

03081



Universidad Nacional Autónoma de México

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

5

PAPEL DEL Ca^{2+} EN LA REGULACION DE LA FOSFORILACION OXIDATIVA MITOCONDRIAL

POR:

RAFAEL MORENO SANCHEZ

T E S I S

ELABORADA PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORADO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA
ESPECIALIDAD BIOQUIMICA

MEXICO, D. F.



2002

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

[WHEN] "YOU HAVE NO NEW IDEAS, USE
A NEW INSTRUMENT"

E. RACKER

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Armando Gómez-Puyou en el Departamento de Bioenergética del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Me gustaría agradecer profundamente al Dr. Gómez-Puyou por su asesoría a lo largo del trabajo; sus observaciones y agudas críticas me enseñaron la forma como se deben plantear y analizar los experimentos. Además, en el laboratorio del Dr. Puyou siempre trabajé en un ambiente de cordialidad y amistad, algo que no es fácil de encontrar.

Agradezco igualmente a los Drs. Alberto Darszon, Edmundo Chávez, Mario Calcagno, Adolfo García-Sainz, Lourival Possani y Ana Ma. López Colomé, por sus observaciones acerca de la tesis y el trabajo experimental.

El trabajo artístico fue elaborado por el Sr. Arturo Franco Torres y el mecanográfico por la Sra. Concepción Rivera a quienes estoy también agradecido por la realización de estas tareas, indispensables para la terminación de la tesis.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE

Teoría de Control Metabólico -----	1
- Estado estacionario -----	1
- Modulación de la actividad enzimática (Tabla I) ---	3
- Identificación de las etapas de control -----	4
- Reacciones alejadas del equilibrio -----	5
- Teorema del entrecruzamiento -----	9
- Capacidades enzimáticas relativas -----	12
- Enzimas alostéricas -----	14
- Forma de la curva de inhibición -----	17
Una Nueva Teoría Sintética y Cantitativa de Control	
Metabólico -----	19
- Coeficiente de control de flujo -----	21
- Propiedad de la Sumatoria -----	22
- Coeficiente de elasticidad y propiedad de la	
conectividad -----	24
- Solución analítica para F y C_1 en una secuencia li-	
neal. -----	29
- Conceptualización del teorema de entrecruzamiento en	
la teoría de control -----	32
- Aplicación de la teoría de control en vías	
metabólicas específicas -----	33
- Objeciones al uso de inhibidores específicos -----	42
- Epílogo -----	43
Estructura y Composición Mitocondrial -----	44
Mecanismo de Síntesis de ATP -----	47
- Quimiosmosis localizada -----	49
- Estequiometría de la Fosforilación oxidativa -----	50
- Mecanismo cinético y químico de la síntesis de ATP -	
-----	53
Regulación de la Fosforilación Oxidativa Mitocondrial -----	54
- Hipótesis del quasi-equilibrio -----	55
- Hipótesis de la etapa limitante -----	58
- Hipótesis del control múltiple -----	62
- Función moduladora del Ca^{2+} en la fosforilación oxi-	
dativa -----	63
- Bibliografía -----	69

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Regulation of Oxidative Phosphorylation in Mitochondria by --- External Free Ca ²⁺ Concentrations (1985) J. Biol. Chem. <u>260</u> -- 4028-4034 -----	74
- Comentarios de los revisores -----	81
- Respuesta al editor -----	85
Contribution of the Translocator of Adenine Nucleotides and -- the ATP Synthase to the Control of Oxidative Phosphorylation - and Arsenylation in Liver Mitochondria (1985) J. Biol. Chem. - <u>en prensa.</u> -----	89
- Comentarios de los revisores -----	96
- Respuesta al editor -----	98
Discusión y Conclusiones Generales -----	100

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TEORIA DE CONTROL METABOLICO^a

La continua adaptación de la célula viva a los cambios ambientales es una condición indispensable para su preservación. La necesidad de mantener la constancia del medio intracelular u homeostasis celular requiere de mecanismos de control metabólico capaces de ajustar el funcionamiento celular a esos cambios externos. Una disminución en la capacidad de control acarrea el deterioro de las redes metabólicas y podría conducir al envejecimiento de la célula; en ese momento, la célula va de un estado ordenado a otro menos ordenado, aumentando la entropía. El sistema muere cuando termina por equilibrarse con el medio. Por lo tanto, cualquier vía metabólica y de hecho todo ser vivo, es un sistema abierto que siempre se encuentra alejado del equilibrio termodinámico, lo cual permite un flujo continuo de materia y energía.

ESTADO ESTACIONARIO

En una vía metabólica el sustrato inicial (S_0) proveniente del medio ambiente se transforma mediante una serie de reacciones enzimáticas en un producto (S_n) que regresa al medio (Fig. 1).

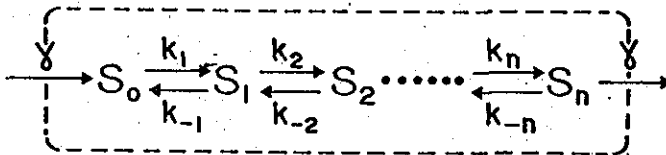


Figura 1. Esquema de una vía metabólica lineal. S se refiere a la concentración de cada intermediario; k es la constante de velocidad de cada reacción enzimática; γ es la constante de velocidad de la entrada de S_0 y de la salida de S_n .

Cuando la velocidad de entrada del sustrato inicial es igual a la velocidad de formación de producto, la vía se encuentra en el llamado estado es-

a. Parte de esta sección de la tesis fue publicada en: Mensaje Bioquímico, Vol. 8, pp97-143. Ed.Fc. de Medicina, UNAM, 1985.

tacionario. En dicho estado todas las enzimas de la vía trabajan a la misma velocidad y la concentración de todos los intermediarios es constante, aunque no de la misma magnitud. La expresión matemática del estado estacionario se puede definir como sigue:

$$v_i = F \quad (\text{I})$$

$$\frac{dS_i}{dt} = 0 \quad (\text{II})$$

donde v_i representa la velocidad de cualquier enzima, F la velocidad de formación del producto final o flujo metabólico, S_i la concentración de cualquier intermediario y t el tiempo.

¿Qué factores determinan el flujo de una vía metabólica?

El control del metabolismo se realiza a nivel de la actividad enzimática (1) excepto en unos pocos casos donde las reacciones no son catalizadas por enzimas. La actividad total de una enzima se puede alterar modificando el pH, la temperatura, las concentraciones de sustratos y productos ó la concentración de la enzima misma. Además, las enzimas alostéricas pueden cambiar su actividad por la presencia de moduladores específicos (Tabla I). El metabolismo celular también puede controlarse mediante señales externas como son los estímulos hormonales; las hormonas a través de mecanismos de regulación covalentes y no covalentes pueden modificar la actividad enzimática y de esta manera influir en el metabolismo.

En la mayoría de los seres vivos los cambios drásticos de pH (más de una unidad de pH) ó temperatura son raros ó inexistentes; los cambios en las concentraciones de sustratos, productos y cofactores son más frecuentes y como todos ellos son compartidos por diferentes vías, pueden considerarse como mecanismos de control. Además el transporte de metabolitos de un compartimento celular a otro puede modificar tremendamente sus concentraciones relativas (diluyéndolos ó concentrándolos) y en consecuencia el flujo metabólico.

TABLA I. MODULACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

A) MECANISMOS DE REGULACION NO COVALENTE

1. Concentraciones de sustratos y productos. Compartimentalización.
2. Alosterismo (Cooperatividad y modulación por moléculas pequeñas que se unen a sitios regulatorios: ATP/ADP, NADH/NAD⁺, acetyl CoA/CoA, etc.)
3. Interacciones proteína-proteína (polimerización de sub-unidades y agregación específica en complejos multienzimáticos)
4. Temperatura, pH y fuerza iónica.

B) MECANISMOS DE REGULACION COVALENTE

1. Fosforilación-desfosforilación
2. Transformación irreversible (Conversión de proenzimas en las formas activas mediante proteólisis limitada)
3. Síntesis y degradación de enzimas

C) MECANISMOS DE REGULACION HORMONAL

Sin embargo, el cambio en la concentración de algún metabolito solo podría alterar la actividad enzimática cuando estuviera por debajo de la K_m , donde la velocidad varía apreciablemente con la concentración de sustrato. Más aun, mediante el empleo de modelos matemáticos se ha llegado a la conclusión de que el secuestro de intermediarios no es un mecanismo verdadero de control, ya que el sustrato secuestrado se renueva inmediatamente a expensas del reservorio de metabolitos del mismo sistema. Por ejemplo una disminución de NADH afecta poco al flujo en el ciclo de Krebs debido a la acción compensatoria del par malato/oxaloacetato para forzar la reducción de NAD⁺ y disminuir la pérdida de NADH libre (2).

La célula modula principalmente la actividad metabólica mediante mecanismos más finos y efectivos de tal forma que los cambios producidos en una o dos enzimas repercuten en el flujo total de la vía metabólica. Este tipo de enzima llamada reguladora se ha definido como aquella cuyas propiedades son controladas por otros factores diferentes de las concentraciones de sustratos y productos y la cual es capaz de ejercer control significativo so-

bre la vía (3). Se han utilizado en la literatura otras acepciones como enzima marcapaso, etapa limitante, enzima clave o "cuello de botella", pero todas ellas implican una restricción exclusiva al control del flujo, lo cual no siempre sucede.

IDENTIFICACION DE LAS ETAPAS DE CONTROL

Existe una serie de criterios generales (3-5) utilizados para definir que enzimas determinan el flujo de una vía metabólica (Tabla II). Desde el punto de vista teleológico, el control debe ocurrir al inicio de la vía o después de una ramificación, para así evitar la existencia de segmentos largos no controlados del metabolismo y para obtener máxima economía. El uso de este enfoque no requiere experimentación sino simple inspección de la vía. Sin embargo, la mayoría de rutas metabólicas estudiadas esta suposición teleológica ha encontrado validez experimental.

TABLA II. CRITERIOS EXPERIMENTALES PARA LA IDENTIFICACION DE SITIOS DE CONTROL METABOLICO

1. Identificación de reacciones alejadas del equilibrio y de los puntos de entrecruzamiento

$$\frac{K_{AM} \text{ (constante de acción de masas)}}{K_{eq} \text{ (constante de equilibrio)}} < 0.2$$

2. Determinación de las capacidades enzimáticas relativas (enzimas lentas y rápidas)
3. Identificación y análisis de enzimas alostéricas
 - Tipo de cooperatividad
 - Moduladores alostéricos fisiológicos
4. Forma de la curva de inhibición: enzimas limitantes y en exceso.

El enfoque experimental mostrado en la Tabla II analiza las propiedades de las enzimas y de las reacciones de la vía. El primer criterio considera aspectos termodinámicos, donde aquellas enzimas que catalizan reacciones alejadas del equilibrio se clasifican como reguladoras.

Reacciones Alejadas del Equilibrio

Suponiendo que una ruta metabólica alcanzara el equilibrio termodinámico la constante de acción de masas $K_{AM} = \frac{[\text{productos}]}{[\text{sustratos}]}$ de cada reacción sería igual a la constante termodinámica de equilibrio K_{eq} y no podría existir flujo neto. Para obtener flujo a través de la vía, la reacción debe estar desplazada del equilibrio de modo que K_{AM} sea menor que K_{eq} . La amplitud del desplazamiento del equilibrio determinará la magnitud de la energía libre que impulsará la reacción hacia la formación neta del producto. El desplazamiento del equilibrio se distribuye entre las diferentes etapas de la vía metabólica de tal forma que siempre hay algunas de estas etapas funcionando más alejadas del equilibrio. Entonces las enzimas que catalizan las reacciones más cercanas al equilibrio deben poseer suficiente capacidad catalítica para poder igualar las velocidades de ida y vuelta, por lo cual no pueden ser consideradas como limitantes del flujo a través de la vía. Así el control del metabolismo mediante la alteración de una enzima debe ejercerse principalmente en aquellas reacciones más alejadas del equilibrio. Sin embargo, una enzima que cataliza una reacción que tiende al equilibrio puede llegar a convertirse en una enzima reguladora si ocurre una fuerte inhibición específica de su actividad. Más aún, si las reacciones en equilibrio responden a cambios en las concentraciones de cofactores, alterando las concentraciones de los intermediarios, pueden igualmente llegar a influir en la cinética de las reacciones en desequilibrio disminuyendo la inhibición por producto o incrementando la cooperatividad y de esta manera ejercer cierto control del flujo metabólico (3,6).

Mediante la utilización de este criterio de identificación de etapas de control (Tablas III y IV) se ha señalado que la glucólisis es controlada por el acarreador de glucosa, la hexocinasa y la fosfofructocinasa (3,8,9); el ciclo de Krebs por la piruvato deshidrogenasa, citrato sintetasa, isocitra-

(c) Tabla III. Identificación de Reacciones Alejadas del Equilibrio de la Glicólisis y Gluconeogénesis.

ENZIMAS	K_{AM}							
	Keq	HIGADO	RINON	CEREBRO	CORAZON	ERITROCITOS	TUMOR DE ASCITIS	
HEXOCINASA (O GLUCOCINASA)	$3.9-5.5 \times 10^3$ (a)	0.016(b)	0.077	0.04	0.08	7.6×10^{-4}	2.6×10^{-2}	
HEXOSA FOSFATO- ISOMERASA	0.36-0.47	0.31	0.25	0.22	0.24	0.41	0.23	
FOSFOFRUCTOCINASA	$0.9-1.2 \times 10^3$	0.09	0.33	0.13	0.03	4.4×10^{-2}	0.63	
ALDOLASA	$6.8-13 \times 10^{-5}M$	12×10^{-9}	81×10^{-8}	2.4×10^{-6}	9×10^{-6}	1.4×10^{-5}	$2.9 \times 10^{-5}M$	
GLICERALDEHIDO 3 FOSFATO	$0.2-1.5 \times 10^3 M^{-1}$	0.3×10^3	0.2×10^3	53	9	124	$17.8 M^{-1}$	
FOSFOGLICERATO CINASA	$3.6-4.5 \times 10^{-2}$	—	—	—	0.24	0.35	1.5	
TRIOSA FOSFATO - ISOMERASA	$0.1-0.2 M^{-1}$	0.12	0.10	0.1	0.12	0.15	$0.43 M^{-1}$	
FOSFOGLICERATO - MUTASA	2.8-4.6	2.91	4.4	3.6	1.4	1.7	1.6	
ENOLASA	$2-20 \times 10^3$	0.70	1.82	5.4	40	51	2.8	
PIRUVATO CINASA	850	119.3	203.7	—	—	—	—	
GLUCOSA 6 FOSFATASA	530	19.1	4.77	—	—	—	—	
FRUCTOSA DIFOSFATASA	—	—	—	—	—	—	—	
PIRUVATO CARBOXILASA + PEP CARBOXICINASA	7.0 M	1.1×10^{-3}	0.53×10^{-3}	—	—	—	M	

(a) A menos que se indique lo contrario los valores de Keq y K_{AM} son sin dimensiones

(b) Este valor corresponde a las dos enzimas en hígado. Para el resto de los órganos el valor de K_{AM} se refiere a la hexocinasa

(c) Tomado de Newsholme y Start (ref. 4)

Tabla IV. Identificación de Reacciones alejadas del Equilibrio en la Glicólisis y la Vía de las Pentosas en Diferentes

Estados Fisiológicos (a)

Enzima	Control						
	Keq	(alimentado)	Ayuno	Ayuno y realimento con dieta grasa	Ayuno y realimento con dieta de carbohidratos	Diabético + Insulina	
Hexocinasa	—	0.019	0.016	0.008	0.008	0.004	0.007
Fosfofructocinasa	—	0.090	0.36	0.36	0.13	0.13	0.08
Aldólase	—	7.5×10^{-5}	3.5×10^{-5}	2.5×10^{-5}	9.0×10^{-5}	3.8×10^{-5}	4.5×10^{-5} M
Piruvato cinasa	—	2.36	1.34	1.25	20.0	1.64	3.88
Glucosa 6 Fosfato Deshidrogenasa + Lactonasa	2.74×10^{-4}	7.17	27.93	20.33	20.91	24.86	29.17
Fosfofluconato Deshidrogenasa	0.172M	0.154	0.025	0.121	0.14	0.11	0.11 M
Transcetolasa (Ribosa)	1.0	0.56	0.85	1.54	0.015	1.58	0.02
Transcetolasa (Eritrosa)	10	3.16	2.69	4.64	0.37	4.56	0.87
Transaldolasa	1.0	1.09	0.75	1.30	0.72	0.91	1.08

(a) Tomado de Greenbaum, Guraa y McLean, ref. 7.

to deshidrogenasa, alfa-cetoglutarato deshidrogenasa, succinil-CoA sintetasa, y succinato deshidrogenasa (9); la gluconeogénesis por la fructuosa difosfatasa, flucosa 6 fosfatasa, piruvato carboxilasa y fosfoenolpiruvato carboxicinasa (3,9); la vía de las pentosas por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (7) y la fosforilación oxidativa por el translocador de adenin nucleótidos (10) ó por la citocromo oxidasa (11). En el caso específico de la glucólisis parece no existir duda acerca de que la fosfofructocinasa es la enzima reguladora más importante de la vía, pues no sólo se encuentra catalizando una reacción muy alejada del equilibrio en diferentes órganos $K_{AM}/K_{eq} = 4.4 \times 10^{-5}$ a 6.3×10^{-4} (Tabla III) sino también en diversas condiciones experimentales ($K_{AM}/K_{eq} = 8 \times 10^{-5} - 3.6 \times 10^{-4}$; Tabla IV).

Por otro lado, la evaluación de una reacción en desequilibrio consiste en comparar el valor de K_{eq} con la relación de masas K_{AM} determinada experimentalmente durante el funcionamiento de la vía en estado estacionario. Rolleston (3) sugirió un valor menor de 0.2 del cociente K_{AM}/K_{eq} para clasificar a una reacción como alejada del equilibrio, pues este valor correspondería a una velocidad de la reacción inversa (v_{-1}) menor al 20% de la velocidad de la reacción directa (v_{+1}), de acuerdo con la ecuación:

$$\frac{v_{-1}}{v_{+1}} = \frac{K_{AM}}{K_{eq}} \quad (III)$$

La estimación de las concentraciones de los intermediarios durante el estado estacionario debe considerar varios aspectos; 1) La vía metabólica puede estar compartimentalizada o bien algunos de los intermediarios son compartidos por diferentes vías. En este caso, no habría mucha exactitud si la determinación se realiza en la célula entera. En el artículo de Tischler y colaboradores (12) se hace una discusión sobre el tipo de técnicas empleadas para tratar de solucionar este problema. 2) La estimación de los inter-

mediarios en las muestras desproteinizadas no indica necesariamente la actividad de los metabolitos in situ, pues estos pueden encontrarse unidos a macromoléculas, formando diferentes complejos iónicos o la extracción puede ser incompleta dependiendo del método empleado (13).

3) La reacción debe ser detenida instantáneamente para que no ocurran cambios inducidos por artefactos durante el procesamiento posterior. Sin embargo, aunque la mayoría de las técnicas empleadas logran detener la reacción inmediatamente tienen la desventaja de que inducen transformaciones de metabolitos. Por ejemplo cuando se utilizan ácidos orgánicos como tricloroacético o perclórico, ocurren cambios espontáneos en metabolitos inestables a pH ácido como ATP, ADP, PEP, PPI y otros (14). Cuando se utiliza el método de congelamiento ultrarrápido con nitrógeno líquido, los cambios en los metabolitos pueden ocurrir durante el descongelamiento.

4) La medición del volumen celular o del compartimento estudiado. Actualmente se emplea sacarosa o inulina radiactivas, moléculas que prácticamente no atraviesan las membranas biológicas, lo cual hace muy confiable la determinación.

Como puede apreciarse sólo puede obtenerse control absoluto de las variables en los puntos 1 y 4 y por lo tanto, pese al desarrollo tecnológico para la medición in situ de algunos metabolitos como Ca^{2+} , nucleótidos de piridina^{y adenina}, la determinación exacta de todos los intermediarios de una vía es todavía una cuestión no resuelta en el estudio del control metabólico.

Teorema del entrecruzamiento

Este teorema originalmente empleado por Chance y Williams (15) en el estudio de los componentes, sitios de inhibición y sitios de conservación de energía del transporte mitocondrial de electrones, propone que la transición de un estado estacionario a otro desenmascara los puntos de regulación a través de la determinación de los cambios en las concentraciones de los

intermediarios (fig. 2). Si por ejemplo se induce una disminución del flujo metabólico, se podrá observar un aumento en el sustrato de alguna reacción y disminución en el producto, lo contrario debe suceder si el flujo se incrementa. Sin embargo este teorema identifica un punto de entrecruzamiento como un sitio de regulación sin definir los mecanismos de acción. Existen al menos tres posibles explicaciones (3): a) las constantes de velocidad de la reacción de entrecruzamiento pudieron alterarse, si el flujo disminuyó, entonces la velocidad de la reacción de ida pudo disminuir, la velocidad de la reversa aumentar o ambos eventos a la vez; b) la concentración de los intermediarios puede modificarse por la interacción con el agente externo y c) el punto de entrecruzamiento puede ser una expresión incompleta de la reacción.

Este teorema fue fructífero al evaluar la cadena respiratoria en la cual no varía la concentración de los intermediarios durante el curso del experimento. Sin embargo, debe usarse con precaución cuando se aplica al análisis de vías metabólicas cuyos intermediarios varían de un estado estacionario a otro. En este último caso, no existe una relación obligada de reciprocidad entre las concentraciones de sustrato y producto, y el punto de entrecruzamiento puede carecer de significado. Por ejemplo, considérese la reacción:



en la cual S y P son intermediarios de la vía y a y b son cofactores. Si se observa un punto de entrecruce donde S disminuye y P aumenta con incremento en el flujo total, existen dos posibles explicaciones (3): a) la reacción puede estar en equilibrio, de tal forma que la relación a/b aumenta y P/S disminuye para mantener el equilibrio. En este caso, el cambio en el estado estacionario produjo el cambio en la relación a/b y el punto de entrecruzamiento carece de significado con respecto a la identificación de enzimas reguladoras, b) la reacción puede estar lejos del equilibrio, por lo cual

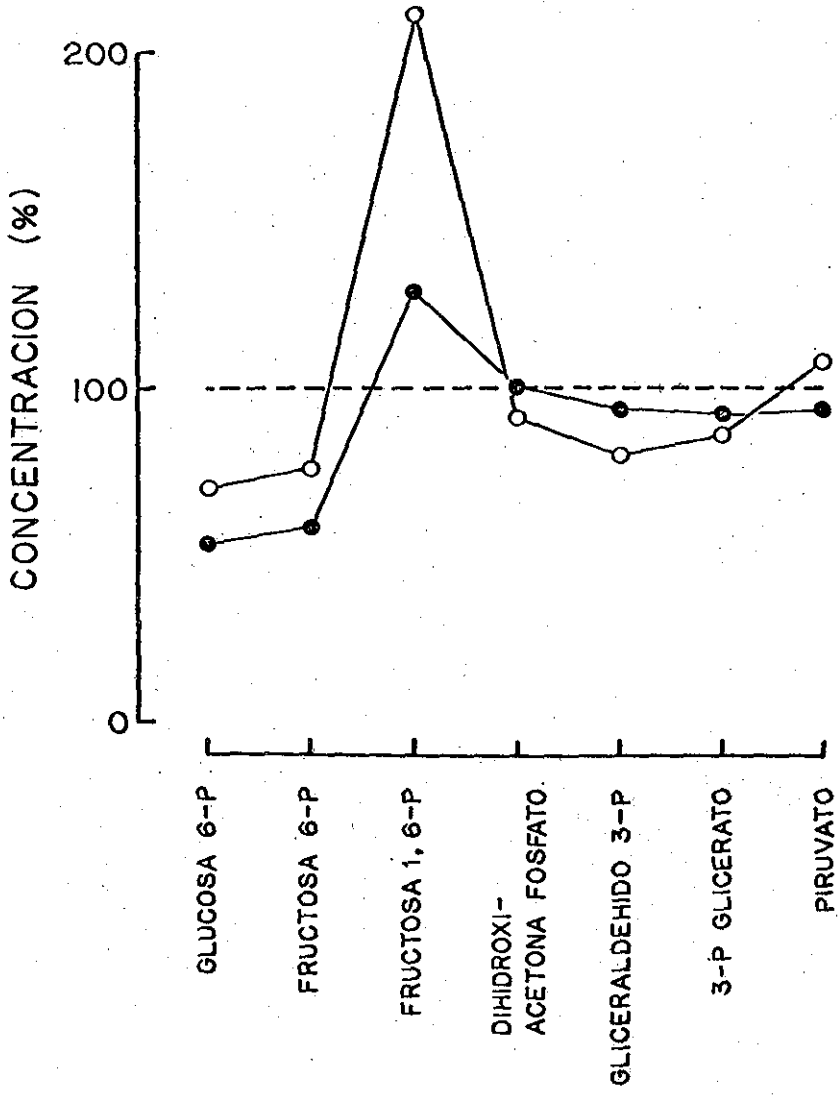


Figura 2. Puntos de entrecruzamiento de la glucólisis inducidos por anaerobiosis total. Las concentraciones de los intermediarios en levaduras en anaerobiosis se expresan como porcentaje de los valores medidos en células aeróbicas. ●—● células incubadas con glucosa, ○—○ células incubadas con galactosa. De Lagunas, R. y Gancedo, C. (1983): Eur. J. Biochem 137, 479-483. Puede observarse claramente un punto de entrecruzamiento a nivel de la fosofructocinasa, pues los sustratos de esta enzima (las hexosas fosfato) disminuyen y el producto (fructosa 1,6 difosfato) aumenta. Esto correlaciona con los flujos glucolíticos: medio con glucosa, 3.6 mmol de glucosa consumida g⁻¹h⁻¹ en aerobiosis contra 6.5 en anaerobiosis; medio de galactosa, 7.1 en aerobiosis contra 12.8 en anaerobiosis.

los cambios en el flujo y en la concentración de S conducen a la conclusión de que la enzima es reguladora y los cambios de P pasan a ser irrelevantes. Por lo tanto, el teorema del punto de entrecruzamiento carece de validez si no se acompaña de otro tipo de análisis y tampoco tiene una interpretación precisa si se aplica a sistemas donde los intermediarios no se conservan constantes.

Capacidades enzimáticas relativas

Cabe esperar que las enzimas que pueden regular el flujo metabólico posean las capacidades catalíticas más bajas respecto al resto de las enzimas de la vía, pues de acuerdo con las dos secciones anteriores, las enzimas reguladoras se encuentran en las reacciones alejadas del equilibrio y en los puntos de entrecruzamiento. Así, este enfoque se ocupa de determinar in vitro las propiedades cinéticas de cada enzima de una vía metabólica, después de su extracción y purificación o bien, mediante técnicas específicas para cada especie enzimática. De esta manera, se ha observado (8) que las enzimas más lentas en la glucólisis y gluconeogénesis (Tabla V) son: piruvato carboxilasa, fosfoenol piruvato carboxilasa, enolasa, aldolasa, fructuosa difosfatasa, fosfofructocinasa y glucosa-6-fosfatasa con actividades menores de $10 \mu\text{mol min}^{-1}$ a 38°C , mientras que las enzimas más rápidas son: gliceraldehído-3-P deshidrogenasa, hexosa fosfato isomerasa, lactato deshidrogenasa, fosfoglicerato mutasa, fosfoglicerato cinasa y piruvato cinasa con actividades de 10 a $500 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ a 38°C . En la degradación de aminoácidos se ha determinado que las enzimas de elevada actividad (20 a $200 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ a 38°C) son aspartato y alanina transaminasa, mientras que las enzimas de poca actividad (1 a $5 \mu\text{mol min}^{-1}$ a 38°C) son: triptofano pirrolasa, tirosina y ornitina transaminasas, serina y treonina deshidratada. En la fosforilación oxidativa hay al menos cuatro enzimas lentas con

TABLA V. ACTIVIDADES MAXIMAS DE LAS ENZIMAS DE LA GLUCOLISIS Y GLUCONEOGENESIS (a)
 V_{max} (μmol sustrato transformado min^{-1} (g peso fresco) $^{-1}$ a 37°C)

Enzima	Hígado	Riñón	Cerebro	Corazón	Músculo Esqueletico	Eritrocito
Hexocinasa	0.7	7.9	17	7	1.5	0.3
Glucocinasa	4.3	—	—	—	—	—
Hexosa fosfato isomerasa	136	130	80	65	176	5.6
Fosfofructocinasa	3.3	5.7	24	14	56	1.8
Aldolasa	10	10.0	15	24	78	0.7
Triosa fosfato isomerasa	—	—	415	580	2650	97
Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa	170	200	105	135	440	17.1
Fosfoglicerato cinasa	150	170	610	74	169	25.6
Fosfoglicerato mutasa	—	—	122	27	100	8.6
Enolasa	17	53	47	15	158	1.6
Piruvato cinasa	50	50	164	145	387	4.6
Lactato deshidrogenasa	230	170	100	386	366	20.4
Glucosa 6 fosfatasa	17	13	—	—	—	—
Fructosa difosfatasa	15	17	—	—	—	—
Piruvato carboxilasa	6.7	5.8	—	—	—	—
Fosfoenol piruvato carboxilasa	6.7	6.7	—	—	—	—

(a) Tomado de Newholme y Start (4).

actividades menores a $1 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$: la translocasa de adenin-nucleótidos, la ATP sintetasa, el acarreador de fosfatos y el acarreador de dicarboxilatos (Tabla VI).

Sin embargo, existen algunos problemas con este enfoque. El ensayo de la actividad enzimática requiere la ruptura del tejido, la extracción y dilución de la enzima y finalmente, para la medición de la actividad, la incubación en condiciones completamente artificiales. Muchas enzimas pueden aumentar o disminuir su actividad durante el proceso de extracción. Además, las velocidades máximas (V_{max}) obtenidas ó las constantes de velocidad (k_{cat}) calculadas no necesariamente reflejan la situación fisiológica del funcionamiento enzimático, pues en la célula intacta las enzimas difícilmente trabajan a concentraciones saturantes de sustrato y en ausencia total de producto.

Enzimas alostéricas

Generalmente este tipo de enzimas producen curvas de velocidad sigmoideas. La unión de una molécula de sustrato incrementa la afinidad de los sitios vacíos y facilita la unión de las siguientes moléculas. Este fenómeno llamado cooperatividad positiva puede también reproducirse cuando la enzima interacciona con moléculas diferentes al sustrato en sitios diferentes al sitio catalítico. El término alostérico en su concepción más amplia implica una modificación a distancia de las propiedades cinéticas inducidas por cualquier ligando.

Las ventajas potenciales de una respuesta sigmoidea en comparación con una respuesta hiperbólica (16) son: para incrementar la velocidad específica (v/V_m), de $0.1 V_{\text{max}}$ a $0.75 V_{\text{max}}$ se requiere en la cinética hiperbólica incrementar la concentración del sustrato 27 veces, mientras en la cinética sigmoidea menos de 10 veces en la mayoría de los casos. Esto permite que

TABLA VI. ACTIVIDADES MÁXIMAS DE LAS ENZIMAS DE LA FOSFORILACION OXIDATIVA

Enzimas	K_m	V_m	Referencia
Translocador de adenín-nucleótidos	2-4 μM (ADP)	1.5 nmd $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ (0°C)	a
ATP sintetasa	—	200-300 $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ (30°C)	b
Citocromo oxidasa	0.4-0.6 μM (cit. c)	35 $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ (38°C)	c
Complejos de citocromos b-c ₁	—	20-30 $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ (30°C)	d
Acarreador de fosfatos	1.6mM (Pi)	205 $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ (0°C)	e
Acarreador de dicarboxilatos	1.17mM (Succ)	60-80 $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ (9°C)	f
Succinato deshidrogenasa	—	200-300 $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ (15°C)	g

(a) Barbour y Chan (1981) J. Biol. Chem. 256, 1940-48.

(b) Este valor se calculó de la V_m de la hidrólisis desacoplada de ATP y de la V_m de la respiración estimulada por arsenato en mitocondrias de hígado de rata.

(c) Wharton y Tzagoloff (1967) Meth. Enzymol. 10, 245-250.

(d) Rieske (1967) Meth. Enzymol. 10, 239-245.

(e) Coty y Pedersen (1974) J. Biol. Chem. 249, 2593-98.

(f) La Noue y Schoolwerth (1979) Ann. Rev. Biochem. 48, 871-922.

(g) Gutman, Kearney y Singer (1971) Biochem. 10, 4763-70.

las enzimas alostéricas actúen como un switch, sobre todo en situaciones don de se requiere la acumulación previa de los sustratos, como podría ser en las vías biosintéticas. Además, la respuesta sigmoidea solo se entiende completamente en término de regulación metabólica y de economía celular pues la inhibición de la primera reacción de una secuencia por el producto final o retroalimentación negativa, únicamente puede ocurrir en enzimas alostéricas. Este tipo de regulación permite que ciertos intermediarios clave en una vía actúen como moduladores en otra vía. De hecho, la regulación por intermediarios centrales (de nucleótidos de adenina y piridina por ejemplo) puede determinar la dirección final del metabolismo como anabólico o catabólico, dependiendo de los estados redox y energético de la célula. Por lo tanto, la cinética sigmoidea puede ser un diagnóstico de enzimas reguladoras.

Aparentemente el único problema que puede surgir al usar este criterio de identificación de enzimas reguladoras es el de la posible inexistencia de correlación entre las variaciones fisiológicas de los sustratos y los efectores alostéricos con la cinética de la enzima, y el flujo metabólico. Sin embargo en los casos ^{hasta} ahora estudiado si se ha encontrado un estrecho paralelismo.

Una de las enzimas alostéricas más estudiadas en términos de regulación metabólica es la fosfofructocinasa, para la que se han descrito 23 diferentes moduladores (17), de los cuales solo ATP, citrato y H^+ entre los inhibidores y AMP, Pi y las fructosas 1,6 y 2,6-difosfato (6), entre los activadores, parecen ser fisiológicos. Recientemente se reportó un efecto activador de la calmodulina, que aumenta la afinidad por fructosa-6-fosfato y disminuye la inhibición por ATP (18). Concentraciones micromolares de ATP disminuyen la afinidad de la enzima por el otro sustrato, la fructosa-6-fosfato; la inhibición por ATP es potenciada por citrato. La inhibición por ATP desaparece con AMP o fructosa-1,6-difosfato pero al aumentar la concentra-

ción de ATP nuevamente aparece la inhibición (8). La cuestión de si estas variaciones de los moduladores y por lo tanto de la actividad de la fosfofructocinasa se correlacionan con el flujo glucolítico fue abordada por Wu y Davis (19). Estos autores observaron que la producción de lactato aumentaba al incrementar la concentración de Pi de 2 a 20 mM y disminuía al reducir el pH de 7.6 a 7.0, al aumentar el ATP de 2 a 3 mM ó al añadir citrato 0.5 mM. Con excepción del ATP, los otros moduladores son específicos para la fosfofructocinasa, por lo cual es válido concluir que esta enzima controla el flujo glucolítico.

Otros ejemplos de enzimas alostéricas en la glucólisis son la piruvato cinasa (fructosa difosfato, activador; ATP y alanina; inhibidores (8,17)); sorprendentemente la hexocinasa no se modula alostéricamente y solo presenta inhibición por el producto glucosa-6-fosfato (4). En el ciclo de Krebs todas las deshidrogenasas presentan cinética alostérica (4,8,20) siendo los moduladores principales de la vía las relaciones de concentración ATP/ADP y NADH/NAD⁺ junto con los niveles intramitocondriales de Ca²⁺ (21). En cambio, la citrato sintetasa solo obedece a las concentraciones de sustratos y productos a pesar de catalizar una reacción alejada del equilibrio. Por tanto, estos ejemplos nos previenen de aceptar completamente la localización de enzimas reguladoras basándonos exclusivamente en el estudio cinético o en la determinación de la K_{AM}. Debido a esto, deben emplearse siempre la mayor cantidad de criterios disponibles.

la
Forma de curva de inhibición

Otro de los criterios utilizados en el estudio de la regulación metabólica es el de la forma de las curvas de inhibición de la vía mediante inhibidores específicos de cada enzima. El razonamiento es que si el inhibidor actúa sobre una enzima con elevada capacidad y/o cataliza una reacción

cercana al equilibrio, entonces solo habrá poco o nulo efecto sobre el flujo total aún cuando disminuya la actividad de la enzima. Conforme la concentración del inhibidor aumente, esta enzima eventualmente se convertirá en la etapa más lenta de la vía y habrá proporcionalidad entre el flujo y la cantidad de inhibidor. Por otro lado, si el inhibidor actúa sobre una enzima lenta, aun la más baja concentración de inhibidor disminuirá el flujo de la vía metabólica (22). En otras palabras, una enzima se clasifica como reguladora si se observa una relación lineal y no-reguladora si la curva de titulación es sigmoidea (fig. 3). El "exceso" de enzima se determina por la cantidad de inhibidor necesaria para provocar una disminución significativa del flujo metabólico. Rognstad (22) propuso realizar una gráfica de Dixon ($1/v$ vs $[I]$) para determinar con precisión las capacidades enzimáticas. Sin embargo, como el mismo autor reconoce no existe una teoría rigurosa que justifique este planteamiento. Además la interpretación mencionada en el párrafo anterior solo podría ser válida cuando se utiliza un inhibidor irreversible, pues la forma de la curva de inhibición también depende del tipo de inhibidor y de la constante de inhibición K_i . En teoría, los inhibidores competitivo y no-competitivo generan una curva hiperbólica (fig. 3 A), mientras que los inhibidores alostéricos producen una curva sigmoidea (fig. 3 B). La cuestión se complica cuando se considera si la enzima es o no reguladora. Con inhibidor irreversible se debe asegurar que exista una relación cuantitativa entre inhibidor añadido y enzima inhibida. Por otro lado, si la enzima en estudio no sigue una cinética hiperbólica, también puede generar curvas de inhibición ligeramente sigmoideas. Por último, tampoco hay un criterio para determinar cual debe ser la cantidad inicial mínima que se debe usar de inhibidor para titular el flujo metabólico. Obviamente que si se emplean muy pequeñas cantidades de inhibidor, todas las curvas de inhibición serán sigmoideas; por el contrario, si inicialmente se empieza a titular con

cantidades relativamente grande de inhibidor, todas las curvas podrán ser hiperbólicas.

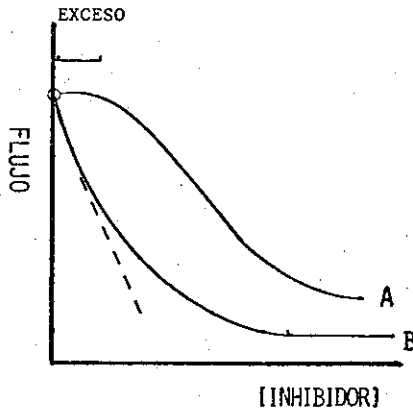


Figura 3. Curva de Titulación de una vía metabólica con inhibidores específicos de una enzima de elevada capacidad (A) y una enzima reguladora (B).

UNA NUEVA TEORIA SINTETICA Y CUANTITATIVA DE CONTROL METABOLICO

La discusión en las secciones anteriores sugiere que las enzimas reguladoras pueden ser identificadas como aquellas que satisfacen diversos criterios los cuales a su vez están directamente relacionados a la forma de medición; sin embargo, no es claro cual es la conexión teórica de esos criterios entre sí. Clasificar a una enzima como reguladora, sólo ofrece un término estrictamente cualitativo, empírico y hasta esotérico; esta terminología y el desarrollo conceptual de las secciones anteriores, no establece cómo las enzimas podrían controlar el flujo metabólico ni tampoco cuantifica la importancia relativa de cada etapa. Implícitamente se supone que al señalar una enzima como reguladora, ésta controla totalmente el flujo metabólico. En la literatura también se discute en este sentido cuál es el factor determinante en la velocidad de flujo, si la actividad de alguna de las en-

cantidades relativamente grande de inhibidor, todas las curvas podrán ser hiperbólicas.

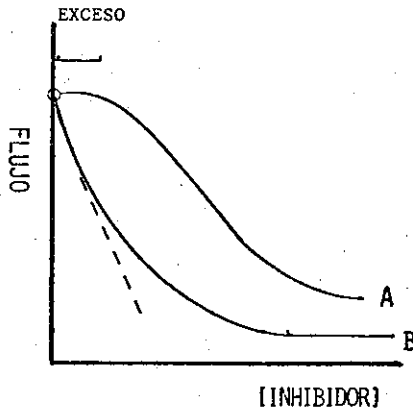


Figura 3. Curva de Titulación de una vía metabólica con inhibidores específicos de una enzima de elevada capacidad (A) y una enzima reguladora (B).

UNA NUEVA TEORIA SINTETICA Y CUANTITATIVA DE CONTROL METABOLICO

La discusión en las secciones anteriores sugiere que las enzimas reguladoras pueden ser identificadas como aquellas que satisfacen diversos criterios los cuales a su vez están directamente relacionados a la forma de medición; sin embargo, no es claro cual es la conexión teórica de esos criterios entre sí. Clasificar a una enzima como reguladora, sólo ofrece un término estrictamente cualitativo, empírico y hasta esotérico; esta terminología y el desarrollo conceptual de las secciones anteriores, no establece cómo las enzimas podrían controlar el flujo metabólico ni tampoco cuantifica la importancia relativa de cada etapa. Implícitamente se supone que al señalar una enzima como reguladora, ésta controla totalmente el flujo metabólico. En la literatura también se discute en este sentido cuál es el factor determinante en la velocidad de flujo, si la actividad de alguna de las en-

zimas de la vía o la disponibilidad de sustratos o cofactores, aunque más bien parecería absurdo sugerir que alguno de estos factores no intervienen e influyen sobre el flujo metabólico. Más aún, las cuestiones de si todos los factores son igualmente importantes en el control de una vía metabólica, la definición de importancia y los criterios necesarios para evaluar esta importancia, no se contestan con precisión usando los criterios discutidos en las secciones anteriores.

En un intento por responder estas incógnitas y formalizar el análisis de la regulación metabólica Kacser y Burns (23-25) en Escocia y Heinrich y Rapoport (26-29) en Alemania Democrática, desarrollaron en forma independiente una teoría cuantitativa de control que sintetiza mucha de la información disponible. El análisis de estos autores propone que las variables de una vía metabólica son los niveles de metabolitos; en el estado estacionario, las concentraciones de los intermediarios no varían con el tiempo, puesto que cada uno de ellos ha alcanzado un balance de formación y remoción que depende de la actividad de todas las enzimas; por esto, las concentraciones de los intermediarios y los flujos están determinados por los parámetros del sistema. El flujo es una propiedad sistémica pues la disminución de la actividad de una enzima a cero resulta en la anulación de la vía y las cuestiones acerca de su regulación no pueden ser contestadas estudiando una etapa aislada. Los parámetros del sistema están representados por las constantes enzimáticas determinadas genéticamente como constante de Michaelis K_M , la constante catalítica k_{cat} , las constantes de inhibición K_I , etc. Existen además restricciones termodinámicas representadas por la constante de equilibrio de una reacción. La cantidad y la calidad de las enzimas y las condiciones del micro ambiente también son parámetros del sistema, al menos en la mayoría de los experimentos. (Para una revisión ver refs. 29 y 29a).

COEFICIENTE DE CONTROL DE FLUJO (C_i)

Aunque en el estado estacionario todas las enzimas llegan a tener la misma actividad, el efecto que tendrá una variación en sus actividades sobre el flujo metabólico, no es necesariamente el mismo. Es posible estimar este efecto induciendo un pequeño cambio en una de las enzimas y expresando esto como un cambio fraccional $\delta E_i/E_i$, donde E_i es la actividad de la enzima. Este cambio en la actividad puede deberse a un cambio en la concentración de la enzima, número de recambio u otras constantes cinéticas, o sea, un cambio en la concentración de enzima activa. Debido al cambio inducido, se establecerá un nuevo estado estacionario con un flujo diferente, el cual se puede expresar como $\delta F/F$. La comparación de estas dos medidas, representa cómo el cambio inducido en la enzima afecta al flujo.

$$\frac{\delta F}{F} = C_i \frac{\delta E_i}{E_i} \quad (\text{IV})$$

$$C_i = \frac{E_i}{F} \frac{\delta F}{\delta E_i} \quad (\text{V})$$

La constante de proporcionalidad (C_i) describe cuantitativamente cuán sensible es el flujo a cambios en una de las enzimas de la vía y fue denominado como coeficiente de sensibilidad por Kacser y Burns (23) y como fuerza de control por Heinrich y Rapoport (26). Recientemente, estos dos grupos han acordado una nomenclatura unificante (30) y nombraron a C_i como coeficiente de control de flujo.

Nótese que de la ecuación V se puede calcular C_i de la pendiente de la curva de flujo contra concentración de enzima, multiplicada por el factor escalar E_i/F . Sin embargo el valor de la pendiente cambia con el valor de E_i ya que la relación F contra E no es lineal. Entonces la ecuación V puede convertirse en la siguiente expresión: $C_i = \frac{\delta \ln F}{\delta \ln E_i}$, y de la pendiente de la grá

fica de $\ln F$ versus $\ln E_i$ se obtendrá directamente el valor de C_i .

El coeficiente C_i puede tomar cualquier valor entre 0 y 1.0. Es obvio que una enzima cuyo coeficiente de control de flujo sea cercano a 1.0, es decir cuya variación produce una respuesta casi proporcional en el flujo, es considerablemente más importante en la regulación del flujo metabólico que otra enzima con un coeficiente cercano a cero en donde el efecto sobre el flujo es imperceptible. Los valores particulares de cada coeficiente dependerán de la proporción de equilibrio de cada reacción (K_{AM}/K_{eq}), de la concentración efectiva de cada enzima y su constante catalítica en comparación con las demás, del grado de saturación y de la influencia de los diversos efectores. Por lo tanto, no hay únicamente dos clases de enzimas, reguladoras y no-reguladoras, sino que el control se comparte entre todas las enzimas que constituyen la vía.

La Propiedad de la Sumatoria

La velocidad de una reacción enzimática siempre es una función lineal de la concentración de enzima y del número de recambio, sin importar que tan compleja sea esta. En el estado estacionario, se cumple entonces la expresión:

$$\sum_{i=1}^{i=n} C_i = 1 \quad (\text{VI})$$

esto es, la suma de los coeficientes de control de flujo es siempre la unidad. La demostración es la siguiente (24): ya que F es una función de todas las enzimas, se aplican las reglas de la diferenciación parcial para variables independientes $F = f(E_1, E_2, \dots, E_n)$:

$$dF = \frac{\delta F}{\delta E_1} dE_1 + \frac{\delta F}{\delta E_2} dE_2 + \dots + \frac{\delta F}{\delta E_n} dE_n$$

dividiendo entre F y multiplicando por E_i/E_i ,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

$$\frac{dF}{F} = \left(\frac{\delta F}{F} / \frac{\delta E_1}{E_1} \right) \frac{dE_1}{E_1} + \left(\frac{\delta F}{F} / \frac{\delta E_2}{E_2} \right) \frac{dE_2}{E_2} + \dots$$

las derivadas parciales son los coeficientes de control de flujo (ecuación V),

$$\frac{dF}{F} = C_1 \frac{dE_1}{E_1} + C_2 \frac{dE_2}{E_2} + \dots + C_n \frac{dE_n}{E_n} \quad (\text{VII})$$

Considerando que el sistema se encuentra en estado estacionario, las concentraciones de los intermediarios no varían (ecuación II), porque su velocidad de formación está balanceada con la desaparición. Como todas las velocidades son proporcionales a la concentración de enzima, un cambio simultáneo en todas las enzimas por un mismo factor (α) alteraría las concentraciones de los intermediarios, de tal forma que:

$$\frac{\delta E_i}{E_i} = \alpha; S_i = \text{constante}$$

y el flujo total del sistema F cambiará en el mismo factor

$$\frac{\delta F}{F} = \alpha$$

si $\alpha \rightarrow 0$, la ecuación VII resulta en:

$$\alpha = C_1 \alpha + C_2 \alpha + \dots + C_n \alpha$$

Por lo tanto:

$$\sum_{i=1}^n C_i = 1$$

La propiedad sumatoria tiene una serie de importantes consecuencias.

a) Si una enzima cambia su actividad y por lo tanto cambia su coeficiente de control de flujo, los coeficientes de las demás enzimas deben cambiar, de tal forma que la nueva suma sea otra vez igual a 1.0. La propiedad sumatoria se sostiene para cualquier conjunto de enzimas, pero la distribución interna cambiará dependiendo del nivel del estado estacionario.

b) Los coeficientes son positivos, pues se podrán generar coeficientes

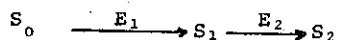
**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

negativos sólo en vías metabólicas que eventualmente tuvieran fugas. Bajo estas circunstancias la suma de los coeficientes puede ser mayor a 1.0. Kacser (25) propuso que la inhibición por sustrato, la expansión del sistema, donde masas y volúmenes aumentan exponencialmente y la ramificación de la vía podría generar contribuciones negativas al control del flujo, por ejemplo reacciones que afectan a la vía mediante un drenaje lateral del flujo principal.

c) Si un coeficiente es muy grande, el resto serán muy pequeños, de aquí resulta obvio que el concepto de exceso de enzima (Tabla II) no es más que la descripción de un coeficiente de control de flujo pequeño. Como establece la propiedad sumatoria, es imposible para una vía no tener a la mayoría de las enzimas en exceso, por tanto el concepto de exceso carece de significado.

Coefficiente de Elasticidad y Propiedad de la Conectividad

El coeficiente de control de flujo C_i describe la efectividad de las enzimas en controlar el flujo total de la vía metabólica. Sin embargo, no revela como las enzimas consiguen ejercer determinado grado de control. Considerese un sistema simple de dos reacciones.



De acuerdo con la propiedad de la sumación, es evidente que la relación entre las dos enzimas es de reciprocidad de tal forma que un cambio en el grado al cual una enzima es limitante resulta en un cambio opuesto en la otra enzima. Si, por ejemplo, se disminuye la concentración de la enzima E_2 mediante una inhibición específica, entonces la concentración del sustrato S_1 aumenta hasta alcanzar el nuevo estado estacionario. El incremento de S_1 conduce a que la enzima E_2 trabaje en una situación mas alejada del equilibrio y la enzima E_1 en una condición mas cercana al equili-

librio en comparación con el estado estacionario inicial. Por el contrario, si ocurre una activación de E_2 , S_1 disminuye y entonces E_1 se vuelve mas limitante porque trabajaría en una situación mas alejada del equilibrio. Este análisis cualitativo fue utilizado por Stoner y Cols. (31,32) en el estudio de la fosforilación oxidativa. Estos autores concluyeron que existe relación de acoplamiento secuencial entre dos reacciones en una vía metabólica, cuando una limitación (o activación) en la actividad de una enzima conduce a un cambio recíproco en otra enzima. Si esto no ocurre la relación es de tipo no-secuencial.

La teoría del control metabólico (23-30) describe otro conjunto de coeficientes que especifica los efectos de las enzimas sobre las otras variables sistémicas, las concentraciones de los metabolitos. Los intermediarios y los cofactores son las conexiones entre las enzimas y cinéticamente esto significa por supuesto que el producto de una reacción es el sustrato de la próxima, o bien un efector producido por una reacción puede actuar como un inhibidor o activador en otra reacción.

Considérese nuevamente un cambio en la velocidad de la enzima E_2 , el cual tenderá a producir un cambio en la concentración de su sustrato. La magnitud de este cambio que se transmite hacia la primera enzima dependerá de la naturaleza de las enzimas (K_m, V_m) y de su microambiente. Es claro que entre más cerca a la saturación se encuentre una enzima, más reducida será la respuesta a los cambios en la concentración del sustrato. La expresión matemática de esta respuesta es:

$$\epsilon_{S_1}^{v_1} = \left(\frac{\delta v_1}{v_1} \right) \left(\frac{\delta S_1}{S_1} \right)^{-1} \quad \text{(VIII)}$$

donde se ha designado como coeficiente de elasticidad (30). Debe notarse que este coeficiente define el cambio diferencial en la velocidad de una enzima "aislada" y es por lo tanto una propiedad local y no una propie

dad del sistema, tal como lo es el flujo a través de la vía completa. Es decir, si ocurrió un cambio en la concentración de un metabolito, este debió haber sido causado por un cambio en alguna enzima o por algún efector o sustrato externos. Las variaciones en las concentraciones de los metabolitos son efectos más que causas; por eso es inadecuado proponer que un metabolito controla el flujo, pues ambos son mutuamente dependientes.

Para cada enzima existen tantos coeficientes de elasticidad como sustratos, productos y efectores interactuen con ella. El valor de ϵ dependerá, en parte de la proporción de desequilibrio de los metabolitos y del grado de saturación. El valor numérico puede ser muy grande (positivo si aumenta la velocidad al incrementar el metabolito, ecuación VIII o negativo si disminuye la velocidad al incrementar el metabolito) para reacciones cercanas al equilibrio o para moduladores alostéricos. Un valor muy alto de ϵ se manifestará como un cambio en las concentraciones de metabolitos, satisfaciendo el teorema del entrecruzamiento, pero esto no necesariamente significa que esa enzima tenga un papel importante en la regulación del flujo. El valor del coeficiente de control de flujo C_i es un factor igualmente importante.

La teoría del control metabólico (23-30) describe una relación cuantitativa entre los coeficientes de control de flujo y los coeficientes de elasticidad de enzimas conectadas por un intermediario común. Esta relación se llama propiedad de la conectividad.

En la figura 4 se ilustra esta propiedad. La enzima E_2 disminuye un 1% y la pregunta es ¿que factores determinarán el valor del nuevo estado estacionario? En el caso A, la enzima E_2 tiene una K_m de 8mM y en el caso B, de 0.1mM. La enzima E_1 es constante en ambos casos. La concentración de S_2 , el intermediario común es de 4mM. Para el caso A, la enzima E_2 es muy sensible a los cambios en la concentración de S_2 pues está por debajo de

la Km. Así, un cambio de S_2 de 4 a 4.04mM debido a la inhibición del 1% de E_2 , produce un incremento de 0.96% en la velocidad de E_2 y el nuevo estado estacionario es casi idéntico al inicial. La enzima E_1 es poco sensible a los cambios en la concentración de S_2 debido a su baja constante de inhibición por producto (K_p) y solo disminuye 0.26%. Intuitivamente podemos señalar para este caso que E_2 no tiene una contribución importante en el control del flujo y que E_1 si ejerce control acorde con la propiedad de la sumación. Por otro lado, en el caso B, la enzima E_2 es muy poco sensible a los cambios en S_2 pues se encuentra 40 veces arriba de la Km. Esto ocasiona que S_2 aumente mas que en el primer caso e inhibe 0.80% a la enzima E_1 . De aquí que el nivel del nuevo estado estacionario disminuya significativamente. Entonces, E_2 ejerce un control importante sobre el flujo y E_1 no tiene una contribución apreciable.

Este ejemplo sugiere que hay una relación recíproca entre la magnitud de los coeficientes de control de flujo y las sensibilidades de las enzimas a los cambios en las concentraciones de los intermediarios comunes. La propiedad de la conectividad es una formulación cuantitativa de estas observaciones cualitativas:

$$\frac{C_1}{C_2} = - \frac{\epsilon_{S_1}^{V_2}}{\epsilon_{S_1}^{V_1}}$$

Esta ecuación muestra que la proporción entre las elasticidades de las enzimas E_1 y E_2 hacia un metabolito común (S_1), determina la magnitud de los grados de control de estas enzimas, una conclusión que ya se había obtenido cualitativamente en el ejemplo de la figura 4.

El análisis realizado al sistema de 2 enzimas puede extenderse fácilmente a un sistema con n enzimas. Para cada par de enzimas que compartan un mismo intermediario habrá una expresión de la propiedad de la conectivi-

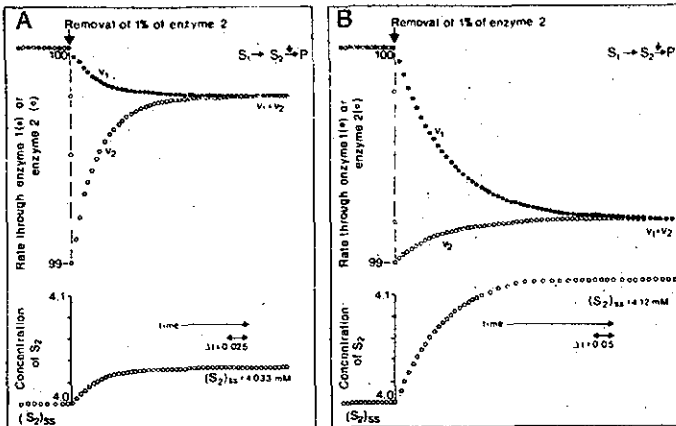


Fig. 4. Illustration of the connectivity theorem: the relative sensitivities of enzyme 1 and 2 towards the common intermediate S_2 determine the magnitude of the flux control coefficients of these enzymes. The pathway of Fig. 3A and 3B consists of two enzymes: the first being identical in Fig. 3A and 3B and the second with different kinetic parameters in Fig. 3A and 3B. The concentration of initial substrate S_1 and final product P are kept constant ($S_1 = 10$ mM, $P = 10$ mM). The kinetic parameters of enzyme 1 in Fig. 3A and 3B are: $K_{m1} = 1$ mM, $K_{p1} = 1$ mM, $V_S = 150$, $V_P = 0$. The kinetic parameters of enzyme 2 in Fig. 3A are: $K_{m2} = 8$ mM, $K_{p2} = 1$ mM, $V_S = 2300$, $V_P = 0$. The kinetic parameters of enzyme 2 in Fig. 3B are: $K_{m2} = 0.1$ mM, $K_{p2} = 5$ mM, $V_S = 107.5$, $V_P = 0$. The concentration of the common intermediate S_2 was set at 4 mM. Under these conditions steady state flux through the pathway amounts to 100. As indicated in the figure 1% of the activity of enzyme 2 was removed both in Fig. 3A and 3B. The subsequent changes in v_1 , v_2 and the concentration of S_2 were calculated as a function of time with the aid of the kinetic parameters of enzyme 1 and 2 using a simple calculation program.

DE: R. J. A. WANDERS (1985) Ph. D. THESIS, UNIVERSITY OF AMSTERDAM

dad (ecuación IX). De esta manera, el coeficiente de control de flujo de cada enzima puede expresarse solo en función de todos los coeficientes de elasticidad en el sistema. Esto indica que las propiedades locales de las enzimas pueden considerarse como las responsables de generar las propiedades globales de la vía metabólica. Además, la propiedad de la conectividad demuestra que carecen de fundamento preguntas tan comunes en la literatura como, si es el flujo limitado por el sustrato o por la enzima, pues puede haber reacciones con altas o bajas elasticidades conjuntamente con altos o bajos coeficientes de control.

SOLUCION ANALITICA PARA F Y C_i EN UNA SECUENCIA LINEAL

Heinrich y Rapoport (26) realizaron los cálculos necesarios para obtener expresiones matemáticas de C_i y ε_i en términos de las variables de una vía metabólica lineal y así, tratar de racionalizar el concepto de control metabólico. Estos autores consideraron una vía como la mostrada en la figura 1. Entonces plantearon las ecuaciones de velocidad para cada reacción:

$$\frac{dS_1}{dt} = k_1 S_0 - (k_{-1} + k_2) S_1 + k_{-2} S_2, \text{ (primera reacción)}$$

$$\frac{dS_n}{dt} = k_n S_{n-1} - (k_{-n} + \gamma) S_n \text{ (última reacción)}$$

resolviendo el sistema de ecuaciones lineales no homogéneas y considerando que el flujo total es F = γS_n se obtiene:

$$F = \frac{\gamma S_0 \prod_{j=1}^n q_j}{1 + \gamma \sum_{k=1}^n \tau_k (1 + q_k) \prod_{m=k+1}^n q_m} \quad (X)$$

donde $\tau_i = \frac{1}{k_i + k_{-i}}$ es el tiempo de relajación y

$q_i = \frac{k_i}{k_{-i}}$ es la constante de equilibrio de cada reacción

Observese que el flujo total F es entonces una función de factores termodinámicos (q_i) y cinéticos (τ_i). En el caso especial donde q_i = 1 (i = 1, ..., n), la ecuación X se transforma en:

$$F = \frac{S_0}{\frac{1}{\gamma} + 2 \sum_{k=1}^n \tau_k} \quad (XI)$$

En esta situación todas las reacciones se encuentran en equilibrio ter-

ecuación X.

$$\text{Si } q_i = 1 (i=1,2,\dots,n)$$

$$C_i = \frac{2\tau_i}{\frac{1}{Y} + 2 \sum_{k=1}^n \tau_k} \quad (\text{XIV})$$

Ahora bien, si se considera la etapa irreversible donde $q_s \gg 1$ se tendrían las 3 ecuaciones siguientes:

1. Para calcular el grado de control de una enzima anterior a la etapa irreversible donde $i < S$

$$C_i = \frac{\tau_i (1+q_i) \prod_{j=i+1}^{S-1} q_j}{i-1 \prod_{k=1}^{S-1} (\tau_k + \sum_{j=k+1}^{S-1} \tau_j (1+q_k))} \quad (\text{XV})$$

2. Para calcular C_i en la etapa irreversible $i = S$ entonces se tiene la ecuación:

$$C_i = \frac{\tau_i}{i-1 \prod_{k=1}^{i-1} (\tau_k + \sum_{j=k+1}^{S-1} \tau_j (1+q_k))} \quad (\text{XVI})$$

3. Para calcular C_i de enzimas localizadas después de la etapa irreversible donde $i > S$ se tiene que:

$$C_i = 0 \quad (\text{XVII})$$

lo que implica que esas enzimas no ejercerían control sobre la vía.

En términos de regulación metabólica, las etapas irreversibles "acortan" la cadena ($C_i = 0$ para $i < S$). Sin embargo, si la vía tiene retroalimentación las enzimas localizadas más allá de la etapa irreversible pueden llegar a tener influencias.

CONCEPTUALIZACION DEL TEOREMA DEL ENTRECRUZAMIENTO EN LA TEORIA DE CONTROL

Otro conjunto de ecuaciones similares a las anteriores también fueron desarrollados por Heinrich y Rapoport (28,29) para cadenas no lineales y para vías metabólicas que no se encuentran en estado estacionario. Estos mismos autores demuestran en un estudio sobre la validez del teorema de entrecruzamiento (27), que existen diversos casos en los cuales las condiciones derivadas de este teorema pueden ser erróneas. Estos casos son:

(a) un efector externo puede modular a más de una enzima. Considérese por ejemplo un efector M que es activador de dos enzimas E_j y E_k que no son necesariamente adyacentes en la vía. Dependiendo de los coeficientes de control y elasticidad, pueden ocurrir puntos de entrecruce en una u otra enzima, en ambas a la vez o aún más sorprendente, en ambas y surgir un tercer pseudo-entrecruce en medio de ellas, siempre que los coeficientes de control de flujo de las enzimas intermedias sean cercanos a cero y la enzima con el pseudo-cruce tenga una τ mayor de cero. (b) flujo lateral de metabolitos. En este caso, la variación de intermediarios que ingresan o salen de la vía en puntos intermedios puede generar pseudo-entrecruces, aún en reacciones cercanas al equilibrio o en aquellas catalizadas por enzimas no alostéricas. (c) existencia de efectores internos. Estos moduladores son generados por la propia vía metabólica y dependiendo de su sitio de acción, pueden hacer desaparecer a los verdaderos puntos de entrecruce, generando solo mitades de entrecruce (half-crossover) (d) cambio en el estado de formación de complejos de los metabolitos.

Heinrich y Rapoport (27) derivaron una ecuación para la identificación de los sitios de interacción de efectores:

$$\frac{(R)}{v} \left(\frac{1 - Q_i}{q_i} \right) = \frac{1}{k_i} = \frac{\tau_i (1 + q_i)}{q_i} \quad (\text{XVIII})$$

donde R es el producto de los sustratos de la reacción i y Q_i es la K_{AM} .

Nótese que el término de la derecha es una constante. Si una etapa es modificada por algún efector, el tiempo de relajación τ_i cambiará. Puede determinarse entonces experimentalmente el valor de $Q_i (K_{AM})$ antes y después de la adición de algún efector y todas las reacciones donde se observa un cambio serán identificadas como puntos de regulación.

APLICACION DE LA TEORIA DE CONTROL EN VIAS METABOLICAS ESPECIFICAS

La cuestión de la aplicación de los conceptos desarrollados por la teoría de control estriba, en su evaluación experimental. La pregunta parece ser ¿cómo calcular los valores de C_i y ϵ_i para todas las enzimas y todos los metabolitos de una vía metabólica? Es importante recordar que se requiere variar la concentración efectiva de enzimas para calcular C_i (ecuación V). Así la determinación de los coeficientes de control de flujo se ha realizado empleando 3 métodos diferentes.

1. El grupo de Kacser ha utilizado la variación genética de mutantes y heterocariontes de Neurospora crassa para manipular las concentraciones de las enzimas de la biosíntesis de arginina y urea (33). Ellos concluyeron que en la cepa nativa de Neurospora, la actividad de la argininosuccinato sintetasa era la que poseía mayor control sobre el flujo total ($C_i = 0.40$). El resto de las enzimas tenían coeficientes de control menores a 0.10. Este mismo enfoque se utilizó en el análisis de la expresión fenotípica y Kacser y Burn (34) concluyeron que la amplia distribución de la recesividad genética observada en el mundo biológico de acuerdo con las leyes de Mendel se debía a los bajos valores de los coeficientes de control de la mayoría de las enzimas.

2. Otros investigadores han derivado modelos matemáticos adecuados que posteriormente son evaluados experimentalmente a través de la medición de algunas constantes cinéticas (35-37). Por ejemplo Heinrich y Rapoport (35,

36) determinaron los tiempos de relajación de las 3 enzimas de la glucólisis aparentemente más importantes: hexocinasa, fosfofructocinasa y piruvato cinasa (Tabla VII).

TABLA VII. TIEMPOS DE RELAJACION (τ_i) Y COEFICIENTES DE CONTROL DE FLUJO (C_i) DE LA HEXOCINASA (HK), FOSFOFRUCTOCINASA (PFK) Y PIRUVATO CINASA (PK) DE ERITROCITOS HUMANOS (e)

CONDICIONES EXPERIMENTALES	[GGP]	[PEP]	[ATP-Mg]	flujo	τ_{HK}	τ_{PFK}	τ_{PK}	C_{NK}	C_{PFK}
(A) pH 7.2, Pi 1 mM ^a	60 ^b	20	680	1200 ^c	1100 ^d	74	30	0.69	0.31
(B) pH 8.2, Pi 1 mM	10	36	570	2300	780	6.4	28	0.89	0.11
(C) pH 7.2, Pi 50 mM	50	32	800	1800	950	41	32	0.70	0.30
(D) pH 8.2, Pi 50 mM	16	54	910	3200	850	7.4	30	0.85	0.15
(E) pH 7.2, Pi 1 mM 4°C	43	29	340	70	9000	9000	750	0.71	0.29

a) La temperatura fue 37°C, excepto en el experimento E

b) Las unidades de concentración para los 3 metabolitos es μM

c) Las unidades del flujo son $\mu\text{M/h}$

d) Las unidades de τ_i son seg

e) De Rapoport, Heinrich, Jacobasch y Rapoport (1974) (35).

Sorprendentemente, la hexocinasa fué la enzima más lenta bajo diversas condiciones metabólicas y en consecuencia fué la que ejerció mayor control sobre la vía. Otra enzima que ejerce también un fuerte control sobre la glucólisis es la ATPasa, pero debido a que su actividad conduce a un decremento en el flujo total su contribución es negativa (Tabla VIII).

Este mismo grupo (37) simuló las condiciones de síntesis de proteínas en reticulocitos en función de la densidad de ribosomas y de la longitud del ARN_m . Mediante la variación de las constantes de velocidad estos autores concluyeron que las etapas de iniciación ($C_i = 0.22-0.51$) y elongación

TABLA VIII. COEFICIENTES DE CONTROL DE FLUJO (C_i) DE
ALGUNAS ENZIMAS GLUCOLITICAS^(a)

ENZIMA	C_i
Hexocinasa + Fosfofructocinasa	1.37
Piruvato cinasa	0.04
ATPasa	-0.33
Difosfoglicerato mutasa	-0.04
Difosfoglicerato fosfatasa	-0.04

(a) de Rapoport, Heinrich y Rapoport (1976) (36).

(0.49-0.75) determinan la velocidad de síntesis de proteínas, dependiendo de la densidad ribosomal. La terminación y la longitud del ARN_m aparentemente no influyen en el flujo metabólico.

Por otro lado, McMinn y Ottaway (38) desarrollaron programas de computación donde incluyeron todas las propiedades de todas las enzimas del ciclo de Krebs y de la síntesis de glutatión, como son K_m , V_{max} , K_i , K_a , K_{eq} y el mecanismo cinético (por ejemplo, mecanismo hexa-uni ping-pong, entra un sustato y sale un producto tres veces, para el complejo de la oxoglutarato deshidrogenasa). Variando las concentraciones de las enzimas o de metabolitos y manteniendo constante el resto del sistema, estos autores calcularon los respectivos coeficientes de control de flujo y de elasticidad. Los valores encontrados de C_i para el ciclo de Krebs indican que la citrato sintetasa ($C_i = 0.83$) es la enzima que ejerce el mayor control de la vía, mientras que la isocitrato y succinato deshidrogenasas ($C_i = 0.08$) sólo regulan el flujo ligeramente. De nueva cuenta es sorprendente que la oxoglutarato deshidrogenasa no ejerza control sobre el ciclo de Krebs, pues en una enzima típicamente alostérica.

Bohnsack y colaboradores (39) estimaron los valores de los coeficientes de control de flujo de la respiración mitocondrial mediante simulaciones por computadora y experimentos de titulación con inhibidores específicos. Modificando el valor de la relación ATP/ADP extramitocondrial, los valores computarizados de C_i mostraron que la translocasa de adenin-nucleótidos ($C_i = 0.35-0.50$) es la enzima más importante en el control de la respiración mitocondrial.

3. Otros grupos han venido utilizando recientemente el método de inhibición específica para la modificación de las actividades enzimáticas. Originalmente desarrollada por el grupo de Westerhoff y Tager (40), la idea básica es la de titular el flujo metabólico con diferentes inhibidores (al menos uno para cada enzima de la vía) y calcular la pendiente inicial de la curva de inhibición. La determinación del valor del coeficiente de control de el flujo depende entonces del tipo de inhibición, de acuerdo con las siguientes fórmulas (40):

$$\text{Para inhibición irreversible} \quad C_i = \frac{I_{\max}}{F} \left(\frac{dF}{dI} \right) \quad (\text{XIX})$$

$$\text{inhibición no-competitiva} \quad C_i = -\frac{K_i}{F} \left(\frac{dF}{dI} \right) \quad (\text{XX})$$

$$\text{inhibición competitiva} \quad C_i = -\frac{K_i \left(1 + \frac{S}{K_m} \right)}{F} \left(\frac{dF}{dI} \right) \quad (\text{XXI})$$

donde F es el flujo total de la vía, I_{\max} la cantidad mínima de inhibidor necesaria para obtener la máxima disminución del flujo, K_i constante de inhibición, S concentración de sustrato, K_m constante de Michaelis y dF/dI la pendiente de la curva de inhibición.

El procedimiento experimental para calcular C_i consiste en determinar la pendiente inicial de la curva de inhibición (dF/dI) y relacionar este valor con la velocidad de flujo no inhibido (F) y los correspondientes parámetros cinéticos. Se considera la pendiente inicial porque aquí ocurre

una inhibición lineal que permite extrapolar al nivel inicial de estado estacionario, que es el estado de interés. Algunos ejemplos de los cálculos requeridos para obtener C_i son los siguientes: en la figura 5 se muestra el efecto de varios inhibidores respiratorios y de la ATP sintetasa sobre la respiración estimulada por As_i (arsenato iónico) (Figura 6). En el caso de la titulación con malato (figura 5 A), el valor de la pendiente inicial es -4.4, la K_i del acarreador de dicarboxilatos para malato es 0.23 mM, la concentración de succinato es 5 mM, la K_m para succinato 1.17 mM y el flujo inicial F es 132 n átomos oxígeno $mg^{-1} min^{-1}$. Empleando la fórmula XXI para inhibición competitiva tenemos que:

$$C_i = - \frac{0.23 (1 + 5/1.17)}{132} (-4.4) = 0.04$$

Para la curva de titulación con azida (figura 5 A), se utiliza la fórmula XX para inhibición no competitiva. En el caso del HOQNO (un análogo de Coenzima Q), claramente se observa que la pendiente inicial es cero, por lo cual la etapa inhibida no ejerce control sobre la vía (Tabla IX). Finalmente en la titulación con el inhibidor irreversible oligomicina (figura 5 B) tenemos los siguientes cálculos empleando la ecuación XIX:

$$C_i = \frac{236}{186} (-0.60) = 0.76 \quad (+ADP)$$

$$C_i = \frac{275}{137} (-0.35) = 0.70 \quad (-ADP)$$

Empleando este enfoque Groen y colaboradores (40), determinaron los grados de control de las enzimas de la fosforilación oxidativa mitocondrial siendo la translocasa de adenin-nucleótidos ($C_i = 0.33$), el acarreador de dicarboxilatos ($C_i = 0.33$) y la citocromo oxidasa ($C_i = 0.20$), las que ejercían el mayor control. Debido a la facilidad que brinda el uso de inhibidores específicos, este enfoque se ha popularizado rápidamente. Por ejemplo

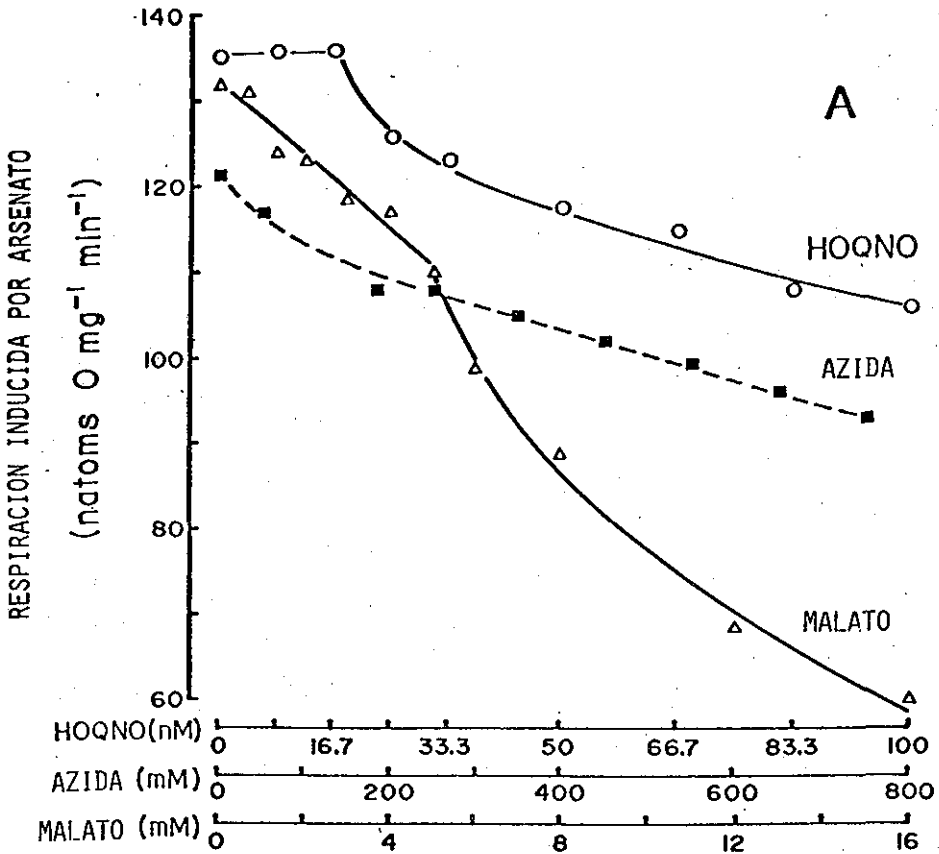
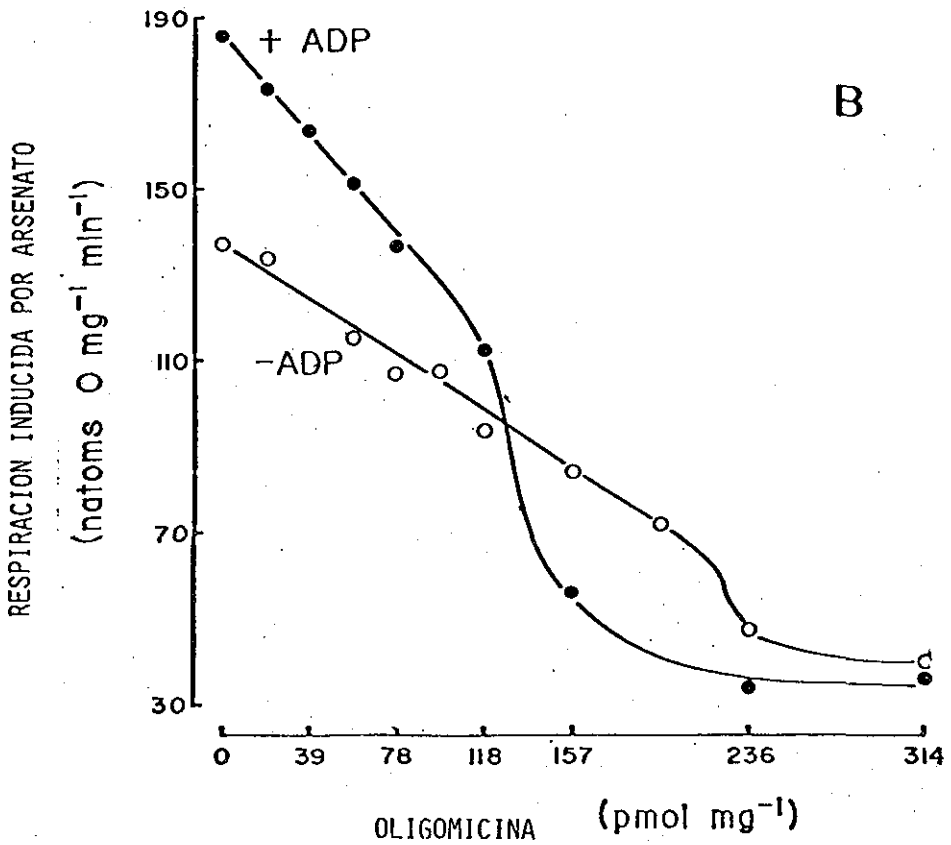


FIGURA 4. INHIBICION DE LA VELOCIDAD DE RESPIRACION. Las mitocondrias de hígado de rata se incubaron con ADP $20\ \mu M$, 20 segundos antes de la adición de arsenato (41).



ESTIMULADA POR ARSENATO (ARSENILACION OXIDATIVA)
 Se baron durante 5 min con los inhibidores indicados. Se
 arsenilación la cual se inició con la adición de As_i 2mM.

se ha utilizado en el análisis del control de la arsenilación oxidativa (41), un proceso análogo a la fosforilación pero sin la participación de la translocasa de adenin-nucleótidos (Tabla IX).

TABLA IX: COEFICIENTES DE CONTROL DE FLUJO (C_i) DE LA ARSENILACION OXIDATIVA MITOCONDRIAL^{1(a)}

ENZIMA	C_i	Inhibidor
ATP sintetasa	0.70 0.76 (+ ADP)	Oligomicina (irreversible)
Citocromo oxidasa	0.17	Azida (no competitivo)
Complejo de citocromos	0.0	HOQNO (no competitivo)
B-C ₁	0.02	Antimicina (irreversible)
Acarreador de As _i	0.12	Fosfato (competitivo)
	0.0	NEM (no competitivo)
Acarreador de dicarboxilatos	0.05	Malato (competitivo)
	0.10	Mersalil (no competitivo)

(a) Tomado de Moreno-Sánchez, R. (1985) (41)

En esta vía, el arsenato ingresa a la mitocondria a través del acarreador de fosfatos, se combina con el ADP endógeno en una reacción catalizada por la ATP sintetasa, la cual consume el gradiente de H^+ generado por la cadena respiratoria para sintetizar ADP • As y como todos los ésteres orgánicos de arsenato, el producto se hidroliza espontáneamente en el medio acuoso, creándose un ciclo de síntesis e hidrólisis a nivel de la ATP sintetasa (figura 6). Debido a que en la arsenilación no está funcionando una de las enzimas importantes (translocasa) todo el control de la vía radica principalmente en la ATP sintetasa ($C_i = 0.74$).

Por otro lado, Wanders y colaboradores (42) usando norvalina, un inhibidor competitivo de la ornitina transcarbamilasa y la propiedad de la conecti

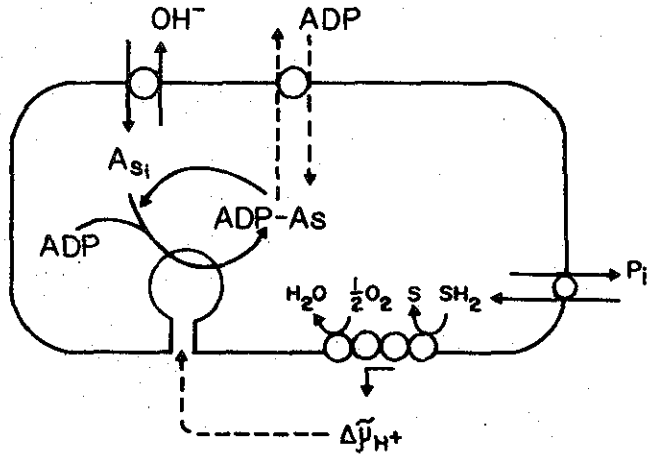


Figura 6. Mecanismo de Estimulación Respiratoria por Arsenato. El As_i penetra a la mitocondria a través del intercambiador Pi/OH^- el cual es sensible a mersalil. El As_i reacciona entonces con el ADP endógeno para formar ADP-arsenilado , mediante un proceso catalizado por la ATPasa y dependiente de energía. El ADP-As es inestable en soluciones acuosas y se hidroliza rápidamente, produciéndose un reciclaje de As , a nivel de ATPasa con gasto de energía. El ADP-As también podría ser expulsado por la translocasa de adenín-nucleótidos e hidrolizarse posteriormente en el medio extramitocondrial.

vidad de la teoría de control, concluyeron que la síntesis mitocondrial de citrulina es controlada exclusivamente por la carbamil-fosfato-sintetasa ($C_i = 0.88-1.10$), mientras que la ornitín transcarbamilasa, la anhidrasa carbónica, la síntesis de ATP y el transporte de ornitina no contribuyen significativamente a la regulación del flujo. Los elevados coeficientes de control de flujo de la ATP sintetasa en el caso de la arsenilación (41) y de la carbamil-fosfato sintetasa en la síntesis de citrulina (42), pueden explicarse por los bajos coeficientes de elasticidad de las enzimas subsecuentes hacia sus sustratos (translocasa de adenín-nucleótidos y ornitina transcarbamilasa, respectivamente).

Objeciones al Uso de Inhibidores Específicos.

Se puede señalar 3 inconsistencias en la determinación de los coeficientes de control de flujo usando la pendiente inicial de la curva de titulación.

1) No existe criterio analítico para decidir a partir de qué rango de concentraciones de inhibidor se debe iniciar la titulación del flujo. Es cierto que si la titulación empieza con concentraciones de inhibidor extremadamente bajas, la pendiente inicial (dF/dI) siempre será igual a cero. Lo contrario sucederá si la titulación empieza con concentraciones relativamente altas. Un criterio semiempírico sería iniciar la titulación con una cantidad de inhibidor igual a $0.1 K_i$, este criterio fué empleado en el análisis de control de la fosforilación y arsenilación oxidativa (41).

2) Cuando se usan inhibidores irreversibles, se requiere identificar cual es la concentración mínima necesaria de inhibidor para alcanzar la inhibición máxima (I_{max}) de acuerdo con la ecuación XIX, ver, por ejemplo, figura 5 B donde se usó un inhibidor irreversible. Como la zona de máxima inhibición no es lineal existe cierta incertidumbre para determinar I_{max} . Además, no siempre pueden garantizarse las condiciones óptimas para la unión

estequiométrica del inhibidor a su enzima.

3) En el caso de inhibidores reversibles se requiere conocer las constantes de inhibición (K_i) y de Michaelis (K_m), además de la concentración real de sustrato (ecuaciones XX y XXI). Aquí se supone que dichas constantes son de la misma magnitud cuando se determinaron en la enzima aislada que cuando se extrapolan a las condiciones particulares de la vía metabólica. Sabemos que la asociación de un ligando depende muchas veces del pH, temperatura y fuerza iónica y estos parámetros generalmente no son iguales en las condiciones de la enzima aislada o en la vía. Además, debido a estos mismos factores, las conformaciones de las enzimas pueden ser completamente diferentes.

EPILOGO

Los criterios "clásicos" empleados en el análisis del control metabólico y discutidos en la primera parte de este trabajo solo describen cualitativamente a las enzimas que regulan el flujo de la vía, esto no significa que dichos criterios utilicen premisas equivocadas, simplemente, no establecen un análisis riguroso de las variables del sistema (flujo y concentraciones de metabolitos contra concentraciones de enzimas). La teoría de control desarrollada originalmente por Koser y Burns (23-25) y Heinrich y Rapoport (26-29), establece un estricto tratamiento matemático que permite cuantificar el grado de control que ejerce cada una de las enzimas de una vía metabólica, considerando todas las variables del sistema. De esta manera, el desarrollo conceptual de la teoría de control ha proporcionado la posibilidad de plantear preguntas cuantitativas sobre regulación metabólica y obtener, respuestas cuantitativas y precisas. Esto seguramente estimulará en los próximos años el estudio del control del metabolismo y conducirá a la conclusión de que toda vía metabólica es una sociedad democrática donde todas las enzimas tienen derechos y obligaciones.

ESTRUCTURA Y COMPOSICION MITOCONDRIAL^a

La mitocondria es uno de los organelos mas ampliamente distribuidos en la naturaleza, pues se localiza en animales, vegetales, hongos y protistas. Este organelo se encarga de sintetizar el ATP, la molécula que la célula utiliza como fuente de energía. Se ha calculado que hay de 1000 a 2000 mitocondrias por célula hepática y que el volumen que ocupan es del 30-40% del total celular. La forma que adoptan es muy variada y puede ser esférica, alargada ó laminar. Estan constituidas por dos membranas: una externa y una interna que forma pliegues o crestas. Funcionalmente pueden observarse dos tipos de mitocondrias: en estado condensado, la mitocondria sintetiza ATP, las crestas estan bien definidas y el volumen interno es muy reducido (0.4-1.0 μ l/mg prot. mit.); en estado ortodoxo, la mitocondria esta hinchada, no sintetiza ATP, las crestas desaparecen, es difícil distinguir la separación entre las dos membranas y el volumen interno es relativamente grande (2.0 μ l/mg) (43-45).

La membrana externa es sumamente permeable a metabolitos y polímeros de no mas de 8,000 daltones de peso molecular, lo cual parece estar relacionado con una proteína formadora de canales llamada porina (46). Aunque es posible que el límite de permeabilidad señalado sea más amplio puesto que el citocromo c (PM 12 kda) es capaz de estimular la respiración mitocondrial.

Sin embargo, recientemente se reportó que la oxidación del citocromo c exógeno era catalizada por una pequeña fracción (5-12%) de mitocondrias rotas la cual siempre esta presente en todas las preparaciones mitocondriales (46a). En la membrana externa también se encuentra la monoamino oxidasa, enzima en células nerviosas se encarga de metabolizar algunos neurotransmisores, así como un citocromo b_5 , cuya función es aún desconocida. En cuanto

a. Parte de esta sección de la tesis apareció publicada en las Memorias del Curso de Actualización "Procesos Celulares" Fac.Med.Vet. y Zoot. UNAM 1984

a la composición lipídica esta membrana contiene cantidades apreciables de colesterol y en contraste con la membrana interna no posee cardiolipina, algo totalmente contrario a lo que sucede en la membrana interna.

La membrana interna mitocondrial es más compleja. Contiene una gran variedad de actividades enzimáticas y de transporte, algunas de las cuales no han sido todavía bien caracterizadas. La siguiente es una lista de los complejos proteicos de la membrana interna que han sido purificados y relacionados con alguna función (47,47a):

- NADH deshidrogenasa o Complejo I. Cataliza la transferencia de 2 electrones de NADH hacia ubiquinona y tiene actividad de bomba de H^+ . Tiene un peso molecular de 850,000. Está constituido por al menos 16 polipéptidos. El NADH es oxidado en el lado de la matriz mitocondrial por un componente que tiene ligado FMN. Contiene entre 4 a 7 ferrosulfo-proteínas. Es inhibida específicamente por rotenona y piericidina.

- Succinato deshidrogenasa o Complejo II. Cataliza la transferencia de dos electrones desde succinato a ubiquinona; no tiene actividad de bomba de H^+ . Está constituida por 4 polipéptidos, con un peso molecular de 97,000. La subunidad mayor tiene unido covalentemente FAD; contiene dos ferrosulfoproteínas y mantiene unido un citocromo b, diferente a los del complejo III. Se inhibe competitivamente por malonato y oxaloacetato.

- Complejo bc_1 ó Complejo III. Cataliza la transferencia de dos electrones desde la ubiquinona al citocromo c y expulsa H^+ fuera de la mitocondria. Está constituido por 8 subunidades, incluyendo 2 citocromos b y un citocromo c_1 ; tiene un peso molecular de 280,000 Es inhibido por Antimicina A.

- Citocromo oxidasa ó Complejo IV. Cataliza la transferencia de 4 electrones desde el citocromo c hasta el oxígeno y posee actividad de bomba de H^+ . Está constituida por 2 citocromos: a y a_3 , los cuales son distinguibles porque a_3 reacciona con el oxígeno y con los inhibidores CO , CN^- y N_3^- . Tiene un

peso molecular de 200,000.

- ATPasa o Complejo V. Cataliza la formación de ATP a partir de ADP y fosfato, utilizando la energía proveniente de un gradiente electroquímico de H^+ . Está constituida por aprox. 19 subunidades. Tiene un peso molecular de 500,000. Es inhibida por oligomicina y aurovertina.
- Acarreador de ADP/ATP. Esta proteína cataliza el intercambio de un nucleótido interno por otro externo y durante la fosforilación oxidativa funciona introduciendo ADP y expulsando ATP. Está constituida por dos subunidades idénticas con peso molecular de 30,000. Es inhibido por atractilósido, carboxiatractilósido, ac. agárico y ac. bonkrékico.
- Acarreador de Fosfato. Durante la fosforilación oxidativa funciona introduciendo fosfato y sacando OH^- . Tiene un peso molecular de 30,000 y es inhibido por N-etilmaleimida y mersalil. También puede transportar arsenato.
- Nicotinamida nucleótido transhidrogenasa. Cataliza la transferencia de electrones de NADPH a NAD^+ , generando un gradiente electroquímico de H^+ . El sitio catalítico está en el lado de la matriz.
- Acarreador de Calcio. Se han realizado algunos intentos para aislar a la proteína responsable del transporte de calcio, pero cada investigador extrae una molécula diferente. A pesar de esto, con una de estas preparaciones se lograron obtener anticuerpos. Se inhibe con rojo de rutenio y lantánidos.

Existen algunas otras proteínas bien estudiadas que se encuentran a uno u otro lado de la membrana interna. Como ejemplo tenemos: la glicerol fosfato deshidrogenasa, adenilato cinasa, carnitina acil transferasa, betahidroxibutirato deshidrogenasa y acilCoA deshidrogenasa, entre otras. Además se han observado actividades de transporte para una gran cantidad de metabolitos sin que a la fecha se haya logrado aislar a los acarreadores específicos.

Aparte de la bien conocida función de las mitocondrias de formar ATP,

existe una multitud de procesos metabólicos que se realizan parcialmente ó en su totalidad en el interior de las mitocondrias entre las cuales se pueden citar las siguientes:

- Ciclo de Krebs. Oxidación total de carbohidratos, lípidos y aminoácidos.
- Beta oxidación. Degradación de ácidos grasos.
- Metabolismo de aminoácidos. La mitocondria posee enzimas para la síntesis y degradación de algunos aminoácidos, como son transaminasas y la glutamato deshidrogenasa.
- Gluconeogénesis. En la matriz mitocondrial se localiza la piruvato carboxilasa y en algunos organismos también la PEP carboxicinasas, enzimas reguladoras de la vía.
- Ureogénesis. Se encuentran la carbamilo fosfato sintetasa y la ornitina trans carbamilasa, enzimas que inicial la vía.
- Síntesis de ácidos grasos. La mitocondria se encarga de alargar la cadena de los ácidos sintetizados en el citosol.
- Síntesis de Porfirinas. La mitocondria posee la coproporfirinógeno III descarboxilasa y la protoporfirinógeno oxidasa en la matriz y la ferroquelatasa y la deltaaminolevulinato sintetasa en la membrana interna.
- Síntesis de hormonas esteroides. La primera reacción de esta vía es la conversión de colesterol a pregnenolona, catalizada por la enzima mitocondrial desmolasa colesterol oxidasa.

MECANISMO DE SINTESIS DE ATP

Este proceso para su mejor análisis puede dividirse en tres problemas:

a) ¿ Como se acopla la energía de oxidación de los sustratos realizada por la cadena respiratoria con la formación de ATP?

b) ¿ Cómo acopla la ATPsintetasa o ATPasa el gradiente electroquímico de H^+ con la formación de ATP?

c) ¿Cuál es el mecanismo químico en el sitio catalítico de la enzima pa-

existe una multitud de procesos metabólicos que se realizan parcialmente ó en su totalidad en el interior de las mitocondrias entre las cuales se pueden citar las siguientes:

- Ciclo de Krebs. Oxidación total de carbohidratos, lípidos y aminoácidos.
- Beta oxidación. Degradación de ácidos grasos.
- Metabolismo de aminoácidos. La mitocondria posee enzimas para la síntesis y degradación de algunos aminoácidos, como son transaminasas y la glutamato deshidrogenasa.
- Gluconeogénesis. En la matriz mitocondrial se localiza la piruvato carboxilasa y en algunos organismos también la PEP carboxicinasas, enzimas reguladoras de la vía.
- Ureogénesis. Se encuentran la carbamilo fosfato sintetasa y la ornitina trans carbamilasas, enzimas que inician la vía.
- Síntesis de ácidos grasos. La mitocondria se encarga de alargar la cadena de los ácidos sintetizados en el citosol.
- Síntesis de Porfirinas. La mitocondria posee la coproporfirinógeno III descarboxilasa y la protoporfirinógeno oxidasa en la matriz y la ferroquelatasa y la deltaaminolevulinato sintetasa en la membrana interna.
- Síntesis de hormonas esteroideas. La primera reacción de esta vía es la conversión de colesterol a pregnenolona, catalizada por la enzima mitocondrial desmolasa colesterol oxidasa.

MECANISMO DE SINTESIS DE ATP

Este proceso para su mejor análisis puede dividirse en tres problemas:

a) ¿ Como se acopla la energía de oxidación de los sustratos realizada por la cadena respiratoria con la formación de ATP?

b) ¿ Cómo acopla la ATPsintetasa o ATPasa el gradiente electroquímico de H^+ con la formación de ATP?

c) ¿Cuál es el mecanismo químico en el sitio catalítico de la enzima pa-

ra la unión del fosfato al ADP?

Para responder a la primera pregunta, P. Mitchell en 1961 propuso la llamada hipótesis quimiosmótica, la cual recibió fuerte apoyo experimental en los subsecuentes 15 años. Esta hipótesis postula que del flujo de electrones en las reacciones de oxidoreducción de la cadena respiratoria, se obtiene suficiente energía libre para que ciertos componentes de la misma cadena respiratoria expulsen H^+ hacia el exterior de la mitocondria, generando un gradiente electroquímico llamado fuerza protomotriz. Este gradiente es aprovechado por la ATPsintetasa permitiendo flujo de H^+ a través del componente membranal F_0 , que actúa como un canal de H^+ y conduce los iones hasta el sitio catalítico de la enzima en la F_1 , donde los H^+ promueven la unión química del fosfato al ADP (48, 48a).

La hipótesis quimiosmótica está basada, por tanto en 4 postulados:

- a) una cadena de óxido-reductores que transloca H^+
- b) Una ATPsintetasa que transloca H^+
- c) Una membrana impermeable a iones
- d) Sistemas de intercambio y difusión, para el transporte de iones, acoplados a la translocación de protones.

Respecto al primer punto, se ha aislado el componente membranal de la ATPasa (F_0) de bacterias, cloroplastos y mitocondrias y se ha observado que funciona como un transportador de H^+ . También se ha demostrado que ciertos componentes de la cadena respiratoria actúan como bombas de H^+ . La conductancia de la membrana interna a H^+ es muy baja y por último existen sistemas de transporte para algunos iones (Ca^{++} , Na^+ , K^+) (revisado por Ernster y Schatz, ref. 49).

La hipótesis quimiosmótica presupone que el verdadero intermediario energético que acopla la actividad de la cadena respiratoria con la formación de ATP es el gradiente electroquímico de protones, los cuales están desloca-

lizados en ambos lados de la membrana debido a su alta velocidad de difusión en agua. Es consecuencia, la actividad de la ATP sintetasa debe estar determinada por las concentraciones de sustratos y productos y por la amplitud de la fuerza protomotriz. Esto significa que el potencial de fosforilación ΔG_p varía proporcionalmente con la fuerza protomotriz $\Delta \mu_{H^+}$ de acuerdo con la ecuación:

$$\Delta G_p = n \Delta \mu_{H^+} \quad (XXII)$$

y la constante de proporcionalidad n es el número de protones requeridos para la síntesis de ATP. El potencial de fosforilación se podría definir como la cantidad de energía almacenada en forma de ATP de acuerdo con la ecuación

$$\Delta G_p = \Delta G^\circ_p + R_t \ln \frac{[ATP]}{[ADP][Pi]} \quad \text{Y } \Delta \mu_{H^+}$$

se define como la suma de los gradientes químico y eléctrico ($\Delta \psi$) de protones a través de una membrana $\Delta \mu_{H^+} = \Delta \psi - \frac{RT}{F} \Delta pH$. La hipótesis quimiosmótica postula que la síntesis de ATP (ΔG_p) tiene una dependencia lineal a la magnitud de la fuerza protomotriz y que el número de H^+ requeridos para la síntesis de una molécula de ATP es 2 (48,48a).

Quimiosmosis localizada

Sin embargo, varias observaciones recientes han demostrado que la fuerza protomotriz no guarda una relación lineal con la síntesis de ATP en mitocondrias de animales (50) y vegetales (51), en partículas submitocondriales (52), cloroplastos y bacterias (54). Estos estudios se han realizado añadiendo inhibidores de la cadena de transporte de electrones o bien titulando con algún desacoplante y midiendo en cada caso la velocidad de síntesis de ATP y la fuerza protomotriz. Con los inhibidores se ha observado que la fuerza protomotriz permanece constante mientras que la velocidad de fosforilación disminuye progresivamente. Con los desacoplantes (6 valinomicina + K^+) disminuye la fuerza protomotriz mientras que la síntesis de ATP se mantiene constante. Aparentemente, la velocidad de formación

de ATP se correlaciona mejor con el número de cadenas oxidorreductoras activas que con la fuerza protomotriz (50,54); por tanto estos datos se han interpretado como un acoplamiento localizado entre cadenas oxido reductoras individuales y ATP sintetetasas (55) o bien como un cambio en las propiedades cinéticas del sistema fosforilante (56, 56a,56b).

Estequiometría de la Fosforilación Oxidativa.

Otra cuestión de la hipótesis quimiosmótica sumamente controvertida es acerca de las estequiometrías de los H^+ expulsados en cada sitio de conservación de energía y consumidos en la formación de una molécula de ATP. De acuerdo con los postulados del acoplamiento quimiosmótico, en el equilibrio termodinámico habría una dependencia lineal del ΔG_p con la energía libre disponible de la oxidación de sustrato (ΔG_r o potencial redox):

$$- \Delta G_r = \left(\frac{ATP}{O} \right) \Delta G_p \quad (XXIII)$$

donde la constante de proporcionalidad sería el número de moléculas de ATP formadas al oxidarse una molécula de sustrato. Esta ecuación es exactamente igual a la ecuación XXII si se supone que ΔG_r y $\Delta \bar{\mu}_{H^+}$ son proporcionales.

Debido a que en mitocondrias y partículas submitocondriales continúan la respiración aún después de que ha finalizado la síntesis de ATP (estado 4), Lemasters y colaboradores (57-58) han planteado la necesidad de analizar las relaciones entre fuerzas ($\Delta G_p, \Delta G_r$) y flujos (vel. de síntesis de ATP y de respiración) en términos de la termodinámica de procesos irreversibles.

Este enfoque describe las velocidades de respiración (J_r) y fosforilación (J_p) mediante ecuaciones lineales simples:

$$J_r = (L_r \Delta G_r - L_{rp} \Delta G_p) \quad (XXIV)$$

$$J_p = (L_{pr} \Delta G_r + L_p \Delta G_p) \quad (XXV)$$

donde L_r y L_p son coeficientes directos y L_{rp} y L_{pr} son coeficientes cruzados e iguales. Esta condición de reciprocidad fue planteada originalmente

(59) para reacciones cercanas al equilibrio. Por tanto, parecería que la linealidad entre flujos y fuerzas y la reciprocidad planteada en las ecuaciones XXIV y XXV sería difícil de aplicar en la fosforilación oxidativa mitocondrial la cual es una reacción bastante alejada del equilibrio termodinámico. Sin embargo, recientemente se demostró que ambas condiciones se cumplían en la fosforilación oxidativa en mitocondrias (60) y partículas submitocondriales (57). El significado bioquímico de los coeficientes (L) es descrito por dos parámetros adimensionales, el grado de acoplamiento (q) y la estequiometría fenomenológica (Z):

$$q = \frac{L_{rp}}{\sqrt{L_r L_p}} \quad ; \quad Z = \sqrt{L_p/L_r}$$

El grado de acoplamiento toma valores entre 0 y 1. Cuando $q=1$, las dos reacciones (respiración y fosforilación) están perfectamente acopladas. La estequiometría fenomenológica Z representa la estequiometría ideal o mecánica n dentro de límites definidos por el grado de acoplamiento:

$$q Z \leq n \leq \frac{Z}{q}$$

De esta manera Z es idéntico a n conforme q se aproxima a 1.0.

Para la determinación de Z y q podrían considerarse dos estados estacionarios: flujo basal (level flow) y flujo estático (static head). El flujo basal es la condición en la cual no hay presión negativa de la reacción de salida (fosforilación) y entonces $\Delta G_p=0$. Sustituyendo los valores de q y Z en las ecuaciones XXIV y XXV tenemos que:

$$\frac{J_p}{J_r} = q \cdot Z \quad (\text{XXVI})$$

donde J_p/J_r sería la relación ATP/O medida empíricamente (61). Desafortunadamente, esta condición de flujo basal no es posible obtenerla en el caso de la fosforilación oxidativa pues la energía libre de la síntesis de ATP es muy grande. Es prácticamente imposible fijar concentraciones de ATP, ADP y Pi que establezcan un $\Delta G_p=0$.

El flujo estático corresponde al clásico estado 4 de respiración mitocondrial en el cual ΔG_p es tan grande que la reacción de salida (fosforilación) no puede proceder, aunque la reacción de entrada (respiración) sigue funcionando y $J_p = 0$. Sustituyendo los valores de q y Z en la ecuación XXV se tiene.

$$-\frac{\Delta G_r}{\Delta G_p} = \frac{Z}{q} \quad (\text{XXVII})$$

Para determinar Z de la ecuación XXVII es necesario calcular antes q . Rottenberg (61) propuso que q puede estimarse con la siguiente expresión:

$$q = \sqrt{1 - \frac{J_r(J_p = 0)}{J_r(\Delta G_p = 0)}} \quad (\text{XXVIII})$$

donde $J_r(J_p=0)$ es la velocidad de respiración cuando la síntesis neta de ATP es cero (en estado 4 o flujo estatico) y $J_r(\Delta G_p=0)$ es la respiración cuando ΔG_p es cero. $J_r(J_p=0)$ puede medirse directamente pero $J_r(\Delta G_p=0)$ debe extrapolarse del intercepto en el eje de las ordenadas de la gráfica ΔG_p vs J_r (cuando $\Delta G_p=0$). Lemasters y colaboradores calcularon en particular las submitocondriales (57) que el grado de acoplamiento variaba entre 0.77 a 0.81 y tendía a disminuir con la concentración de P_i , mientras que Z con NADH como sustrato variaba entre 3.8 a 4.1 y tendía a aumentar con la concentración de P_i . En mitocondrias el valor de q fue de 0.980 y Z fue de 1.99 para succinato, 2.99 para glutamato + malato, 3.16 para β -hidroxibutirato y de 4.07 para oxoglutarato (58). En el caso de oxoglutarato está involucrada una fosforilación a nivel de sustrato y para β -hidroxibutirato el valor de Z es mayor porque el transporte de este sustrato no requiere de energía como en el caso del transporte de glutamato. Lemasters y Bilica (57) propusieron otro procedimiento menos laborioso para determinar el grado de acoplamiento:

$$q = \sqrt{1 - \frac{J_r(J_p=0)}{J_r(\text{Desacoplada})}} \quad (\text{XXIX})$$

Los valores obtenidos con esta ecuación iban de 0.780 a 0.826 y tendían

a disminuir con la concentración de Pi.

Esté mismo grupo (57,58) determinó los valores de ΔG_r para los distintos sitios de conservación de energía y de ΔG_p , y usando la ecuación XXVII propusieron un modelo de 13 H^+ para el acoplamiento quimiosmótico, donde las estequiometrías de H^+ son 3 para la ATP sintetasa, 1 para los transportes de Pi y ADP y 5,4 y 4 para los sitios 1, 2 y 3 respectivamente. La única diferencia con el modelo de 12 H^+ (62) es la estequiometría en el sitio 1 por lo cual sería prematuro descartar este modelo.

Mecanismo Cinético y Químico de la Síntesis de ATP

Respecto a la segunda pregunta que nos hacíamos inicialmente, existe también mucha discusión acerca de como interaccionan la F_0 con la F_1 . De acuerdo con Mitchell, los H^+ son conducidos por la F_0 hasta el sitio catalítico en la F_1 . Boyer (63) propuso un mecanismo indirecto, en donde la conducción de H^+ a través de la F_0 produce un cambio conformacional en la F_1 , lo cual facilita la unión de ADP y fosfato a una subunidad y libera ATP de otra subunidad; la formación de ATP se realizaría a expensas de la energía almacenada en la conformación "energizada" de la mitocondria. En este sentido se ha demostrado que la formación del enlace fosfato-fosfato en un ambiente no-acuoso es espontánea, a diferencia del ambiente acuoso donde el proceso es endergónico (64). En la ATPasa de retículo sarcoplásmico, de Meis (65) observó la síntesis espontánea del intermediario de alta energía (acil-fosfato) cuando la enzima se incubaba en un medio hidrofóbico con solventes orgánicos. En la ATPasa mitocondrial ya se ha observado también la formación espontánea de ATP utilizando solventes orgánicos (66). Por tanto, la hipótesis para el acoplamiento del gradiente de H^+ con la síntesis de ATP a nivel de la enzima, sería la de que el flujo de H^+ a través de la F_0 induce un cambio conformacional que capacita a la en-

zima para reducir el grado de hidratación de los sustratos ADP y fosfato, produciendo un ambiente de baja polaridad en el sitio catalítico que facilitaría la unión espontánea de los dos sustratos para formar sí ATP. Actualmente dicha hipótesis esta siendo sometida a experimentación.

El mecanismo químico de unión del fosfato al ADP aún no se ha dilucidado, pero se sabe por estudio de inactivación que para la catálisis son indispensables residuos de lisina, tirosina, aspártico y arginina. Se ha propuesto que el grupo carboxílico del aspártico podría unir un ión de magnesio, el cual a su vez estaría orientando al fosfato durante la reacción; el grupo guanidino de la arginina uniría por atracción electrostática a los grupos fosfato del ADP, quedando los grupos amino y fenolato de la lisina y la tirosina como responsables directos de la catálisis (67).

REGULACION DE LA FOSFORILACION OXIDATIVA MITOCONDRIAL^a

En los mamíferos, el ATP proveniente de la glicólisis y de la fosforilación oxidativa es la fuente de energía utilizada para realizar las diversas funciones celulares. En particular, las actividades del cerebro y el corazón dependen prácticamente en un 100% del ATP suministrado por la mitocondria. Entender cómo se regula la síntesis de ATP en las mitocondrias es uno de los problemas centrales de la bioenergética que en la actualidad se estudia intensamente.

La fosforilación oxidativa mitocondrial es la síntesis de ATP acoplada a la actividad de la cadena respiratoria. De acuerdo con la teoría quimiosmótica, la oxidación del NADH y FADH₂ (formados en el ciclo de Krebs y la β-oxidación) a través de la cadena de transportadores de electrones genera un gradiente electroquímico de H⁺, el cual es aprovechado por la ATP sintetasa (F₀F₁-ATPasa) para catalizar la formación de ATP a partir

a. Parte de esta Sección de la tesis aparecerá publicada en: Boletín de Educación Bioquímica. Ed. Dept. Bioquímica, Fac. Medicina, UNAM, 1985.

existe una multitud de procesos metabólicos que se realizan parcialmente ó en su totalidad en el interior de las mitocondrias entre las cuales se pueden citar las siguientes:

- Ciclo de Krebs. Oxidación total de carbohidratos, lípidos y aminoácidos.
- Beta oxidación. Degradación de ácidos grasos.
- Metabolismo de aminoácidos. La mitocondria posee enzimas para la síntesis y degradación de algunos aminoácidos, como son transaminasas y la glutamato deshidrogenasa.
- Gluconeogénesis. En la matriz mitocondrial se localiza la piruvato carboxilasa y en algunos organismos también la PEP carboxicinasas, enzimas reguladoras de la vía.
- Ureogénesis. Se encuentran la carbamilo fosfato sintetasa y la ornitina trans carbamilasa, enzimas que inicial la vía.
- Síntesis de ácidos grasos. La mitocondria se encarga de alargar la cadena de los ácidos sintetizados en el citosol.
- Síntesis de Porfirinas. La mitocondria posee la coproporfirinógeno III descarboxilasa y la protoporfirinógeno oxidasa en la matriz y la ferroquelatasa y la deltaaminolevulinato sintetasa en la membrana interna.
- Síntesis de hormonas esteroides. La primera reacción de esta vía es la conversión de colesterol a pregnenolona, catalizada por la enzima mitocondrial desmolasa colesterol oxidasa.

MECANISMO DE SINTESIS DE ATP

Este proceso para su mejor análisis puede dividirse en tres problemas:

a) ¿ Como se acopla la energía de oxidación de los sustratos realizada por la cadena respiratoria con la formación de ATP?

b) ¿ Cómo acopla la ATPsintetasa o ATPasa el gradiente electroquímico de H^+ con la formación de ATP?

c) ¿Cuál es el mecanismo químico en el sitio catalítico de la enzima pa-

ra la unión del fosfato al ADP?

Para responder a la primera pregunta, P. Mitchell en 1961 propuso la llamada hipótesis quimiosmótica, la cual recibió fuerte apoyo experimental en los subsecuentes 15 años. Esta hipótesis postula que del flujo de electrones en las reacciones de oxidoreducción de la cadena respiratoria, se obtiene suficiente energía libre para que ciertos componentes de la misma cadena respiratoria expulsen H^+ hacia el exterior de la mitocondria, generando un gradiente electroquímico llamado fuerza protomotriz. Este gradiente es aprovechado por la ATPsintetasa permitiendo flujo de H^+ a través del componente membranal F_0 , que actúa como un canal de H^+ y conduce los iones hasta el sitio catalítico de la enzima en la F_1 , donde los H^+ promueven la unión química del fosfato al ADP (48, 48a).

La hipótesis quimiosmótica está basada, por tanto en 4 postulados:

- a) una cadena de óxido-reductores que transloca H^+
- b) Una ATPsintetasa que transloca H^+
- c) Una membrana impermeable a iones
- d) Sistemas de intercambio y difusión, para el transporte de iones, acoplados a la translocación de protones.

Respecto al primer punto, se ha aislado el componente membranal de la ATPasa (F_0) de bacterias, cloroplastos y mitocondrias y se ha observado que funciona como un transportador de H^+ . También se ha demostrado que ciertos componentes de la cadena respiratoria actúan como bombas de H^+ . La conductancia de la membrana interna a H^+ es muy baja y por último existen sistemas de transporte para algunos iones (Ca^{++} , Na^+ , K^+) (revisado por Ernster y Schatz, ref. 49).

La hipótesis quimiosmótica presupone que el verdadero intermediario energético que acopla la actividad de la cadena respiratoria con la formación de ATP es el gradiente electroquímico de protones, los cuales están desloca-

lizados en ambos lados de la membrana debido a su alta velocidad de difusión en agua. Es consecuencia, la actividad de la ATP sintetasa debe estar determinada por las concentraciones de sustratos y productos y por la amplitud de la fuerza protomotriz. Esto significa que el potencial de fosforilación ΔG_p varía proporcionalmente con la fuerza protomotriz $\Delta \mu_{H^+}$ de acuerdo con la ecuación:

$$\Delta G_p = n \Delta \mu_{H^+} \quad (XXII)$$

y la constante de proporcionalidad n es el número de protones requeridos para la síntesis de ATP. El potencial de fosforilación se podría definir como la cantidad de energía almacenada en forma de ATP de acuerdo con la ecuación

$$\Delta G_p = \Delta G^\circ_p + R_t \ln \frac{[ATP]}{[ADP][Pi]} \quad \text{Y } \Delta \mu_{H^+}$$

se define como la suma de los gradientes químico y eléctrico ($\Delta \psi$) de protones a través de una membrana $\Delta \mu_{H^+} = \Delta \psi - \frac{RT}{F} \Delta pH$. La hipótesis quimiosmótica postula que la síntesis de ATP (ΔG_p) tiene una dependencia lineal a la magnitud de la fuerza protomotriz y que el número de H^+ requeridos para la síntesis de una molécula de ATP es 2 (48,48a).

Quimiosmosis localizada

Sin embargo, varias observaciones recientes han demostrado que la fuerza protomotriz no guarda una relación lineal con la síntesis de ATP en mitocondrias de animales (50) y vegetales (51), en partículas submitocondriales (52), cloroplastos y bacterias (54). Estos estudios se han realizado añadiendo inhibidores de la cadena de transporte de electrones o bien titulando con algún desacoplante y midiendo en cada caso la velocidad de síntesis de ATP y la fuerza protomotriz. Con los inhibidores se ha observado que la fuerza protomotriz permanece constante mientras que la velocidad de fosforilación disminuye progresivamente. Con los desacoplantes (6 valinomicina + K^+) disminuye la fuerza protomotriz mientras que la síntesis de ATP se mantiene constante. Aparentemente, la velocidad de formación

de ATP se correlaciona mejor con el número de cadenas oxidorreductoras activas que con la fuerza protomotriz (50,54); por tanto estos datos se han interpretado como un acoplamiento localizado entre cadenas oxido reductoras individuales y ATP sintetasas (55) o bien como un cambio en las propiedades cinéticas del sistema fosforilante (56, 56a,56b).

Estequiometría de la Fosforilación Oxidativa.

Otra cuestión de la hipótesis quimiosmótica sumamente controvertida es acerca de las estequiometrías de los H^+ expulsados en cada sitio de conservación de energía y consumidos en la formación de una molécula de ATP. De acuerdo con los postulados del acoplamiento quimiosmótico, en el equilibrio termodinámico habría una dependencia lineal del ΔG_p con la energía libre disponible de la oxidación de sustrato (ΔG_r o potencial redox):

$$- \Delta G_r = \left(\frac{ATP}{O} \right) \Delta G_p \quad (XXIII)$$

donde la constante de proporcionalidad sería el número de moléculas de ATP formadas al oxidarse una molécula de sustrato. Esta ecuación es exactamente igual a la ecuación XXII si se supone que ΔG_r y $\Delta \bar{\mu}_{H^+}$ son proporcionales.

Debido a que en mitocondrias y partículas submitocondriales continúan la respiración aún después de que ha finalizado la síntesis de ATP (estado 4), Lemasters y colaboradores (57-58) han planteado la necesidad de analizar las relaciones entre fuerzas ($\Delta G_p, \Delta G_r$) y flujos (vel. de síntesis de ATP y de respiración) en términos de la termodinámica de procesos irreversibles.

Este enfoque describe las velocidades de respiración (J_r) y fosforilación (J_p) mediante ecuaciones lineales simples:

$$J_r = (L_r \Delta G_r - L_{rp} \Delta G_p) \quad (XXIV)$$

$$J_p = (L_{pr} \Delta G_r + L_p \Delta G_p) \quad (XXV)$$

donde L_r y L_p son coeficientes directos y L_{rp} y L_{pr} son coeficientes cruzados e iguales. Esta condición de reciprocidad fue planteada originalmente

(59) para reacciones cercanas al equilibrio. Por tanto, parecería que la linealidad entre flujos y fuerzas y la reciprocidad planteada en las ecuaciones XXIV y XXV sería difícil de aplicar en la fosforilación oxidativa mitocondrial la cual es una reacción bastante alejada del equilibrio termodinámico. Sin embargo, recientemente se demostró que ambas condiciones se cumplían en la fosforilación oxidativa en mitocondrias (60) y partículas submitocondriales (57). El significado bioquímico de los coeficientes (L) es descrito por dos parámetros adimensionales, el grado de acoplamiento (q) y la estequiometría fenomenológica (Z):

$$q = \frac{L_{rp}}{\sqrt{L_r L_p}} \quad ; \quad Z = \sqrt{L_p/L_r}$$

El grado de acoplamiento toma valores entre 0 y 1. Cuando $q=1$, las dos reacciones (respiración y fosforilación) están perfectamente acopladas. La estequiometría fenomenológica Z representa la estequiometría ideal o mecánica n dentro de límites definidos por el grado de acoplamiento:

$$q Z \leq n \leq \frac{Z}{q}$$

De esta manera Z es idéntico a n conforme q se aproxima a 1.0.

Para la determinación de Z y q podrían considerarse dos estados estacionarios: flujo basal (level flow) y flujo estático (static head). El flujo basal es la condición en la cual no hay presión negativa de la reacción de salida (fosforilación) y entonces $\Delta G_p=0$. Sustituyendo los valores de q y Z en las ecuaciones XXIV y XXV tenemos que:

$$\frac{J_p}{J_r} = q \cdot Z \quad (\text{XXVI})$$

donde J_p/J_r sería la relación ATP/O medida empíricamente (61). Desafortunadamente, esta condición de flujo basal no es posible obtenerla en el caso de la fosforilación oxidativa pues la energía libre de la síntesis de ATP es muy grande. Es prácticamente imposible fijar concentraciones de ATP, ADP y Pi que establezcan un $\Delta G_p=0$.

El flujo estático corresponde al clásico estado 4 de respiración mitocondrial en el cual ΔG_p es tan grande que la reacción de salida (fosforilación) no puede proceder, aunque la reacción de entrada (respiración) sigue funcionando y $J_p = 0$. Sustituyendo los valores de q y Z en la ecuación XXV se tiene.

$$-\frac{\Delta G_r}{\Delta G_p} = \frac{Z}{q} \quad (\text{XXVII})$$

Para determinar Z de la ecuación XXVII es necesario calcular antes q . Rottenberg (61) propuso que q puede estimarse con la siguiente expresión:

$$q = \sqrt{1 - \frac{J_r(J_p = 0)}{J_r(\Delta G_p = 0)}} \quad (\text{XXVIII})$$

donde $J_r(J_p=0)$ es la velocidad de respiración cuando la síntesis neta de ATP es cero (en estado 4 o flujo estatico) y $J_r(\Delta G_p=0)$ es la respiración cuando ΔG_p es cero. $J_r(J_p=0)$ puede medirse directamente pero $J_r(\Delta G_p=0)$ debe extrapolarse del intercepto en el eje de las ordenadas de la gráfica ΔG_p vs J_r (cuando $\Delta G_p=0$). Lemasters y colaboradores calcularon en particular las submitocondriales (57) que el grado de acoplamiento variaba entre 0.77 a 0.81 y tendía a disminuir con la concentración de P_i , mientras que Z con NADH como sustrato variaba entre 3.8 a 4.1 y tendía a aumentar con la concentración de P_i . En mitocondrias el valor de q fue de 0.980 y Z fue de 1.99 para succinato, 2.99 para glutamato + malato, 3.16 para β -hidroxibutirato y de 4.07 para oxoglutarato (58). En el caso de oxoglutarato está involucrada una fosforilación a nivel de sustrato y para β -hidroxibutirato el valor de Z es mayor porque el transporte de este sustrato no requiere de energía como en el caso del transporte de glutamato. Lemasters y Bilica (57) propusieron otro procedimiento menos laborioso para determinar el grado de acoplamiento:

$$q = \sqrt{1 - \frac{J_r(J_p=0)}{J_r(\text{Desacoplada})}} \quad (\text{XXIX})$$

Los valores obtenidos con esta ecuación iban de 0.780 a 0.826 y tendían

a disminuir con la concentración de Pi.

Esté mismo grupo (57,58) determinó los valores de ΔG_r para los distintos sitios de conservación de energía y de ΔG_p , y usando la ecuación XXVII propusieron un modelo de 13 H^+ para el acoplamiento quimiosmótico, donde las estequiometrías de H^+ son 3 para la ATP sintetasa, 1 para los transportes de Pi y ADP y 5,4 y 4 para los sitios 1, 2 y 3 respectivamente. La única diferencia con el modelo de 12 H^+ (62) es la estequiometría en el sitio 1 por lo cual sería prematuro descartar este modelo.

Mecanismo Cinético y Químico de la Síntesis de ATP

Respecto a la segunda pregunta que nos hacíamos inicialmente, existe también mucha discusión acerca de como interaccionan la F_0 con la F_1 . De acuerdo con Mitchell, los H^+ son conducidos por la F_0 hasta el sitio catalítico en la F_1 . Boyer (63) propuso un mecanismo indirecto, en donde la conducción de H^+ a través de la F_0 produce un cambio conformacional en la F_1 , lo cual facilita la unión de ADP y fosfato a una subunidad y libera ATP de otra subunidad; la formación de ATP se realizaría a expensas de la energía almacenada en la conformación "energizada" de la mitocondria. En este sentido se ha demostrado que la formación del enlace fosfato-fosfato en un ambiente no-acuoso es espontánea, a diferencia del ambiente acuoso donde el proceso es endergónico (64). En la ATPasa de retículo sarcoplásmico, de Meis (65) observó la síntesis espontánea del intermediario de alta energía (acil-fosfato) cuando la enzima se incubaba en un medio hidrofóbico con solventes orgánicos. En la ATPasa mitocondrial ya se ha observado también la formación espontánea de ATP utilizando solventes orgánicos (66). Por tanto, la hipótesis para el acoplamiento del gradiente de H^+ con la síntesis de ATP a nivel de la enzima, sería la de que el flujo de H^+ a través de la F_0 induce un cambio conformacional que capacita a la en-

zima para reducir el grado de hidratación de los sustratos ADP y fosfato, produciendo un ambiente de baja polaridad en el sitio catalítico que facilitaría la unión espontánea de los dos sustratos para formar sí ATP. Actualmente dicha hipótesis esta siendo sometida a experimentación.

El mecanismo químico de unión del fosfato al ADP aún no se ha dilucidado, pero se sabe por estudio de inactivación que para la catálisis son indispensables residuos de lisina, tirosina, aspártico y arginina. Se ha propuesto que el grupo carboxílico del aspártico podría unir un ión de magnesio, el cual a su vez estaría orientando al fosfato durante la reacción; el grupo guanidino de la arginina uniría por atracción electrostática a los grupos fosfato del ADP, quedando los grupos amino y fenolato de la lisina y la tirosina como responsables directos de la catálisis (67).

REGULACION DE LA FOSFORILACION OXIDATIVA MITOCONDRIAL^a

En los mamíferos, el ATP proveniente de la glicólisis y de la fosforilación oxidativa es la fuente de energía utilizada para realizar las diversas funciones celulares. En particular, las actividades del cerebro y el corazón dependen prácticamente en un 100% del ATP suministrado por la mitocondria. Entender cómo se regula la síntesis de ATP en las mitocondrias es uno de los problemas centrales de la bioenergética que en la actualidad se estudia intensamente.

La fosforilación oxidativa mitocondrial es la síntesis de ATP acoplada a la actividad de la cadena respiratoria. De acuerdo con la teoría quimiosmótica, la oxidación del NADH y FADH₂ (formados en el ciclo de Krebs y la β-oxidación) a través de la cadena de transportadores de electrones genera un gradiente electroquímico de H⁺, el cual es aprovechado por la ATP sintetasa (F₀F₁-ATPasa) para catalizar la formación de ATP a partir

a. Parte de esta Sección de la tesis aparecerá publicada en: Boletín de Educación Bioquímica. Ed. Dept. Bioquímica, Fac. Medicina, UNAM, 1985.

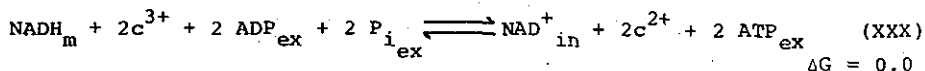
de ADP y Pi intramitocondriales (Fig. 7).

En el análisis del control de la síntesis mitocondrial de ATP deben considerarse dos aspectos: (a) el termodinámico, que se refiere al suministro de energía proveniente de la cadena respiratoria y (b) el cinético, que indica la rapidez con que se realiza el proceso. Si el gradiente electroquímico de H^+ se mantuviera siempre constante y de una magnitud suficientemente grande para mantener la síntesis de ATP, podría esperarse que la regulación de la fosforilación fuera estrictamente cinética. Sin embargo, si la velocidad y la magnitud con que se genera el gradiente y su magnitud no fueran elevadas, cabría suponer una contribución importante de los factores termodinámicos en el control de la síntesis de ATP.

Existen en este momento 3 hipótesis que tratan de explicar la forma como se regula la fosforilación oxidativa. La hipótesis del quasi-equilibrio o de la citocromo oxidasa que considera el aspecto termodinámico (11,68), la hipótesis de la etapa limitante atribuida a la translocasa de ATP/ADP que analiza el aspecto cinético (10,11,69,70) y la hipótesis del control múltiple que involucra ambos aspectos (40,71).

Hipótesis del Quasi-Equilibrio

Esta hipótesis propone que los 2 primeros sitios de conservación de energía de la cadena respiratoria (NADH deshidrogenasa y complejo b-c₁) se encuentran en equilibrio termodinámico con el potencial extramitocondrial de fosforilación $\Delta G_{ATP_{ex}}$ de acuerdo con la siguiente reacción:



donde in y ex significan los compartimentos intra- y extramitocondrial respectivamente. El ΔG_{ATP} se puede definir como la energía almacenada en forma de ATP de acuerdo con la fórmula $\Delta G_{ATP} = \Delta G^0 + RT \ln \frac{[ATP]}{[ADP][Pi]}$ y el

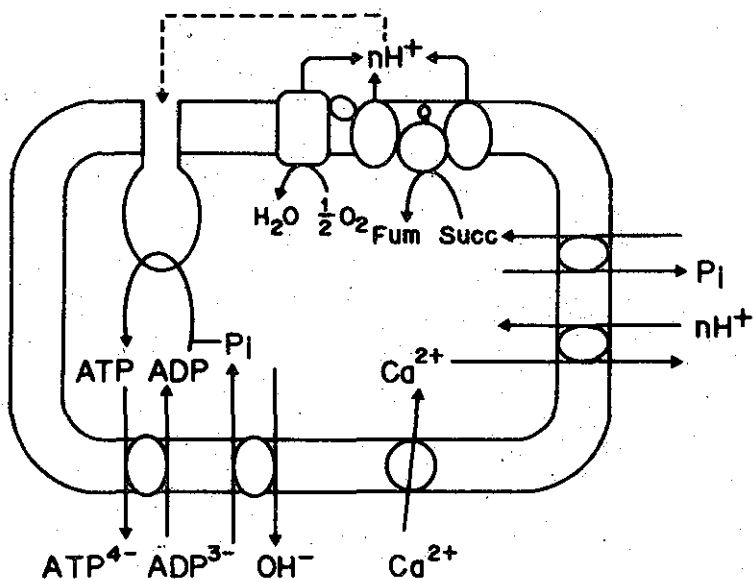


Fig. 7. FOSFORILACION OXIDATIVA Y TRANSPORTE DE Ca^{2+} EN MITOCONDRIAS.

El succinato entra a la mitocondria por intercambio electroneutro con P_i a través del acarreador de dicarboxilatos. La succinato deshidrogenasa convierte al succinato en fumarato y dona los electrones a la cadena respiratoria. La cadena respiratoria genera un gradiente electroquímico de H^+ interior negativo, utilizando la energía libre de las reacciones de oxido-reducción. Este gradiente es empleado por la ATP sintetasa para formar ATP a partir de ADP y P_i . El P_i ingresa a la mitocondria por medio del acarreador de fosfatos que realiza un intercambio electroneutro con OH^- . El ADP^{3-} se intercambia electrogénicamente con ATP^{4-} interno a través del translocador de adenín-nucleótidos. El Ca^{2+} entra por medio de un acarreador electroforético sensible a rotación de rutenio y sale en intercambio con H^+ en mitocondrias de hígado o con Na^+ en mitocondrias de corazón.

$\Delta G_{\text{redox } 1+2}$ es la energía liberada en las reacciones de oxidoreducción de NADH a citocromo c.

Una consecuencia de esta hipótesis sería que la translocasa de ATP/ADP y la ATP sintetasa estarían trabajando en una situación cercana al equilibrio, lo cual hace suponer que estas enzimas están en exceso y no podrían regular el proceso de síntesis de ATP. Por lo tanto, la fosforilación oxidativa sólo puede ser controlada por la actividad de la citocromo oxidasa, que es la única enzima del proceso que no estaría en el equilibrio, la cual al generar un potencial transmembranal desvía el equilibrio de la reacción XXX hacia la formación de ATP (11).

El apoyo experimental a esta hipótesis procede principalmente del grupo de Wilson (11,68). Estos investigadores han empleado 3 diferentes protocolos para demostrar que el $\Delta G_{\text{redox } 1+2}$ es igual al ΔG_{ATPex} en mitocondrias aisladas: (a) midiendo el segmento de la cadena respiratoria $\text{NADH} \rightarrow \text{cit c}$ utilizando ferricianuro como aceptor final de electrones e inhibiendo la citocromo oxidasa con cianuro; (b) midiendo polarográficamente la actividad de toda la cadena respiratoria en el sentido $\text{NADH} \rightarrow \text{O}_2$ y (c) usando la reversa de electrones desde citocromo c a NADH mediante la hidrólisis de ATP. En todos estos casos se determina la concentración de los componentes de la reacción XXX cuando cesa la fosforilación y se ha alcanzado el equilibrio termodinámico y entonces se calculan los valores de $\Delta G_{\text{redox } 1+2}$ y ΔG_{ATPex} . De acuerdo con la hipótesis del quasi-equilibrio los valores obtenidos fueron casi idénticos y oscilaron entre 25 a 30 kcal mol⁻¹ (11,68). En esta hipótesis también se postula que la velocidad de respiración depende de la relación $\frac{[\text{ATP}]}{[\text{ADP}][\text{P}_i]}$ y no de la relación ATP/ADP (11,68). Esto último ha sido observado reiteradamente por varios investigadores, pero igualmente se ha observado que la respiración depende de la relación

ATP/ADP a diferentes concentraciones de Pi (Fig. 7). Al parecer la suposición de que la respiración depende del ΔG_{ATPex} es incorrecta, pues no siempre existe una correlación entre parámetros cinéticos y termodinámicos. Otras objeciones a esta hipótesis provienen de la determinación directa de la reacción de translocación de adenin-nucleótidos (ver Fig. 7), la cual se encuentra aproximadamente $2.08 \text{ kcal mol}^{-1}$ fuera del equilibrio (10).

Por otro lado, en el concepto de la hipótesis del quasi-equilibrio existe la suposición crucial de que hay una estequiometría de 2.0 moléculas de ATPs sintetizados por la transferencia de 2 electrones desde el NADH hasta el citocromo c (ver ecuación XXX) pues dicho valor tiene que ser considerado en los cálculos del ΔG . A pesar de que varios grupos han determinado una estequiometría de 2, recientemente Lamasters y Col. (57) aplicando la teoría de la termodinámica de procesos irreversibles (ver segunda sección de la tesis), observaron estequiometrías de menos de 2.0 y además determinaron que el $\Delta G_{\text{redox}} \cdot 1 + 2$ y el ΔG_{ATPex} se encontraban alejados del equilibrio. A la luz de estos datos la citocromo oxidasa parecería no ser la única enzima responsable de la regulación de la fosforilación oxidativa, ya que no sería la única enzima trabajando fuera del equilibrio termodinámico.

Hipótesis de la Etapa Limitante

Esta hipótesis supone que en una vía metabólica la enzima que tiene la V_{max} mas baja es la que determina el flujo total.

En el caso de la fosforilación oxidativa, el translocador de ATP/ADP parece ser la enzima que tiene la mas baja capacidad catalítica (aprox. $300 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ a 30°C en mitocondrias de hígado). Sin embargo, la ATP sintetasa, el acarreador de fosfato y el acarreador de dicarboxilatos tiene una V_{max} que no es muy diferente, oscilando entre los $300\text{-}400 \text{ nmol min}^{-1}$

mg^{-1} . Durante la fosforilación oxidativa se requiere que el translocador introduzca ADP externo y expulse ATP interno (ver Fig. 7), pero el ATP que se acumula en el exterior puede competir con el ADP por los sitios de translocación, por lo cual esta hipótesis postula que la velocidad es dependiente de la relación extramitocondrial de ATP/ADP, sin importar la concentración de Pi (11,69,70).

Esta predicción ha sido corroborada por varios grupos (ver Fig. 8); sin embargo existe controversia sobre si la velocidad de fosforilación depende sólo de la relación externa de ATP/ADP o también de la intramitocondrial (69). En cualquiera de los casos el translocador de adenin-nucleótidos sería la etapa limitante de la velocidad pues este transportador requiere de sustratos internos y externos, para su funcionamiento.

Otras evidencias que favorecen esta hipótesis provienen de experimentos con inhibidores específicos del translocador de ATP/ADP: el atractilósido y el carboxiatractilósido. Estos inhibidores actúan del lado citosólico de manera competitiva y no competitiva, respectivamente. En estos experimentos se supone que si el inhibidor disminuye la actividad del translocador y paralelamente también reduce la velocidad de síntesis de ATP, entonces el proceso de fosforilación oxidativa depende exclusivamente del funcionamiento del acarreador de ATP/ADP. Esta predicción se cumple si se utiliza atractilósido pero no con carboxiatractilósido (ver Fig. 9). Además, la misma curva hiperbólica se observa cuando se emplean inhibidores de otras enzimas de la fosforilación v.g. con cianuro, inhibidor no competitivo de la citocromo oxidasa; con n-butilmalonato, inhibidor competitivo del acarreador de dicarboxilatos. Por tanto, el translocador de ATP/ADP parecería no ser la única etapa limitante de la velocidad de síntesis de ATP, al menos considerando los criterios hasta ahora empleados de la relación ATP/ADP y la titulación con inhibidores. Para una discusión más amplia acerca del significado

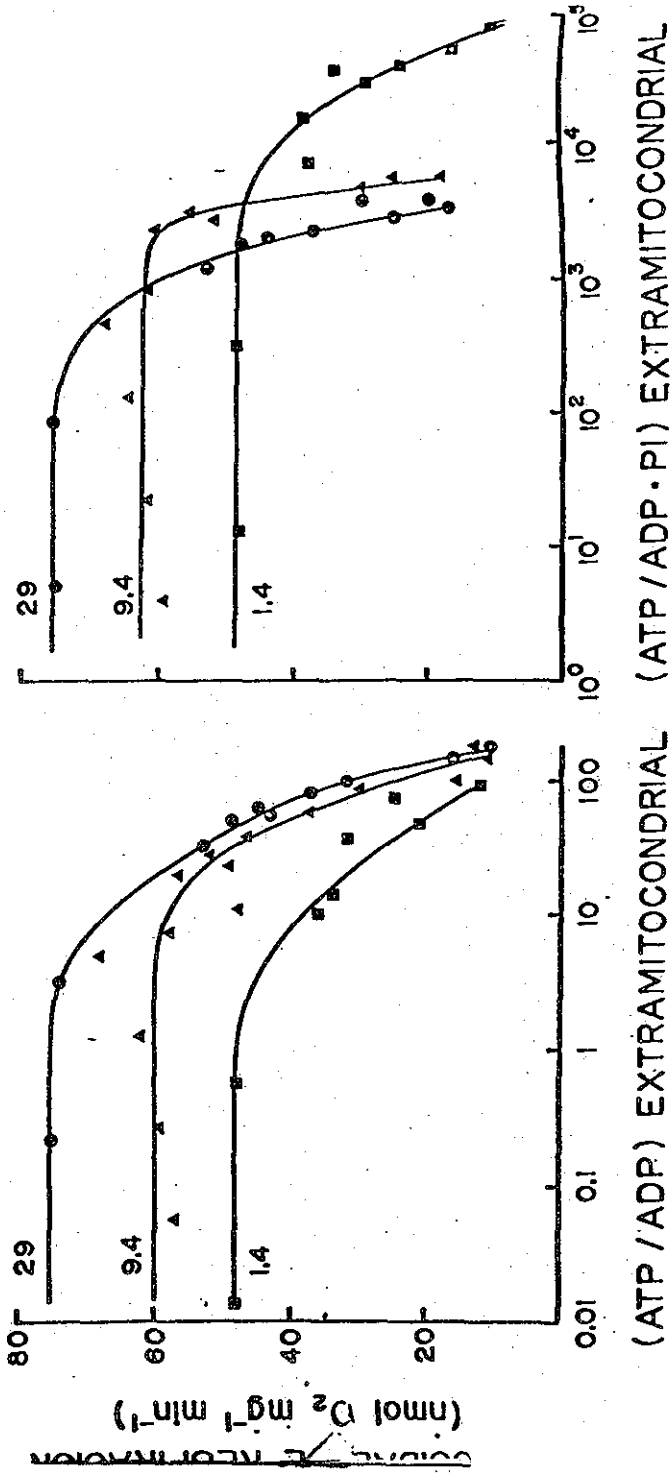


FIG. 8. VARIACION DE LA VELOCIDAD DE RESPIRACION EN FUNCION DE LAS RELACIONES EXTRAMITOCONDRIALES DE ATP/ADP Y $\text{ATP}/(\text{ADP} \times \text{Pi})$

Se incubaron mitocondrias con ATP y succinato y diferentes concentraciones de Pi . La fosforilación oxidativa se inició añadiendo diferentes cantidades de hexocinas. Durante el estado estacionario se paró la reacción y se determinaron los niveles externos de ATP, ADP y Pi . Los números en las gráficas indican la concentración de Pi . De Kunz *et al.* (71).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

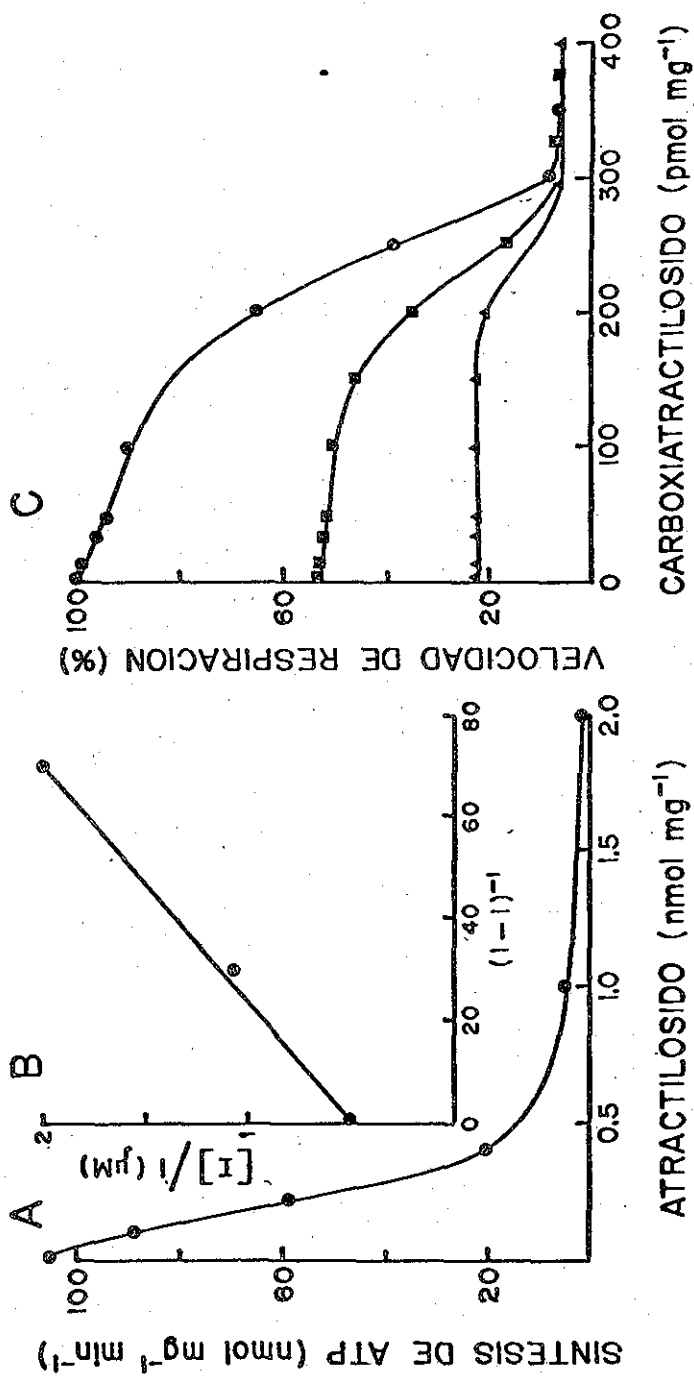


Fig. 9. EFECTO DE INHIBIDORES ESPECIFICOS DEL TRANSLOCADOR DE ATP/ADP SOBRE LA FOSFORILACION OXIDATIVA.

A. La síntesis de ATP se midió por la luminiscencia producida en la reacción de la luciferasa. En B se muestra una gráfica de conservación de ligando siendo la variable independiente la inhibición porcentual y la variable dependiente la fijación del inhibidor. La linealidad de la gráfica sugiere que la inhibición fraccional de la fosforilación es igual a la fracción de atractilósido unido al translocador de ATP/ADP. De Lemasters y Sowers (72)

C. Las diferentes velocidades de síntesis de ATP se ajustaron con Hexocinasa. De Groen et al (40).

de la forma de la curva de inhibición y de las reacciones alejadas del equilibrio, ver la primera sección de la tesis.

Hipótesis del Control Múltiple

Recientemente, Groen et al (40) y Wanders et al (71) desarrollaron una teoría de control metabólico la cual permite cuantificar la cantidad de control ejercido por una enzima sobre el flujo en estado estacionario sin necesidad de alterar las condiciones experimentales (ver la primera sección de la tesis).

De esta manera, este grupo de investigadores propuso (40) que la fosforilación oxidativa era controlada por varias enzimas. Entre las mas importantes se encontraban el translocador de ATP/ADP ($C_i = 0.30$), el acarreador de dicarboxilatos ($C_i = 0.33$) y la citocromo oxidasa ($C_i = 0.17$). Además la contribución del translocador de adenin-nucleótido al control de la fosforilación también depende del sistema de regeneración de ADP utilizado: con el sistema de glucosa + hexocinasa, el grado de control del translocador oscila de 0.07 a 0.31 y con creatina + creatina cinasa de 0.40 a 0.66 (71). Estas variaciones parecen depender de la sensibilidad (coeficiente de elasticidad) del sistema regenerante a los cambios inducidos por el inhibidor del translocador en el sustrato común (relación extramitocondrial de ATP/ADP). Esto significa que el grado de control ejercido por una enzima determinada puede variar dependiendo de la velocidad de flujo que mantenga una vía metabólica, de tal manera que la suma de todas las etapas involucradas sea siempre igual a la unidad. Para el caso de la fosforilación oxidativa, el nivel de estado estacionario será establecido por la vía consumidora de energía, sea en el citosol o en la matriz mitocondrial.

Por tanto, este nuevo concepto en regulación metabólica parece sintetizar todas las observaciones sobre la dependencia de la velocidad de

fosforilación oxidativa respecto a las relaciones $\frac{[ATP]}{[ADP][Pi]}$ y el efecto de los distintos inhibidores específicos. De aquí que su inmediata aceptación se refleje en el creciente número de sistemas experimentales en los cuales se evalúa el grado de control de las distintas enzimas de la síntesis de ATP: en células intactas como hepatocitos y levaduras y en mitocondrias aisladas de diferentes órganos (ver primera sección de la tesis)

Función Moduladora del Calcio en la Fosforilación Oxidativa

El gradiente electroquímico de H^+ generado por la cadena respiratoria puede ser utilizado por la mitocondria para sintetizar ATP o bien para el transporte de iones. En particular la mitocondria posee un activo sistema de transporte de Ca^{2+} (ver Fig. 7). Existe un acarreador electroforético con una K_m de 5-20 μM y una V_m de aprox. 400 $nmol\ mg^{-1}\ min^{-1}$, el cual se encarga de acumular Ca^{2+} en el interior de la mitocondria; también se encuentra un intercambiador Ca^{2+}/nH^+ con una estequiometría aún no bien definida que se ocupa de expulsar Ca^{2+} . Cuando la mitocondria acumula cantidades masivas de Ca^{2+} (más de 100 $nmol\ mg^{-1}$) ocurren dos tipos de inhibición de la síntesis de ATP: (a) si el transporte de Ca^{2+} y la fosforilación ocurren simultáneamente, se establece una competencia por la energía disponible (b) si la fosforilación se realiza en mitocondrias que ya contienen grandes cantidades de Ca^{2+} , la inhibición parece estar asociada a una disminución de la actividad del translocador de ATP/ADP inducida por un eflujo de los adenin-nucleótidos intramitocondriales (72).

Sin embargo, las concentraciones de Ca^{2+} determinadas en el citosol de varios tipos de células están en el rango de $10^{-7}M$ a $10^{-5}M$. En este rango de concentraciones recientemente se describió que el Ca^{2+} tenía un efecto modulador de la velocidad de síntesis de ATP en mitocondrias de hígado (41). En la tabla Xa se muestran las variaciones en la velocidad de fosforilación cuando las mitocondrias se incuban en medios con diferentes concentraciones

externas de Ca^{2+} . Como puede observarse la velocidad de síntesis de ATP cae abruptamente en un medio con 10^{-9}M de Ca^{2+} mientras que con $\text{Ca}^{2+} 10^{-6}\text{M}$, la velocidad de síntesis de ATP disminuye ligeramente. Estos datos correlacionan bien con los niveles internos de Ca^{2+} a lo largo del tiempo (tabla Xb). Con 10^{-9}M , de Ca^{2+} externo, el Ca^{2+} intramitocondrial disminuye progresivamente mientras que con 10^{-6}M de Ca^{2+} , el Ca^{2+} interno permanece constante y alto. En los experimentos, con $5 \times 10^{-6}\text{M}$ de Ca^{2+} puede observarse que la velocidad de fosforilación se inhibe notablemente, lo cual parece deberse a la acumulación masiva de Ca^{2+} .

Con el objeto de definir el mecanismo por el cual el Ca^{2+} intramitocondrial regula la velocidad de síntesis de ATP, hemos aplicado el enfoque cuantitativo descrito en la primera sección de la tesis los grados de control de todas las enzimas participantes en la fosforilación oxidativa en mitocondrias incubadas por 5 min a dos concentraciones de Ca^{2+} : 10^{-9} y 10^{-6}M . En la figura 10 se muestra la titulación con oligomicina de la respiración asociada a la síntesis de ATP. Este inhibidor es específico de la ATP sintetasa y es irreversible. Puede apreciarse que la pendiente inicial es diferente a las dos concentraciones de Ca^{2+} . Empleando la ecuación V se calculó el grado de control que la ATP sintetasa ejerce sobre la fosforilación oxidativa, el cual se muestra en la tabla XI. de Esta manera se determinaron las contribuciones de las otras enzimas. Analizando cuidadosamente la tabla XI se observa que existen 4 etapas importantes en el control de la síntesis de ATP: el translocador de ATP/ADP, la ATP sintetasa, la citocromo oxidasa y el complejo b-c₁. Sin embargo, el Ca^{2+} solo modifica los grado de control de las dos primeras enzimas de manera recíproca: mientras el translocador incrementa su contribución con 10^{-6}M , de Ca^{2+} , la sintetasa la reduce. Esto indica que el Ca^{2+} intramitocondrial regula la velocidad de fosforilación oxidativa porque modifica las propiedades cinéticas de es-

Tabla Xa. EFECTO DEL Ca^{2+} EXTERNO SOBRE LA SINTESIS DE ATP.

Se incubaron mitocondrias con las concentraciones de Ca^{2+} y los tiempos mostrados. Se transfirieron alícuotas a tubos con ADP. Después de 1 min se paró la reacción y se determinó la cantidad de ^{32}P -ATP formado. De ref. 41.

Tiempo	$[\text{Ca}^{2+}]$	10^{-9}M	5×10^{-7}	$5 \times 10^{-6}\text{M}$
		$\text{nmol/ATP min}^{-1} \text{mg}^{-1}$		
1 min		301	281	
5		119	203	74
10		48	150	44

Tabla Xb. VARIACION DEL Ca^{2+} INTRAMITOCONDRIAL A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE Ca^{2+} EXTERNO.

El Ca^{2+} interno se determinó por absorción atómica después de incubación de mitocondrias en las concentraciones de Ca^{2+} y tiempos mostrados. A los 5 min se añadió ADP

tiempo	$[\text{Ca}^{2+}]$	10^{-9}M	10^{-6}	$5 \times 10^{-6}\text{M}$
1 min		20.4±1.8	19.4±1.5	27.2±7.3
5		10.8±1.1	22.2±3.3	31.1±8
10		5.9±2.4	29.2±2	85.9±8.3

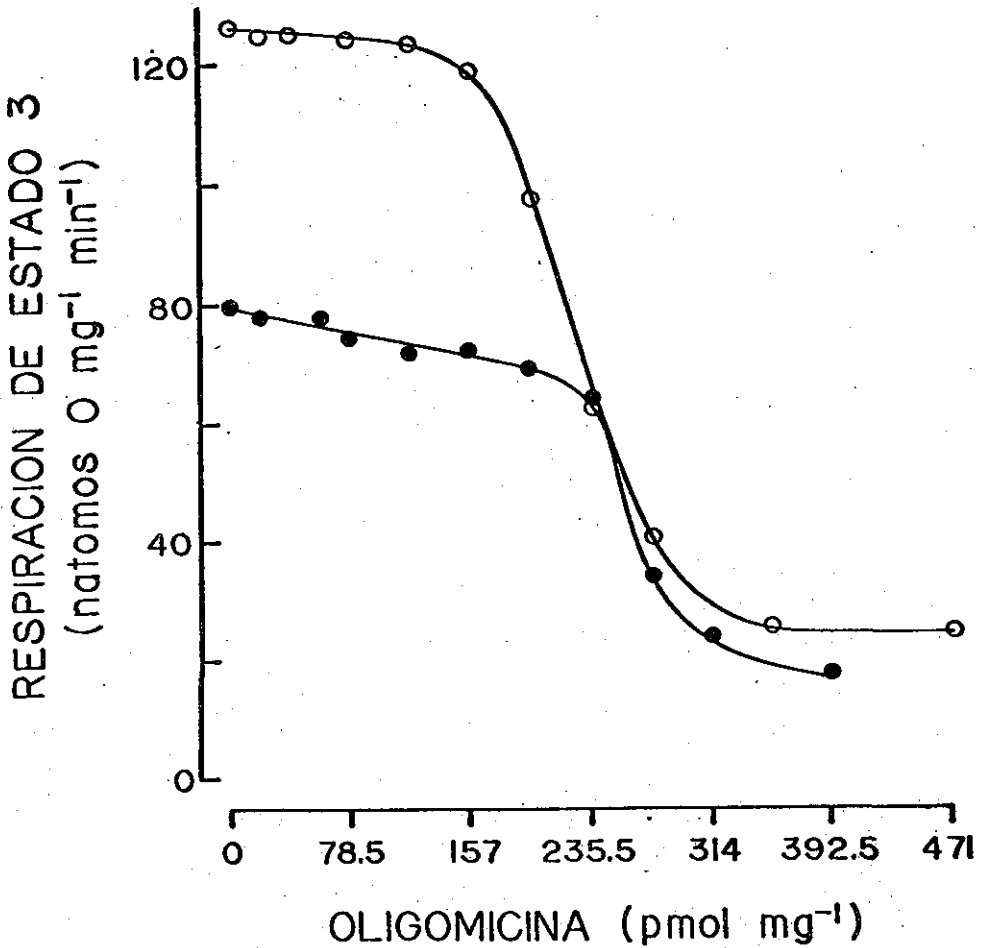


Fig. 10. EFECTO DEL INHIBIDOR ESPECIFICO DE LA ATP SINTETASA, OLIGOMICINA SOBRE LA FOSFORILACION OXIDATIVA.

La síntesis de ATP medida por consumo de oxígeno se inició añadiendo ADP a una suspensión de mitocondrias incubadas con Ca^{2+} externo $10^{-9}M$ (●) o con Ca^{2+} externo $10^{-6}M$ (○) por 5 min en presencia de diferentes cantidades de oligomicina. De Moreno-Sánchez (41).

XI. COEFICIENTES DE CONTROL DE FLUJO DE VARIAS ETAPAS DE LAS FOSFORILACION OXIDATIVA.

Los coeficientes de control de flujo (Ci) se calcularon de acuerdo con la ref. 40 usando los datos de la figura 10 y otras curvas de titulación con los inhibidores indicados. Se utilizaron los siguientes valores de K_i para los cálculos: Azida 250 μM ; cianuro 10 μM ; HQNO, 64 nM; NEM 60 μM malato 0.23 mM; mersalil, 5 μM ; fenilsuccinato, 0.7/mM; y n-butilmalonato, 0.35 mM. Se utilizaron los siguientes valores de K_m : P_i , 1.6mM; succinato, 1.7mM; As_i , 0.34 mM. carboxiatractilósido, oligomicina y antimicina se consideraron como inhibidores irreversibles.

ENZIMA	Ci		INHIBIDOR
	$[\text{Ca}^{2+}]$		
Acarreador de ATP/ADP	0.32	0.48	Carboxiatractilósido
ATP sintetasa	0.21	0.05	Oligomicina
Citocromo oxidasa	0.16	0.20	Azida
	0.27	0.23	Cianuro
Complejo B-C ₁	0.30	0.27	HQNO
Acarreador de P_i	0.08	0.12	Asi
	0.03	0.05	NEM
Acarreador de Dicarboxilatos	0.03	0.05	Malato
	0.09	0.14	Mersalil
	0.08	-	Butilmalonato
	0.00	-	Fenilsuccinato

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

tas dos enzimas posiblemente por algún efecto directo sobre ellas o a través de alterar la relación interna ATP/ADP.

El Ca^{2+} está involucrado en el mecanismo de transmisión intracelular de ciertas señales hormonales, en el ciclo de contracción-relajación muscular o en otros procesos celulares, los cuales requieren del suministro de ATP mitocondrial. Por tanto, la observación de que el Ca^{2+} modula la fosforilación oxidativa abre interesantes perspectivas sobre los posibles mecanismos moleculares involucrados en la coordinación de la actividad celular.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Herman, R.H. (1980) Principles of Metabolic Control. En: Principles of Metabolic Control in Mammalian Systems (Herman et al, eds.) Plenum pres, New York. Cap I.
- 2.- Ottaway, J.H. (1979) Sequestration of Metabolites. *Biochem. Soc. Trans.* 7, 1161-67.
- 3.- Rolleston, F.S. (1972) A Theoretical Background in Study of the Control of Intermediary Metabolism. *Curr. Top. Cell Reg.* 5, 47-75.
- 4.- Newsholme, E.A. y Start, C. (1973) Regulation in Metabolism. John Wiley and Sons, London Cap. I.
- 5.- Cohn, R.M. y Yandrasitz, J.R. (1980) Modulation of Enzyme Activity. Ver ref. 1. Cap. 4.
- 6.- Pilkis, S.J., El-Maghrabi, M.R., Pilkis J., Claus, T.H. y Cumming, D. A. (1981) Fructose 2,6-Bisphosphate, a new Activator of PFK. *J. Biol. Chem.* 256, 3171-74
- 7.- Greenbaum, A.L., Gumaa, K.A. y McLean, P. (1971) The Distribution of Hepatic Metabolites and the control of the Pathways of Carbohydrate Metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* 148, 617-663
- 8.- Newsholme, E.A. y Gevers, W. (1967) Control of Glycolysis and Gluconeogenesis. *Vitam. Horm.* 25, 1-87
- 9.- Krebs, H.A. (1969) The Role of Equilibria in the Regulation of Metabolism. *Curr. Top. Cell. Reg.* 1, 45-55
- 10.- Wanders, R.J.A., Groen, A.K., Meijer, A.J. y Tager, J.M. (1981) Determination of AG of the adenine nucleotide translocator in rat liver mitochondria. *FEBS Lett.* 132, 201-206.
- 11.- Erecinska, M. y Wilson, D.F. (1982) Regulation of Cellular Energy Metabolism. *J. Memb. Biol.* 70, 1-14
- 12.- Fischler, M.E., Hecht, P. y Williamson, J.R. (1977) Determination of Mitochondrial/cytosolic Metabolite Gradients in Isolated Rat Liver Cells by Cell Disruption. *Arch. Biochem. Biophys.* 181. 278-292.
- 13.- Olempska-Beer, Z. y Bautz-Freese, E. (1984) Optimal Extraction Conditions for HPLC Determination of Nucleotides in Yeast. *Anal Biochem.* 140, 236-245.
- 14.- Hutchings, G.J., Banks, B.E.C., Mruzek, M., Ridd, J.H. y Vernon, Ch.A. (1981) Mechanisms of Hydrolysis of ATP, ADP and P_i in Aqueous Perchloric Acid. *Biochem.* 20, 5809-16.
- 15.- Chance, B. y Williams, G.R. (1956) The Respiratory Chain and Oxidative Phosphorylation. *Adv. Enzymol.* 17, 65-134
- 16.- Segel, I.H. (1975) Enzyme Kinetics. John Wiley and Sons, New York. Cap 7.

- 17.- Sols, A. (1981) Multimodulation of Enzyme Activity. *Curr. Top. Cell. Reg.* 19, 77-101.
- 18.- Mayr, G.W. (1984) Interaction of Calmodulina with muscle phosphofruktokinase. *Eur. J. Biochem.* 143, 521-529.
- 19.- Wu, T.F.L. y Davis, E.J. (1981) Regulation of Glycolytic Flux in an Energetically Controlled Cell-Free System. *Arch. Biochem. Biophys.* 209, 85-99.
- 20.- Williamson, J.R. y Cooper, R.H. (1980) Regulation of the Citric Acid Cycle in Mammalian Systems. *FEBS Lett.* 117, Suppl. K73-K85.
- 21.- Denton, R.M. y McCormack, J.G. (1980) On the Role of the Calcium Transport Cycle in Mammalian Mitochondria. *FEBS Lett.* 119, 1-8.
- 22.- Rognstad, R. (1979) Rate-limiting Steps in Metabolic Pathways. *J. Biol. Chem.* 254, 1875-78
- 23.- Kacser, H. y Burns, J.A. (1973) The Control of Flux. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 27, 65-104
- 24.- Kacser, H. y Burns, J.A. (1979) Molecular Democracy: Who Shares The Controls *Biochem. Soc. Trans.* 7, 1149-1160.
- 25.- Kacser, H. (1983). The Control of Enzyme Systems *in vivo*. *Biochem. Soc. Trans.* 11, 35-40
- 26.- Heinrich, R. y Rapoport, T.A. (1974) A Linear Steady-State Treatment of Enzymatic Chains. *Eur. J. Biochem.* 42, 89-95.
- 27.- Heinrich, R. y Rapoport, T.A. (1974) Critique of the Crossover Theorem and a General Procedure to Identify Interactions Sites with an Effector *Eur. J. Biochem.* 42, 97-105.
- 28.- Heinrich, R. y Rapoport, T.A. (1975) Mathematical Analysis of Multienzyme Systems. II. Steady State and Transient Control. *Biosystems* 7, 130-136.
- 29.- Heinrich, R., Rapoport, S.M. y Rapoport, T.A. (1977) Metabolic Regulation and Mathematical Models. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 32, 1-82.
- 29a.- Westerhoff, H.V., Groen, A.K. y Wanders, R.J.A. (1984) Modern Theories of Metabolic Control and their applications. *Biosci. Rep.* 4, 1-22
- 30.- Burns, J.A., Cornish-Bowden, A., Groen, A.K., Heinrich, R. Kacser, H., Porteous, J.W., Rapoport, S.M., Rapoport, T.A., Stucki, J.W., Tager, J.M., Wanders, R.J.A. y Westerhoff, H.V. (1985) Control Analysis of Metabolic Systems. *TIBS* 10 (1), 16
- 31.- Stoner, C.D. y Sirak, H.D. (1979) Steady-State Kinetics of the Overall Oxidative Phosphorylation Reaction. *J. Bioenerg. Biomemb.* 11, 113-146
- 32.- Stoner, C.D. (1984) Determination of the Coupling Relationships Between the Respiratory Reactions. *J. Bioenergy. Biomemb.* 16, 115-141.

- 33.- Flint, H.J., Tateson, R.W., Barthelmes, I.B., Porteous, D.J., Donachie, W.D. y Kacser, H. (1981) Control of the Flux in the Arginine Pathway of *Neurospora crassa*. *Biochem. J.* 200, 231-246.
- 34.- Kacser, H. y Burns, J.A. (1981) The Molecular Basis of Dominance. *Genetics* 97, 639-666.
- 35.- Rapoport, T.A., Heinrich, R., Jacobasch, G. y Rapoport, S. (1974) A Mathematical Model of Glycolysis of Human Erythrocytes. *Eur. J. Biochem.* 42, 107-120
- 36.- Rapoport, T.A., Heinrich, R. y Rapoport, S.M. (1976) The Regulatory Principles of Glycolysis in Erythrocytes in vivo and in vitro. *Biochem J.* 154, 449-469
- 37.- Heinrich, R. y Rapoport, T.A. (1980) Mathematical Modelling of Translocation of mRNA in Eucaryotes. *J. Theor. Biol.* 86, 279-313
- 38.- McMinn, C.L. y Ottaway, J.H. (1976) On the Control of Enzyme Pathways *J. Theor. Biol.* 56, 57-73
- 39.- Bohnensack, R., Kuster, U. Letko, G. (1982) Rate Controlling Steps of Oxidative Phosphorylation in Rat Liver Mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 680, 271-280.
- 40.- Groen, A.K., Wanders, R.J.A., Westerhoff, H.V., Van der Meer, R. y Tager, J.M. (1982) Quantification of the Contribution of Various Steps to the Control of Mitochondrial Respiration. *J. Biol. Chem.* 257, 2754-57
- 41.- Moreno-Sánchez, R. (1985) Contribution of the Translocator of Adenine-Nucleotides and the ATP synthase to the Control of Oxidative Phosphorylation and Arsenylation in Liver Mitochondria *J. Biol. Chem.* en prensa.
- 42.- Wanders, R.J.A., Van Roermund C.W.T. y Meijer, A.J. (1984) Analysis of the Control of Citrulline Synthesis *Eur. J. Biochem.* 142, 247-254.
- 43.- Packer, L. (1960) Metabolic and Structural States of Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 235, 242-249.
- 44.- Hackenbrock, C.F. (1969) Ultrastructural Bases for Metabolically Linked Mechanical Activity in Mitochondria. *J. Cell. Biol.* 30, 269-297.
- 45.- Holian, A. y Wilson, D.F. (1980) Relationship of ΔpH and $\Delta\psi$ with Respiration and ATP Synthesis in Mitochondria. *Biochem.* 19, 4213-21
- 46.- Linden, M. y Gelerfors, P. (1983) Hydrodynamic Properties of Porin Isolated from outer Membranes of Mitochondria *Biochim. Biophys. Acta* 736, 125-129.
- 46a.- Wikstrom, M. y Casey, R. (1985) The Oxidation of Exogenous Cytochrome c by Mitochondria. *FEBS Lett.* 183, 293-298
- 47.- Nicholls, D.F. (1982) *Bioenergetics*. Academic Press. London. Cap. 5.

- 47a.- Hatefi, Y. (1985) The Mitochondrial Electron Transport and Oxidative phosphorylation system. *Ann Rev. Biochem.* 54, 1015-69.
- 48.- Mitchell, P. (1976) Vectorial Chemistry and the Molecular Mechanics of chemiosmotic Coupling *Biochem. Soc. Trans.* 4, 399-430
- 48a.- Mitchell, P. (1979) Compartmentation and Communication in Living System. *Eur. J. Biochem.* 95, 1-20
- 49.- Ernster, L. y Schatz, G. (1981) Mitochondria: A Historical Review *J. Cell. Biol.* 91 (Parte 2), 227-255
- 50.- Zoratti, M., Pietrobon, D. y Azzone, G.F. (1982) On the relationship between Rate of ATP Synthesis and $\Delta\psi$ in Rat Liver Mitochondria. *Eur J. Biochem.* 126, 443-451
- 51.- Mandolino, G., De Santis, A. y Melandri, B.A. (1983) Localized Coupling in Oxidative Phosphorylation by Mitochondria from Jerusalem Artichoke. *Biochim. Biophys. Acta* 723, 428-439.
- 52.- Sorgato, M.C., Branca, D. y Ferguson, S.J. (1980) The rate of ATP Synthesis by Submitochondrial Particles can be independent of the magnitude of the Protonmotive force. *Biochem. J.* 188, 945-948.
- 53.- Ort D., Dilley, R. y Good, N. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 449-95-107
- 54.- Venturoli, G. y Melandri, B.A. (1982) The localized coupling of bacterial photophosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* 680, 8-16.
- 55.- Westerhoff, H.V., Melandri, B.A., Venturoli, G., Azzone, G.F. y Kell, D.B. (1984) A minimal Hypothesis for Membrane-Linked Free-Energy Transduction. *Biochim Biophys. Acta* 768, 257-292
- 56.- Yagi, T., Matsuno-Yagi, A., Vik, S.B. y Hatefi, Y. (1984) Modulation of the Kinetics and Steady-State Level of Intermediates of Mitochondrial Coupled Reactions by Inhibitors and Uncouplers. *Biochem.* 23, 1029-36.
- 56a.- McCarthy, J.E.G. y Ferguson, S.J. (1983) The Effect of Partial Uncoupling upon the Kinetics of ATP Synthesis. *Eur. J. Biochem.* 132, 425-431.
- 56b.- Ferguson, S.J. (1985) Fully Delocalised Chemiosmotic or localized Proton flow pathways in Energy Coupling? *Biophys. Acta* 811, 47-95
- 57.- Lemasters, J.J. y Billica, W.H. (1981) Non-Equilibrium thermodynamics of Oxidative Phosphorylation by Inverted Inner Membrane Vesicles. *J. Biol. Chem.* 256, 12949-57.
- 57a.- Lemasters, J.J. Grunwald, R. y Emaus, R.K. (1984) Thermodynamics Limits to the ATP/Site Stoichiometries of Oxidative Phosphorylation by Rat Liver Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 259, 3058-63
- 58.- Lemasters, J.J. (1984) The ATP-to-Oxygen Stoichiometries of Oxidative Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 259, 13123-30

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- 59.- Katchalsky A. y Curran, P.F. (1975) Nonequilibrium Thermodynamics in Biophysics. Harvard University Press. London.
- 60.- Stücki, J.W. (1980). The Optimal Efficiency and the Economic Degrees of Coupling of Oxidative Phosphorylation. *Eur. J. Biochem.* 109, 269-283.
- 61.- Rottemberg, H. (1979) Non-Equilibrium thermodynamics of Energy Conversion in Bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta* 549, 225-253
- 62.- Alesandre, A., Reynafarje, B. y Lehninger, A.L. (1978) Stoichiometry of vectorial H^+ movements coupled to electron transport and ATP synthesis in mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75, 5296-300
- 63.- Kayalar, C., Rosing, J. y Boyer, P.D. (1977) An Alternating Site Sequence for oxidative phosphorylation suggested by Measurement of Substrate Binding Patterns and Exchange Reaction Inhibitions. *J. Biol. Chem* 252, 2486-91
- 64.- Hayes, D.M., Kenyon, G.L. y Kollman, A. (1978) *J. Am. Chem. Soc.* 100, 4331
- 65.- de Meis, L. y Vianna, A.L. (1979) Energy Interconversion by the Ca^{2+} -dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Ann Rev. Biochem.* 48, 275-292.
- 66.- Sakamoto, J. y Tonomura, Y. (1983) Synthesis of Enzyme-Bound ATP by Mitochondrial Soluble F_1 -ATPase in the Presence of DMSO. *J. Biochem.* 93, 1601-14
- 67.- Ting, L.P. y Wang, J.H. (1980) Functional groups at the Catalytic Site of the F_1 -ATPase - *Biochem.* 19, 5665-70
- 68.- Forman, N.G. y Wilson, D.F. (1983) Dependence of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation an Activity of the Adenine Nucleotide Translocase *J. Biol. Chem.* 258, 8649-55.
- 69.- Kunz, W., Bohnensack, R., Böhme, G., Küster, U. Letko, G. y Schanfeld, P. (1981) Relation between Extramitochondrial and Intramitochondrial Adenine Nucleotide Systems. *Arch. Biochem. Biophys.* 209, 219-229.
- 70.- Lemasters, J.J. y Sowers, A.E. (1979) Phosphate Dependence and Atractyloside Inhibition of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation *J. Biol. Chem.* 254, 1248-51
- 71.- Wanders, R.J.A., Groen, A.K. Van Roermund, C.W.T. y Tager, J.M. (1984) Factors determining the relative contribution of the adenine Nucleotide translocator to the control of oxidative phosphorylation. *Eur. J. Biochem.* 142, 417-424
- 72.- Moreno-Sánchez, R. (1983) Inhibition of Oxidative Phosphorylation by a Ca^{2+} -Induced Diminution of the Adenine Nucleotide Translocator. *Biochim. Biophys. Acta* 724, 278-285.

Regulation of Oxidative Phosphorylation in Mitochondria by External Free Ca^{2+} Concentrations*

Rafael Moreno-Sánchez†

From the Departamento de Bioenergética, Centro de Investigaciones en Fisiología Celular, UNAM. Apartado Postal 70-600, 04510 México, D.F.

(Received for publication, July 18, 1984)

The rate of oxidative phosphorylation was studied in rat liver mitochondria incubated with free Ca^{2+} concentrations that range from 10^{-9} to 5×10^{-8} M. The highest rate was observed between 0.5–1.0 μM Ca^{2+} . ATP synthesis was measured by polarographic and spectrophotometric techniques and by uptake of radioactive inorganic phosphate. The concentration of Ca^{2+} at which maximal rates of ATP synthesis take place is modified by Mg^{2+} and phosphate. The dependence of oxidative phosphorylation on Ca^{2+} was observed with α -ketoglutarate, glutamate + malate, and succinate, but not with β -hydroxybutyrate. At 10^{-9} M Ca^{2+} there is a continuous exit of endogenous Ca^{2+} , while with 10^{-8} M Ca^{2+} , intramitochondrial Ca^{2+} levels remained constant throughout time. Apparently the control of the level of internal Ca^{2+} by external Ca^{2+} modulates the rate of oxidative phosphorylation. Uncoupler-stimulated respiration also depends on Ca^{2+} concentration, even though at 10^{-9} to 10^{-8} M Ca^{2+} the rate of oxidative phosphorylation is lower than the rate of uncoupled respiration. The contribution of the ADP/ATP carrier and the ATP synthase to the kinetic regulation of ATP synthesis at 10^{-9} and 10^{-8} M Ca^{2+} was evaluated by titrations with carboxyatractylolide and oligomycin, respectively. The contribution of the carrier and the synthase to the regulation of the final rate of ATP synthesis was different at the two concentrations of Ca^{2+} ; therefore, the concentration of extramitochondrial Ca^{2+} influences the overall kinetics of oxidative phosphorylation.

Oxidative phosphorylation and Ca^{2+} uptake in mitochondria are two processes that depend on energy of electrochemical H^+ gradients. In competition studies (1, 2) it has been shown that mitochondria preferentially use the energy of H^+ gradient for Ca^{2+} uptake rather than for the phosphorylation of ADP. On the other hand, it has been reported that oxidative phosphorylation is inhibited in mitochondria that have a high content of endogenous Ca^{2+} , i.e. smooth muscle (3), heart (4, 5), uterus (6), tumor (7–9), and brain (10), which suggests that the level of matrix Ca^{2+} may affect directly the activity of intramitochondrial enzymes involved in ATP synthesis. The exact mechanism of the inhibition by internal Ca^{2+} is not well known, but in liver and uterus mitochondria it has

been observed that Ca^{2+} affects the functioning of the ADP/ATP carrier (6, 11, 12). More recently it was found that internal Ca^{2+} induces a unidirectional efflux of adenine nucleotides (13) which apparently diminishes the activity of the translocator, thus inducing low rates of oxidative phosphorylation in Ca^{2+} -loaded mitochondria (13). It has also been suggested that Ca^{2+} prevents the release of inhibiting action of the ATPase inhibitor protein from mitochondrial ATPase (14, 15).

Interestingly, Robertson *et al.* (16) reported that in heart mitochondria external Ca^{2+} in the range of 10^{-7} – 10^{-6} M induces a dual effect on oxidative phosphorylation, either an activation of approximately 25% (between 0.1–1.0 μM) and a strong inhibiting effect with >1.0 μM regardless of the presence of Mg^{2+} . In this work the effect of external Ca^{2+} concentrations lower than 1.0 μM on oxidative phosphorylation was studied. The results showed that by varying external Ca^{2+} concentrations, it is possible to observe different rates of steady-state ATP synthesis. At these different rates, the contribution of the adenine nucleotide translocase and the ATP synthase to the control of rate of oxidative phosphorylation (17, 18) was evaluated. It was found that the level of external Ca^{2+} induces important modifications of the overall kinetics of oxidative phosphorylation.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of Mitochondria—Female Wistar rats weighing 180–230 g and fasted for 38–44 h were killed by decapitation. The liver was extracted and washed twice and homogenized with 250 mM sucrose, 5 mM HEPES, 0.5 mM EGTA (SHE), pH 7.0, in the cold. The homogenate was centrifuged to $7000 \times g$ for 10 min. The mitochondrial pellet was washed with SHE, resuspended, and incubated with 0.5% bovine serum albumin for 5 min in ice with occasional stirring; subsequently the mixture was diluted 20 times and centrifuged to $7000 \times g$ for 10 min. The sediment was washed and resuspended in SHE to a concentration of 50–80 mg/ml.

Oxygen Consumption—Oxygen uptake of mitochondria incubated in 3 ml of incubation basis mixture that contained 130 mM KCl, 20 mM HEPES, 2 mM MgCl_2 , 2 mM K phosphate, 5 mM succinate, and Ca^{2+} -EGTA buffer, pH 7.20, was recorded by means of an oxygen electrode (Yellow Springs Instrument Co.).

Ca^{2+} -EGTA Buffers—To calculate the free Ca^{2+} concentration, the stability constants and the program described by Fabiato and Fabiato (19) were used. This program considers the contribution of all the ligands and metals ions that were included in the experiments. The final concentration of EGTA was 2.0 mM, and the pH of the fresh medium was carefully adjusted to 7.20.

Ca^{2+} Transport—For assays of Ca^{2+} fluxes the procedure in Ref. 13 was utilized. Briefly, mitochondria were incubated in the conditions described under "Results" with $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ($2\text{--}4 \times 10^6$ cpm/ μmol). At the desired times aliquots were withdrawn and filtered through

* This study was supported in part by a grant from CONACyT, México and the Organization of American States to Dr. A. Gómez-Puyou. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

† Fellow of Universidad Nacional Autónoma de México.

The abbreviations used are: HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; EGTA, ethylene glycol bis(*o*-aminoethyl ether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid; Tris, tris(hydroxymethyl)amino-methane.

THESIS COM
FALLA DE ORIGEN

Sartorius filters of a pore diameter of 0.22 μ m. The filter was washed with 1 ml of cold 130 mM KCl, 5 mM Tris-HCl, pH 7.4, and counted for radioactivity after solubilization with 5 ml of the scintillation liquid Tritonol (20).

Intramitochondrial Ca²⁺ Content—This measurement was made by atomic absorption spectrophotometry, using a Perkin-Elmer (model 560) spectrophotometer. Mitochondria were separated from the medium by rapid centrifugation in a Beckman microfuge B. The pellet was extracted for Ca²⁺ determination with 1.5% (v/v) HCl, 1% (w/v) LaCl₃, 25 mM KCl, and denatured protein eliminated by centrifugation. The supernatant was used for the assays.

Spectrophotometric ATP Determination—This was carried out according to Lamprecht and Trautschold (21). Mitochondria were incubated under the conditions described under "Results." At fixed times aliquots of 2 ml were transferred to cuvettes that contained the necessary compounds for the spectrophotometric determination of ATP (21).

Uptake of ³²P into ATP—Mitochondria were incubated under the indicated conditions with ³²P_i (approximately 0.5 μ Ci/ μ mol). At predetermined times the reaction was stopped with 6% trichloroacetic acid (final concentration). After centrifugation of denatured protein an aliquot of the supernatant was withdrawn and ³²P_i extracted as described originally by Linsberg and Ernster (22) with *n*-butyl acetate. The aqueous phase was used for assay of ³²P_i incorporated into ATP by assay of Cerenkov radiation.

RESULTS

Ca²⁺ Uptake at Various External Free Ca²⁺ Concentrations—The experiments detailed in Table I show that the intramitochondrial level of Ca²⁺ of respiring mitochondria is importantly affected by the extramitochondrial Ca²⁺ concentration. At 10⁻⁶ M external Ca²⁺, the intramitochondrial level of Ca²⁺ diminishes progressively by approximately 70% of that of the starting preparation. In mitochondria incubated with 10⁻³ M Ca²⁺, the level does not change significantly, while at an external Ca²⁺ concentration of 5 \times 10⁻⁴ M the intramitochondrial level increases. The addition of ADP which induces a state 4 to state 3 transition results in a further increase in Ca²⁺ uptake in mitochondria incubated with 5 \times 10⁻⁴ M Ca²⁺ but does not modify appreciably the level of internal Ca²⁺ when mitochondria are incubated with lower external Ca²⁺ concentrations. In agreement with Nicholls (23), it would appear, that at 10⁻⁶ M external Ca²⁺, the rate of Ca²⁺ influx would equal that of Ca²⁺ efflux, while at concentrations below or above 10⁻⁶ M external Ca²⁺ either Ca²⁺ efflux or influx would proceed until a different steady state is reached. As the concentration of internal Ca²⁺ may influence ATP synthesis (3-16) oxidative phosphorylation by mitochondria incubated in the experimental conditions of Table I was studied.

TABLE I
Variation of intramitochondrial Ca²⁺ at different external Ca²⁺ concentrations

Mitochondria (3 mg) were incubated in 3 ml of basic medium (see "Materials and Methods") with the Ca²⁺ concentrations shown. At the times indicated, an aliquot was centrifuged in a Microfuge, the supernatant discarded, and Ca²⁺ determined in the sediment by atomic spectrophotometric absorption. This was corrected by the trapped volume which was measured with [¹⁴C]sucrose. At 5 min 250 μ M ADP was added. The numbers in parenthesis indicate the number of determinations made.

Time min	Intramitochondrial Ca ²⁺		
	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁴ M	5 \times 10 ⁻⁴ M
	nmol mg ⁻¹		
1	20.4 \pm 1.8 (4)	19.4 \pm 1.5 (2)	27.2 \pm 7.3 (3)
3	11.7		
5	10.8 \pm 1.1 (4)	22.2 \pm 3.3 (4)	31.1 \pm 8 (2)
7	6.0	22.4 \pm 4.1 (4)	88.4 \pm 11 (2)
10	5.9 \pm 2.4 (4)	29.2 \pm 2 (3)	85.9 \pm 8.3 (2)

Synthesis of ATP at Various Ca²⁺ Concentrations—Mitochondria incubated in state 4 conditions for 5 min with different oxidizable substrates and then given ADP show a distinct rate of state 3 respiration that depends on the concentration of Ca²⁺ in the medium (Table II). With succinate, glutamate + malate, and α -ketoglutarate as oxidizable substrates, higher rates of oxygen uptake are observed with 10⁻⁶ M than at 10⁻⁴ M Ca²⁺. With all these substrates, 5 \times 10⁻³ M Ca²⁺ induces a strong diminution of the state 3 respiration rate; with β -hydroxybutyrate the diminution starts to be observed at 10⁻⁴ M Ca²⁺.

Fig. 1 shows a curve of Ca²⁺ concentration versus rate of respiration with succinate as substrate. Maximal stimulation of state 3 respiration was observed with 10⁻⁶ M Ca²⁺ (Fig. 1A). From preparation to preparation, the maximum was found to vary between 0.5-1.0 μ M Ca²⁺, but in all cases, at higher Ca²⁺ concentrations the rate of state 3 respiration falls sharply. Even though state 4 respiratory rates increase progressively from 24 natoms O mg⁻¹ min⁻¹ at 10⁻⁶ to 34 at 10⁻³ M Ca²⁺, the large variations in state 3 respiration observed between these concentrations of Ca²⁺ are most likely due to changes in the rate of oxidative phosphorylation. Indeed the ADP/O ratios are not modified by these concentrations of Ca²⁺, and the respiratory control values at 10⁻⁶ and 10⁻³ M Ca²⁺ are 3.6 and 4.6, respectively (see data of Fig. 1A). Moreover, the direct assay of ATP formed in the various incubation media showed that ATP formation parallels the rate of oxygen consumption (Fig. 1B). For example, with the polarographic method it was observed that state 3 respiration is approximately 33% higher at 10⁻⁶ M than at 10⁻³ M Ca²⁺, while the spectrophotometric assay of ATP, in the presence of 10 mM AMP, indicated that ATP synthesis was 25% higher at 5 \times 10⁻⁷ M than at 10⁻³ M Ca²⁺.

The effect of different concentrations of Ca²⁺ on ATP synthesis was also measured by assays of the phosphorylation of ADP by inorganic phosphate [³²P_i]. Mitochondria preincubated for 5 min with 5 \times 10⁻⁷ M Ca²⁺ show a higher synthesis of ATP, than when preincubated with 10⁻³ M Ca²⁺. At 5 \times 10⁻⁶ M Ca²⁺ synthesis of ATP is depressed (Table III). Thus the results of Fig. 1 and Tables I to III indicate that there is a critical concentration of Ca²⁺ at which oxidative phosphorylation takes place at maximum rates. The strong inhibition of oxidative phosphorylation by high Ca²⁺ concentrations (5 \times 10⁻⁶ M) observed in Fig. 1 and Tables II and III is probably due to a massive accumulation of Ca²⁺, a phenomenon which has been extensively documented (Refs. 3-16 and see also Table I).

Characteristics of the Effect of External Ca²⁺ on Oxidative Phosphorylation—The rate of oxidative phosphorylation de-

TABLE II
Effect of Ca²⁺ on rate of state 3 respiration with several oxidizable substrates

Mitochondria (3 mg) were incubated in 3 ml of basic medium (see "Materials and Methods") with the Ca²⁺ concentrations shown. At 5 min 300 μ M ADP was added, and the rates of respiration were recorded. The concentration of all oxidizable substrates was 5 mM.

Substrate	Rate of state 3 respiration		
	10 ⁻⁶ M Ca ²⁺	10 ⁻⁴ M Ca ²⁺	5 \times 10 ⁻³ M Ca ²⁺
	natoms mg ⁻¹ min ⁻¹		
α -Ketoglutarate	38.4	86.4	19.7
Glutamate + malate	84	124.8	16.3
Succinate	105.6	161.7	34.5
Succinate + rotenone (3 μ M)	95.2	156.1	
β -Hydroxybutyrate	45.6	30.2	12

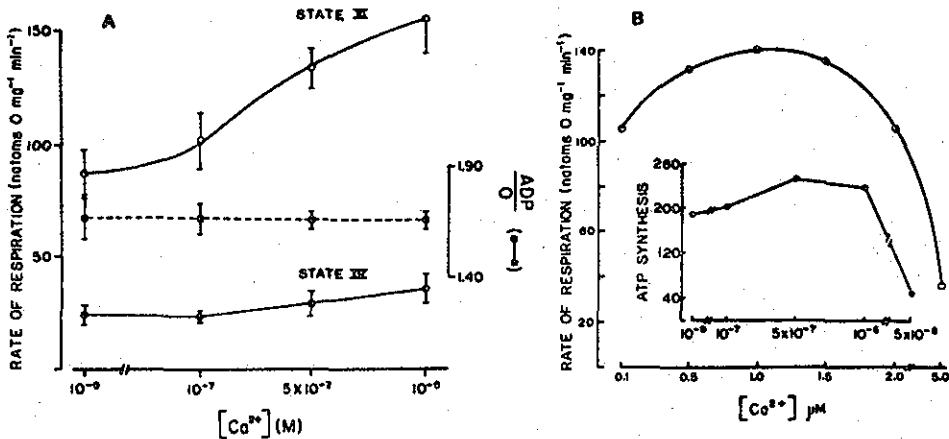
Ca²⁺ and Oxidative Phosphorylation

FIG. 1. Stimulation by external free Ca²⁺ of state 3 respiration. A, mitochondria (3 mg) were added to 3 ml of basic medium of incubation (see "Materials and Methods") with 5 mM succinate as substrate and the concentrations of Ca²⁺ shown. After 5 min, 250 μM ADP was added and the rate of respiration recorded. The values reported are the mean ± S.D. of 4 observations. B, the rate of respiration was measured as indicated in A. Spectrophotometric ATP determination was made according to Ref. 21. Mitochondria (1 mg/ml) were incubated for 5 min, and aliquots were transferred to cuvettes with the necessary compounds plus 0.5 mM ADP for ATP determination (21). Respiration was carried out at 30 °C and ATP determination at 23 °C. The unit of x axis of the inset is 1 μM Ca²⁺; ATP synthesis is nmol min⁻¹ mg⁻¹.

TABLE III

Effect of Ca²⁺ on uptake of ³²P_i into ATP

Mitochondria (1 mg/ml) were incubated for the time and Ca²⁺ concentrations shown. Aliquots were transferred to vessels which contained 250 μM ADP. After 1 min, the reaction was stopped and the uptake of ³²P_i was determined in the supernatant as described under "Materials and Methods."

Time	10 ⁻⁹ M Ca ²⁺	5 × 10 ⁻⁷ M Ca ²⁺	5 × 10 ⁻⁶ M Ca ²⁺
min	nmol ATP min ⁻¹ mg ⁻¹		
1	301.3	280.6	
5	118.7	202.6	74.3
10	48	149.6	43.9

pends on the time of exposure of mitochondria to different concentrations of external Ca²⁺ (Fig. 2, see also Table III). In mitochondria incubated with 10⁻⁹ M Ca²⁺, the rate of state 3 respiration decreases with the length of state 4 conditions; with 10⁻⁶ M Ca²⁺, the rate of state 3 is affected, but to a lower extent. In both cases, the rate of state 3 respiration ceases to be modified after 10 min of incubation. ATP synthesis as assayed by the spectrophotometric technique and by ³²P_i uptake yielded the same results (Fig. 2, Table III).

Similar results are obtained when mitochondria are exposed to consecutive ADP additions at different Ca²⁺ concentrations (Table IV), with two substrates that were assayed, succinate and glutamate-malate. Again, with 10⁻⁹ M Ca²⁺, there is a time-dependent diminution of state 3 respiration, while with 10⁻⁶ M Ca²⁺, the diminution is less pronounced. The same pattern of results was obtained with succinate or glutamate-malate as substrates. Interestingly, the rate of state 4 respiration also decreases in a time-dependent manner with 10⁻⁹ M Ca²⁺ and stays constant with 10⁻⁶ M Ca²⁺ (Table IV, see also Fig. 2).

In rat liver mitochondria it is established that Mg²⁺ inhibits

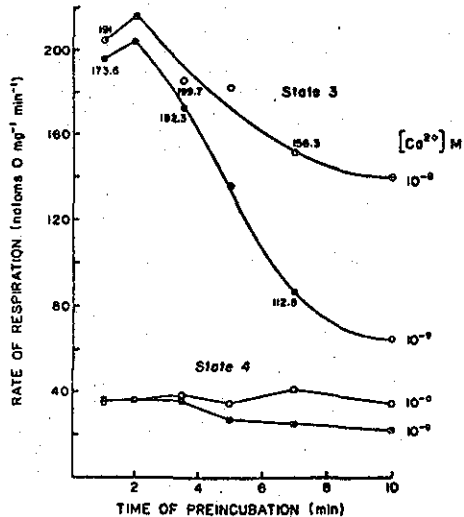


FIG. 2. Effect of the time of preincubation with different Ca²⁺ concentrations on rate of respiration. Experimental conditions were as indicated in Fig. 1A, except that at the times shown, 250 μM ADP was added. The numbers on the traces indicate ATP synthesis (nmol mg⁻¹ min⁻¹) determined spectrophotometrically as described in Fig. 1B.

Ca²⁺ transport (24, 25) by diminishing carrier affinity, and Robertson *et al.* (16) observed that Mg²⁺ shifted the inhibiting effect of Ca²⁺ on state 3 respiration to higher concentration

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLE IV

Respiration stimulated by consecutive additions of ADP at different Ca²⁺ concentrations

Mitochondria were incubated in conditions described in Table 1. At the times shown, consecutive additions of 240 nmol of ADP were made.

Time	Rate of respiration							
	Succinate				Glutamate + malate			
	10 ⁻⁶ M		10 ⁻⁸ M		10 ⁻⁹ M		10 ⁻⁸ M	
	State 3	State 4	State 3	State 4	State 3	State 4	State 3	State 4
min	natoms mg ⁻¹ min ⁻¹							
1	175.2	44	159.8	44	104.1	30	110.4	25
3	132	38.4	144	42.2	105.6	28.8	105.6	23
5	72	24	132	39.8	87.8	27.8	103.2	21.6
7	44.6	21.6		39.8	69	25.9	93.6	24

TABLE V

Effect of Ca²⁺ on uncoupler-stimulated respiration

Mitochondria were incubated at the times and Ca²⁺ concentrations shown. At this time, 0.39 μM carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone was added and the rate of respiration recorded. The numbers in parenthesis indicate the rates of state 3 respiration obtained in the same conditions with 300 μM ADP.

Time	Rate of uncoupled respiration	
	10 ⁻⁶ M Ca ²⁺	10 ⁻⁸ M Ca ²⁺
min	natoms mg ⁻¹ min ⁻¹	
1.5	272 (152)	244 (156)
5.0	157 (84)	212 (144)

in porcine heart mitochondria. The concentration of Ca²⁺ required to induce maximal stimulation of state 3 respiration in the experimental conditions described in this work is also affected by Mg²⁺. In the absence of Mg²⁺ the same pattern of results shown in Fig. 2 was obtained, except that maximal rates of state 3 respiration were obtained with 0.3 μM Ca²⁺ (data not shown). The shift in Ca²⁺ concentration required to induce maximal rates of oxidative phosphorylation could be related to an effect of Mg²⁺ on the null point between influx and efflux of Ca²⁺ as described by various authors (Refs. 23, 26, and 27; for a review see Ref. 23).

It was also observed that the effect of Ca²⁺ on oxidative phosphorylation is modified by the concentration of inorganic phosphate. With the optimal Ca²⁺ concentration (10⁻⁶ M), the rate of state 3 respiration was further increased when inorganic phosphate was varied from 0.5 to 10 mM. The rate of resting respiration decreased approximately 30% in the same range of inorganic phosphate (data not shown).

Thus from the experiments described, it appears that there is a level of endogenous Ca²⁺ which would be essential for maximal rates of oxidative phosphorylation.

Uncoupled Respiration of Mitochondria Incubated with 10⁻⁶ and 10⁻⁸ M Ca²⁺—In an attempt to understand why the rate of oxidative phosphorylation is higher at 10⁻⁶ than 10⁻⁸ M external Ca²⁺, the rate of uncoupler-stimulated respiration was studied (Table V). It was observed that in mitochondria exposed to 10⁻⁶ M Ca²⁺ the rate of respiration decreased as the time of preincubation was increased. In mitochondria incubated with 10⁻⁸ M Ca²⁺, the rate of respiration remained more or less constant regardless of the length of the preincubation. These observations indicate that external Ca²⁺ has an effect on the rate of electron flow and/or the transport of oxidizable substrates into the mitochondria. However, this

does not seem to account completely for the different rates of ATP synthesis observed at the two Ca²⁺ concentrations, since the rate of uncoupled-stimulated respiration is higher than that of state 3 (Table V), notwithstanding the concentration of Ca²⁺. This suggests that the presently described effect of different Ca²⁺ concentrations on the rate of ATP synthesis is most likely due to an action on the phosphorylation of ADP or on the adenine nucleotide translocator.

Control of the Rate of ATP Synthesis by the Adenine Nucleotide Translocator and by the ATP Synthase—It has been previously proposed that the rate of oxidative phosphorylation is limited by the activity of the adenine nucleotide translocator (28–32). However, this postulation has not been entirely accepted (Refs. 33, and 34; for a review see Ref. 35). Since different steady-state rates of ATP synthesis can be induced by varying external Ca²⁺ concentrations, it was possible to explore the contribution of the adenine nucleotide translocator to the process, in an attempt to define the role of Ca²⁺ in the control of the rate of ATP synthesis. To this purpose a titration of the rate of state 3 respiration with a specific irreversible inhibitor of the translocator (36) was carried out. Fig. 3 shows the effect of different amounts of carboxyatractyloside on state 3 respiration of mitochondria incubated with 10⁻⁹ and 10⁻⁸ M external Ca²⁺ with succinate and glutamate + malate as substrates (Fig. 3, A and B, respectively). A marked difference of the effect of carboxyatractyloside on the rate of state 3 respiration is observed at a concentration of carboxyatractyloside below 70 pmol/mg, respiration at 10⁻⁶ M Ca²⁺ being more sensitive to carboxyatractyloside than at 10⁻⁸ M Ca²⁺.

According to Tager and co-workers (17, 18), the degree of

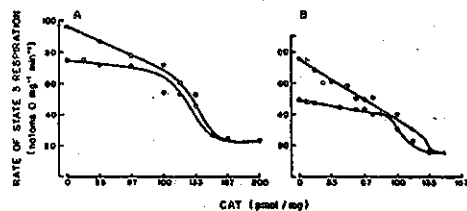


FIG. 3. Inhibition of the state 3 respiration by carboxyatractyloside at two Ca²⁺ concentrations. Mitochondria (5 mg) were incubated in the conditions described in Fig. 1A with the amounts of carboxyatractyloside (CAT) indicated. After 5 min of preincubation with succinate plus rotenone (A) or glutamate plus malate (B), 240 μM ADP was added and the rate of respiration recorded. ○, 10⁻⁶ M Ca²⁺; ○, 10⁻⁸ M Ca²⁺.

TABLE VI

Control strength of the adenine nucleotide translocator and ATP synthase on oxidative phosphorylation at 10⁻⁶ and 10⁻⁸ M external Ca²⁺

The control strength (Ci) was calculated according to Ref. 17 using the data of Figs. 3 and 4. Uninhibited oxidative phosphorylation (Fo) was calculated from the rate of state 3 respiration and its respective ADP/O ratio.

Substrate	External Ca ²⁺							
	Translocase				ATP synthase			
	10 ⁻⁶ M		10 ⁻⁸ M		10 ⁻⁶ M		10 ⁻⁸ M	
	Fo	Ci	Fo	Ci	Fo	Ci	Fo	Ci
Succinate + rotenone	124	0.10	163	0.46	138	0.20	214	0.05
Glutamate + malate	119	0.27	197	0.66				

4032

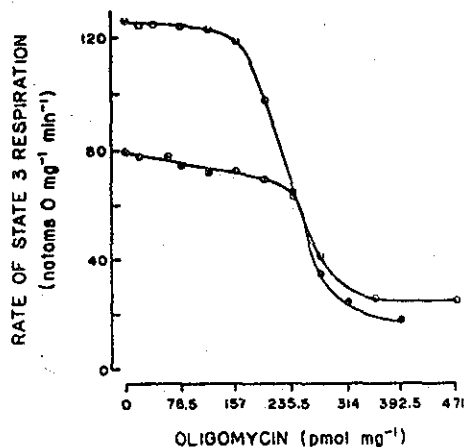
Ca²⁺ and Oxidative Phosphorylation

FIG. 4. Inhibition of the state 3 respiration by oligomycin at two Ca²⁺ concentrations. Experimental conditions were as indicated in Fig. 1A, except that the indicated amounts of oligomycin were included in the incubation mixture. Note that oligomycin was incubated with the mitochondria for 5 min before the addition of ADP. \circ , 10⁻⁶ M Ca²⁺; \square , 10⁻⁸ M Ca²⁺.

control of a step in a metabolic pathway may be estimated by measuring the initial slope of the inhibition curve and relating it to the uninhibited and fully inhibited activity. The results of the calculations are shown in Table VI. Clearly there is significant difference in the control of the rate of oxidative phosphorylation by the translocator at the two Ca²⁺ concentrations studied, independently of the substrate used. Its contribution to the overall control of the rate of oxidative phosphorylation is about 4.6 and 2.4 times higher with succinate and with glutamate-malate, respectively, at 10⁻⁶ M than at 10⁻⁸ M Ca²⁺.

The contribution of the ATP synthase to the control of oxidative phosphorylation was judged by assaying the sensitivity of state 3 respiration to oligomycin of mitochondria incubated with 10⁻⁸ and 10⁻⁶ M Ca²⁺. The results of Fig. 4 show that regardless of the rate of state 3 respiration, the inhibition curve by increasing concentrations of oligomycin is highly sigmoidal; nevertheless, it is of interest to point out that 10⁻⁸ M Ca²⁺, the degree of control of oxidative phosphorylation exerted by the ATP synthase is higher than at 10⁻⁶ M Ca²⁺. Moreover, according to the criterion employed to estimate the control exerted by the ATP synthase and the translocase, it would appear that with 10⁻⁸ M external Ca²⁺, the two enzymes possess a similar quantitative effect on the regulation of the rate of ATP synthesis.

DISCUSSION

The effect of Ca²⁺ on oxidative phosphorylation has been extensively studied, and there is general agreement that at relatively high amounts of Ca²⁺ accumulated, oxidative phosphorylation is inhibited (3-16). In this work these results have been confirmed, but in addition it was found that there is a concentration of Ca²⁺ at which maximal rates of ATP synthesis (as determined by the polarographic method or by direct assay) take place. In our standard experimental conditions this is around 10⁻⁶ M Ca²⁺, but it may vary with the presence

or absence of Mg²⁺ and with the concentration of phosphate in the medium.

It may be considered that the lower rates of ATP synthesis observed at 10⁻⁸ M Ca²⁺ in comparison to those observed with 10⁻⁶ M Ca²⁺ are due to damage of mitochondria. In this respect, it is to be noted that between 10⁻⁸ and 10⁻⁶ M external Ca²⁺ concentration, similar ADP/O ratios are attained, which indicates that the permeability properties of the mitochondria are not affected.

The modulation of the rates of oxidative phosphorylation by concentrations of external Ca²⁺ below 1.0 μ M is of interest, since this is apparently the range in which Ca²⁺ concentration varies within the cell under physiological conditions (26). As to how these concentrations of external Ca²⁺ regulate the rate of ATP synthesis, the results of this work also show that upon exposure of mitochondria to concentrations of external Ca²⁺ of 10⁻⁸ M (a concentration at which oxidative phosphorylation is about 30% lower than at 10⁻⁶ M Ca²⁺), the amount of internal Ca²⁺ falls to a level of about 10 nmol/mg of protein (after 5 min of incubation). While during incubation with 10⁻⁶ M external Ca²⁺, the amount of intramitochondrial Ca²⁺ is poised at a level of approximately 20 nmol/mg⁻¹, a concentration approximately equal to that of the starting preparation. Following Nicholls (23), at concentrations of 10⁻⁸ M external Ca²⁺, a membrane potential of -192 mV would be required to retain internal Ca²⁺ (as derived from the Nernst equation assuming an activity coefficient of internal Ca²⁺ of 0.1). Since in conditions similar to those of the present work, the mitochondrial membrane potential is of the order of 120-170 mV negative inside (37, 38), Ca²⁺ release would be a thermodynamically favored process. Using the same considerations, in mitochondria incubated with 10⁻⁸ M external Ca²⁺ and in which maximal rates of ATP synthesis were detected, the inward and the outward movements of Ca²⁺ would be in near equilibrium.

The present data show that the rate of ATP synthesis in mitochondria decreases in a time-dependent process when incubated at 10⁻⁸ M Ca²⁺ in comparison to that attained at 10⁻⁶ M Ca²⁺. Apparently as Ca²⁺ leaks out of the mitochondria, the rate of oxidative phosphorylation gradually decreases. Moreover, in conditions in which internal Ca²⁺ is maintained at a constant level of approximately 20 nmol/mg of protein, the rate of respiration is not ostensibly affected. Thus it would appear that the level of internal Ca²⁺ as modulated by the extramitochondrial Ca²⁺ concentrations influences the rate of oxidative phosphorylation.

An attempt has been made to explore how the internal concentration of Ca²⁺ affects the overall kinetics of ATP synthesis. It has been observed that, similar to the state 3 respiratory rates, electron transport of uncoupled mitochondria is faster at 10⁻⁶ than at 10⁻⁸ M Ca²⁺. This Ca²⁺-dependent process can be related to the higher rate of ATP synthesis observed with 10⁻⁶ M Ca²⁺, but it is noteworthy that the rate of state 3 respiration is lower than uncoupled respiration, regardless of the Ca²⁺ concentration in the medium. This indicates *a priori* that state 3 respiration is more importantly limited by either the phosphorylation of ADP and/or by the activity of the adenine nucleotide translocator.

An analysis of the inhibition curve of state 3 respiration as induced by oligomycin revealed that the control exerted by the ATP synthase was higher at 10⁻⁸ than at 10⁻⁶ M Ca²⁺. However, it was also observed that to attain a steep change in the slope of the inhibition curve more oligomycin was required at 10⁻⁶ M Ca²⁺. The latter would suggest that a different number of active enzymes would be operating at the two concentrations of Ca²⁺ studied; indeed it has been previ-

TESIS CON
 FALTA DE ORIGEN

ously reported that Ca²⁺ levels may affect the interaction of the inhibitor protein with the ATP synthase (14, 15), thus affecting the number of functional enzymes. Therefore, the overall data obtained with oligomycin suggest that the analysis of the control exerted by an enzyme on a metabolic pathway as described by Kacser and Burns (39, 40) and by Heinrich and Rapoport (41, 42) would seem to require an experimental evaluation of the extent to which an enzyme that undergoes reversible transitions affects its degree of control on the pathway. The ATP synthase would seem to be a good system to test the reported theoretical considerations.

The titrations of state 3 respiration with carboxyatractylate showed that the degree of control exerted by the translocase is significantly different in the presence of 10⁻⁶ than with 10⁻⁸ M Ca²⁺, being several times higher at 10⁻⁶ than at 10⁻⁸ M Ca²⁺. Thus, the modification of the rate of oxidative phosphorylation parallels a change of the kinetic control exerted by the translocase, which suggests that other kinetic transitions are occurring in other steps of coupled ATP synthesis when the amount of mitochondrial Ca²⁺ is varied. In other words, if the degree of control exerted by the ADP/ATP carrier is different at the two levels of Ca²⁺ studied, it follows that the quantitative contribution of the other steps of oxidative phosphorylation would also necessarily undergo modification. In fact, it is relevant that the Ca²⁺-dependent variations in the control, as evaluated from the initial slope of inhibition curves (17, 18, 39-42), exerted by the ATP synthase and the translocase occur in opposite directions, i.e. when the control exerted by the ATP synthase is higher (10⁻⁸ M external Ca²⁺), the control by the translocase is relatively low. The kind of kinetic relation where a change in the degree to which one enzyme is rate limiting results in an opposite directed change in the degree to which the other enzyme becomes limiting has been studied by Stoner and Sirak (43). They concluded that such a sequential coupling relation is established between ADP transport and the phosphorylation reaction during oxidative phosphorylation.

Moreover, the observed difference between the rates of uncoupled electron transport and state 4 respiration at 10⁻⁶ and 10⁻⁸ M external Ca²⁺ suggests the existence of a Ca²⁺-induced modification of substrate transport and/or electron transfer. Therefore, it is suggested that variations in the extramitochondrial Ca²⁺ concentration, within the limits that exist in living cells (26), modify quantitatively the contribution of the multiple control points (17, 18) that are involved in the overall kinetics of ATP synthesis poisoning the system at various rates of oxidative phosphorylation.

Along this line, measurements of the activity of several intramitochondrial dehydrogenases (44-46) and electron probe analysis of heart and other muscle cells (47) indicate that the possible physiological range of intramitochondrial Ca²⁺ is of the order of 1-5 nmol/mg of mitochondrial protein. In our experimental conditions, the Ca²⁺ levels are near the aforementioned values which suggests that Ca²⁺ exerts a physiological role on the regulation of oxidative phosphorylation. Moreover, a dependence of the activity of carbamoyl phosphate synthase and pyruvate carboxylase on internal Ca²⁺ levels in a range similar to that attained here has been reported (11, 48).

At the moment it is not possible to ascertain the mechanism through which the internal concentrations of Ca²⁺ induce the aforementioned changes of the kinetics of oxidative phosphorylation, but it is interesting that there are reports that indicate that the amount of intramitochondrial adenine nucleotides is affected by the internal concentration of Ca²⁺ (13, 49, 50), and recently it was reported that prolonged incuba-

tions of mitochondria increase the control strength exerted by the adenine nucleotide translocator (51) which apparently is associated with a diminution in the intramitochondrial pool of adenine nucleotides. However, it is necessary to consider that variations in the level of other endogenous components may account for the presently described observations. With respect to Mg²⁺, it is important to point out that in liver mitochondria with a content of approximately 30 nmol of Mg²⁺/mg of protein incubated for 5 min in mixtures similar to those employed here, Masini et al. (52) observed a loss of approximately 3 nmol of Mg²⁺/mg. Thus variations in Mg²⁺ levels would not seem to be an important factor in the presently described effects of Ca²⁺ on oxidative phosphorylation.

In relation to the contribution of the ATP synthase to the overall process of ATP synthesis, it must be recalled that the action of the natural ATPase inhibitor protein on the ATP synthase appears to be modulated by the concentrations of Ca²⁺ in the mitochondria (14, 15). Therefore, it would seem that Ca²⁺ concentration in the exterior and/or interior of the mitochondria induces important modifications of the kinetic characteristics of many of the steps involved in the total process of ATP synthesis.

Acknowledgments—I would like to gratefully acknowledge the helpful discussions of Dr. A. Gómez-Puyou. The collaboration of Guadalupe Ramirez in typing the manuscript is acknowledged.

REFERENCES

- Rossi, C. S., and Lehninger, A. L. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 3971-3980
- Vaccasi, A., Reynafarje, B., and Lehninger, A. L. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 6379-6385
- Vallières, J., Scarpa, A., and Somlyo, A. P. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.* 170, 659-669
- Jacobus, W. E., Tiozzo, R., Lugli, G., Lehninger, A. L., and Carafoli, E. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 7863-7870
- Sordhal, L. A. (1978) *Arch. Biochem. Biophys.* 167, 104-115
- Malmström, K., and Carafoli, E. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 182, 657-668
- Thorne, R. F. W., and Bygrave, F. L. (1974) *Biochem. J.* 144, 551-558
- Villalobo, A., and Lehninger, A. L. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 2457-2464
- Abou-Khalil, S., Abou-Khalil, W. H., and Younis, A. A. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* 209, 460-464
- Roman, I., Clark, A., and Swanson, F. D. (1981) *Membr. Biochem.* 4, 1-9
- Foides, M., and Barritt, G. J. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 6372-6380
- Gómez-Puyou, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., Klapp, M., and Carafoli, E. (1979) *Arch. Biochem. Biophys. Acta* 592, 396-404
- Moreno-Sánchez, R. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 724, 278-285
- Tuena de Gómez-Puyou, M., Gavilanes, M., Gómez-Puyou, A., and Ernster, L. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 592, 396-405
- Hillered, L., Muchiri, P. M., Nordenbrand, K., and Ernster, L. (1983) *FEBS Lett.* 154, 247-250
- Robertson, S. P., Potter, J. D., and Rouslin, W. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 1743-1748
- Groen, A. K., Wanders, R. J. A., Westerhoff, H. V., van der Meer, R., and Tager, J. M. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 2754-2757
- Tager, J. M., Wanders, R. J. A., Groen, A. K., Kunz, W., Bohnenack, R., Küster, U., Letko, G., Böhme, G., Duszyński, J., and Wolteck, L. (1983) *FEBS Lett.* 151, 1-9
- Fabiato, A., and Fabiato, F. (1979) *J. Physiol. (Paris)* 75, 463-505
- Fricke, U. (1975) *Anal. Biochem.* 63, 555-559
- Lamprecht, W., and Trautschold, I. (1965) in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H. U., ed) Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., FRG
- Lindberg, O., and Ernster, L. (1956) *Methods Biochem. Anal.* 3, 1-22

Ca²⁺ and Oxidative Phosphorylation

23. Nicholls, D. G. (1978) *Biochem. J.* **176**, 463-474
24. Hutson, S. M., Pfeiffer, D. R., and Lardy, H. A. (1976) *J. Biol. Chem.* **251**, 5251-5258
25. Hutson, S. M. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 4539-4545
26. Murphy, E., Coll, K., Rich, T. L., and Williamson, J. R. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 6600-6608
27. Becker, G. L. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* **581**, 234-239
28. Nicholls, D., and Akerman, K. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* **683**, 57-68
29. Lemasters, J. J., and Sowers, A. E. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 1248-1251
30. Kunz, W., Bohnsack, R., Böhme, G., Küster, U., Letko, G., and Schönfeld, P. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* **209**, 219-229
31. Jacobus, W. E., Moreadith, R. W., and Vandegær, K. M. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 2397-2402
32. Wanders, R. J. A., Groen, A. K., Meijer, A. J., and Tager, J. M. (1981) *FEBS Lett.* **132**, 201-206
33. Forman, N. G., and Wilson, D. F. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 12908-12915
34. Forman, N. G., and Wilson, D. F. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 8649-8655
35. Erecinska, M., and Wilson, D. F. (1982) *J. Membr. Biol.* **70**, 1-14
36. Vignais, P. V. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* **456**, 1-38
37. Wilson, D. F., and Forman, N. C. (1982) *Biochemistry* **21**, 1438-1444
38. Zoratti, M., Pietrubon, D., and Azzone, G. F. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* **723**, 69-70
39. Kasser, H., and Burns, J. A. (1973) *Symp. Soc. Exp. Biol.* **27**, 68-104
40. Kasser, H., and Burns, J. A. (1979) *Biochem. Soc. Trans.* **7**, 1149-1160
41. Heinrich, R., and Rapoport, T. A. (1974) *Eur. J. Biochem.* **42**, 89-95
42. Heinrich, R., and Rapoport, T. A. (1974) *Eur. J. Biochem.* **42**, 97-105
43. Stoner, C. D., and Sirak, H. D. (1978) *J. Bioenerg. Biomembr.* **11**, 113-146
44. Hanaford, R. G., and Castro, F. (1981) *Biochem. J.* **198**, 525-533
45. Coll, K. E., Joseph, S. K., Corkey, B. E., and Williamson, J. R. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 8696-8704
46. Hanaford, R. G., and Castro, F. (1982) *J. Bioenerg. Biomembr.* **14**, 361-376
47. Somlyo, A. P., Somlyo, A. V., Shuman, H., Scarpa, A., Endo, M., and Inesi, G. (1981) in *Calcium Phosphate Transport Across Biomembranes* (Bronner, F., and Peterlik, M., eds) pp. 87-93, Academic Press, New York
48. Meijer, A. J., van Woerkom, G. M., Steinman, R., and Williamson, J. R. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 3443-3446
49. Zoccarato, F., Rugolo, M., Siliprandi, D., and Siliprandi, N. (1981) *Eur. J. Biochem.* **114**, 195-199
50. Harris, E. J., and Chen, M. S. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **104**, 1264-1270
51. Grunwald, R., and Lemasters, J. J. (1984) *Fed. Proc.* **43**, 1877
52. Masini, A., Caccarelli-Stanzani, D., and Muscatello, U. (1983) *J. Bioenerg. Biomembr.* **15**, 217-234

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY

FOUNDED BY CHRISTIAN A. HERTER

PUBLISHED BY

THE AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, INC.

October 10, 1984

QUENTIN H. GIBSON, Associate Editor
SECTION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY
WING HALL - CORNELL UNIVERSITY
ITHACA, NEW YORK 14853
TEL: 607 256-2303

Dr. Rafael Moreno-Sanchez
Department of Bioenergetica
Cent. de Invest. En Fis. Cel.
UNAM Apart. Postal 70-600
04510 MEXICO, D.F.

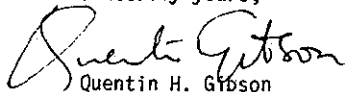
Dear Dr. Moreno-Sanchez:

Your manuscript MS# 4-2212 entitled "*Regulation of Oxidative Phosphorylation in Mitochondria by External Free Ca²⁺ Concentrations*" has been carefully read by an expert outside referee and a member of the Editorial Board, both of whom find the work interesting. However, they feel there are several points which much be clarified before the work can be considered acceptable for publication in The Journal of Biological Chemistry (comments enclosed).

Although your manuscript is not considered acceptable in its present form, submission of a revised manuscript is encouraged. It would be helpful if you would include a letter explaining how you have dealt with the reviewer's comments.

Your replies and a revised version of your paper will be returned promptly to the reviewing Editor for his further consideration, and I will let you know his recommendation about publication as soon as I can.

Sincerely yours,


Quentin H. Gibson
for the Editorial Board

QHG:hmg

Enclosures

Please Return This Manuscript With Comment Within Two Weeks At Most, Preferably By.....
If You Cannot Do So, Please Return It Immediately Without Comment

Date: 8/1/84 Manuscript No.: 4-2212

After distinction
of ATP synthesis by Ca^{2+}
and some other direct

Author(s): Rafael Moreno-Sanchez

Title: Regulation of Oxidative Phosphorylation in Mitochondria
by External Free Ca^{2+} Concentrations

The Editors would appreciate your opinion on the suitability of this manuscript for publication in The Journal of Biological Chemistry. This is a *privileged communication*. Its contents should not be revealed nor made use of until it has appeared in print.

Comments (Continue on another sheet, if necessary):

No. 1

I believe this paper contains interesting observations which deserve to be published. The paper is generally well written, and the 'control strength' interpretation appears to be generally valid despite its application to complex experiments.

It is somewhat disappointing that the mechanism by which Ca^{++} exerts the observed effects is not investigated further. It would have been revealing, perhaps, if the author had actually measured matrix adenine nucleotide levels, since he suggests that these may vary with Ca^{++} levels.

The weakest point of the paper is the failure to address the role of Mg^{++} . Recent work by Siliprandi and others indicate that mitochondrial Mg^{++} is more labile under some conditions than others and that Mg^{++} retention is profoundly affected by Ca^{++} , by oxidative phosphorylation and by external Mg^{++} concentration. Is it possible that effects attributed to Ca^{++} are due to secondary effects of Ca^{++} on Mg^{++} ? Since most of the conclusions are derived from simple respiration studies, it seems reasonable to request the author to demonstrate that the conclusions are not affected if Mg^{++} concentration is varied.

I have difficulty with the author's statement that there is no effect of Ca^{++} on State 4, since Fig. 1A shows it to increase along with State 3. The magnitude of the effect on State 4 is smaller, but isn't this likely to be due to primary limitation by H^{+} permeability?

As I began to read the paper, I anticipated some discussion about the extent to which matrix enzymes besides the ATPase are activated by Ca^{++} and the controversy (e.g., Hansford, McCormack) over whether matrix Ca^{++} is in the proper range to exert this control function. I was disappointed that this subject was not addressed, in view of the conclusion that matrix Ca^{++} activity affects ATP synthesis by an unknown mechanism.

(continued on next page)

Do not write comments below this line

Do not write name above the line

Date: Sept. 28, 1984

Please Return Original and Two Unsigned Carbon Copies

Reviewer Name & Address (type)

Specific Comments:

page 4, 1st paragraph: "Along this line" a better distinction should be made between evidence for inhibition of ATP synthesis by Ca^{2+} uptake through competition for the available energy and some other direct effect of matrix Ca^{2+} .

p. 8, 1st paragraph: It does not appear accurate to say that state 4 rates are unmodified by Ca^{2+} concentration.

p. 9, 1st paragraph: Effect of Mg^{2+} and Pi - do these effects simply result from slowing down Ca^{2+} uptake or are the final steady state rates, i.e. after 10 min or more, affected? Does inorganic phosphate in the range of 0.5 to 10 mM affect free Ca^{2+} concentration? Is this taken into account when calculating external free $[\text{Ca}^{2+}]$?

p. 10, Table IV: Is there an error in the rates of the 7 min time point with 10^{-9} M Ca^{2+} ?

p. 11, 1st paragraph: Differences in curves of Fig. 3 are observed below 0.7 nmol/mg CAT, not 70 pmol/mg?

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY

Please Return This Manuscript With Comment Within Two Weeks At Most, Preferably By.....
If You Cannot Do So, Please Return It Immediately Without Comment

Date: _____ Manuscript No.: 4-2212

Author(s): Rafael Moreno-Sanchez

Title: Regulation of Oxidative Phosphorylation in Mitochondria by External

Free Ca^{2+} Concentrations

The Editors would appreciate your opinion on the suitability of this manuscript for publication in The Journal of Biological Chemistry. *This is a privileged communication. Its contents should not be revealed nor made use of until it has appeared in print.*

Comments (Continue on another sheet, if necessary): No. 2

This manuscript concerns an interesting problem in bioenergetics, and ultimately the work should be acceptable for J.B.C. In the present form, however, the manuscript should not be accepted. Firstly, on the trivial level there are errors and/or omissions, as noted in the points below, which should be corrected. Secondly, the point made about control of ATP formation by either the translocase or the ATP synthase being strongly dependent on the Ca^{++} level is obscured by the omission of information about Fig. 4 and, perhaps more importantly, to this reader the Ca^{++} effect seems, from the data to be in the opposite sense to what the author concludes. Probably I am missing something, but it points to the fact that the author must clarify the issue as to the effect of Ca^{++} on the two processes.

Specific Comments

1. Legend of Fig. 2. There is an error in the legend in referring to Fig. 2A and 2B. Do the authors mean Fig. 1A and 1B?
2. P. 10, 2nd line from bottom. I think the authors meant . . . due to an effect on the phosphorylation. . .
3. Fig. 3B. There is no justification for drawing the top line with the sharp drop at 1.33 Ca^+ .
4. p. 11, middle. The reference to 70 pmol/mg seems an error, as the x-axis of Fig. 3 is in nmol.
5. Fig. 4. The legend does not indicate what the solid and open circles represent.
6. p. 14, line 17, and Fig. 4. The effect of 0.15 nmol olig. effect was only found in the open circle (10^{-6}mCa^{++} ?) case. In the closed circle case, the oligomycin effect did^{not} get dramatic until about 0.240 nmol.
7. p. 15, top. The point about the opposite sense of the control by 10^{-6}m and 10^{-9}m Ca^{++} is not at all clear, partly due to the point 5 above. This must be clarified. If the open circles are meant to be 10^{-6}m Ca^{++} as in Fig. 3, then I don't agree with the author's conclusion.

Do not write comments below this line

Do not write name above the

Date:

Please Return Original and Two Unsigned Carbon Copies

Reviewer Name & Address (type)

550-52-15 ext. 4886

October 31, 1984

Quentin H. Gibson, Associate Editor
Section of Biochemistry and Molecular Biology
Wing Hall-Cornell University
Ithaca, New York 14853

Dear Dr. Gibson:

This is in reference to your letter of October 10, 1984 concerning the manuscript "Regulation of Oxidative Phosphorylation in Mitochondria by External Free Ca^{2+} Concentration" which was submitted for publication in the Journal of Biological Chemistry. The manuscript was returned with the comments of two reviewers which considered that the work could be published if several questions and criticisms were answered and various corrections made. I have tried to answer the various points that were raised and have also made the necessary corrections. These are as follows:

First referee:

He mentions that the weakest point is the failure to address the role of Mg^{2+} . Specifically he asks if "it is possible that effects attributed to Ca^{2+} are due to secondary effects of Ca^{2+} on Mg^{2+} ". I would like to point that although Mg^{2+} controls the concentration of Ca^{2+} at which maximal rates of oxidative phosphorylation are attained, the same effects of Ca^{2+} are observed regardless of the presence or absence of Mg^{2+} in the media (see p.9, lines 23-29). Thus as the referee points out it is possible that Ca^{2+} , through controlling intramitochondrial Mg^{2+} levels, could exert its effects on oxidative phosphorylation. However, variations in Mg^{2+} levels in the time range and incubating conditions similar to those employed here have been previously determined (ref. 52 of this work), and apparently it would seem that the effects of Ca^{2+} are not mediated through variations of Mg^{2+} content. This point of view has been included on p.16 lines 22-29.

The same reviewer suggested that it would have been revealing if the content of adenine nucleotides had been measured. Needless to say I agree with the reviewer, but unfortunately at this moment there are several alternatives through which Ca^{2+} can affect the overall process of oxidative phosphorylation and my point of view on this matter is now stated on p.15

...

- 2 -

last paragraph, p.16 last paragraph and p.17 of this work. In this manuscript I have only tried to point out that Ca^{2+} levels regulate the rate of oxidative phosphorylation through a process that is accompanied by shifts in the control strength of some of the enzymes involved in the process.

I think that the mechanism(s) through which the described regulatory effect of Ca^{2+} takes place would require much more study. This point of view is stated on p. 16 lines 14-24. This was also described in the first version of the manuscript.

A third point of the reviewer that there is an effect of Ca^{2+} on State 4 respiration. Correct, this has now been acknowledged on p.8 lines 5-6.

The reviewer suggested that some discussion on the extent to which matrix enzymes are activated by Ca^{2+} and the controversy over whether matrix Ca^{2+} is in the proper range to extent control. In this version, I have included some relevant data on the question raised by the reviewer. Apparently the overall data suggest that the levels of intramitochondrial Ca^{2+} at which the measurement were carried out are in the physiological range. This is stated on pag. 16, second paragraph.

Specific Comments (Reviewer 1)

- 1) I have tried to make the distinction between inhibition of ATP synthesis by Ca^{2+} uptake through competition for the available energy and a some other direct effect of matrix Ca^{2+} . See p.4, lines 2-9.
- 2) With respect to state 4 resp., (see similar comments of second reviewer) both referees are correct. Changes in State 4 respiration are now stated (p. 8 lines 5-6).
- 3) p.9 first paragraph - The referee comments on the role of Mg^{2+} and Pi. This experimental results that relate to his question are described on p.9, lines 21-26. My point of view on the role of Mg^{2+} is stated above in reference to the general comments of the reviewer.
- 4) p. 10 Table IV. The reviewer is correct. This has been clarified.
- 5) The error on p.11, 1st. paragraph has been corrected.

...

Second Reviewer:

First, I want to apologize by the omission of information of Figure 4 in the original manuscript. Nevertheless from the data, the reviewer reaches conclusions that are different from these made in the original (and present version) manuscript. I think the reviewer in his comments has stressed an important point on how to evaluate the control exerted by a given enzyme from inhibition titration data. Essentially the problem is that if the reasoning of several authors (see refs. 17, 18, 39-42) are followed a figure that reflects control strength is obtained. On the other hand, if the concentration of the inhibitor of which a steep change of the inhibition curve is attained a different conclusion on the degree of control exerted by that enzyme may be reached. In this manuscript the experiments with the ATP synthase (Fig. 4) illustrates this point. From my point of view this enzyme presents several yet unexplored points of regulation, in particular the variation in the number of active enzymes that may exist in different metabolic conditions. Whether with this enzyme the experimental results agree with the theoretical considerations of Kacsér and Buras (39,40) and Heinrich and Rappport (41,42) remains to be established. In the present manuscript, it has been stressed that the evaluation of the control strength has been made from the initial slope of the inhibition curve, but at the same time recognizing that the evaluation of other parameters of the inhibition curve may imply other interpretation. This point of view has been stated in p. 14, lines 15-27. I hope that the reviewer agrees with our point of view on this problem.

Specific comments of the reviewer:

1. Error to legend of Fig. 2. This has now been corrected.
2. His observation is correct. This has been clarified.
3. Fig. 3 B. "There is no justification for drawing top line with a sharp drop of 1.33 CAT". This observation is correct; unfortunately a point was not drawn in the original drawing. The drawing has been corrected.
4. p.11, middle. This point has been corrected.
5. Fig. 4, the meaning of the solid and open circles has now been stated.
- 5 and 7. ~~End of the comment~~ ^{End of the comment} Fig. 4 and the text were corrected according to the reviewer's observations. With respect to his disagreement on our conclusions, please see the comments with respect to the titration of the ATP synthase with oligomycin.

I have tried to answer the comments of the reviewers to the best of my ability. I thank the reviewers, indeed I believe their comments point out the main problems involved in the process described in the manuscript and I have tried to express the state of the problem taking into account their observations. I also thank them for pointing out the errors of the original manuscript. I hope that in its present form the manuscript is acceptable for publication.

An editorial comment was that the abstract be condensed. This has been done.

Except for the corrections specified in this letter, the rest of the manuscript has not been altered.

Thank you very much for your interest.

Sincerely yours,

MS RAFAEL MORENO SANCHEZ

'grz.

Contribution of the Translocator of Adenine Nucleotides and the ATP Synthase to the Control of Oxidative Phosphorylation and Arsenylation in Liver Mitochondria*

(Received for publication, February 21, 1985)

Rafael Moreno-Sánchez

From the Departamento de Bioenergética, Centro de Investigaciones en Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-600, 04510, México, D. F., México

The regulation of the rate of mitochondrial oxidative phosphorylation and arsenylation was studied at two external free Ca^{2+} concentrations. The rate of arsenate-stimulated respiration in absence of added ADP was not affected by external 10^{-9} and 10^{-6} M Ca^{2+} levels or carboxyatractyloside, while state 3 respiration was profoundly modified. In addition, the kinetic analysis showed that the rate of arsenylation in the presence of ADP was more efficient (V_m/K_m ratio 3.5 times higher) in the catalytic process than phosphorylation. Therefore, this suggests that the activity of the ATP/ADP carrier is importantly controlled by Ca^{2+} . The evaluation of the control in phosphorylation showed that the flux-control coefficients (C_f) exerted by the ATP/ADP carrier (ranged between 0.23 and 0.48) and the ATP synthase (0.05–0.57) were modified in a reciprocal way by Ca^{2+} and P_i concentrations. This suggests that these two enzymes are coupling sequentially through a common intermediate, the intramitochondrial ATP/ADP ratio. Other important steps controlling phosphorylation were the *b-c*₁ complex ($C_f = 0.30$) and the cytochrome oxidase ($C_f = 0.23$) but they were not modified by Ca^{2+} . It was also found that the main step controlling arsenylation was the ATP synthase ($C_f = 0.74$). The increment in the inorganic arsenate concentration induced a diminution in the control exerted by the ATP synthase (from 0.73 to 0.56). The results suggest that Ca^{2+} and P_i (or inorganic arsenate) could be regulated by ATP synthesis through an activating effect on ATP/ADP carrier and/or ATP synthase.

The regulation of steady-state mitochondrial oxidative phosphorylation has been a problem of interest for several years. On the basis of studies on the effect of specific inhibitors and variations in the ADP/ATP and ATP/(ADP) × (P_i) ratios on the rate of ATP synthesis, it has been proposed that the adenine nucleotide translocator is the rate-limiting step of oxidative phosphorylation (1–4). In contrast, through a thermodynamic approach, it was postulated that cytochrome oxidase is an important control point of oxidative phosphorylation, since it was observed that sites 1 and 2 of oxidative phosphorylation were in near-equilibrium with the extramitochondrial phosphorylation potential (5, 6). However, other

studies showed that the translocator was approximately 2 kcal/mol out of equilibrium (7), and, more recently, the conclusions reached from the aforementioned thermodynamic studies were critically evaluated (8). In addition, using the theory of metabolic control developed by Kacser and Burns (9, 10) and Heinrich and Rapoport (11, 12), Tager and co-workers (13, 14) showed that control of oxidative phosphorylation is exerted at multiple points, the most important being the adenine nucleotide translocator, the dicarboxylate carrier, and cytochrome oxidase.

It has been described that the level of intramitochondrial Ca^{2+} affects the rate of oxidative phosphorylation (15–21). Apparently this effect of Ca^{2+} involves a change in the degree of kinetic control exerted by the various steps of oxidative phosphorylation (22); nevertheless, at two different rates of oxidative phosphorylation, it was found that the adenine nucleotide translocator is an important point of control (22). With respect to how intramitochondrial Ca^{2+} levels regulate the various steps involved in oxidative phosphorylation, it was considered of interest to evaluate the multiple control points in the absence of the contribution exerted by the adenine nucleotide translocator. Such a system could be the arsenate-stimulated respiration (23–26), the rationale being that arsenate that enters the mitochondria through the mersalvi-sensitive phosphate carrier (27) arsenylates internal ADP via the ATP synthase using the H^+ gradient generated by the respiratory chain (27–30). As ADP-arsenate is rapidly hydrolyzed, an internal cycle of ADP-arsenate synthesis and hydrolysis would take place. Thus, in this system, the arsenate-stimulated respiration would not involve the function of the translocator. In this work, the control strength of all the steps involved in oxidative phosphorylation and arsenylation was quantitated at two different rates of oxygen uptake as controlled by the external Ca^{2+} level.

METHODS

The preparation of rat liver mitochondria with a medium containing 250 mM sucrose, 5 mM HEPES,¹ 0.5 mM EGTA, pH 7.0, the determinations of oxygen uptake (by means of a Clark-type electrode) and protein, and the use of Ca^{2+} -EGTA buffers were described in a previous work (22). Mitochondria (1 mg/ml) were incubated in a basic medium containing 120 mM KCl, 30 mM HEPES, 2 mM MgCl_2 , 5 mM succinate, 2 mM EGTA, pH 7.20, at 30 °C. Other experimental conditions are detailed in the legends to the tables and figures.

* This study was supported in part by a grant from the Organization of American States and the Ricardo J. Zavada Foundation to Dr. A. Gómez-Puyou. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ The abbreviations used are: HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; As, inorganic arsenate; C_f , flux-control coefficient; EGTA, ethylene glycol bis(3-aminoethyl ether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid; FCCP, carbonyl cyanide 4-trifluoromethoxyphenylhydrazone; HQNO, 2-heptyl-4-hydroxyquinoline-*N*-oxide.

RESULTS

Effect of Carboxyatractyloside on Oxidative Arsenylation—The mechanism through which arsenate stimulates mitochondrial respiration is visualized as the formation of ADP-arsenate through the ATP synthase and its subsequent spontaneous internal hydrolysis (27–30). Nevertheless, the addition of ADP to the system increases the rate of the arsenate-stimulated respiration (24–26), which suggests that the metabolic cycle exhibits a certain dependence on the translocation of adenine nucleotide across the membrane. Therefore, the sensitivity of oxidative phosphorylation and arsenylation to carboxyatractyloside, a specific irreversible inhibitor of the translocator (31, 32), was assayed in mitochondria incubated for 5 min with 10^{-9} M external Ca^{2+} (Table I), which is assumed to be much lower than physiological concentrations of Ca^{2+} (33). As discussed in previous work in this condition (22), the amount of intramitochondrial Ca^{2+} is lowered from 20 to 11 nmol mg^{-1} , which is near to the possible physiological range of intramitochondrial Ca^{2+} of 1–5 nmol/mg of mitochondrial protein determined in entire cells (34). On the other hand, arsenylation in the absence of ADP was completely insensitive to carboxyatractyloside. In the presence of ADP, the rates of phosphorylation and arsenylation were diminished by carboxyatractyloside, but as expected the former was much more sensitive. These findings indicate that phosphorylation fully depends on translocator activity, while arsenylation is only partially dependent.

The increase in the rate of the arsenate-stimulated respiration as induced by ADP suggests that either intramitochondrial ADP concentration is limiting for respiration or alternatively, as phosphate is competitive with arsenate (23, 24, 26), the phosphorylation of ADP lowers the internal phosphate concentration, thus allowing full expression of the action of arsenate. These possibilities were explored by assaying the rate of arsenate-stimulated respiration of mitochondria preincubated for 5 min prior to the addition of arsenate in the usual conditions (Table I). The rate of respiration stimulated by 2 mM As_5 in the absence of added ADP and P_i was 129 nanatoms $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. As_5 added to mitochondria after 15 s of incubation with 4 μM ADP induced a rate of 146. In mitochondria preincubated for 5 min with hexokinase, glucose, and 4 μM ADP, in which endogenous phosphate would have been converted to glucose 6-phosphate, As_5 induced respiration to a value of 143. Thus, a lowering of the internal phosphate concentration did not modify the effect of ADP on the As_5 -stimulated respiration, which may suggest that the

TABLE I
Inhibition of oxidative phosphorylation and arsenylation by carboxyatractyloside

Rat liver mitochondria (3 mg) were incubated in 3 ml of the basic medium: 120 mM KCl, 30 mM HEPES, 2 mM MgCl_2 , 5 mM succinate, 2 mM EGTA, 10^{-9} M Ca^{2+} , pH 7.29, at 30 °C. For the assay of oxidative phosphorylation, the mixture contained 2 mM P_i from the beginning of the experiment. After 5 min of preincubation with the indicated amounts of carboxyatractyloside, 250 μM ADP was added. For the assay of arsenylation, 2 mM As_5 was added instead of P_i . After either the addition of ADP or As_5 , the rate of oxygen uptake was calculated. In oxidative arsenylation plus ADP, 250 μM ADP was added 20 s before As_5 .

Carboxyatractyloside <i>pmol mg⁻¹</i>	Oxidative phosphorylation <i>nanatoms O mg⁻¹ min⁻¹</i>	Oxidative arsenylation <i>nanatoms O mg⁻¹ min⁻¹</i>	Oxidative arsenylation (+ ADP) <i>nanatoms O mg⁻¹ min⁻¹</i>
0	136	116	180
50	127	115	172
167	17	106	100

translocation of ADP *per se* may be involved in the increase by ADP of the As_5 -stimulated respiration. The K_m for ADP in the arsenate-stimulated respiration in the absence of hexokinase was 13.2 μM (data not shown). This was calculated by plotting the increase of As_5 -stimulated respiration by various concentrations of added ADP.

Effect of Ca^{2+} on the Arsenate-stimulated Respiration—The level of internal Ca^{2+} as regulated by the external Ca^{2+} concentration controls the rate of oxidative phosphorylation (22). Therefore, it was considered of interest to study whether Ca^{2+} levels affect the arsenate-stimulated oxygen uptake. In agreement with previous findings (22), it was found that, at a concentration of 10^{-9} M external Ca^{2+} , the ADP-stimulated respiration decreases with time (Table II); with 10^{-8} M external Ca^{2+} in a 5-min period, the decrease in respiration is much lower. In the presence of ADP and arsenate, a similar pattern is observed, except that the decrease in respiration is much lower than in the presence of phosphate. In contrast, the arsenate-stimulated respiration in the absence of added ADP remains essentially unchanged regardless of the concentration of Ca^{2+} introduced into the mixture. Also, it is to be noted that, after a 5-min incubation period with 10^{-9} M external Ca^{2+} , which lowers the level of internal Ca^{2+} (22), the rate of respiration in the presence of ADP and arsenate is higher than that obtained with ADP and phosphate. The data of Table II also indicate that the rate of oxidative phosphorylation is 20% faster than the rate of arsenylation after a 1-min preincubation, which is in accord with previous reports (26, 28, 29, 35–37). However, when mitochondria were preincubated for 5 min at 10^{-9} M Ca^{2+} , the rate of respiration in the presence of ADP and As_5 is 27% higher than that obtained with ADP and phosphate. Therefore, the data show that the rate of respiration is modified by the level of extramitochondrial Ca^{2+} only in conditions in which ADP determines the rate of respiration. These results suggest that Ca^{2+} levels modify mainly the functioning of the adenine nucleotide translocator.

Catalytic Constants for Oxidative Phosphorylation and Arsenylation—A double reciprocal plot of the rate of respiration at various concentrations of phosphate and arsenate is shown in Fig. 1. In the Lineweaver-Burk plot, two clearly distinguishable slopes were detected; in a kinetic study of oxidative phosphorylation, Stoner and Sirak (38) noted a similar downward curve. These authors interpreted these findings as different affinities for phosphate during oxidative phosphorylation. Using the second slope of the data in Fig. 1, the kinetic parameters depicted in the figure were calculated. Apparently, oxidative phosphorylation has a 14% higher catalytic capacity than arsenylation in the absence of added ADP. In contrast, arsenylation plus ADP shows a higher V_{max} and a K_m for arsenate 70% lower than that for phosphate in oxidative

TABLE II
Rate of respiration stimulated by ADP and As_5 at two Ca^{2+} concentrations

Addition	Rate of respiration <i>nanatoms O mg⁻¹ min⁻¹</i>			
	10^{-9} M Ca^{2+}		10^{-8} M Ca^{2+}	
	1 min*	5 min*	1 min*	5 min*
As_5	122	125	117	131
As_5 (+ ADP)	209	183	211	204
P_i + ADP	252	144	240	205

* Preincubation time.

Control of Phosphorylation and Arsenylation

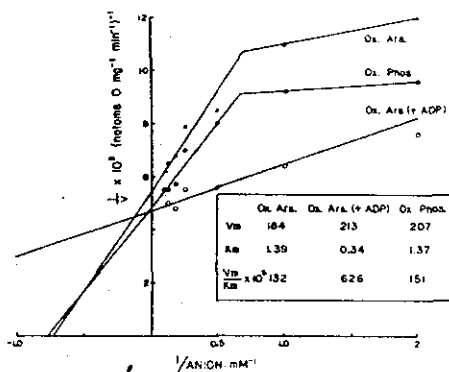


FIG. 1. Kinetics of mitochondrial oxidative phosphorylation and arsenylation. The experimental details are described in the legend to Table I.

phosphorylation, and the catalytic constant V_m/K_m is 3.5 times higher in arsenylation (+ ADP) than in oxidative phosphorylation.

Evaluation of Multiple Control Points of Oxidative Phosphorylation and Arsenylation.—The quantitative analysis of control of a metabolic pathway (9–12) introduced by Tager and co-workers (13, 14) for mitochondrial ATP synthesis was used here. The values of flux-control coefficient (see Ref. 39 for new terminology in the metabolic control theory) for the adenine nucleotide translocator and the ATP synthase of mitochondria incubated in 10^{-6} and 10^{-9} M external Ca^{2+} were described before (22). These results were confirmed (Table III). It should be noted that the concentration of Ca^{2+} modulates in a reciprocal form the flux-control coefficient exerted by the adenine nucleotide translocator and the ATP synthase. In addition, it is to be noted that cytochrome oxidase and b-c₁ complex also contribute in an important form to the control of the rate of ATP synthesis, but that the value is not modified by external Ca^{2+} concentration.

The titration curves from which the values of Table III were calculated are shown in Fig. 2. For reasons unknown, the C_i values for the b-c₁ complex and the dicarboxylate carrier are significantly different from those obtained by Tager and co-workers (13, 14). In different experiments, the C_i values for 10^{-9} M Ca^{2+} exerted by the b-c₁ complex using HQNO were 0.40, 0.33, and 0.46. At 10^{-6} M Ca^{2+} , values were 0.34, 0.27, and 0.26. Titration with antimycin, another inhibitor of the b-c₁ complex (48), also gave a high value of the flux-control coefficient. Malate was considered a specific inhibitor of the dicarboxylate carrier on the rationale that mitochondria in the presence of rotenone would be unable to oxidize malate, and that malate could compete with the influx of succinate (43, 44). In different experiments on the effect of malate, the values obtained for the flux-control coefficient exerted by the dicarboxylate carrier at 10^{-9} M Ca^{2+} were 0.04 and 0.03, and at 10^{-6} M Ca^{2+} , 0.11 and 0.04. The values determined for this carrier using mersalyl, phenylsuccinate, and n-butylmalonate confirmed that the dicarboxylate carrier exerted a low control of the rate of oxidative phosphorylation.

From titrations with oligomycin, it has been reported (49, 50) that the ATP synthase does not exert significant control of state 3 respiration (however, see Ref. 51). In our experimental conditions and using also oligomycin, this seems to be

TABLE III

Flux-control coefficient of various steps in oxidative phosphorylation

Flux-control coefficients were calculated according to Ref. 13 using the data of Fig. 2 and other titration curves with the indicated inhibitors (not shown). The estimation of C_i values was done measuring the slope of the inhibition curve at the lowest concentrations of inhibitor used, and relating it to the uninhibited activity and other kinetics parameters depending on the kind of inhibitor used, following the considerations of Ref. 13. The following K_i were used for the calculations: azide, 250 μM at pH 7.20 (40); cyanide, 10 μM (this was determined in the conditions employed here by measuring cytochrome oxidase activity as described in Ref. 41); HQNO, 64 mM (42); N-ethylmaleimide, 60 μM (determined from the inhibition curve); malate, 0.23 mM (43); mersalyl, 5 μM (43); phenylsuccinate, 0.71 mM (44); n-butylmalonate, 0.35 mM (44). The following K_m values were used: P_i, 1.6 mM (45); succinate, 1.17 mM (43); As_i, 0.34 mM (see Fig. 1). Carboxyatractyloside (31, 32), oligomycin (46), and antimycin (47) were considered irreversible inhibitors. The symbols C and NC indicate competitive and noncompetitive inhibitors, respectively.

Enzyme	C _i		Inhibitor
	10^{-9} M Ca^{2+}	10^{-6} M Ca^{2+}	
ATP/ADP carrier	0.32	0.48	Carboxyatractyloside
ATP synthase	0.21	0.05	Oligomycin
Cytochrome oxidase	0.16	0.20	Azide (NC)
b-c ₁ complex	0.27	0.23	Cyanide (NC)
	0.30	0.27	HQNO (NC)
	0.50	0.43	Antimycin
P _i carrier	0.08	0.12	Arsenate (C)
	0.03	0.05	N-Ethylmaleimide (NC)
Dicarboxylate carrier	0.03	0.05	Malate (C)
	0.09	0.14	Mersalyl (NC)
	0.08		Butylmalonate (C)
	0.00		Phenylsuccinate (C)
ΣC_i	$1.02-1.47$	$1.16-1.46$	

the case at 10^{-6} M Ca^{2+} , but at 10^{-9} M Ca^{2+} , the contribution of the ATP synthase is high (Table III). In various experiments, the values obtained at 10^{-9} M Ca^{2+} were 0.32 and 0.31, while at 10^{-6} M Ca^{2+} , the values obtained ranged between 0.01 and 0.14.

The flux-control coefficients of several of the reactions involved in oxidative phosphorylation were also calculated from titrations with various inhibitors (the titration curves are shown in Fig. 3 and the results of calculations of the flux-control coefficient in Table IV). Noteworthy is that the most important point of control of this process is the ATP synthase, notwithstanding the presence of ADP or external Ca^{2+} . In addition, it is of interest to note that the contribution of the ATP synthase to the arsenate-stimulated respiration is about 3 times and approximately 12 times higher at 10^{-9} and 10^{-6} M Ca^{2+} , respectively, than its contribution in oxidative phosphorylation (compare data of Tables III and IV). The contribution of the other metabolic steps to the control of the arsenate-stimulated respiration was similar to that detected in oxidative phosphorylation, except for the case of b-c₁ complex, which was lower in the case of the arsenate-stimulated oxygen uptake.

Up to this point, the results suggest that there is a reciprocal relation in the control of oxidative phosphorylation between the adenine nucleotide translocator and the ATP synthase. Indeed, by poising the rate of oxidative phosphorylation at two different steady-state levels, it was observed that the contribution of the translocator and the ATP synthase varied in opposite directions. Moreover, without a functional adenine nucleotide translocator, as in the case of the arsenate-stimulated respiration, the main point of control is the ATP synthase. Therefore, it was of interest to estimate the control

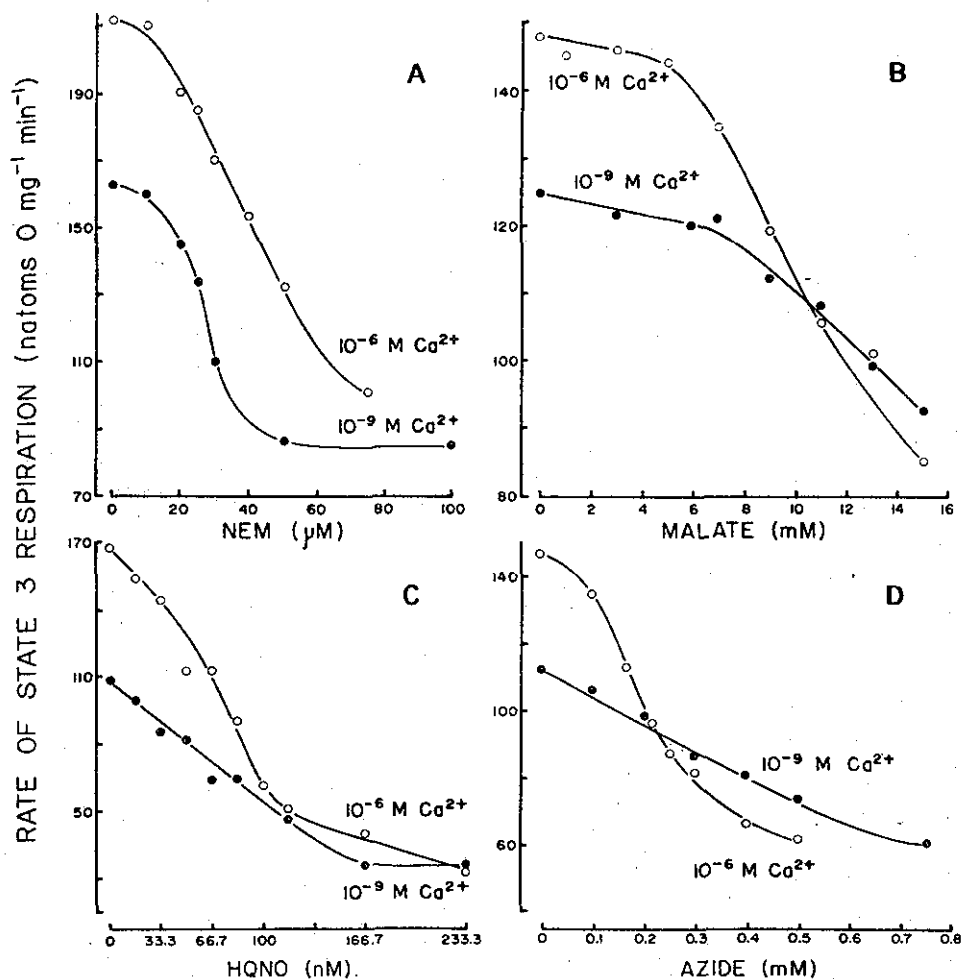


FIG. 2. Inhibition of the rate of state 3 respiration at two Ca²⁺ concentrations at different enzymic steps. Mitochondria were incubated with the indicated inhibitors for 5 min in the conditions described in the legend to Table I at 10⁻⁶ and 10⁻⁹ M Ca²⁺. State 3 respiration was induced by the addition of 200 μM ADP. In B, 3 μM rotenone was added.

exerted by the two enzymes at different steady-state rates of oxidative phosphorylation. The rates of arsenylation and phosphorylation were adjusted to different levels by varying the concentration of phosphate or arsenate introduced into the mixture; at each of these concentrations, titrations with carboxyatractyloside and oligomycin were carried out. From the slope of the inhibition curve the flux-control coefficient was calculated. The results (Table V) showed that, as the rate of phosphorylation increased, the contribution of the translocator increased, while that of the synthase diminished. In the

arsenylation reaction, it was observed that, as the rate of respiration increased, the contribution of the synthase to the regulation of the process also diminished. It should be noted that, at all levels of respiration, the control exerted by the synthase is significantly higher for the arsenylation than for the phosphorylation reaction.

DISCUSSION

It has been repeatedly observed (26, 28, 29, 35-37) that the rate of respiration during ATP synthesis is higher than that

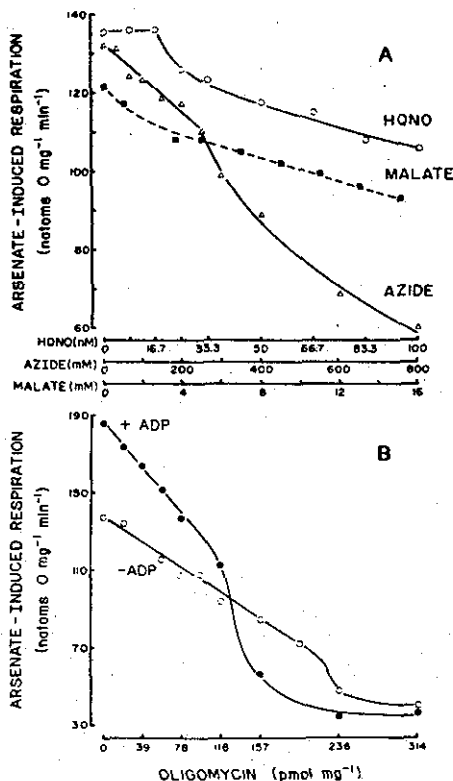


Fig. 3. Inhibition of the rate of arsenate-induced respiration at different enzymic steps. Mitochondria were incubated with the indicated inhibitors for 5 min at 10^{-8} M Ca^{2+} in the media detailed in the legend to Table I. Arsenate-induced respiration was started by the addition of 2 mM As_2 . Where indicated, 200 μM ADP was added 20 s before As_2 .

induced by As_2 in the presence or absence of ADP. This observation was confirmed, but it was observed that, in mitochondria incubated for 5 min with 10^{-8} M external Ca^{2+} , the rate of oxidative phosphorylation declined (Table II and Ref. 22) to a point in which the arsenate-stimulated respiration became higher. The diminution of the rate of oxidative phosphorylation correlates with a drop in the level of internal Ca^{2+} (22). In agreement with previous conclusions (17, 21, 22, 52, 53), it would appear that a main effect of Ca^{2+} levels on mitochondrial phosphorylation is on the activity of the adenine nucleotide translocator, since the arsenate-stimulated respiration was not affected by variations in Ca^{2+} levels.

The quantitation of the flux-control coefficient exerted by the various metabolic steps involved in oxidative phosphorylation at two different steady-state rates as determined by the concentration of external Ca^{2+} showed that only the control exerted by the adenine nucleotide translocator and the ATP synthase underwent significant variations; more-

TABLE IV

Flux-control coefficient of various steps of oxidative arsenylation. Flux-control coefficients were calculated from the data of Fig. 3 and other titration curves obtained with the indicated inhibitors (not shown) as described in the legend to Table III. Other experimental details were also described in the legend to Table III. C, competitive inhibitor.

Enzyme	C_i		Inhibitor
	10^{-8} M Ca^{2+}	10^{-6} M Ca^{2+}	
ATP synthase	0.74	0.60	Oligomycin
Cytochrome oxidase	0.76 (+ ADP)		Azide
b-c ₁ complex	0.15		HQNO
As_2 carrier	0.00	0.10	Antimycin P ₁ (C)
Dicarboxylate carrier	0.02		N-Ethylmaleimide
	0.12		Malate
	0.00		Mersalyl
	0.05		
	0.10		
$\Sigma C_i = 0.94-1.15$			

TABLE V

Contribution of the translocator of adenine nucleotides and the ATP synthase to the control of oxidative phosphorylation and arsenylation at different steady-state rates

Mitochondria were incubated at 10^{-8} M Ca^{2+} in the basic medium detailed in the legend to Table I. Different steady-state rates were fixed by adding the indicated concentrations of P_i in the case of phosphorylation or As_2 in the case of arsenylation. Flux-control coefficients were calculated as indicated in the legend to Table III, using carboxyatractylidase and oligomycin as irreversible inhibitors. The rates of the uninhibited steady-states (F_0 , As_0) are shown and indicate nanoatoms of O mg⁻¹ min⁻¹. After 5 min of incubation with the inhibitors, either 250 μM ADP or As_2 was added. After this addition, the rate of oxygen uptake was measured.

P _i or As_2	F_0	C_i			
		Phosphorylation		Arsenylation	
		Translocator	Synthase	As_0	Synthase
mM					
0.5	97	0.23	0.57	88	0.73
2.0	112	0.33	0.23	110	0.70
5.0	139	0.52	0.20	127	0.56

over, opposite variations in the control exerted by the synthase and the translocase were also observed when the rate of phosphorylation was modified by variations in the concentration of phosphate. In agreement with previous considerations (38, 54), the observed reciprocal changes that occur with the adenine nucleotide translocator and the ATP synthase as induced by Ca^{2+} or phosphate suggest that there is a strong functional coupling between the two enzymes, i.e. an activation of the synthase would lead to an inverse shift in the kinetic control exerted by the translocase and the synthase.

The theory of metabolic control (9-12) describes a quantitative relation between the flux-control coefficients and the elasticity coefficients (39) of adjacent enzymes through common metabolites; the elasticity coefficient of an enzyme being defined as the "local" response of the rate to a change in the concentration in one of the intermediates (10, 11). Such relation was named the connectivity property (10):

$$\frac{C_i}{C_s} = -\frac{\epsilon}{\epsilon_s}$$

where C_i and C_s are the respective flux-control coefficients of the translocator and the synthase, and ϵ and ϵ_s are the

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

respective elasticity coefficients toward the common intermediate, i.e. the ATP/ADP intramitochondrial ratio.

The values obtained of the C_i/C_e ratios at two different Ca^{2+} and P_i concentrations are illustrated in Table VI. When the concentrations of Ca^{2+} or phosphate were increased, the rate of oxidative phosphorylation also augmented, and this is characterized by a higher value of the C_i/C_e ratio. The increment in the C_i/C_e ratio with the rate of oxidative phosphorylation indicates that the elasticity coefficient of the synthase (ϵ_s) increases and/or the elasticity coefficient of the translocator (ϵ_t) decreases. As it has been shown that in respiring mitochondria the intramitochondrial ATP/ADP ratio increases with the concentration of phosphate (3), it would appear improbable that the higher ϵ_s/ϵ_t ratio is due to a diminution in ϵ_s ; this is because the increase in the ratio occurs in a condition in which the existing higher ATP/ADP ratio would favor the activity of the translocator (however, see Ref. 55). Therefore, at this stage it would appear that the high C_i/C_e ratio at high rates of oxidative phosphorylation is due to or correlates with an increase in the elasticity coefficient of the synthase. In other words, it would seem that ATP synthase has a greater capacity of response with respect to variations in the intramitochondrial pool of adenine nucleotides.

There are reports that indicate that Ca^{2+} (20, 56) and phosphate (57) control the hydrolytic activity of the ATP synthase by modifying the interaction of the natural ATPase inhibitor protein with the ATP synthase in heart mitochondria and that these interactions affect the rate of ATP synthesis (58, 59). Moreover, phosphate and arsenate (60) modify *per se* the catalytic activity of the ATP synthase. Therefore, it is possible that an important point of control of oxidative phosphorylation and arsenylation is the regulation of the activity of the ATP synthase or the number of active enzymes as determined by the interaction of the enzyme with the inhibitor protein. Although the molecular events that occur at each of the steps of the metabolic pathways and which account for the overall rate cannot be ascertained at this moment, the present results are consistent with the idea (38) that there is a strong functional relation between the ATP synthase and the translocator, and that variations in the catalytic activity of the synthase influence the kinetic control exerted by the translocase. The role of the inhibitor protein in the modulation of the rates of oxidative phosphorylation and its kinetic control in whole mitochondria is a problem that merits detailed studies.

Finally, two points deserve some comment. The first is the present inability to explain the different flux-control coefficient exerted by the b-c complex on oxidative phosphorylation and arsenylation. The second is that, in the theory of control proposed by Kacser and Burns (9, 10) and Heinrich and Rapoport (11, 12), the sum of the contributions of the individual steps to the regulation of a metabolic pathway should be a unit; this has been referred to as the summation

theorem (9, 10). However, in the present studies, the sum of the control exerted by the individual steps of oxidative phosphorylation was found to be higher than one. The possibilities for obtaining higher values have been discussed (61), and it was proposed that substrate inhibition, expansion of the system, and branched pathways could account with negative contributions to the control of the flux, i.e. reactions that affect the pathway by a lateral draining of the main flux. *substrate*

In the present experimental conditions, *product* inhibition would be difficult to postulate, while the expanding system applies to a growing system where masses and volumes increase exponentially. On the other hand, the existence of a branched pathway may well exist in mitochondria, and this could be the passive permeability of the inner membrane to protons. It should be noted that, if respiration is evaluated, H^+ permeability would exert a positive control, but as it has been assumed that rates of state 3 respiration correspond to phosphorylation rates, passive H^+ permeability would exert a negative contribution to the regulation of oxidative phosphorylation. The passive H^+ permeability of mitochondria was evaluated according to Groen *et al.* (13). This method estimates membrane H^+ leakage through titration of respiration with FCCP and extrapolation to zero respiration. The intrinsic proton diffusion was calculated to be 11–19 nM FCCP in state 4 conditions. With the latter value and results of titrations with FCCP on state 3 and arsenylation rates, the degree of control of H^+ permeability during the operation of oxidative phosphorylation and arsenylation was calculated and ranged between 0.04 and 0.12 and 0.11 and 0.23, respectively. Thus, it would appear that an important point with a negative contribution to the overall control of ATP synthesis is the intrinsic permeability of the mitochondrial membrane to H^+ .

Acknowledgments—I gratefully acknowledge helpful discussions with Dr. A. Gómez-Puyou from Departamento Bioenergética, Centro de Investigaciones en Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. The collaboration of Guadalupe Ramirez in typing the manuscript is acknowledged.

REFERENCES

- Davies, E. J., and Lumeng, L. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 2275–2282
- Lemasters, J. J., and Sowers, A. E. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 1248–1251
- Kunz, W., Bohnensack, R., Böhme, G., Küster, U., Letko, G., and Schönfeld, P. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* 209, 219–223
- Jacobus, W. E., Moresdith, R. W., and Vandegær, K. M. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 2397–2402
- Forman, N. G., and Wilson, D. F. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 12908–12915
- Forman, N. G., and Wilson, D. F. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 8649–8655
- Wanders, R. J. A., Groen, A. K., Meijer, A. J., and Tager, J. M. (1981) *FEBS Lett.* 132, 201–206
- Lemasters, J. J., Grunwald, R., and Emsau, R. K. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 3058–3063
- Kacser, H., and Burns, J. A. (1973) *Symp. Soc. Exp. Biol.* 27, 65–104
- Kacser, H., and Burns, J. A. (1979) *Biochem. Soc. Trans.* 7, 1149–1160
- Heinrich, R., and Rapoport, T. A. (1974) *Eur. J. Biochem.* 42, 89–95
- Heinrich, R., and Rapoport, T. A. (1974) *Eur. J. Biochem.* 42, 97–105
- Groen, A. K., Wanders, R. J. A., Westerhoff, H. V., Van der Meer, R., and Tager, J. M. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 2754–2757
- Tager, J. M., Wanders, R. J. A., Groen, A. K., Kunz, W., Bohnensack, R., Küster, U., Letko, G., Böhme, G., Duszyński, J., and Wojtczak, L. (1983) *FEBS Lett.* 151, 1–9
- Jacobus, W. E., Tiozzo, R., Lugli, G., Lehninger, A. L., and

TABLE VI

The C_i/C_e ratios of the rate of oxidative phosphorylation

The values of C_i (flux-control coefficient of the translocator of adenine nucleotides) and C_e (flux-control coefficient of the ATP synthase) were taken from the values shown in the legends to Tables III and V.

	2 mM P_i		10^{-6} M Ca^{2+}	
	10^{-6} M Ca^{2+}	10^{-4} M Ca^{2+}	0.5 mM P_i	5.0 mM P_i
C_i	0.32	0.48	0.23	0.52
C_e	0.20 = 1.6	0.45 = 9.6	0.57 = 0.4	0.20 = 2.6
	0.05			

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Carafoli, E. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 7863-7870
16. Sortshøj, L. A. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.* **167**, 104-115
17. Malmström, K., and Carafoli, E. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* **182**, 657-666
18. Roman, I., Clark, A., and Swanson, P. D. (1981) *Membr. Biochem.* **4**, 1-9
19. Robertson, S. P., Potter, J. D., and Rouslin, W. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 1743-1748
20. Hillered, L., Muchini, P. M., Nordenbrand, K., and Ernster, L. (1983) *FEBS Lett.* **154**, 247-250
21. Moreno-Sánchez, R. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* **724**, 278-285
22. Moreno-Sánchez, R. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 4028-4034
23. Crane, R. K., and Lipmann, F. (1953) *J. Biol. Chem.* **201**, 235-243
24. Estabrook, R. W. (1961) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **4**, 89-91
25. Chappell, J. B., and Crafts, A. R. (1965) *Biochem. J.* **95**, 707-716
26. Ter Welle, H. F., and Slater, E. C. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* **143**, 1-17
27. Bertagnolli, B. L., and Hanson, J. B. (1973) *Plant Physiol.* **52**, 431-435
28. Gresser, M. J. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 5981-5983
29. Moore, S. A., Moennich, D. M. C., and Gresser, J. J. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 6266-6271
30. Zoratti, M., Pietrobon, D., and Azzone, G. F. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* **723**, 59-70
31. Klingenberg, M., Grebe, K., and Scherer, B. (1975) *Eur. J. Biochem.* **52**, 351-363
32. Vignais, P. V. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* **456**, 1-38
33. Murphy, E., Coll, K., Rich, T. L., and Williamson, J. R. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 6600-6606
34. Somlyó, A. P., Somlyó, A. V., Shuman, H., Scarpa, A., Endo, M., and Inesi, G. (1981) in *Calcium Phosphate Transport Across Biomembranes* (Bonner, F., and Peterlik, M., eds) pp. 87-93. Academic Press, New York
35. Avron, M., and Jagendorf, A. T. (1959) *J. Biol. Chem.* **234**, 967-972
36. Cross, R. L., and Wang, J. H. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **38**, 848-854
37. Slotten, L., and Nuytzen, A. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* **725**, 49-59
38. Stoner, C. D., and Sirak, H. D. (1979) *J. Bioenerg. Biomembr.* **11**, 113-146
39. Burns, J. A., Cornish-Bowden, A., Groen, A. K., Heinrich, R., Kacser, H., Porteous, J. W., Rapoport, S. M., Rapoport, T. A., Stücki, J. W., Tager, J. M., Wanders, R. J. A., and Westerhoff, H. V. (1985) *Trends Biochem. Sci.* **10**, 16
40. Wilson, D. F., Erecinska, M., and Brocklehurst, E. S. (1972) *Arch. Biochem. Biophys.* **151**, 180-187
41. Brautigan, D. L., Ferguson-Miller, S., and Margolias, E. (1978) *Methods Enzymol.* **53**, 128-164
42. Van Ark, G., and Berden, J. A. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* **459**, 119-137
43. Passarella, S., and Quagliariello, E. (1976) *Biochimie (Paris)* **58**, 989-1001
44. LaNoue, K. F., and Schoolwerth, A. C. (1979) *Annu. Rev. Biochem.* **48**, 871-922
45. Coty, W. A., and Pedersen, P. L. (1974) *J. Biol. Chem.* **249**, 2593-2598
46. Bertina, R. M. (1972) Ph.D. thesis, University of Amsterdam
47. Gellerfors, P., Johansson, T., and Nelson, B. D. (1981) *Eur. J. Biochem.* **115**, 273-278
48. Keilin, D., and Hartree, E. F. (1955) *Nature* **176**, 200-206
49. Bagetto, L., Gautheron, D. C., and Godinot, C. (1984) *Arch. Biochem. Biophys.* **232**, 670-678
50. Bohnensack, R., Küster, U., and Letko, G. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* **680**, 271-280
51. Doussiète, J., Ligeti, E., Brandolin, G., and Vignais, P. V. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **766**, 492-500
52. Foldes, M., and Barritt, G. J. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 5372-5380
53. Gómez-Puyou, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., Klapp, M., and Carafoli, E. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* **194**, 399-404
54. Stoner, C. D. (1984) *J. Bioenerg. Biomembr.* **16**, 115-141
55. Letko, G., Küster, U., Duszyński, J., and Kunz, W. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* **593**, 196-203
56. Tuena de Gómez-Puyou, M., Gavilanes, M., Gómez-Puyou, A., and Ernster, L. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* **592**, 396-405
57. Beltrán, C., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A., and Darsson, A. (1984) *Eur. J. Biochem.* **144**, 151-157
58. Gómez-Puyou, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., and Ernster, L. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* **547**, 252-257
59. Harris, D. A., Von Tscharnner, V., and Radda, G. K. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* **548**, 72-84
60. Ebel, R. E., and Lardy, H. A. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 191-196
61. Kacser, H. (1983) *Biochem. Soc. Trans.* **11**, 35-40

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY

FOUNDED BY CHRISTIAN A. HERTER

PUBLISHED BY

THE AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, INC.

May 1, 1985

QUENTIN H. GIBSON, *Associate Editor*
SECTION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY
WING HALL - CORNELL UNIVERSITY
ITHACA, NEW YORK 14853
TEL: 607 256-2203

Dr. Rafael Moreno-Sanchez
Dept. de Bioenergetica
Centro de Investig. en Fisiologia Cell.
Univ. Nacio. Autonoma de Mexico
Ap. Postal 70-600
04510 Mexico, D.F. MEXICO

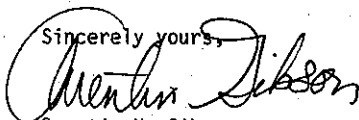
Dear Dr. Moreno-Sanchez:

Your manuscript MS# 5-0518 entitled "*Contribution of the Translocator of Adenine Nucleotides and the ATP Synthase to the Control of Oxidative Phosphorylation and Arsenylation in Liver Mitochondria*" has been carefully read by a member of the Editorial Board and an expert referee, whose comments are enclosed.

The reviewers agree that the manuscript is interesting and recommend publication in The Journal of Biological Chemistry, pending your attention to the cogent comments of the referee. May I ask you to consider these comments and make what changes you think seem appropriate.

When you return the revised manuscript, it would be helpful if you would include a letter explaining how you have dealt with the referee's comments. I will let you know the outcome as soon as possible.

Sincerely yours,



Quentin H. Gibson
for the Editorial Board

QHJ:hmg

Enclosures

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Please Return This Manuscript With Comment Within Two Weeks At Most, Preferably By.....
If You Cannot Do So, Please Return It Immediately Without Comment

Date: 3/1/85 Manuscript No.: M5-518

Author(s): Rafael Moreno-Sánchez

Title: Contribution of the Translocator of Adenine Nucleotides and the ATP Synthase to the Control of Oxidative Phosphorylation and Arsenylation in Liver Mitochondria.

This paper discusses the control of mitochondrial respiration under conditions of oxidative phosphorylation and oxidative arsenylation. It includes the effect of Ca on these two processes.

The paper is at its best in the sections where the Kacser & Burns control analysis is used. Especially Tables III and IV contain rather impressive information. I therefore recommend this paper for publication in JBC. However, I propose the editor to request the following modifications of the paper:

- (i) clarify the discussion at the bottom of page 6 and at the top of page 7. Here it will be important to unequivocally describe in which experiments added phosphate is present. Also, I do not understand why 4 μM ADP stimulates respiration only from 129 to 146, 250 μM ADP stimulates from 116 till 180, whereas the K_m for ADP is reported as 3.1 μM . Moreover, the rationale behind the addition of hexokinase is not sufficiently clarified.
- (ii) what does 1 nM Ca mean in the presence of 2 mM Mg and 2 mM EGTA?
- (iii) the various 'founding fathers' of metabolic control theory have recently agreed to a common terminology. This terminology has recently been published in TIBS and in (1984) Biosc. Rep. 4, 1-22 (Westerhoff et al). I would hope that Dr Moreno-Sánchez is willing to consider adhering to that terminology (Flux-Control Coefficient for Control Strength and Elasticity Coefficient for Elasticity, symbols C and epsilon).
- (iv) the author should indicate more precisely how he went from Fig. 2 to Table III. Did he simulate the inhibition curves and take the slope from the simulations or did he just approximate the slopes with the difference after the addition of the least amount of inhibitor?
- (v) the discussion of control in the terms used by Stoner and as reproduced at pp. 12/13 is now outdated. It can be left out, as the correct discussion in terms of Elasticity Coefficients is given just below (please do use epsilons rather than e's!).
- (vi) the argument with respect to the control by the leak at the bottom of page 15, seems to contain a flaw. The proton leak exhibits a negative control on phosphorylation, but a positive control on respiration (more leak increases respiration). Therefore, the presence of appreciable control by the leak would further aggravate the problem that the sum of the Flux-Control Coefficients exceeds 1. Recently (a review in the last BBA reviews in bioenergetics) it was indicated that such a result might reflect that energy coupling proceeds via proton microcircuits rather than through a bulk proton gradient.
- (vii) I find the V_m/K_m argument much too intuitive, especially when compared with the more sophisticated control analysis in the rest of this paper. I would recommend to eliminate, or at least clarify this point.

Date: Please Return Original and Two Unsigned Carbon Copies

Reviewer Name & Address (type)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

550-52-15 ext. 4886

May 30, 1985

Mr. Quentin H. Gibson,
Associate Editor
Section of Biochemistry and Molecular Biology
Wing Hall - Cornell University
Ithaca, New York 14853

Dear Dr. Gibson:

This is in reference to your letter of May 1, 1985 concerning the manuscript M5-518 entitled "Contribution of the Translocator of Adenine Nucleotides and the ATP Synthase to the Control of Oxidative Phosphorylation and Arsenylation in Liver Mitochondria" which was submitted for publication in the Journal of Biological Chemistry. The manuscript was returned with the comments of one referee which considered that the work could be published if several modifications were made. I have tried to answer the different points that were requested and have also made the necessary corrections. These are as follows:

i. As pointed out by the reviewer on p. 7 the text was clarified with respect to the experimental conditions and results. His observation with respect to the K_m for ADP is commented on p. 7, lines 16-19. The value of K_m described in the original text was calculated considering total respiration (including that observed in the absence of added ADP). In the present version (in view of the reviewers comment) the K_m was recalculated by subtracting respiration observed in the absence of added ADP from that observed with various concentrations of added ADP.

ii. The "meaning" of 1 nM Ca^{2+} external Ca^{2+} is commented on p. 6 lines 11-15.

iii. I fully agree with the third point of the reviewer. The terminology originally used was corrected to the recently proposed terms.

...

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

iv. In the legend to Table III, it is clarified how the flux-control coefficients were calculated from the data of Figure 2. It was also acknowledged that for the data of Table IV and V a similar procedure was followed.

v. I have followed the indication of the reviewer with respect to discussion of Stoner's work. The original paragraph was corrected and shortened p. 13 lines 3-8

vi. I agree with the comments of the reviewer that the sign of the contribution to the control depends on whether respiration and phosphorylation are evaluated. I have attempted to evaluate phosphorylation and thus a negative contribution was considered. This has stated at the end of p.15 and p. 16

vii. In respect to the recommendation of the reviewer to withdraw comments on the V_m/K_m , the original text was drastically condensed on p. 9, first paragraph.

I would like to thank the referee for his excellent review of the work, I believe his comments point out the main problems studied in the manuscript. I hope that in its present form the manuscript is acceptable for publication.

Due to the corrections specified in this letter, I had to modify the order of the references. Except for this and the points stated above, the rest of the manuscript has not been altered.

Thank you very much for your interest.

Sincerely yours,

Dr. Rafael Moreno-Sánchez

'grz

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

DISCUSION Y CONCLUSIONES GENERALES

La observación principal en el primer trabajo es la de que el Ca^{2+} externo puede modular la velocidad de la fosforilación oxidativa mediante la modificación de los niveles intramitocondriales de Ca^{2+} . Cuando el Ca^{2+} interno disminuye a valores inferiores a 20nmol mg^{-1} se observa una disminución drástica de la velocidad de síntesis de ATP. Si se mantiene constante la cantidad de Ca^{2+} interno, la velocidad de síntesis de ATP solo disminuye ligeramente. Entonces una pregunta interesante sería si este efecto del Ca^{2+} sobre la fosforilación oxidativa es un mecanismo fisiológico de regulación. En este sentido sabemos que los niveles intramitocondriales de Ca^{2+} determinados in situ oscilan alrededor de los 5 nmol mg^{-1} o menos. Además, la estimulación de las hormonas alfa-adrenérgicas induce en hepatocitos y otros tipos de células un incremento en la concentración citosólica de Ca^{2+} ionizado; el proceso de contracción muscular también acarrea un aumento del Ca^{2+} citosólico. Como ambos eventos celulares requieren de ATP, entonces el incremento en el Ca^{2+} citosólico podría inducir una acumulación de Ca^{2+} en las mitocondrias lo cual conduciría a una estimulación de la síntesis de ATP.

Por supuesto que antes de proponer un modelo semejante, requerimos de saber el mecanismo molecular del efecto del Ca^{2+} en la fosforilación oxidativa. A este respecto, sabemos que el Ca^{2+} estimula ó preserva altas velocidades de síntesis en mitocondrias, oxidando diferentes sustratos, en presencia o ausencia de Mg^{2+} ó ATP externos y a cualquier concentración de P_i ($0.5\text{-}10\text{mM}$). La diferencia de potencial eléctrico transmembranal $\Delta\psi$ también es constante. Por lo tanto, podría sugerirse que el efecto es específico del Ca^{2+} y no es un efecto secundario. Esto querría decir que el Ca^{2+} estaría interactuando directamente con una o varias enzimas de la fosforilación oxidativa.

Inicialmente estudié un posible efecto del Ca^{2+} sobre cada una de las enzimas de la fosforilación, midiendo la actividad con técnicas específicas. Así, para la succinato deshidrogenasa se emplea la reducción de DCPIP en mitocondrias envenenadas con cianuro, para la citocromo oxidasa se mide el consumo de O_2 dependiente de ascorbato + TMPD en mitocondrias incubadas - con antimicina; para el acarreador de ATP/ADP, se mide la incorporación de nucleótidos radiactivos en mitocondrias enfriadas a 4°C . En estas condiciones no observe ningún efecto estimulador del Ca^{2+} sobre las enzimas. Todas estas técnicas utilizan exceso de sustrato y las condiciones de medición no son semejantes a aquellas usadas cuando se mide la fosforilación oxidativa. Se puede ver claramente que para evaluar el efecto del Ca^{2+} sobre la fosforilación, se requiere estudiarlo en las condiciones en las cuales opera la vía, sin alterar las concentraciones de los intermediarios. Entonces decidí analizar el efecto del Ca^{2+} a la luz de la nueva teoría de control descrita por Kacser y Burns y Heinrich y Rapoport y desarrollada por el grupo de Westerhoff y Tager para el caso de la fosforilación oxidativa. Una discusión mas amplia acerca de los criterios utilizados para estudiar la regulación de una vía metabólica se desarrolló en la primera sección de la tesis.

Los resultados de esta parte del trabajo se esbozaron en la primera publicación y se ampliaron en la segunda publicación.

En ese segundo trabajo se realizaron varias observaciones que son centrales en la conceptualización de la nueva teoría de control. Primero, se describió que la fosforilación oxidativa era controlada principalmente por el acarreador de ATP/ADP, la ATP sintetasa, la citocromo oxidasa y el complejo de citocromos b-c₁. El grupo de Tager y Westerhoff había reportado que la fosforilación era controlada por el acarreador de ATP/ADP, la citocromo oxidasa y el acarreador de dicarboxilatos. Como la ATP sintetasa no fue evaluada por dicho grupo de investigadores, aparentemente la discrepancia sería con el

acarreador de dicarboxilatos y el complejo b-c₁. Nosotros empleamos 4 diferentes inhibidores para determinar el coeficiente de control de flujo del acarreador de dicarboxilatos, entre ellos el utilizado por Tager y Cols., fenilsuccinato; con el complejo b-c₁ usamos HQNO y antimicina. Desafortunadamente, el grupo de Tager no mostró las curvas de titulación de las cuales obtuvieron sus cálculos. Esto es importante pues el rango de concentración de inhibidor pudo ser diferente. Obviamente que si se emplean relativamente bajas concentraciones de inhibidor, la pendiente inicial de la curva de inhibición siempre será muy cercana a cero y por ende el coeficiente de control; por otro lado, si se emplean concentraciones de inhibidor relativamente grandes, entonces la pendiente inicial de la curva de inhibición será elevada. Nosotros, arbitrariamente empleamos un valor aproximado del 10% de la inhibición máxima para la más baja concentración de inhibidor. Esta limitación de la teoría de control no solo es de tipo técnico sino formal, pues no indica a partir de que valor se debe empezar la titulación. Una primera aproximación podría ser para el caso de los inhibidores irreversibles iniciar la titulación del flujo metabólico con 0.05 a 0.10 del valor de [I]_{max} y para los inhibidores reversibles con 0.1 K_i.

Otra observación del segundo trabajo es la de que el Ca²⁺ solo afecta los coeficientes de control del acarreador de ATP/ADP o de la ATP sintetasa de manera recíproca. Cuando se incrementa el Ca²⁺ de 10⁻⁹M a 10⁻⁶M, la velocidad de fosforilación oxidativa aumenta 30-40% y los coeficientes de control del acarreador cambian de 0.30 a 0.50 y de la sintetasa de 0.20 a 0.05. El resto de las enzimas participantes conservan los mismos coeficientes de control. La variación recíproca del control ejercido por la sintetasa y el acarreador también se observó cuando se incrementó la velocidad de fosforilación con diferentes concentraciones de Pi. La teoría de control formaliza en la propiedad de la conectividad, este tipo de situaciones donde dos enzimas es-

tan conectadas a través de un intermediario común. Esta propiedad plantea que los coeficientes de control son una función de la sensibilidad de las enzimas a los cambios en los metabolitos, es decir de los coeficientes de elasticidad. Como el cociente C_t/C_s aumenta con la velocidad del proceso, entonces existen al menos dos posibles explicaciones: (1) que el Ca^{2+} y el Pi (ó As_i) activan a la ATP sintetasa, por lo cual esta enzima sería mas responsiva a los cambios en la relación intramitocondrial de ATP/ADP y menos limitante ó bien (2) que el Ca^{2+} y el Pi (ó As_i) modifican la relación ATP/ADP y la sintetasa no esta saturada (ϵ^s muy grande) mientras que el aca rreador esta cercano a la saturación (ϵ^t es muy bajo), con lo cual el cociente ϵ^s/ϵ^t aumentaría con el incremento en la velocidad de fosforilación. Aparte de requerirse estudios tendientes a dilucidar como el Ca^{2+} y el Pi (ó As_i) afectan la actividad de estas dos enzimas durante la operación de la fosforilación oxidativa, restaría también por investigar como estos agen tes podrían activar a la ATP sintetasa y/o modificar el valor de la relación intramitocondrial de ATP/ADP.

Una observación más es la de que la suma de los coeficientes de control del flujo es mayor a la unidad en la fosforilación oxidativa a concentraciones de Ca^{2+} y en la arsenilación. La teoría de control plantea mediante la propiedad de la sumación que una vía no se puede controlar más alla del 100%, a menos que existan contribuciones negativas de reacciones que drenan el flujo principal. En nuestro caso, una reacción lateral sería la permeabilidad pasiva de los H^+ pues ésta disminuiría el valor estacionario del Δp_{H^+} . El valor del coeficiente de control de esta reacción lateral al restarlo, correspondió con un valor muy cercano a la unidad para la suma total. Sin embargo, la forma como se midió la fosforilación y la arsenilación fue por consumo de oxígeno, y resulta que una mayor permeabilidad de la membrana a los H^+ produciría una mayor velocidad de respiración y no una dis-

minución del flujo metabólico, como se supone que actúa una reacción con un coeficiente de control negativo. Por tanto para comprobar que la permeabilidad pasiva ejerce un control negativo en la fosforilación oxidativa medida polarográficamente debe evaluarse cuidadosamente la ADP/O a diferentes grados de desacoplamiento, cercanos a los valores de la permeabilidad pasiva de H^+ . Otra forma sería medir directamente síntesis de ATP.

Otra explicación para el hecho de que la suma es más de la unidad es más bien trivial: los valores de los coeficientes de control están siendo sobreestimados. Sin embargo, los valores obtenidos repetidas veces con un mismo inhibidor o utilizando otros, son consistentes con una suma total mayor a la unidad.

Otra observación interesante es que la fosforilación oxidativa es controlada casi exclusivamente por la ATP sintetasa. Esto es fácil de entender pues esta vía no tiene una dependencia tan estrecha como la fosforilación de la actividad del acarreador de ATP/ADP. Entonces en la fosforilación tenemos un excelente modelo para estudiar la influencia en una vía de las transiciones de un estado activo a otro inactivo de una enzima como la ATP sintetasa. Una conclusión general del trabajo es que el acarreador de ATP/ADP y la ATP sintetasa determinan el nivel de estado estacionario de la fosforilación oxidativa. Por lo tanto, otro excelente modelo para estudiar la interacción entre estas dos enzimas y los factores que las gobiernan es la hidrólisis de ATP en mitocondrias intactas. Supongo que podemos concluir finalmente que el trabajo desarrollado abre enormes e interesantes perspectivas en el análisis de la regulación metabólica y en particular en la aplicación de la nueva teoría de control en la fosforilación oxidativa.