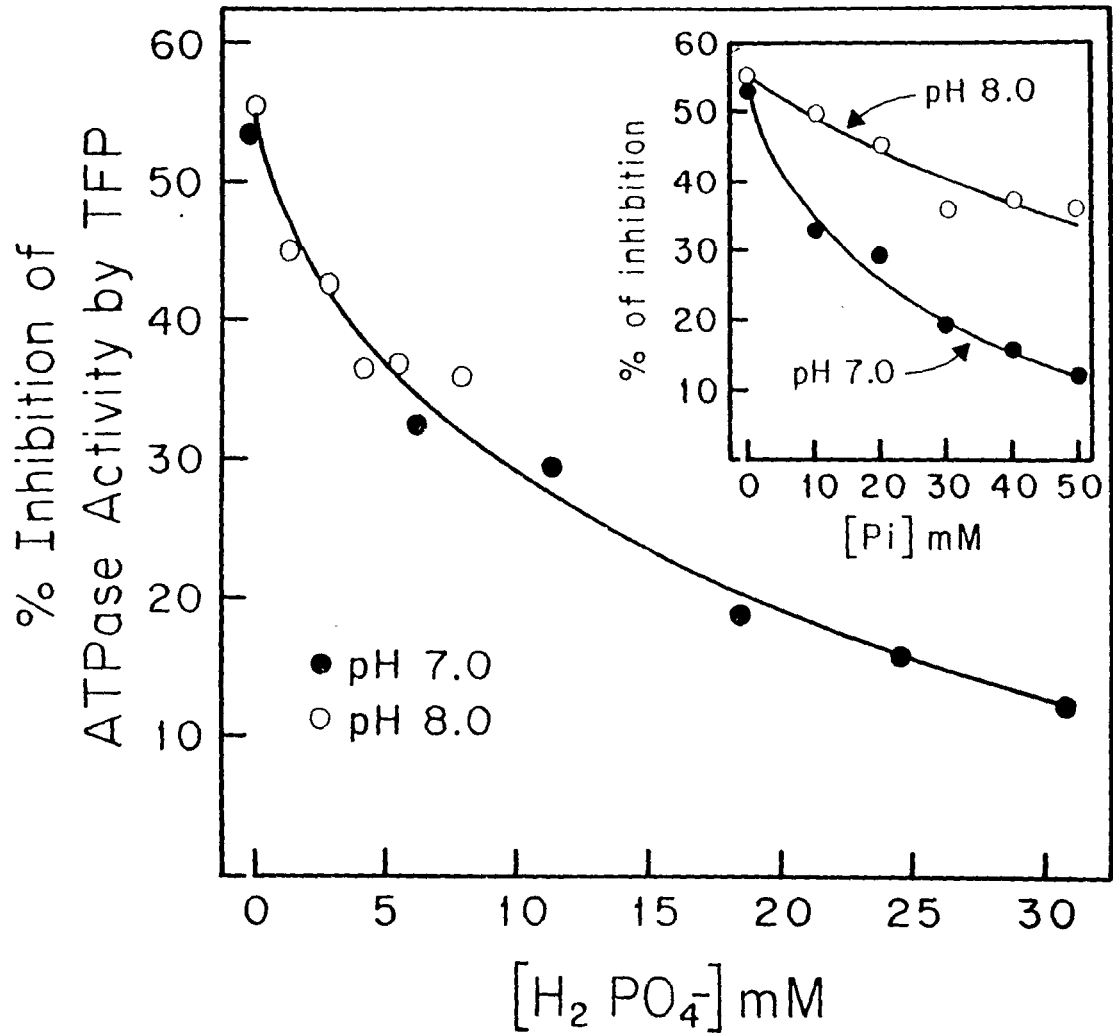
FIGURE 5. Effect of the concentration of submitochondrial particles (SMP) on the distribution of TFP and on the inhibition of oxidative phosphorylation. A: Free (●-●) and SMP bound (o-o) TFP at pH 7.4 with increasing concentrations of SMP. B: same as in A, but the pH was 8.8. Standard deviations are shown only for the measured parameter (free TFP) in four (A) and three (B) separate determinations. C: Oxidative phosphorylation was measured in the presence of 40 μ M TFP with increasing concentrations of SMP at pH 7.4. 100% of activity (without TFP) was constant (87 nmol/min mg) at the different submitochondrial particles concentrations.

FIGURE 6. Inhibition of oxidative phosphorylation by TFP at pH 7.4 and pH 8.8. Oxidative phosphorylation was measured in submitochondrial particles as described under methods in the following conditions: pH 7.4 and 20 mM Pi (●-●, 100% = 125 nmol/min mg); pH 7.4 and 1.25 mM Pi (o-o, 88 nmol/min mg); pH 8.8 and 20 mM Pi (Δ - Δ , 100% = 81 nmol/min mg).

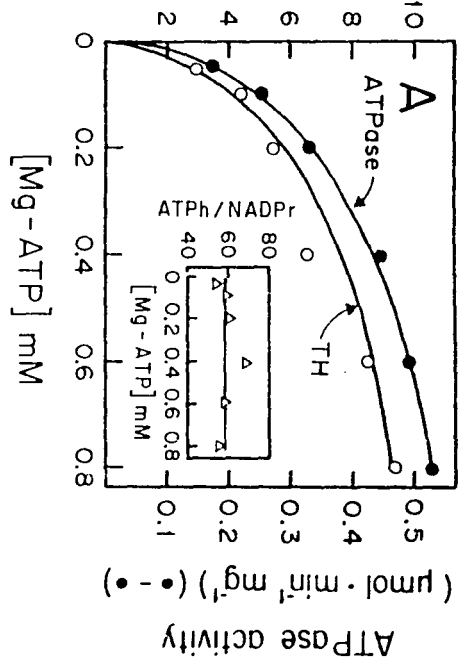
FIGURE 7. Oxidative phosphorylation at different pH and Pi concentrations. Oxidative phosphorylation was measured in submitochondrial particles as described under methods at the Pi concentration and pH shown. The ratio of phosphorylation velocity (V) over Vmax (V/Vmax) was plotted vs. total Pi (left) or against the concentration of H_2PO_4^- (right). (●-●) pH 7.4; (o-o) pH 8.0; (Δ - Δ) pH 8.8. For the values of K_m see text.



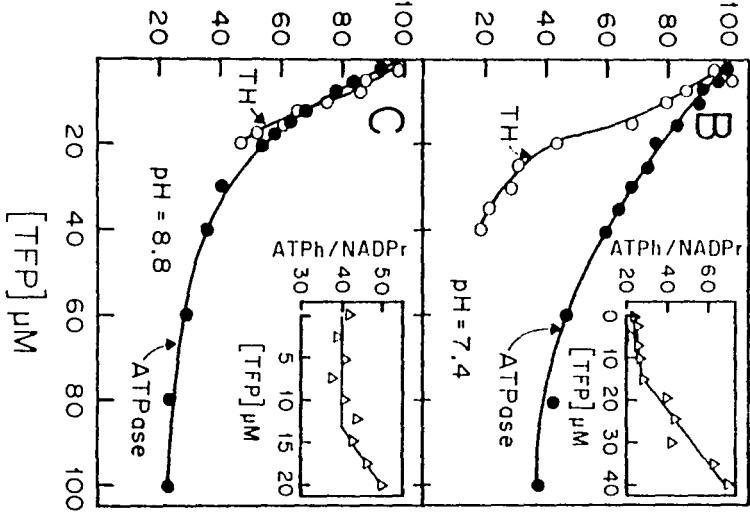




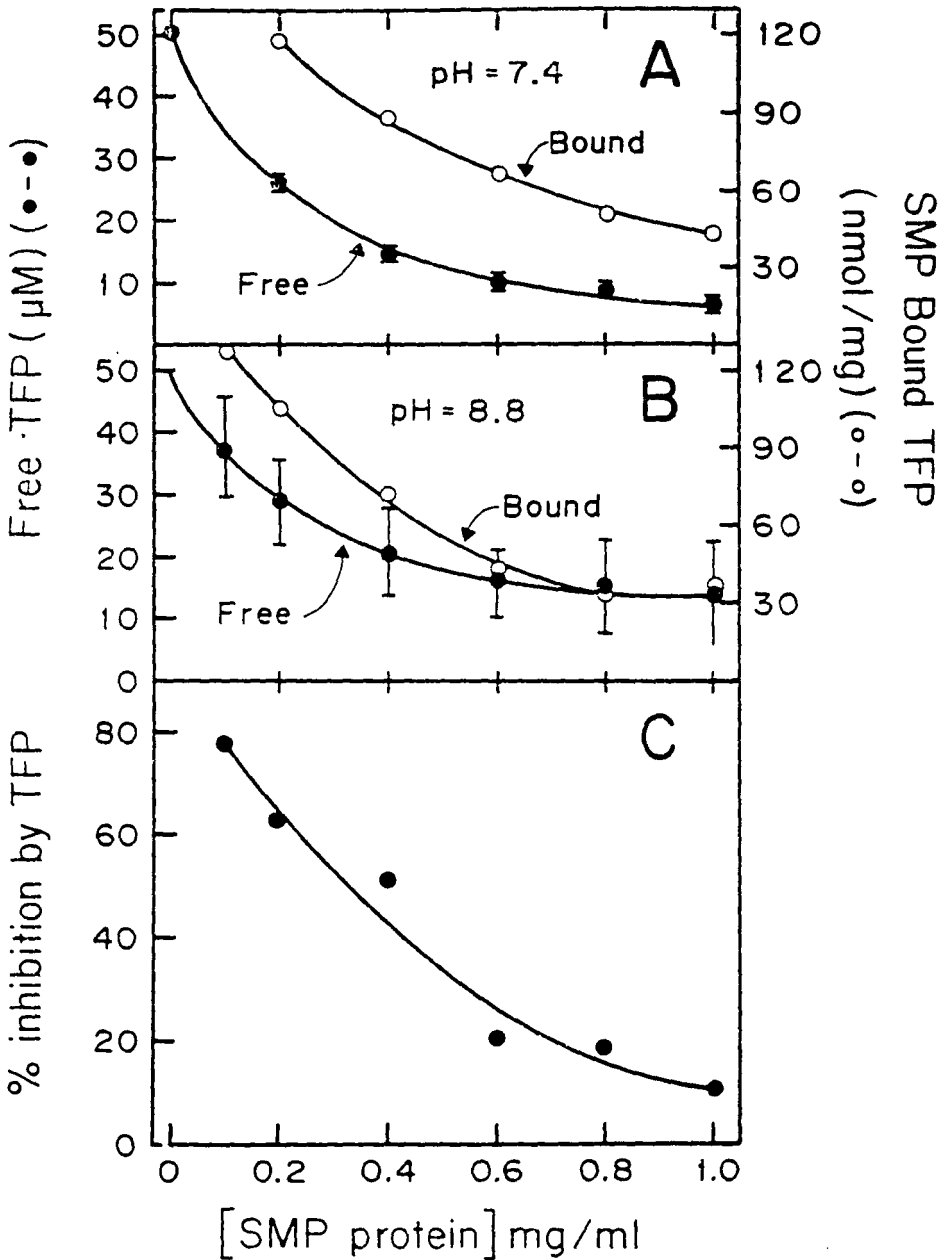
Transhydrogenase Activity
($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) ($\circ - \circ$)



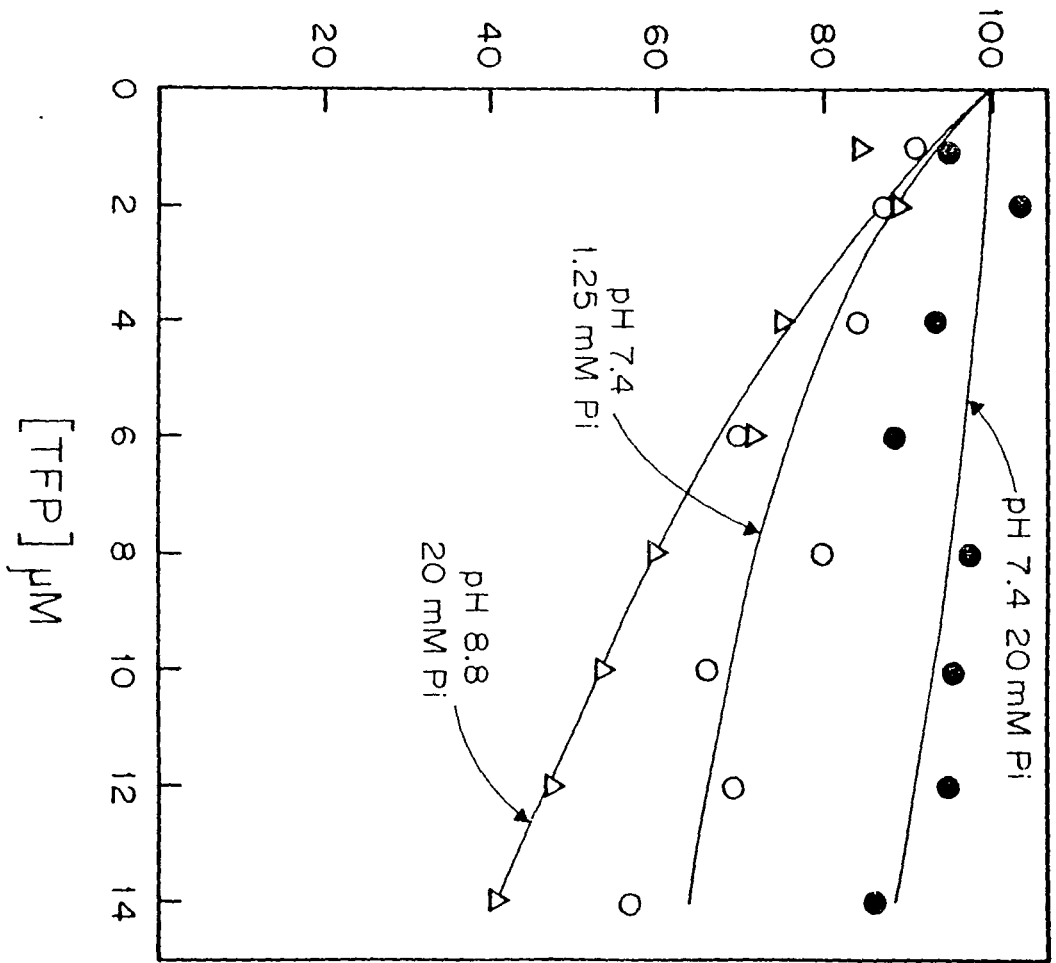
ATPase and Transhydrogenase
activities (% of control)

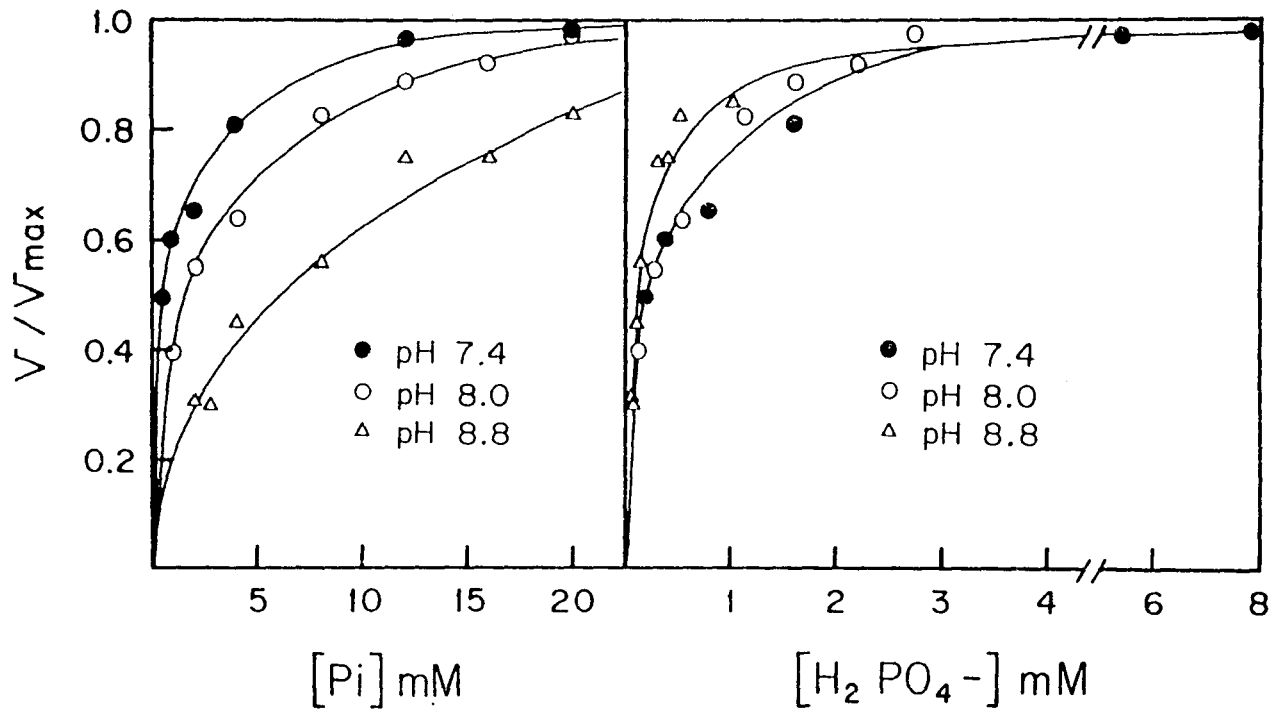


Pi Uptake



Pi Uptake (% of control)





CONCLUSIONES

- La F_1 ATPasa mantiene una actividad residual en presencia de concentraciones saturantes de TFP.
- La TFP no compite con el Mg^{2+} -ATP en la F_1 soluble.
- La TFP compite con el $H_2PO_4^-$ en la F_1 soluble y particulada.
- El $H_2PO_4^-$ es la especie del Pi que el complejo F_0F_1 usa como sustrato preferencial para sintetizar ATP.
- Debido a las dos conclusiones previas es muy posible que la TFP compita con el $H_2PO_4^-$ en los sitios catalíticos.
- La TFP se une inhibitoriamente al complejo F_0F_1 , en sitio de $H_2PO_4^-$ y en otros sitios posiblemente localizados en F_0 .

REFERENCIAS

- Abrahams, J.P., Leslie, A.G., Lutter, R. y Walker, J.E. (1994) *Nature* 370:621-628.
- Adade, A., Chignell, D. y Vanderkooi, G. (1984) *J. Bioenerg. Biomemb.* 16:353-363.
- Al Shawi, M.K. y Senior, A.E. (1992) *Biochemistry* 31:878-885.
- Al-Shawi, M.K., Parsonaje, D. y Senior, A.E. (1990) *J. Biol. Chem.* 265:4402-4410.
- Andrews, W.W., Hill, F.C. y Allison, W.S. (1984) *J. Biol. Chem.* 259: 143678-14382.
- Avetisyan, A.V., Bogachev, A.V., Murtasina, R.A. y Skulachev, V.P. (1993) *FEBS Letters* 317:267-270.
- Becher, B. y Müller, V. (1994) *J. Bacteriol.* 176:2543-2550.
- Bianchet, M.A., Amzel, L.M., Hüllihen, J. y Pedersen, P.L. (1993) II Congreso Iberoamericano de Biofísica. Programa y resúmenes, p. 48.
- Bianchet, M., Ysern, X., Hüllihen, J., Pedersen, P.L. y Amzel, M. (1991) *J. Biol. Chem.* 266:21197-21201.
- Boekema, E.J. y Bötcher, B. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1098:131-143.
- Boekema, E.J., Xiao, J. y McCarty, R.E. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1020:49-56.

- Boyer, P.D. (1989) *FASEB Journal* 3:2164-2178.
- Bullough, D.A. y Allison, W.S. (1986) *J. Biol. Chem.* 261:14171-14177.
- Bullough, D.A., Brown, E.L., Saario, J.D. y Allison, W.S. (1988) *J. Biol. Chem.* 263:14053-14060.
- Bullough, D.A., Verburg, J.G., Yoshida, M. y Allison, W.S. (1987) *J. Biol. Chem.* 262:11675-11683.
- Capaldi, R.A., Aggeler, R., Turina, P. y Wilkens, S. (1992) 7th European Bioenergetics Conference, EBEC Short Reports 7:107.
- Capaldi, R.A., Aggeler, R., Turina, P. y Wilkens, S. (1994) *TIBS* 19:284-289.
- Cross, R.L.(1994) *Nature* 370:594-595.
- Cross, R. L. y Nalin, C. M. (1982) *J. Biol. Chem.* 257:2874-2881.
- Cross, R.L, Cunningham, D., Miller, Ch. D., Xue, Z., Zhou, J.-M. and Boyer, P.D. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5715-5719.
- de Meis, L., Tuena de Gómez-Puyou, M. y Gómez-Puyou, A. (1988) *Eur. J. Biochem.* 171:343-349.
- Dabbeni-Sala, F. y Palatini, P. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1015:248-252.
- Dunn, S. (1992) *J. Biol. Chem.* 267: 7630-7636
- Dunn, S.D. y Futai, M. (1979) *J. Biol. Chem.* 255: 113-118.
- Ebel, R.E. y Lardy, H. A. (1975) *J. Biol. Chem.* 250:4992-4995
- Efoc, B.J.S. y Webster, D.A. (1992) *Arch. Biochem. Biophys.* 292:102-106.
- Esch, F.S., Böhlen, P., Otsuka, A.S., Yoshida, M y Allison, W.S.(1984) *J. Biol. Chem.* 256:9084-9089.
- Ferguson, S.J, Lloyd, W.J. y Radda, G.K. (1976) *Biochem. J.* 159:347-353
- Fersht, A. (1977) *Chemical catalysis*. en "Enzyme structure and mechanism" Segunda edición. W.H. Freeman and Company, New York.
- Garin, J., Boulay, F., Issartel, J.P., Lunardi, J. y Vignais, P.V. (1986) *Biochemistry* 25:4431-4437.

- Fujiyama, Y., Yokoyama, K., Yoshida, M. y Wakabayashi, T. (1990) FEBS Letters 271:111-115.
- Futai, M., Noumi, T. y Maeda, M., (1989) Annu. Rev. Biochem. 58:111-136.
- Futai, M., Park, M.-Y., Iwamoto, A., Omote, H. y Maeda, M. (1994) Biochim. Biophys. Acta 1187:165-170.
- Garret., N.E. y Penefsky., (1975) J. Biol. Chem. 250:6640-6647.
- Girvin, M.E. y Fillingame, R.H. (1994) Biochemistry 33:665-674.
- Gómez-Puyou, A., Tuena de Gómez-Puyou, M. y Ernster, L. (1979) Biochim. Biophys. Acta 547:252-260.
- Grubmeyer, C., Cross, R.L. y Penefsky, H.S. (1982) J. Biol. Chem. 257:12092-12100.
- Grubmeyer, C. y Penefsky, H.S. (1981a) J. Biol. Chem. 256:3718-3727.
- Grubmeyer, C. y Penefsky, H. S. (1981b) J. Biol. Chem. 256:3728-3734.
- Hussian, I. y Harris, D.A. (1983) FEBS Letters 160:110-114.
- Hermolin, J. y Fillingame, R.H. (1989) J. Biol. Chem. 264:3896-3903.
- Hoffmann, A., Laubinger, W. y Dimroth, P. (1990) Biochim. Biophys. Acta 1018:206-210
- Jackson, P.J. y Harris, D.A. (1988) FEBS Letters 229:224-228
- Jault, J.-M. y Allison, W.S. (1993) J. Biol. Chem. 268:1558-1566.
- Johansson, B.C., Baltscheffsky, M. y Baltscheffsky, H (1973) Eur. J. Biochem. 10:109-117.
- Joshi, S. y Burrows, R. (1990) J. Biol. Chem. 265:14518-14525.
- Kasahara, M. y Penefsky, H.S. (1978) J. Biol. Chem. 253:4180-4187
- Kresheck, G., Adade, A. y Vanderkooi, G (1985) Biochemistry 24:1715-1719.
- Laikind, P.K. y Allison, W.S. (1983) J. Biol. Chem. 258:11700-11704
- Lauquin, G., Pougeois, R. y Vignais, P.V. (1980) Biochemistry 19:4620-4626.
- Lüben, M., Lücken, U., Weber, J. y Schäfer, G (1984) Eur. J. Biochem. 143:483-490.
- MacLennan, D.H. y Tzagoloff, A. (1968) Biochemistry 7:1603-1610

- Martins, O.B., Salgado-Martins, I., Grieco, M.A., Gómez-Puyou, A. y Tuena de Gómez-Puyou, M. (1992) *Biochemistry* 31:5784-5790.
- Martins, O.B., Tuena de Gómez-Puyou, M. y Gómez-Puyou, A. (1988) *Biochemistry* 27:7552-7558.
- Matsuno-Yagi, A. y Hatefi, Y. (1990) *J. Biol. Chem.* 265:82-88.
- Melese, T. y Boyer, P.D. (1985) *J. Biol. Chem.* 260:15398-15401.
- Milgrom, Y.M. (1991) *Eur. J. Biochem.* 200:789-795.
- Miller, M.J., Oldenburg, M y Fillingame, R.H. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4900-4904.
- Mitchell, P. (1961) *Nature* 191: 144-148
- Murataliev, M.B. y Boyer, P.D. (1994) *J. Biol Chem.* 269:15431-15439.
- Nakamoto, R. y Futai, M. (1994) *FASEB Journal* 8:A1296
- Negrin, R.S., Foster, D.L. and Fillingame, R.H. (1980) *J. Biol. Chem.* 255:5643-5648.
- Norwood, T.J., Crawford, D.A., Steventon, M.E., Driscoll, P.C. y Campbell, I.D. (1992) *Biochemistry* 31:6285-6290.
- Noumi, T., Maeda, M. y Futai, M. (1987) *FEBS Letters* 213:381-384.
- Noumi, T., Tagaya, M., Miki-Takeda, K., Maeda, M., Fukui, T. y Futai, M. (1987) *J. Biol. Chem.* 262:7686-7692.
- Palatini, P. (1982) *Mol. Pharm.* 21:415-421.
- Penefsky, H. S. (1974) *J. Biol. Chem.* 249: 3579-3585.
- Penefsky, H.S. y Cross, R.L. (1991) *Adv. Enzymol.* 64:173-214.
- Pullman, M.E. y Monroy, G.C. (1963) *J. Biol. Chem.* 238:3762-3769.
- Pullman, M.E., Penefsky, H.S., Datta, A. and Racker, E. (1960) *J. Biol. Chem.* 235:3322-3329.
- Reidlinger, J. y Müller, V. (1994) *Eur. J. Biochem.* 223:275-283.
- Rosling, J., Harris, D.A., Slater, E.C., y Kemp, A., Jr. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 376:13-26.

- Singer, P.T., Smalås, A., Carty, R.P., Mangel, W.F. y Sweet, R.M. (1993) *Science* 259:669-673.
- Tiedge, H., Schäfer, G. y Mayer, F (1983) *Eur. J. Biochem.* 132:37-45.
- Turina, P., Aggeler, R., Lee, R., Senior, A.E. y Capaldi, R. (1992) 7th European Bioenergetics Conference, EBEC Short Reports 7:107.
- Turina, P. y Capaldi, R.A. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:13465-13471.
- Vázquez-Laslop, N., Ramirez, J. y Dreyfus, G. (1989) *J. Biol. Chem.* 264:17064-17068.
- Vambutas, V.K. y Racker, E. (1965) *J. Biol. Chem.* 240:2660-2667.
- Weber, J., Lee, R.S., Wilke-Mounts, S., Grell, E. and Senior, A.E. (1993) 268: 6241-6247.
- Werner, L. y Dimroth, P. (1989) *Biochemistry* 28:7194-7198.
- Williams, N. y Coleman, P.S. (1982) *J. Biol. Chem.* 257:2834-2841.