

171
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

*"CARACTERÍSTICAS DE LA HIDRÓLISIS DE ATP E
ITP EN LA ATP SINTASA DE CORAZÓN DE BOVINO,
CON Y SIN PROTEÍNA INHIBIDORA"*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A :

NATASHA CARIME VILLASEÑOR HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. MARIETTA TUENA DE GÓMEZ-PUYOU

México, D.F.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: "Características de la hidrólisis de ATP e ITP en la ATP-sintasa de partículas submitocondriales de corazón de bovino, con y sin proteína inhibidora"
realizado por Natasha Carime Villaseñor Hernández

con número de cuenta 8733792-7 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Marietta Tuena de Gómez Puyou

Propietario

M. en IBB. Jorge Alberto Pérez León

Propietario

Biol. Gerardo Rivas Lechuga

Suplente

Dr. Jesús Manuel León Cázares

Suplente

Biol. Marco Antonio González Jimenez

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

M. EN C. ALEJANDRO MARTINEZ MENDOZA

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA

Con todo mi AMOR

A mis Padres Rosario y Ruben

A mis hermanos Ruben y

Azucena

y

A mi sobrino Diego

***El presente trabajo se realizó en el laboratorio de la
Dra. Marietta Tuena de Gómez-Puyou, en el
Departamento de Genética Molecular del Instituto de
Fisiología Celular, UNAM.***

Quieres hacer felices a otros?...
Procura que sean mejores.

Retráense las sombras a ritmo más lento.

De cada átomo brota la canción.

En matices del arco iris disuélvase lo múltiple.

El estrechamiento de la dicha sorprendida circula por las venas de la Tierra.

Se encarna en sueño translunar a través de los huesos del cuerpo.

Una lágrima del ojo humano tráfese en luz estelar en las tinieblas de la noche,

y el rocío argénteo en la mejilla de la nueva alborada.

Y reaparece otra vez sobre el horizonte de la creatividad humana.

Como un momento inmortal de oscurecimiento.

A través de una serie de dolores de parto en el tiempo,

Amor es el nacer sin tiempo y la meta de la aspiración humana.

AGRADECIDO A ...

A la Dra. Marietta Tuena de Gómez-Puyou por la dirección de este trabajo y por brindarme incondicionalmente su apoyo, interés, comprensión y asesoría académica durante estos años de convivencia y trabajo.

Con todo mi respeto y admiración a la Dra. Marietta Tuena y al Dr. Armando Gómez-Puyou por permitirme conocer y disfrutar de este mundo apasionante de la investigación, siendo para mi un ejemplo a seguir.

A los miembros de jurado: a la Dra. Marietta Tuena de Gómez-Puyou, al Dr. Jesús Manuel León Cázares, al M. en IBB. Jorge Alberto Pérez León, al Biol. Gerardo Rivas Lechuga y al Biol. Marco Antonio González Jiménez, con todo mi agradecimiento por el tiempo e interés dedicado a la revisión de este trabajo, así como a sus valiosos comentarios.

A la Dra. Francisca Sandoval primero por su invaluable amistad, así como por su interés, apoyo, entusiasmo y compañerismo.

A mis queridos amigos con los que compartí mis experiencias y cariño por la Biología los cuales me hicieron tener una mayor apreciación del trabajo en equipo, mil gracias a Renata Zárate, a Miguel Herrera, a Lyssania Macías, a Georgina Lira, a Daniel Navarro, a Gerardo Rivas, a Carlos Gómez y a Ernesto Maldonado, por su bella, única e incondicional amistad y por todo el apoyo moral que he recibido de cada uno de Ustedes.

A mis amigos de Matemáticas, quienes me mostraron y compartieron el fascinante mundo de los números y la computación, las imágenes y el caos, por toda su paciencia, apoyo animoso, amistad, enseñanzas y compañerismo que me han brindado.

A mi familia por TODO el ánimo y amor que siempre me han brindado.

ÍNDICE

I RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
El proceso de respiración.....	2
El proceso de transducción de energía.....	3
La Mitocondria.....	5
El mecanismo quimiosmótico.....	7
Mecanismo de unión y recambio.....	7
Introducción a la familia de ATPasas.....	8
Función de la enzima ATPsintasa.....	8
Condiciones para la síntesis e hidrólisis de ATP.....	9
Estructura de la enzima ATPsintasa de corazón de bovino.....	10
Estructura y función de las subunidades de la ATPsintasa.....	11
Sitios de unión de nucleótidos.....	16
Efecto del pH en las enzimas.....	17
Efecto del pH sobre la catálisis.....	18
II ANTECEDENTES.....	19
III OBJETIVOS.....	20
Objetivo General.....	20
Objetivos particulares.....	20
IV MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
PREPARACION DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	20
Obtención de mitocondrias de corazón de bovino.....	20
Preparación de partículas submitocondriales Mg^{2+} ATP.....	21
Activación de partículas submitocondriales.....	22

TÉCNICAS	25
Determinación de proteína	25
Determinación por el Método de Biuret	25
Determinación por el Método de de Lowry	27
Determinación de la actividad hidrolítica de la enzima	27
Determinación espectrofotométrica de la actividad	27
Determinación colorimétrica de la actividad	28
Medida de la concentración de nucleótidos utilizados en las curvas cinéticas	28
Cálculos para determinar las constantes cinéticas	29
Cálculos para determinar la energía de activación	29
V RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
Parámetros Generales	30
Medición de la actividad hidrolítica específica	31
Curva de proteína	32
Curva de tiempo a diferentes temperaturas	33
Efecto de la temperatura en la velocidad de hidrólisis en un tiempo determinado	34
Efecto del pH en ambos tipos de partículas con ATP e ITP	36
Efecto del pH en los parámetros cinéticos de la hidrólisis	38
Efecto del pH en los parámetros cinéticos K_m, V_{max} Y V_{max}/K_m	41
VI CONCLUSIONES	49
VII PERSPECTIVAS	51
VIII REFERENCIAS	53

ABREVIATURAS

ADP	5'-adenosin difosfato
ATP	5'-adenosin trifosfato
BSA	albúmina sérica de bovino
DCCD	dicicloexil carbodiimida
DLH	enzima lactato deshidrogenasa
DOC-Na	desoxicolato de sodio
EDTA	ácido etilendiamino tetraacético
FCCP.	carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenil hidraxona
FSBA	5'-p-fluorosulfonil benzoil adenosina
FSBI	5'-p-fluorosulfonil benzoil inosina
F ₀ -F ₁	complejo ATPasa/ATP sintasa
IDP	5'-inosin difosfato
ITP	5'-inosin trifosfato
kDa	kilodaltones
MES	ácido (2-[N morfolino] etano sulfónico
µg	micrográmo
µl	microlitro
mg/ml	miligramos x mililitro ⁻¹
mM	milimolar
MOPS	ácido (3-[N morfolino] propano sulfónico
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido
Nbf	4-cloro-7-nitrobenzofurazan.
ONCP	proteína que confiere sensibilidad a la oligomicina.
PI	proteína inhibidora
PS3	cepa de bacteria termófila
SDS	dodecil sulfato de sodio
TCA	ácido tricloro acético
TNP-ATP o ADP	2',3'-O-(2,4,6-trinitrofenil) ATP ó ADP
Tris	tris-(hidroximetil) aminometano.

TABLA DE AMINOÁCIDOS

Alanina	Ala
Acido aspartico	Asp
Acido glutámico	Glu
Arginina	Arg
Asparagina	Asn
Cisteina	Cys
Fenilalanina	Phe
Glutamina	Gln
Histidina	His
Isoleucina	Ile
Lisina	Leu
Metionina	Met
Prolina	Pro
Serina	Ser
Tirosina	Tyr
Treonina	Thr
Triptofano	Trp
Valina	Val

I RESUMEN

El complejo enzimático F_0-F_1 de mitocondria, cloroplasto y membrana plasmática de procarionto, es capaz de catalizar reversiblemente la síntesis del ATP a partir de ADP y Pi en presencia del gradiente electroquímico y, en presencia de ATP y sin gradiente, se lleva a cabo la hidrólisis del nucleótido.

La hidrólisis del ATP está regulada por la proteína inhibidora (PI) y por la ocupación de ATP o ADP de los sitios reguladores. El papel principal de la proteína inhibidora es el de impedir la hidrólisis del ATP cuando no existe gradiente de protones. El ATP puede ocupar tanto sitios catalíticos como reguladores, cuando el sustrato hidrolizado es el ITP se ha visto que solo puede ocupar sitios catalíticos y no existe recambio en los sitios reguladores como en el caso del ATP.

El presente estudio pretende conocer el efecto de la ocupación de los sitios reguladores por ATP y de los catalíticos con el ITP y ATP, en presencia o ausencia de la PI en la hidrólisis, en partículas submitocondriales (smp) controladas (con PI) o activadas (sin PI), para lo cual se realizaron curvas de temperatura, efecto del pH, tanto en la velocidad de hidrólisis específica como en las constantes cinéticas K_m , V_{max} y V_{max}/K_m .

De dichos resultados encontramos que la diferencia en el valor de la energía de activación para el ATP con y sin la PI podría indicar la energía necesaria para mover la PI de su sitio inhibitorio.

El pH con las partículas submitocondriales controladas con ATP e ITP podría indicar la curva de disociación de la PI.

En las partículas submitocondriales activadas con ATP se observa un pH el cual sugiere pK, aunque también existe recambio, en los sitios reguladores. Con ITP el pH externo no altera la reacción de hidrólisis.

A pH 8.0 (óptimo) la $V_{m\acute{a}x}$ se modifica un orden de magnitud entre ambos tipos de partículas. La K_m no se modifica por lo que la PI no participa en la formación del complejo enzima-sustrato. En la relación $V_{m\acute{a}x}/K_m$ existe una mayor eficiencia de formación del complejo enzima-producto con ATP que con ITP.

A diferentes pH, la K_m con ATP no se modifica y con ITP la diferencia es muy baja, y la PI no modifica los pK de la $V_{m\acute{a}x}$. En la relación $V_{m\acute{a}x}/K_m$ con ATP existe un pK entre 6.9 y 7.0 que interviene en el paso de formación del complejo enzima-sustrato al complejo enzima producto. La PI no modifica la conducta cinética de la enzima.

INTRODUCCIÓN

EL PROCESO DE RESPIRACIÓN

A lo largo de la evolución biológica los seres vivos, para crecer y mantenerse con vida, han desarrollado vías de síntesis y degradación de compuestos que les permite generar y almacenar energía. La energía es conservada en el nucleótido de alta energía llamado adenosin trifosfato (ATP), durante la oxidación de los alimentos, a través del proceso de respiración para ser utilizado posteriormente en procesos como el transporte y la biosíntesis, que son esenciales para la vida. Los procesos biosintéticos dependen de un suministro adecuado de carbono y nitrógeno; y generalmente comienzan con compuestos sencillos, denominados intermediarios metabólicos centrales. Aunque existen variaciones, las rutas que participan en la producción de ATP son esencialmente similares en todos los organismos y están de acuerdo a las necesidades y entorno de cada uno de ellos.

La vía metabólica que utiliza la célula para obtener el ATP necesario depende del medio ambiente (aerobio o anaerobio) a donde pertenezca. Así, en los cloroplastos o cromatóforos de plantas, cianobacterias y otras bacterias fotosintéticas, el ATP se produce fundamentalmente, a través, del acoplamiento del mecanismo fotosintético de transporte de electrones llamado fotofosforilación, donde la fuente de electrones que genera el ATP es la luz, a los organismos que emplean este sistema se les conocen como *fotoótrofos*. En cambio, en los *quimioótrofos* el ATP se deriva de la oxidación de compuestos orgánicos, que en los microorganismos, se denominan sustratos del crecimiento. Las rutas oxidativas que se usan y los procesos de transporte de electrones asociados, son notablemente similares en todos los organismos. En los organismos aerobios estos procesos se denominan habitualmente como *respiración celular* y la energía se obtiene de la transferencia de electrones a partir de moléculas orgánicas, por ejemplo, por la completa oxidación de la molécula de glucosa hasta dióxido de carbono, agua y ATP; en este proceso se obtiene un rendimiento máximo en la síntesis del nucleótido. En los organismos anaerobios o en los aerobios facultativos que funcionan en condiciones anaeróbicas, recibe el nombre de *respiración anaerobia*, o bien, *fermentación* en donde la obtención del ATP es por *fosforilación* (la fosforilación del ADP a nivel de sustrato) en la cual, la energía obtenida a partir de una molécula de glucosa que se transforma en 2 moléculas de ácido láctico ó 2 moléculas de etanol más 2 moléculas de ATP más 2 moléculas de agua (Trevan, 1989).

Del acoplamiento entre la oxidación y la síntesis del ATP se obtiene un rendimiento máximo de 32 a 36 moléculas de ATP en el proceso de fosforilación oxidativa en las mitocondrias de células con

respiración aerobia, y en las células que presentan respiración anaerobia se producen como máximo 2 moléculas de ATP por molécula de glucosa.

En las células la energía es conservada durante el proceso de fosforilación oxidativa en la molécula del ATP, cuya estructura con trifosfatos unidos a la adenina y la ribosa le confieren un valor de energía libre de Gibbs (ΔG) de -7.2 Kcal/mol (Strayer, 1992).

EL PROCESO DE TRANSDUCCIÓN DE ENERGÍA

El proceso de transducción de energía se lleva a cabo en las siguientes membranas transductoras: membrana plasmática en bacterias, membrana tilacoidal de cloroplastos y membrana interna mitocondrial (Fig. 1). Es un proceso complejo debido a la intervención de varias enzimas multisubunitarias localizadas en dichas membranas transductoras y que son esenciales durante el proceso de la fosforilación oxidativa y que participan en el proceso de síntesis del ATP. Por ejemplo en las mitocondrias estas enzimas, al catalizar las reacciones oxidativas, generan un gradiente electroquímico de protones (H^+), a través de la membrana al encargarse de llevar los electrones hasta el O_2 que es el aceptor final, a través, de la cadena respiratoria. Este transporte de electrones es acompañado por la translocación vectorial de protones de un lado hacia el otro de la membrana transductora (Senior, 1988).

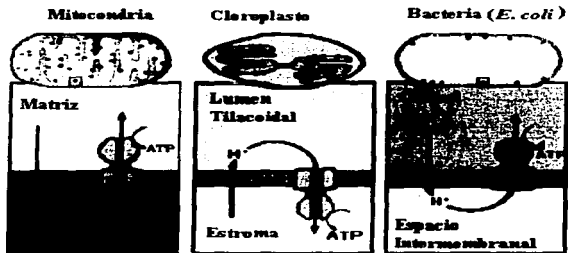


Figura 1 Esquema representativo de la localización de la enzima ATP sintasa en las membranas transductoras de energía (mitocondria, cloroplasto y membrana plasmática).

El proceso de transducción de energía lo podemos dividir en dos:

a) La transferencia de electrones a lo largo de la cadena respiratoria hasta un aceptor final, que da como resultado una separación de cargas (-) y de H^+ de un lado y otro de la membrana y genera un gradiente electroquímico de protones ($\Delta\mu H^+$).

El gradiente electroquímico se define como: $\Delta\mu H^+ = \Delta\psi + Z\Delta p H$.

donde: $\Delta\psi$ = diferencia de carga.

$Z\Delta p H$ = diferencia de la concentración de H^+ .

b) La formación del $\Delta\mu H^+$ en los procesos bionérgéticos es propiciado por la energía luminosa (fotones), o bien, obtenido de los sustratos respiratorios y utilizado por las enzimas de la cadena redox respiratoria o fotosintética en el caso de las halobacterias y la bacteriorrodopsina para formar el $\Delta\mu H^+$. Este gradiente electroquímico puede ser utilizado para el transporte de moléculas cargadas a través de la membrana plasmática, o bien, en la síntesis del ATP (Fig. 2), este último el proceso es más importante (Grant, 1987, Senior, 1988).

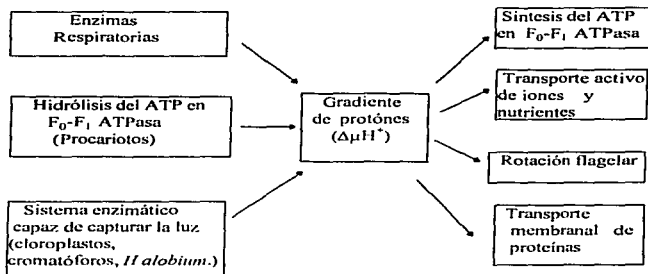


Figura 2. Rutas que favorecen la generación y como es utilizado el $\Delta\mu H^+$ en los seres vivos. (tomado de Senior, 1988).

Aunque todavía no están claros los procesos moleculares que ocurren en la conservación de la energía, cuando el fosfato inorgánico (Pi) se une al ADP para formar al ATP, sabemos que, para el proceso de acoplamiento energético es muy importante la localización de las enzimas participantes en las membranas

transductoras de energía, altamente impermeables a los protones, característica que les permite generar y mantener el potencial eléctrico y la diferencia osmótica de H^+ (Lehninger, 1970).

La cadena respiratoria mitocondrial está constituida por tres complejos catalíticos (Fig. 3) que contribuyen a la translocación transmembranal de protones de la matriz hacia el espacio intermembranal: primero la enzima NADH:ubiquinona (Q) oxidoreductasa (el complejo I), ubiquinol: ferrocitocromo b₁ oxidoreductasa (complejo III) y ferrocitocromo c: O₂ oxidoreductasa (complejo IV) o citocromo oxidasa, más dos acarreadores de bajo peso molecular, el citocromo c oxidasa y la ubiquinona-10 (Q). El complejo succinato:ubiquinona óxido reductasa (complejo II) no produce $\Delta\mu H^+$ por lo que se le considera sólo como un auxiliar en la conservación de la energía de la cadena respiratoria (Wikström y Saraste, 1984).

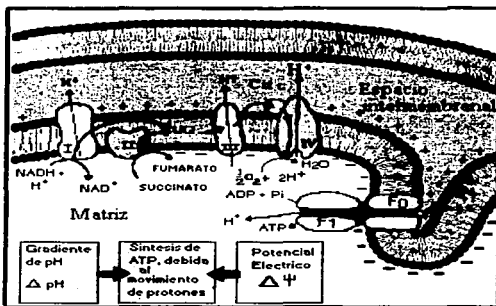


Figura 3. Esquematación de las enzimas participantes en el proceso de transporte de electrones y su orientación dentro de la membrana interna mitocondrial.

LA MITOCONDRIA

De acuerdo al tipo celular, las mitocondrias varían en tamaño, número, forma y localización intracelular. Se encuentran presentes en todos los eucariotes: protoctistas, hongos, animales y plantas. Están constituidas por una membrana externa, una membrana interna y dos compartimentos internos: el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial (Fig. 4). La matriz contiene una mezcla altamente concentrada de

proteínas, que incluyen las que se requieren para la oxidación del piruvato, ácidos grasos y en el ciclo del ácido cítrico. Del peso total de la mitocondria, del 70 al 75% corresponde a las proteínas y el resto lo aportan los fosfolípidos. Genéticamente presenta cierto grado de autonomía dentro de la célula, ya que contiene muchas copias idénticas del ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico mitocondrial, necesarias para llevar a cabo la síntesis de algunas de sus proteínas ya que sólo del 5 al 10 % de las proteínas totales de la mitocondria, son codificadas por el ADN genómico mitocondrial y especialmente ribosomas mitocondriales, ácido ribonucleico (ARN) de transferencia y varias enzimas que se requieren para la expresión de genes mitocondriales; el resto de las proteínas es sintetizado y codificado por el núcleo celular (Tager *et al.*, 1983).

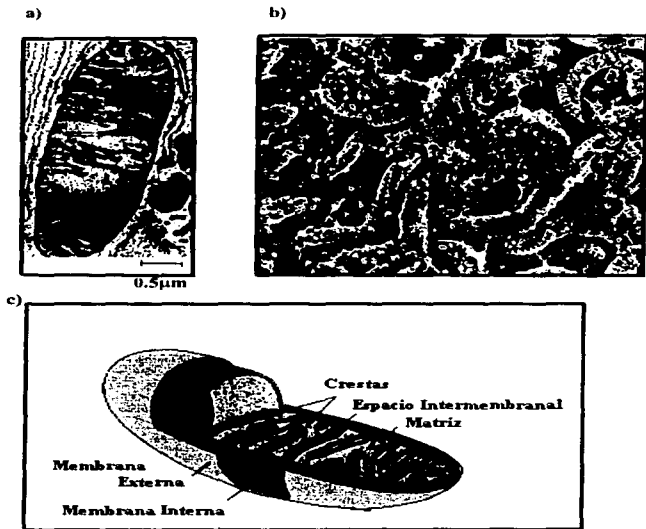


Figura 4 Micrografía electrónica de mitocondria (a); acercamiento de la estructura de la membrana interna mitocondrial, donde se observan a manera de protuberancias en la superficie, a la región del sector F_1 de la ATP sintasa (b). Esquema de la estructura mitocondrial en que se localiza la membrana externa, membrana interna, crestas, matriz, y espacio intermembranal.

EL MECANISMO QUIMIOSMÓTICO

El mecanismo quimiosmótico propuesto por Mitchell en 1965 incluye el acoplamiento entre la membrana interna mitocondrial,

que contiene a la cadena transportadora de electrones y a la enzima ATPsintasa. Este mecanismo propone que la energía derivada del transporte de electrones es utilizada para la translocación de protones, de la matriz mitocondrial a través de la membrana interna hacia el citosol, lo que origina una diferencia de potencial transmembranal ($\Delta\mu H^+$). Este potencial se encuentra constituido por dos componentes: una diferencia de pH (ΔpH) y una diferencia electroquímica de carga o ($\Delta\psi$), separados por una membrana impermeable a protones (H^+). Durante la formación del gradiente de protones, la energía almacenada se utiliza para la formación del ATP cuando éstos regresan hacia la matriz a través del canal de la ATPasa. Este proceso es reversible al existir una interconversión del potencial, así la síntesis del ATP utiliza el $\Delta\mu H^+$ y la hidrólisis lo genera (Fig. 3).

El gradiente también es utilizado para la translocación de otras moléculas a través de la membrana, así el ADP y el Pi son trasladados hacia la matriz mitocondrial para la síntesis del ATP.

La estequiometría de los iones fosfato incorporados al ATP por cada par de electrones que viaja a través de la cadena transportadora de electrones se le conoce como la relación P/2 e⁻, equivalente a la relación P// $\frac{1}{2}O_2$, debido a que por cada par de electrones se reduce un átomo de oxígeno. En las mitocondrias la relación P// $\frac{1}{2}O_2$ es de 3 para el sustrato nicotinamida adenina dinucleotido (NADH). La relación es de 2 para los sustratos que transfieren electrones a flavoproteínas del segundo sitio (Mitchel, 1965).

MECANISMO DE UNIÓN Y RECAMBIO

La síntesis del ATP por la ATP sintasa es un proceso que requiere de energía y para explicar esto, el grupo de Boyer en 1989 propone el mecanismo conformacional, el cual es conocido como el mecanismo de unión y recambio "binding change" y sus características principales son: 1) la síntesis de ATP ocurre espontáneamente en los sitios catalíticos, y el paso que requiere de energía es el cambio conformacional que sufre el sitio catalítico de alta afinidad debido al ATP, para transformarse en uno de baja afinidad, el cual permita la salida del ATP, 2) la unión del sustrato y la liberación del producto están asociados al proceso de

energización de la membrana y 3) la unión del sustrato y la liberación del producto ocurren simultáneamente en subunidades catalíticas separadas pero que funcionalmente se encuentran interconectadas en forma concertada.

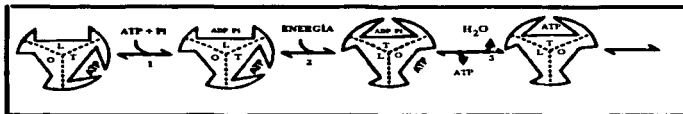


Figura 5. Diagrama del mecanismo de unión y recambio de los sustratos, para los sitios catalíticos.

INTRODUCCIÓN A LA FAMILIA DE ATPASAS

Las enzimas translocadoras de protón ATPsintasas o proton ATPasas, tipo F_0F_1 , se encuentran embebidas en las membranas de bacteria, cloroplastos y mitocondria, así como en otras endomembranas de células eucariotes. Las ATPsintasas se encuentran ampliamente distribuidas en eubacterias aeróbicas y fotosintéticas (BF_0F_1), arqueobacterias (AF_0F_1), mitocondria (MF_0F_1) y cloroplastos (CF_0F_1). Su función es la síntesis del ATP a partir de ADP y P_i , la que se encuentra acoplada al movimiento transmembranal de protones y requiere de la energía del gradiente de H^+ . La función de los complejos tipo (F_0F_1) es exclusivamente como ATPasa y se encuentran en vacuolas de células eucariotas y en anaerobios obligados. Estas ATPasas acoplan la hidrólisis del ATP a la generación del gradiente electroquímico, el cual maneja un sistema de transporte secundario (Penefski y Cross, 1991).

FUNCIÓN DE LA ENZIMA ATPSINTASA

Como se mencionó la combinación entre las proteínas del sistema de transporte de electrones con la generación del $\Delta\mu H^+$, favorece la síntesis del ATP. La enzima ATPsintasa cataliza reversiblemente la reacción de síntesis e hidrólisis ($ADP + P_i \rightleftharpoons ATP$) dicho proceso requiere de una gran cantidad de energía del gradiente de protones ($\Delta\mu H^+$) generado por las reacciones de oxidación en la fosforilación oxidativa (Mitchell, 1966). *In vivo* las enzimas también pueden hidrolizar al ATP y generar un gradiente de protones (Senior, 1988).

Las funciones de las ATPsintasa se resumen de la siguiente manera:

- 1- **La translocación de H^+** por la bicapa lipídica a través del complejo F_0 embebido en la membrana.
- 2- **El acoplamiento** que incluye el proceso por el cual los protones llegan hasta el complejo F_1 , y la energía almacenada en el $\Delta\mu H^+$ favorece la producción del ATP a partir del ADP y P_i .
- 3- **La catálisis**, para la formación del ATP en el sector F_1 a partir de los sustratos ADP y P_i , en ausencia del gradiente electroquímico de protones, la enzima ATPsintasa y en presencia de ATP se lleva a cabo la hidrólisis del nucleótido, que produce ADP y P_i , esta reacción es acompañada por la expulsión vectorial de H^+ , este proceso puede estar acoplado a la translocación vectorial transmembranal de los cationes como: K^+ , Na^+ y Ca^{2+} (Hatefi, 1985).

CONDICIONES PARA LA SÍNTESIS E HIDRÓLISIS DEL ATP

Para la síntesis de ATP es necesario considerar, además del gradiente electroquímico, las características catalíticas de la enzima como son: el requerimiento de energía de disociación del ATP en el sitio de alta afinidad en la F_1 , durante la síntesis en condiciones de fosforilación oxidativa. Este sitio catalítico de alta afinidad tiene una constante de afinidad (K_d o K_m) de 10^{-12} M y una cinética de cooperatividad entre los sitios catalíticos durante la hidrólisis del ATP, tanto en la forma de enzima soluble (Cross *et al.*, 1982), como en la unida a la membrana, y uno de los tres sitios que unen ATP con una alta afinidad es dependiente de la energía de disociación del ATP lo cual sugiere sitios catalíticos heterogéneos (Penefsky, 1985). Durante la síntesis es necesario la energización de la membrana para que ésta ocurra espontáneamente en los sitios catalíticos (Cross *et al.*, 1982).

Las características de disociación del ATP dependiente de la energía en el sitio catalítico de alta afinidad en la enzima unida a la membrana, muestran que el flujo de protones es el responsable de la disociación del nucleótido. Pero la velocidad de disociación es grande cuando ambos sustratos oxidables (P_i y ADP) están presentes, esto es, bajo condiciones de fosforilación oxidativa. Esto sugiere que los dos factores que contribuyen en la disociación y producción del ATP, en el sitio catalítico de alta afinidad, son: 1) la energía del flujo de protones a través de la membrana y 2) la facilidad para liberar el ATP unido al sitio catalítico de alta afinidad, al fijar ADP y P_i en la subunidad contigua (Penefsky y Cross, 1991).

Dentro del proceso quimiosmótico es necesario considerar la utilización de energía de unión de nucleótidos y el proceso de acoplamiento para la conducción vectorial de los protones en la síntesis de ATP. Así la energía de interacción de la unión de sustratos y productos es igual al cambio de energía libre de Gibbs, entre la catálisis en solución y en el sitio catalítico. La energía de fijación es utilizada en formar

el complejo enzima-sustrato (ES) con una energía de Gibbs suficientemente alta, la cual permite que el estado de transición sea fácilmente alcanzado y ocurra una aceleración en la velocidad de catálisis (Jencks, 1975).

En el mecanismo de acoplamiento se distinguen dos estados de la enzima: 1) la especificidad química de la enzima para la catálisis y 2) la especificidad vectorial para la unión y la disociación del ATP, ADP y Pi, que es diferente en cada estado.

En la catálisis, ya sea en la síntesis e hidrólisis de ATP por la ATPsintasa de mitocondrias o de cloroplastos, se presentan diferentes formas de unión y disociación. El complejo F_0-F_1 presenta una forma estructural cuando se encuentran unidos los sustratos ADP y Pi, la cual es capaz de interactuar con los protones del otro lado de la membrana y translocarlos. El punto principal es la exposición alterna del sitio de unión del protón y los dos diferentes sentidos de conducción de la membrana y la interconversión entre dos estados de la enzima que difieren en la especificidad de unión y disociación del ADP, Pi y ATP durante la catálisis (Penefsky y Cross, 1991)

ESTRUCTURA DE LA ENZIMA ATPSINTASA MITOCONDRIAL DE BOVINO

La enzima está compuesta por los complejos F_0-F_1 y los primeros datos aproximados de la estructura global del complejo F_0-F_1 fueron proporcionados por estudios de microscopía electrónica (Tiedge *et al.*, 1983) y difracción de rayos X (Bianchet *et al.*, 1991), a través de los cuales fue posible observar inicialmente la estructura cuaternaria, así como la asimetría y el arreglo estructural de las subunidades, a una resolución de 6.8 Å (Abrahams *et al.*, 1993) y posteriormente la forma ortorrómbica que presenta la proteína en su estructura cristalina a 2.9 Å (Lutter *et al.*, 1993). La enzima de bacteria, cloroplasto y mitocondria presenta dos regiones que pueden separarse, el complejo F_0 y el complejo F_1 , (Tabla I).

El complejo F_0 se caracteriza por ser la región polipeptídica hidrofóbica integral de membrana cuyo peso molecular es de 150.5 kDa constituido por varias subunidades y es el encargado de la translocación de protones, el cual se une a través de un cuello de aproximadamente 45 Å al complejo F_1 .

El complejo F_1 es la región periférica, globular, hidrofílica y soluble, cuyo diámetro se encuentra entre 90 a 100 Å, con un peso molecular del orden de 380 kDa. y está constituido por varias subunidades asimétricas (α , β , γ , δ y ϵ), en donde se lleva a cabo la reacción de síntesis e hidrólisis del ATP. La disposición de las 3 subunidades α y las 3 subunidades β es hexagonal, y se encuentran intercaladas; en la región central se localizan las subunidades γ , δ y ϵ (Walker *et al.*, 1991; Abrahams *et al.*, 1994).

Tipo	Bacteria	Cloroplasto	Mitocondria
F₁	α	α	α
	β	β	β
	γ	γ	γ
	δ	δ	OSCP
	ϵ	ϵ	δ
	-	-	ϵ
F₀	a	a	a
	b	b	b
	c	c	c
	-	-	F_6
supernumerarias	-	-	PI
	-	-	A6L
	-	-	d
	-	-	e
	-	-	e

Tabla I. Equivalencia de subunidades en ATPsintasas de bacteria, cloroplastos y mitocondria de bovino (Tomada de Walker *et al.*, 1991).

ESTRUCTURA Y FUNCION DE LAS SUBUNIDADES DE LA ATPSINTASA

COMPLEJO F_0

El sector translocador de protones (H^+ - F_0), de la F_0 - F_1 ATPsintasa mitocondrial está constituido por los siguientes componentes: una subunidad a , 2 subunidades b y de 6 a 12 subunidades c , además de una subunidad d , una subunidad A6L y 2 subunidades que forman parte del cuello, una subunidad F_6 y la subunidad OSCP.

Subunidad a

La subunidad a de *E. coli* tiene una masa molecular de 30.3 kDa y, cinco de los siete segmentos que la constituyen son posiblemente α hélices, que forman un poro en la membrana. Topológicamente estas hélices se encuentran embebidas en la membrana al estar conformadas de aminoácidos hidrofóbicos, por esta razón no han sido accesibles al ataque con enzimas proteolíticas. Los estudios con mutantes indican que la región entre el residuo 111 y el grupo carboxilo de la subunidad a es la que se une con el sector F_1 . De acuerdo a lo que indican estudios genéticos y de reconstitución la enzima a es requerida junto con las subunidades b y c para formar el segmento F_0 funcional (Futai *et al.*, 1989).

Subunidad b

La subunidad *b*, de acuerdo a los estudios en *E coli*, presenta una masa molecular de 17.2 kDa. La región amino terminal de la enzima es hidrofóbica y se encuentra embebida en la membrana, además, presenta dos dominios helicoidales hidrofílicos que se localizan en el citoplasma. Al emplearse proteasas contra esta subunidad no se modificó la permeabilidad a H^+ en el sector F_0 , pero si se afectó la unión con la F_1 . Se ha demostrado que la región carboxilo-terminal de esta subunidad es necesaria para la función y formación del canal F_0 (Futai *et al.*, 1989).

Subunidad c

La subunidad *c* es una proteína membranar con una masa molecular de 8 kDa según datos obtenidos de estudios en *E coli*, su conformación se ve altamente influenciada por los fosfolípidos. Presenta una estructura oligomérica compuesta de 6 a 12 copias. Al combinar estudios de genética y modificaciones químicas se ha propuesto un modelo de horquilla donde de manera antiparalela las dos α helices se acomodan perpendicularmente al plano de la membrana y presentan un asa hidrofílica que comprende a los residuos 41 al 50, a los que probablemente corresponda la región de unión con la F_1 . En la región carboxilo terminal se localiza un aminoácido esencial para la conducción del protón (el Asp-61, o bien, el Glu-61 en otros organismos) debido a que al interactuar el N,N-dicicloexil carbodiimida (DCCD) con este aminoácido de una de las subunidades *c*, es suficiente para inhibir la conducción de protones (Fillingame, 1992). Esta subunidad mantiene homología con la subunidad *c* de bacteria, que es esencial para la conducción del protón (Fillingame, 1980; Futai *et al.*, 1989).

Región OSCP

La región OSCP nombrada así por ser la proteína que presenta sensibilidad al compuesto oligomicina y que al igual que la subunidad F_6 , juega un papel funcional en el acoplamiento del complejo F_0 - F_1 ATP sintasa. La subunidad OSCP presenta homología con la subunidad δ de bacteria cuya función es unir F_0 a F_1 (Guerrieri *et al.*, 1991; Walker *et al.*, 1991).

Proteína A6L

La proteína A6L es producida por el genoma mitocondrial y es requerida durante el ensamblaje del complejo F_0 - F_1 . Se ha propuesto que esta subunidad tiene homología con una pequeña proteína hidrofóbica llamada aap1, que presenta la función de ensamblaje en la ATPasa mitocondrial de levadura (Walker *et al.*, 1991).

COMPLEJO F_1

El sector MF_1 tiene una masa molecular de 371,000 y consiste de cinco diferentes tipos de subunidades y su estequiometría es: α_3 , β_3 , γ , δ , y ϵ , cuyos pesos moleculares son de 54, 50, 33, 17.5, y 5.7 kDa respectivamente. En este complejo se localizan los sitios de unión de los sustratos ATP, ADP y Pi inorgánico. Además de las cinco subunidades estructurales de la F_1 , se le relaciona por interactuar con la subunidad β , al polipéptido que corresponde a la proteína inhibidora cuyo peso molecular es de 9.58 kDa (Penefsky, 1979; Cross *et al.*, 1982 y Schwerzmann y Pedersen, 1986).

Subunidades α

Las tres subunidades α presentan una homología del 20% con la secuencia de aminoácidos de las subunidades β , incluso el asa P de unión con el nucleótido. (Abrahams *et al.*, 1994). Por medio de modificaciones químicas se determinó su importancia funcional (Nalin *et al.*, 1985) y su asimetría estructural (Falson *et al.*, 1986). El papel regulador de la subunidad α se determinó con la utilización del anticuerpo monoclonal 7B3 anti-subunidad α , con el que se observó una disminución del 75% en la actividad hidrolítica de ATP, debido a la modificación del sitio de interacción con el sustrato en el sitio catalítico en la subunidad β , no sucedió así durante la hidrólisis del ITP, lo que sugirió el papel regulador de la subunidad α (Moradi-Ameli *et al.*, 1989). Con la utilización de sustratos análogos se localizó en esta subunidad, un sitio de alta afinidad para unir al nucleótido ATP o ADP (Dunn y Futai, 1980), esta interacción de la subunidad α con el sustrato provoca un cambio conformacional en la enzima (Dunn, 1980). En esta subunidad se localizan dos sitios que no intercambian al metal (Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{3+}) independientemente del nucleótido (Smith *et al.*, 1985).

Subunidades β

Las tres subunidades β se disponen alternadamente con las tres subunidades α . Estas subunidades β son esenciales cinéticamente por contener a los sitios catalíticos (Khananashvili y Gromet-Elhanan, 1985), además de ser las más conservadas y factibles para la realización de híbridos entre diferentes especies (Walker *et al.*, 1984). En estas subunidades se localiza el sitio de unión de la proteína inhibidora (Klein *et al.*, 1980; Beltrán *et al.*, 1984) en la región que comprende a los aminoácidos Asp-Glu-Leu-Ser-Glu-Glu-Asp (ver código de aminoácidos) del 394 al 400 (Abrahams *et al.*, 1994).

En el asa P de esta subunidad se encuentra la secuencia Gly-X-X-X-Gly-Lys-Thr/Ser (ver código de aminoácidos). que es muy importante para la unión de los fosfatos del ATP. Esta misma secuencia se

encuentra muy conservada en otras proteínas que unen nucleótidos como son la adenilato cinasa, Rec A, el factor de alargamiento Tu y el factor de transducción α (Abrahams *et al.*, 1994).

Subunidad γ

La subunidad γ es indispensable para el ensamblaje de las demás subunidades, pues se ha observado, que en ausencia de ésta no se da el arreglo correcto entre las subunidades α y β (Kanazawa *et al.*, 1983), debido a que se localiza en la cavidad central interna formada entre las subunidades α y β (Abrahams *et al.*, 1994). Por medio de los estudios de entrecruzamiento se ha demostrado que la subunidad γ interacciona muy estrechamente con las subunidades β , δ y ϵ . En experimentos realizados en *E. coli* se demostró que la combinación mínima de subunidades para obtener actividad hidrolítica máxima es: $\alpha_3 \beta_3 \gamma$ (Futa *et al.*, 1977; Yoshida *et al.*, 1977; Kagawa y Nukiwa, 1981). La interacción amino/carboxilo de la subunidad γ con la subunidad β respectivamente, es esencial para el acoplamiento de la energía entre la catálisis y el transporte de H^+ , de acuerdo con los estudios realizados con una mutación puntual en la γ Met-23 por una Lys o Arg que produce la total inhibición de la enzima (Futai *et al.*, 1994).

Subunidades δ y ϵ

De las subunidades δ y ϵ su función se han propuesto como estructurales debido a la equivalencia de la subunidad δ mitocondrial con la subunidad ϵ de *E. coli* y de cloroplasto (Kimura *et al.*, 1989) y que se sabe desempeña el papel de anclaje de las subunidades α_3 , β_3 y γ al sector F_0 (Futai *et al.*, 1974, Kagawa *et al.*, 1976). Aunque la subunidad ϵ mitocondrial no presenta ninguna similitud en cloroplastos ni en bacterias, sí produce inhibición de la hidrólisis (Walker *et al.*, 1991).

Proteína inhibidora

La proteína inhibidora (PI) es un polipéptido de 9.57 kDa y fue purificado de mitocondrias de bovino por Pullman y Monroy en 1963. Consta de 84 aminoácidos y presenta un carácter hidrofóbico, debido a su alta composición de aminoácidos con residuos neutros e hidrofóbicos (Frangione *et al.*, 1981). Su función es la de regular la direccionalidad catalítica de la enzima al inhibir la hidrólisis, así como la de favorecer la síntesis del ATP y las reacciones parciales en los sitios catalíticos (Gómez-Puyou *et al.*, 1979; Tuena *et al.*, 1983). La estequiometría PI/ F_1 es de uno (Wong *et al.*, 1982). Por medio del entrecruzamiento se ha visto que la proteína interacciona con la secuencia de aminoácidos Asp-Glu-Leu-Ser-Glu-Glu-Asp (ver código de aminoácidos) del 394 al 459 del extremo carboxilo terminal de una de las tres subunidades β (Jackson y Harris, 1988; Abrahams *et al.*, 1994). Dentro de esta región de la subunidad β se localiza la

secuencia de aminoácidos (394 a 400) localizada por la fijación de la mostaza de quinacrina (Kasho *et al.*, 1993) y por otro lado, esta secuencia también interacciona con inhibidores anfipáticos igual que la PI, por lo que es muy posible que sea el sitio de unión de la PI en la enzima.

Se ha visto que el emplear los sustratos ATP e ITP en la hidrólisis se presenta una inhibición no competitiva con la mostaza de quinacrina en la enzima F_1 soluble (Penefsky y Cross, 1991). Esta inhibición se presenta también en *E coli* en donde éste papel inhibitorio lo desempeña la subunidad ϵ (Dreyfus y Satre, 1984).

La inhibición de la actividad hidrolítica de la F_1 -ATPasa de mitocondria por la PI requiere de un pH aproximado a 6.7. Probablemente durante el ciclo catalítico, la PI interacciona con el intermediario ATPasa-ADP (Gómez-Puyou *et al.*, 1979). El sitio de unión de la PI a la enzima membranal se encuentra preservado en la F_1 soluble (Klein *et al.*, 1980). Existen estudios donde se demuestra que la PI no se une al sitio catalítico de la enzima (Slater *et al.*, 1979; Amzel y Pedersen, 1983) aunque sí presenta un comportamiento no competitivo con respecto al sustrato catalítico Mg-ATP (Schwerzmann, 1986). Por medio de estudios de la inhibición de la enzima por la PI, a lo largo del perfil de pH, se observó el máximo de inhibición a pH 6.0 con un efecto muy bajo en la inhibición cuando la enzima se encuentra a pH 8.0 (Pullman y Monroy, 1963). Mediante estudios de dicroísmo circular se vio que la enzima a pH 6.5 no se encuentra en una estructura α -hélice, sino en un 63% de hojas " β ", mientras que a pH 8.0 la estructura predominante es la α -hélice con un 56% y un 3% de hojas " β ", y algunas " β " plegadas junto con estructuras "enroscadas" no determinadas (Sah *et al.*, 1993).

En contraste Pedersen en 1996, determinó que la región inhibitoria de la PI consta de 24 aminoácidos importantes comprendida desde la Phe-22 a la Leu-45, y analizó la relación entre la estructura y su función, así como la importancia del pH sobre algunas de las histidinas en la regulación de la enzima soluble y propuso el siguiente modelo: 1) la estructura de la región inhibitoria de la PI no es importante para su función inhibitoria, 2) el pH básico enmascara la región donde interactúa la PI en la F_1 y 3) la reducción del pH disminuye la interacción entre las α hélices inhibitorias y las reguladoras de la PI a la enzima, y presenta un desdoblamiento en esta región. Al esclarecer la región inhibitoria, se observa a pH bajo la unión de la PI a la enzima (Lebowitz y Pedersen, 1996). En este mismo año se detectó la dependencia de la histidina 49 al pH y se explica, como la modificación de la carga que presenta este aminoácido a lo largo del pH, la cual propicia la transición entre una conformación activa y otra inactiva, por lo que se le ha considerado como estabilizador entre ambas conformaciones (Schnizer *et al.*, 1996).

SITIOS DE UNIÓN DE NUCLEÓTIDOS

La utilización de nucleótidos y análogos radiactivos permitió el conocimiento de propiedades de la enzima, como la cooperatividad de los sitios catalíticos (Grubmeyer y Penefsky, 1981; Cross y Nalin, 1982), la localización de algunos aminoácidos involucrados en la catálisis (Bullough *et al.*, 1986 a y b), la asimetría de los seis sitios de unión para el sustrato (Kironde y Cross, 1987) y la heterogeneidad funcional de los sitios catalíticos en la MF₁ (Bullough *et al.*, 1987).

Gracias a estos análogos y a otros inhibidores como el DCCD (Pougeois *et al.*, 1979) y el Nbf-Cl (Di Pietro *et al.*, 1980) los residuos esenciales para la catálisis han sido marcados e identificados en la secuencia primaria en varios tipos de F₁-ATPasa y los datos indican que se localizan en la subunidad β. De acuerdo a la secuencia de aminoácidos de la subunidad β de la MF₁ se observó lo siguiente: la Tyr-311 se marcó durante la inactivación de la MF₁ ATPasa con [¹⁴C] Nbf-Cl (Ferguson *et al.*, 1975). La Lys-162 se marcó con el grupo [¹⁴C] Nbf-Cl por la migración del residuo [¹⁴C] Nbf-O-Tyr en la MF₁ y en la TF₁ ATPasa bajo condiciones alcalinas (Sutton y Ferguson, 1985). El Glu-188 se marcó durante la inactivación de la TF₁ ATPasa con [¹⁴C]DCCD, el Glu-199 también fue marcado durante la inactivación de la MF₁ y EF₁ ATPasa con [¹⁴C]DCCD y la Arg-295, marcada durante su inactivación de la CF₁ ATPasa por el [¹⁴C] fenilgloxal (Allison *et al.*, 1986). La Tyr-368 y la His-427 se marcaron durante la inactivación de la MF₁ con FSBA y la Tyr-345 fue marcada con FSBi (Bullough *et al.*, 1988)

La MF₁ de bovino y la BF₁ de *E. coli* tienen seis sitios de unión para el nucleótido Mg²⁺-ATP. Cuando la MF₁ se coloca en un amortiguador que contiene Mg²⁺ a un pH entre 7.5 y 8, sólo tres de los seis sitios cambian rápidamente el nucleótido unido a la enzima por uno del medio. Las evidencias indican que en la enzima existen dos tipos de sitios de unión de nucleótidos. De los cuales mínimo dos y quizás tres llevan a cabo la reacción de catálisis del nucleótido a los que se les conocen como sitios catalíticos de la enzima y se les localiza uno en cada una de las subunidades β. Los tres sitios que no hidrolizan al nucleótido unido y no lo liberan fácilmente durante la hidrólisis o la síntesis, se les conocen como sitios reguladores localizados en la interfase de las subunidades αβ (Bullough *et al.*, 1988). Además existe asimetría en los sitios catalíticos (Cross 1981, Cross y Nalin, 1982, Cross *et al.*, 1987; Schuster *et al.*, 1975; Wise *et al.*, 1983, Wise y Senior, 1985) y una cooperatividad negativa de fijación observada durante la hidrólisis del ATP (Edel *et al.*, 1993).

Los sitios catalíticos son capaces de hidrolizar GTP (Baubichon *et al.*, 1981) o ITP (Schuster *et al.*, 1975) presentan una inhibición no competitiva (Ebel y Lardy, 1975). En los sitios catalíticos existe una cooperatividad positiva de hidrólisis entre las subunidades catalíticas de la enzima (Grubmeyer y Penefsky,

1981, Gresser *et al.*, 1982)). En los sitios reguladores se puede manifestar como una inhibición "histerética" (tiempo *lag* que muestra la enzima durante la reacción para iniciar la catálisis) a la entrada del ADP en dichos sitios (Baubichon *et al.*, 1981, Di Pietro *et al.*, 1981, Fellous *et al.*, 1984) ya que presenta una alta especificidad por los nucleótidos de adenina (Schuste *et al.*, 1975, Esch y Allison, 1978), no es así para otros nucleótidos difosfato o trifosfato, se ha observado que el IDP no afecta la actividad hidrolítica de la enzima (Vasilyeva, *et al.*, 1982). Con la utilización de análogos y sustratos radiactivos ha sido posible determinar en la enzima la unión del ATP con la subunidad α , lo que no sucede cuando se emplean análogos como el GTP o ITP que sólo interaccionan con los sitios catalíticos en la subunidad β por lo que se les conoce como no catalíticos (Perlin *et al.*, 1984). Al utilizar análogos fluorescentes y de unión covalente como el FSBA y el FSBI fue posible marcar los sitios de interacción de la adenina en la β -Tyr-368 del sitio regulador y la β -His-427 del sitio catalítico con FSBA y al emplear el FSBI se marcó la β -Tyr-345 el residuo al que se une la inosina en el sitio catalítico (Bullough y Allison, 1986 a y b). Estas determinaciones se realizaron a diferentes valores de pH en la enzima purificada (Bullough *et al.*, 1987 y 1988; Cross *et al.*, 1987) con la ocupación de los sitios catalíticos por ATP o ITP y los sitios reguladores solo fueron ocupados por ATP.

Con estos análogos se encontraron diferencias en los resultados. Al utilizar FSBA se requieren de 3 moles por enzima para inhibirla completamente (Bullough y Allison, 1986 a), o bien, al ocupar uno de los tres sitios catalíticos, o dos reguladores (Cross *et al.*, 1987) y, con FSBI se requirió de 0.8 moles por enzima para inhibirla completamente (Bullough y Allison, 1986 b). Cuando se utilizó el 2-azido-ADP como análogo del ADP, se requirió de la modificación de dos sitios por MF_1 para conseguir una inactivación completa de la enzima (Cross *et al.*, 1987).

EFEECTO DEL pH EN LAS ENZIMAS

Los efectos cinéticos observados por la variación en la concentración de iones hidrógeno, son similares a los efectos presentados por los activadores e inhibidores, y los métodos cinéticos como teóricos pueden ser aplicados en ambos sistemas. La escala logarítmica de la concentración de H^+ (pH) es utilizada para la medición de la concentración de iones hidrógeno. Los efectos del tratamiento a diferentes concentraciones del ion hidrógeno aportan información valiosa acerca de los mecanismos cinéticos a que obedecen las enzimas: al tomar en cuenta las constantes de ionización de los aminoácidos que participan se puede intentar localizar los grupos específicos que intervienen en la reacción catalítica.

Aunque las enzimas contienen muchos grupos que son ionizables, la variación en la velocidad inicial, a lo largo de un perfil de pH, puede sugerir los grupos que son esenciales para la catálisis, por ejemplo, si encontramos un comportamiento en campana (Fig. 6) esto se interpreta como la presencia de dos grupos ionizables en la enzima. Aunque esta interpretación es muy simple, permite localizar los grupos ionizables y preferencialmente la forma iónica activa, se presenta primero una protonación y después del pH óptimo una desprotonación de la especie que participa, esto se ha detectado al medir la actividad catalítica. La ionización de otros grupos con valores de pH muy lejos del óptimo, no pueden ser detectados debido a que sólo se observa el efecto en el equilibrio, y las formas activas de la enzima. En este modelo la enzima puede ser considerada como un ácido dibásico.

Es importante mencionar que cada punto de inflexión que presente la curva se considera como el valor del pH al cual el aminoácido de que se trate se encuentra ionizado, ya sea protonado o desprotonado, de acuerdo al intervalo de pH en el que sea observado, y al que se le conoce como pK_a , al valor máximo alcanzado se le conoce como pH óptimo (Fersht, 1985).

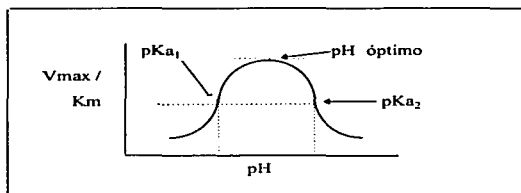


Figura 6. Representación esquemática del modelo de campana para una enzima con comportamiento dibásico (Segel, 1975).

EFFECTO DEL pH SOBRE LA CATÁLISIS

Para el caso de la F_1 , el efecto inhibitorio sobre la hidrólisis de los análogos como el FSBA y el FBSI permitió la identificación de los aminoácidos que participan en la catálisis, al observar la presencia de tres valores de pK 5.8, 7.6 y 8.2. Con la unión covalente de los análogos se logró la localización de los aminoácidos de las subunidades, de lo que se concluyó que, la subunidad β contiene dos sitios de unión para la adenina, uno se encuentra sólo en la subunidad β y el otro se encuentra en la interfase de las

subunidades α/β . Allison *et al.*, en 1986 proponen la posibilidad de que la subunidad β contenga un dominio para el sitio catalítico y otro para el sitio regulador dado que el análogo de inosina (FSBI) no presenta interacción con los sitios reguladores a ningún valor de pH al compararlo con el análogo de adenina (FSBA) en la enzima soluble que sí se une en la subunidad β y en la interfase de las subunidades α/β . Posteriormente los resultados obtenidos por cristalografía probaron estas observaciones (Abrahams *et al.*, 1994).

II ANTECEDENTES

De acuerdo a lo mencionado sabemos que durante el proceso de hidrólisis del ATP por la ATPsintasa intervienen dos reguladores importantes que son: 1) la presencia de nucleótidos en los sitios reguladores y catalíticos, ya sea ATP o ADP y 2) la regulación por la presencia de la proteína inhibidora (Gómez-Puyou *et al.*, 1979 y Tuena *et al.*, 1983).

Con respecto a los nucleótidos sabemos que durante la hidrólisis del ATP se pueden ocupar tanto sitios catalíticos como reguladores, ya sea ocupando los 3 sitios catalíticos y/o darse el recambio en los sitios reguladores. En cambio en la hidrólisis de ITP, este nucleótido sólo puede ocupar sitios catalíticos y no existe el recambio como con el ATP o ADP existente en los sitios reguladores (Schuster *et al.*, 1976). Esto último se comprobó al emplear el FSBI como análogo del ITP y observar que sólo se unía a los sitios catalíticos (Bullough y Allison, 1986 b).

La presencia de la proteína inhibidora cambia la afinidad por el sustrato en uno de los tres sitios reguladores de unión fuerte a laxa, mientras que en otro el nucleótido queda fijo y se inhibe el recambio de nucleótidos en los sitios catalíticos (Dreyfus *et al.*, 1981; Beltrán *et al.*, 1984). Así se entiende como el recambio a la entrada y salida del nucleótido sin que se lleve a cabo la catálisis. La PI inhibe la hidrólisis al impedir la salida del ADP del sitio catalítico (Tuena *et al.*, 1980).

Como ambos reguladores están estrictamente relacionados, un sistema que permita diseccionar el papel de cada uno por separado, sería de utilidad para poder entender mejor el mecanismo de la regulación.

III OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Comparar la hidrólisis de los sustratos ATP e ITP en partículas submitocondriales de corazón de bovino, en presencia y ausencia del inhibidor natural de la enzima (PI), para poder estudiar las dos fuentes reguladoras de la cinética enzimática de la ATPsintasa: la proteína inhibidora y la ocupación de nucleótidos en los sitios reguladores.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Conocer la conducta cinética de la enzima membranal al hidrolizar ATP, en la que hay recambio de nucleótidos en los sitios reguladores, con la hidrólisis del ITP que no provoca recambio.
2. Comparar esta conducta cinética en partículas submitocondriales con o sin la presencia de la proteína inhibidora.
3. Comparar el comportamiento de las partículas submitocondriales de corazón de bovino en presencia o ausencia de la proteína inhibidora con ambos sustratos ATP e ITP con respecto a lo observado por Bullough *et al.* en 1988, para la MF₁ soluble a lo largo del perfil de pH.

IV MATERIALES Y MÉTODOS

PREPARACIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO

OBTENCIÓN DE MITOCONDRIAS DE CORAZÓN DE RES

La técnica para la obtención de mitocondrias de corazón de res es la descrita por Low y Valin en 1963, la cual consiste en romper el tejido por medios mecánicos y separar las mitocondrias por centrifugación diferencial a una temperatura constante de 4°C durante todo el proceso.

Se partió de seis corazones de res frescos mantenidos en hielo y disecados en un cuarto frío en pedazos pequeños (2 a 4 cm de ancho), limpios de tejido conectivo, coágulos y grasa, y fueron molidos en

un molino para carne. Cada 750 gramos de carne molida se resuspendieron en un volumen final de 3 lt de solución amortiguadora que contenía sacarosa 250 mM, 15 mM de EDTA, 5 mM tris-NaOH a pH 7.4, y se reajustó el pH del molido a 7.4 con tris saturado. La solución se homogenizó durante minuto y medio por cada 3 litros a una velocidad media en una licuadora "Waring Blendor" comercial. Al homogenizado se le reajustó el pH a 7.4 con tris saturado y se colocó en botellas de 500 ml de capacidad y se centrifugó en el rotor JA-10 a 2,500 rpm durante 10 minutos a 4°C, para separar células enteras y núcleos. El sobrenadante se decantó y filtró a través de 3 capas de gasa en un matraz Erlenmeyer de 5 lt, en baño de hielo, desechando el precipitado. El filtrado se colocó en botellas de 250 ml y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos en el rotor JA-14. Del centrifugado se desechó el sobrenadante y en el precipitado obtenido se encuentran las mitocondrias. Éstas se resuspendieron en un volumen de 500 ml por Kg de carne molida en una solución amortiguadora que contenía sacarosa 250 mM, 5 mM tris-NaOH a pH 7.4. La suspensión se centrifugó a 2,000 rpm durante 10 minutos en el rotor JA-14. Se decantó el sobrenadante, y se descartó el precipitado blanco rojizo que contiene miosina. Utilizando vasos limpios se centrifugó el sobrenadante a 10,000 rpm durante 15 minutos. Se decantó cuidadosamente el sobrenadante para no eliminar el precipitado. De este precipitado la capa superior poco compacta son las mitocondrias llamadas "ligeras" por tener perforaciones en sus membranas y, la pastilla compacta y fuertemente adherida al fondo de la botella, de color más oscuro, son las mitocondrias conocidas como "pesadas", las cuales tienen sus membranas intactas. Para obtener las mitocondrias ligeras se agitó el contenido de la botella, se decantó y se lavó el precipitado restante con un poco de sacarosa 250 mM, se homogenizaron y almacenaron en alícuotas de 20 ml a -70 °C. Las mitocondrias pesadas se resuspendieron en un mínimo de sacarosa 250 mM pH 7.4, con ayuda de un pincel, sin formar burbujas, y se homogenizaron en un potter. El homogenizado se almacenó en alícuotas de 5 a 10 ml a -70 °C. Estas mitocondrias pueden ser usadas inmediatamente pero, si van a ser almacenadas conviene que se encuentren muy concentradas (60 a 80 mg/ml). A cada tipo de mitocondrias se le midió la concentración de proteína con el método de Biuret (Fig. 7).

PREPARACIÓN DE PARTÍCULAS SUBMITOCONDRIALES Mg^{2+} -ATP

El método que se utilizó fue el descrito por Lee y Emester en 1967, el cual consiste en el rompimiento por sonicación de las mitocondrias diluidas en un medio neutro que contiene Mg^{2+} -ATP. Se obtienen unas partículas submitocondriales con un alto grado de acoplamiento y una actividad hidrolítica para el ATP muy baja de 0.2 a 0.5 $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ debido a su alto contenido de proteína inhibidora.

Las mitocondrias fueron descongeladas lentamente. Todos los pasos se realizaron a 4°C. Las mitocondrias se diluyeron a 20 mg/ml con sacarosa 250 mM, 6 mM de ATP y 6 mM de Mg²⁺. Se ajustó el pH entre 6.9 y 7.1 con NaOH 10 N. Este paso debe ser lo más rápido posible. Se sonicaron 15 ml de la suspensión de mitocondrias en intervalos de 10 segundos, para evitar la elevación de la temperatura, hasta completar un minuto, siempre se mantuvo el vaso del sonicador en baño de hielo. Se centrifugó el sonicado a 12,000 rpm durante 15 minutos en el rotor JA-20. Del sonicado se removió el sobrenadante y se centrifugó a 45 krpm durante 35 minutos en el rotor 60 Ti. En el precipitado se encuentran las partículas submitocondriales y fueron resuspendidas en sacarosa 250 mM para lavarlas y nuevamente centrifugadas a 45 K rpm durante 35 minutos en el rotor 60 Ti. El sobrenadante se desecha y se repitió el lavado del pellet con sacarosa 250 mM y la centrifugación a 45 krpm durante 35 minutos en el rotor 60 Ti. El precipitado se resuspendió en el menor volumen posible con sacarosa 250 mM mediante un pincel para evitar la formación de burbujas y asegurarse de que queden muy concentradas (40 a 60 mg/ml). Se guardaron en alícuotas entre 20 y 100 µl para evitar ciclos de descongelamiento que dañan las propiedades de las partículas. La medición de proteína se determinó por el método de Lowry (Fig. 8).

ACTIVACIÓN DE PARTÍCULAS SUBMITOCONDRIALES

La activación de las partículas submitocondriales (sin PI) consiste en la eliminación de la proteína inhibidora (PI) en la enzima, la cual se realizó diluyendo las partículas submitocondriales controladas (con PI) a una concentración de 2 mg/ml en KCl 0.1 M, sacarosa 200 mM y Tris/SO₄ 0.5 M. Se incubaron a una temperatura de 38°C. Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos (durante 3 a 5 horas) con volúmenes decrecientes de la mezcla de activación, o bien, se fueron diluyendo las muestras con sacarosa 200 mM y se les midió la actividad a 340 nm en una celda de plástico en el espectrofotómetro Beckman 35. Las muestras se miden en un mililitro de la mezcla de reacción para medir la actividad hidrolítica. La mezcla para medir la actividad a pH 8.0 en un volumen final de un 1 ml, contiene: ATP 300 mM, fosfoenol piruvato (PEP) 30 mM, nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) 30 mM, 4 unidades de las enzimas piruvato cinasa (P.K.) y lactato deshidrogenasa (D.L.H.), rotenona 1mM y carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenil hidraxona (FCCP) 1 mM. (Fig. 9)

PURIFICACIÓN DE MITOCONDRIAS $Mg^{2+}ATP$

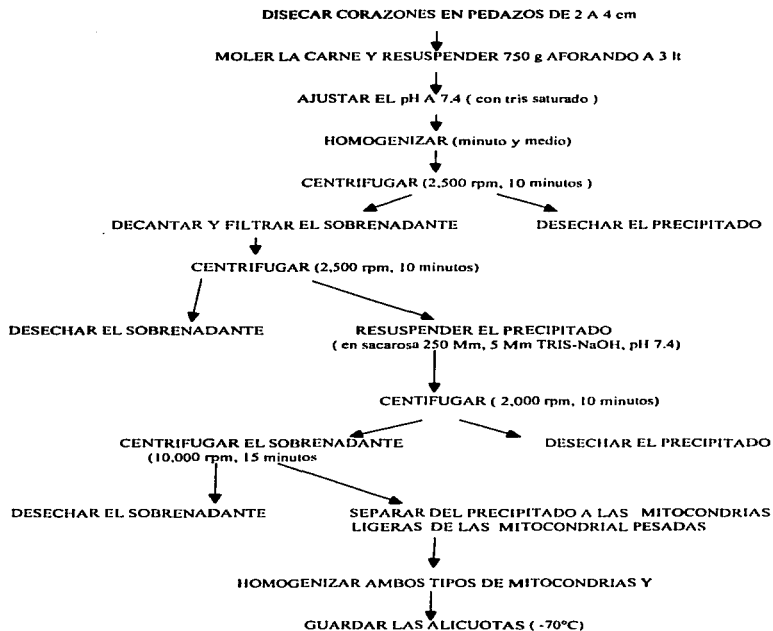


Figura 7 -Diagrama de purificación de mitocondrias de corazón de bovino todo a 4°C.

PREPARACIÓN DE PARTÍCULAS SUBMITOCONDRIALES Mg^{2+} -ATP CONTROLADAS

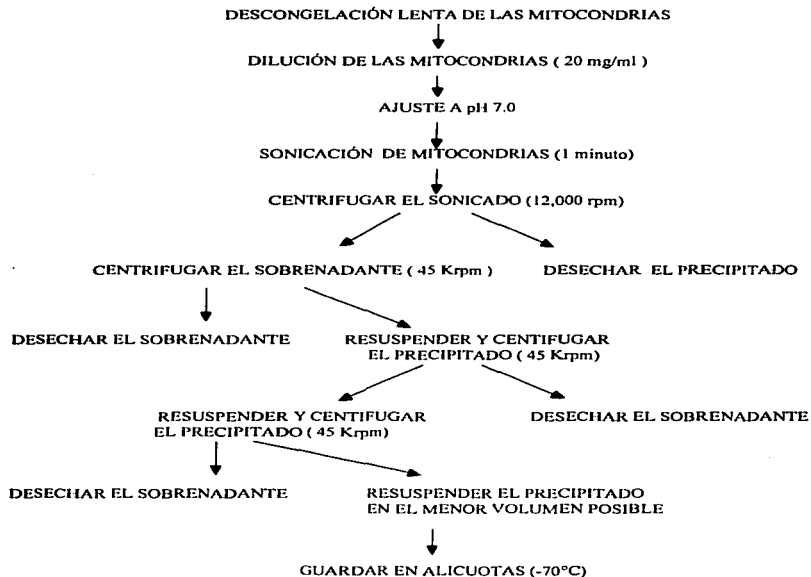


Figura 8 - Diagrama de purificación de partículas submitocondriales Mg -ATP de corazón de bovino todo a 4°C.

PREPARACIÓN DE PARTÍCULAS SUBMITOCONDRIALES Mg^{2+} ATP ACTIVADAS

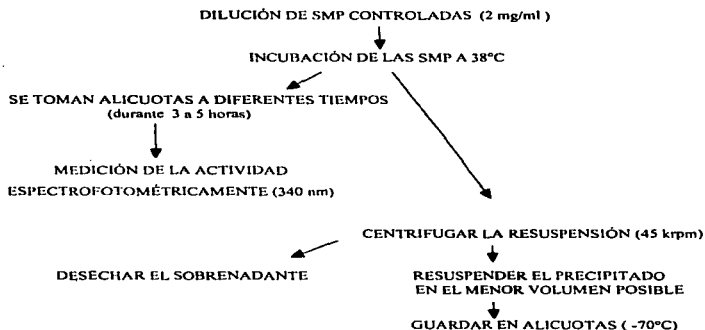


Figura 9 - Diagrama de activación de partículas submitocondriales.

TÉCNICAS

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA

Para determinar de la concentración de proteína se utilizaron dos métodos: el descrito por Biuret y el descrito por Lowry.

DETERMINACIÓN POR EL MÉTODO DE BIURET

El método de Biuret fue descrito por Gornall *et al.* en 1949 y, consiste en la formación del complejo que originan las sales de cobre, en soluciones alcalinas, con los enlaces peptídicos. Por cada ion de Cu^{2+} se forma un complejo con cuatro nitrógenos peptídicos, que da una coloración violeta. Debido a que lo que mide es el contenido de enlaces peptídicos, resulta un método muy reproducible.

aunque tiene la desventaja de no poder utilizarse cuando la concentración de proteína es menor a 1 mg/ml, debido a su baja sensibilidad.

Para la curva patrón se conserva un volumen final de 0.8 ml. Se utiliza una solución de CuSO_4 al 0.15% y de tartrato de Na-K al 0.6% en NaOH al 3%. A cada tubo se le agregan 200 μl de desoxicólato de sodio (DOC-Na) al 1 %. La curva estándar de proteína contiene de 1 a 6 mg de albúmina sérica de bovino (BSA) a partir de una solución de 10 mg/ml en agua. La muestra problema contiene aproximadamente entre 0.25 a 5 mg/ml de proteína y se afora con agua a un volumen de 0.8 ml. Se agregan 2 ml del reactivo de Biuret y se mezcla. Se deja reposar de 20 a 30 minutos y se lee la absorbancia entre 540 y 550 nm, contra el blanco de reactivos.

DETERMINACIÓN POR EL MÉTODO DE LOWRY

El método de Lowry *et al.*, fue descrito en 1951 y, se basa en la reducción del reactivo de Folin Ciocalteu, por medio de los complejos cobre-proteína, formados en un medio alcalino que da una coloración azul-violáceo, debido a la reducción del reactivo de Folin por los residuos de tirosina, triptofano y cisteína, por lo que la consistencia en el color dependerá de la proteína y de su concentración. Las muestras pueden medirse en las siguientes longitudes de onda: 560, 660 o 750 nm como máximo.

La curva estandar se obtuvo con albúmina de suero de bovino a una concentración de 1 mg/ml. Para esto se colocaron de 5 a 100 μg de BSA (la curva tuvo un comportamiento lineal hasta 60 μg). El volumen final en todos los tubos es de 4.0 ml. Se necesitaron los siguientes reactivos: solución A = Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1 N., B = CuSO_4 al 1%, con tartrato de Na-K al 2%, disuelto en NaOH 0.1 N. C = se mezclan 100 ml de A + 2 ml de B (que se deben preparar diariamente) y D = Reactivo de Folin diluido 1:1 en agua (que se debe preparar en el momento de usarse).

La muestra de problema debía contener alrededor de 10 a 60 $\mu\text{g/ml}$ de proteína. A ésta se le agregaron 200 μl de DOC-Na 1% y se aforó a 0.8 ml con agua. Se adicionaron 2 ml del reactivo C, se mezcló durante 10 minutos y se dejó a temperatura ambiente. Pasado el tiempo se mezcló nuevamente y durante la agitación se adicionaron 0.2 ml del reactivo D y se dejó reposar a temperatura ambiente de 20 a 30 minutos. La absorción se leyó a 560 nm en el espectrofotómetro Beckman 35.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIDROLÍTICA DE LA ENZIMA

La determinación de la actividad catalítica de hidrólisis en la ATPsintasa se llevó a cabo con el método espectrofotométrico a partir de la reducción del NADH y el método colorimétrico, por medio de la cuantificación del Pi liberado; ambos, en presencia de un sistema regenerador (Fig.10) de ATP (Ebel y Lardi, 1975).

DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE LA ACTIVIDAD

La determinación espectrofotométrica descrita por Pullman en 1960, es una medida indirecta de la hidrólisis del nucleótido (ATP e ITP) y es seguida por la disminución en la absorbencia del sustrato NADH, a una longitud de onda de 340 nm, en presencia de un sistema regenerador del nucleótido. El medio de reacción aforado a 3.0 ml. contenía en concentración final en la mezcla básica: sacarosa 250 mM, 50 mM de Tris acetato a un pH de 7.4, 30 mM de acetato de potasio pH 7.4, 3 mM de acetato de magnesio; y la solución de enzimas y sustratos para la reacción contenía: 3 mM de fosfoenol piruvato (PEP), 3 mM de ATP o ITP a pH de 7.4, 4 unidades de piruvato cinasa (P.K.), 4 unidades de deshidrogenasa láctica (L.D.H.), 0.33 $\mu\text{g/ml}$ de rotenona en etanol, para evitar la oxidación del NADH por la cadena respiratoria, 0.33 mM de FCCP (que es un protonoforo o desacoplante) y de 7 a 10 μl de NADH 30 mM, preparado en tris acetato pH 7.4. La celda de plástico se incubó de 2 a 5 min para descartar la oxidación de NADH debida a la contaminación de ADP o IDP en la solución. La reacción se inició al agregar 10 μl de partículas submitocondriales controladas a una concentración entre 80 y 100 $\mu\text{g/ml}$. Para esta medición se empleó el espectrofotómetro Beckman 35, a una densidad óptica de 340 nm, en donde el coeficiente de extinción molar del NADH es de $\epsilon = 6.22 \text{ Mm}^{-1} \text{ ml}^{-1}$.

La actividad hidrolítica se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad específica} = \text{densidad óptica} \times 3 \text{ ml} / 6.22 \times \text{minuto} \times \text{mg de proteína.}$$

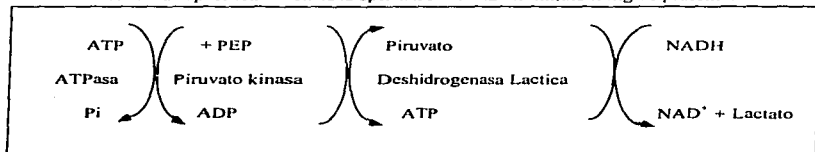


Figura 10. Reacciones que se llevan a cabo en el sistema regenerador de ATP.

DETERMINACIÓN COLORIMÉTRICA DE LA ACTIVIDAD

La medición de la hidrólisis se realizó por medio de la determinación de fosfato inorgánico descrito por Sumner en 1944.

La mezcla de reacción básica contenía: sacarosa 250 mM, 50 mM de Tris acetato pH 7.4, 30 mM de acetato de potasio pH 7.4, 3 mM de acetato de magnesio y en la solución de enzimas y sustratos para la reacción: 3 mM de fosfoenol piruvato, 3 mM de ATP o ITP a pH de 7.4, 4 unidades de piruvato cinasa y 0.1 mM de FCCP, el volumen utilizado fue de 1 ml. En este método el medio de reacción se preincubó durante 10 minutos a una temperatura de 30°C y la reacción se inició con la adición de 10 µl de las smp a una concentración entre 50 y 100 µg/ml (dependiendo de las condiciones experimentales) durante un minuto a 30°C. La reacción se detuvo con 200 µl de ácido tricloroacético al 30% y el tubo se colocó en un baño de hielo y se centrifugó a 3,000 rpm. En la curva patrón se toman de 0.25 a 2.0 ml de la solución de fosfato 1 mM de KH_2PO_4 (0.25 a 2.0 µmoles). Se aforó a 3.6 ml con agua. Se añadieron 0.5 ml de la solución de MoNH_4 al 6.6%_{v/v} se agregaron 0.5 ml de la solución de H_2SO_4 7.5 N y se agitó. Se añadieron 0.4 ml de la solución de FeSO_4 (preparada antes de la determinación con 5 g de FeSO_4 más 50 ml de agua, se disolvió y añadió 1 ml de la solución de H_2SO_4 7.5 N, en agitación. Para la determinación del Pi producido en los experimentos, se tomó una alícuota de 1 ml del volumen de reacción de hidrólisis y se aforó a 3.6 ml con agua y se adicionaron las soluciones de MoNH_4 , H_2SO_4 y FeSO_4 , como en la curva patrón. Después de diez minutos se leyó a 660 nm en el espectrofotómetro Beckman 35. Como referencia se utilizó para los cálculos la absorbencia de 0.5 moles de KH_2PO_4 de la curva patrón.

La actividad hidrolítica se calculó con la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} 0.5/\text{densidad óptica} \times \text{factor de dilución} \times \text{minuto}^{-1} \times \text{mg de proteína}^{-1} &= \text{factor de Pi} \\ \mu\text{moles de Pi producido min}^{-1} \text{mg}^{-1} &= \frac{\text{densidad óptica de la muestra} \times \text{factor de dilución}}{\text{densidad óptica } 0.5 \mu\text{moles} \times \text{mg} \times \text{minuto}} \\ \text{y el factor de Pi} \times \text{densidad óptica de la muestra} &= \text{Actividad específica} \end{aligned}$$

MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE NUCLEÓTIDOS UTILIZADOS EN LAS CURVAS CINÉTICAS

Ésta se realizó en un espectrofotómetro Beckman DU-64 en una celda de cuarzo de 1 ml, contra el blanco que contenía solamente agua. La muestra se midió a una densidad óptica de 259 nm. con un $\epsilon = 15.4$

para el ATP y para el ITP la densidad óptica empleada fue de 248.5 nm con un $\epsilon = 12.2$ (Ebel y Lardy, 1975).

La ecuación utilizada para la calibración fue:

$$\text{Concentración} = \text{densidad óptica} - \text{blanco} / \epsilon$$

CÁLCULOS PARA DETERMINAR LAS CONSTANTES CINÉTICAS

La medición de los valores de K_m , $V_{m\acute{a}x}$ y pK se obtuvieron por medio del paquete de cómputo Enzfiter versión 1.05, a partir de las mediciones de la velocidad en una curva de velocidad a diferentes concentraciones de sustrato y diferentes pH. De los valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ y para cada pH se obtuvo el promedio de acuerdo al número de determinaciones. Posteriormente todos los datos fueron normalizados con respecto al valor máximo obtenido para ambos sustratos (ATP e ITP) en cada tipo de partículas.

De cada uno de los valores normalizados se obtuvieron los logaritmos para la $V_{m\acute{a}x}$, este resultado se graficó contra el pH. De esta gráfica del logaritmo del % de $V_{m\acute{a}x}$ contra el pH los valores máximos indican el pH en el que preferentemente encontramos a la enzima y al sustrato como complejo (E-S).

Los valores de la relación $V_{m\acute{a}x}/K_m$, se obtuvieron con los valores normalizados de K_m y $V_{m\acute{a}x}$, al cual se le calculó el logaritmo y se le graficó contra el pH. De esta gráfica se determinó el valor máximo que nos indica el pK de la enzima (E) y del sustrato (S) libres.

Los valores de K_m al graficarse contra el pH se consideraron sin hacerles ningún tratamiento.

CÁLCULOS PARA DETERMINAR LA ENERGÍA DE ACTIVACIÓN

A partir de los datos de las curvas de temperatura, fue posible calcular la energía de activación (E_a) de acuerdo a la ecuación de Arrhenius:

$$E_a = \frac{2.3 R \log V_{max_2}/V_{max_1} \cdot (T_1 - T_2)}{(T_2 - T_1)}$$

y que representa un valor aparente o medio de las constantes que determinan la velocidad. Cada una de éstas puede responder de forma diferente al cambio de temperatura. La energía de activación para una reacción catalizada puede representarse como el log de V_{max} frente a $1/T$ (Fig. 13). La energía máxima de fijación entre una enzima y un sustrato se produce cuando cada grupo ligante del sustrato está en relación con un sitio de fijación en la enzima.

Dado que la estructura de la enzima cambia durante la reacción primero en el estado de transición y después a productos, el incremento en la energía de fijación del sustrato, a medida que cambia su estructura al estado de transición, disminuiría la energía de activación de la constante catalítica que mide la velocidad de la enzima para llevar a cabo una reacción (K_{cat}), por lo que es más ventajoso energéticamente el que la enzima sea complementaria a la estructura del estado de transición del sustrato que de la estructura original de éste.

Por el contrario, si la estructura de la enzima es complementaria al sustrato sin alterar, la disminución de la energía de fijación al formarse el estado de transición, incrementaría la energía de activación de la constante de velocidad (K_{cat}). En las reacciones catalizadas por enzimas, las moléculas de la enzima deben hallarse en cierta conformación específica para reaccionar con la molécula del sustrato. En el estado nativo, la velocidad aumenta con el incremento de la temperatura, ya que a temperaturas más altas, la enzima puede sufrir desnaturalización. La estabilidad de una enzima en un intervalo de temperaturas depende de ciertos factores como son el pH, la fuerza iónica del medio y la presencia o ausencia de ligandos, los sustratos a menudo impiden la desnaturalización por temperatura. En general una enzima será más estable al calor en preparaciones crudas, libres de altas concentraciones de otras proteínas (Fersht, 1985 y Segel, 1975).

V RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para conocer la participación de los sitios catalíticos y los reguladores en la hidrólisis, se empleó como sustrato al ATP y para evaluar los sitios catalíticos se utilizó ITP debido a que no existe afinidad por él en los sitios reguladores. Ambos sustratos fueron empleados para medir la hidrólisis tanto en las partículas submitocondriales controladas (en presencia de la proteína inhibidora), como en las partículas submitocondriales activadas (sin proteína inhibidora) y así, poder evaluar el efecto de la proteína inhibidora en estos parámetros.

PARÁMETROS GENERALES

Primero se realizaron las siguientes determinaciones, que sirvieron para conocer las condiciones experimentales ideales:

MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD HIDROLÍTICA ESPECÍFICA

El método espectrofotométrico se empleó sólo para la medida de la actividad hidrolítica específica del ATP. El método colorimétrico se utilizó para las determinaciones con ambos sustratos en todos los ensayos.

Como se mencionó la medición de la actividad hidrolítica de la ATPsintasa de las partículas submitocondriales controladas fue realizada por el método espectrofotométrico, en presencia del sistema regenerador de ATP (Fig. 10). De dichas medidas se obtuvo una actividad específica de alrededor de 0.22 $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg de proteína}^{-1}$ para el ATP. La medición de la actividad específica de hidrólisis de ITP se midió sólo por el método colorimétrico (Tabla II).

La medida de la actividad hidrolítica específica por el método colorimétrico, se realizó en el medio descrito en métodos y en presencia de un sistema regenerador. De lo que se obtuvo una actividad específica para el ATP de alrededor de 0.7 $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg de proteína}^{-1}$ y para el ITP de alrededor de 0.25 $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg de proteína}^{-1}$ en las smp controladas a pH 8.0 (Tabla II).

Al emplear las mismas condiciones del medio de reacción mencionado en el metodo, la actividad específica de hidrólisis para el ATP fué de alrededor de 8.4 $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}$ y para el ITP alrededor de 3.5 $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg de proteína}^{-1}$ a pH 8.0 en las partículas submitocondriales recién activadas (Tabla II). La actividad específica de las partículas submitocondriales activadas decae con el tiempo.

MÉTODO	ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE HIDRÓLISIS ($\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1} \text{ proteína}^{-1}$)			
	Partículas submitocondriales controladas		Partículas submitocondriales activadas	
	Mg-ATP	Mg-ITP	Mg-ATP	Mg-ITP
Espectrofotométrico	0.22 \pm 0.072 (5)	no determinado	no determinado	no determinado
Colorimétrico	0.710 \pm 0.13 (7)	0.25 \pm 0.109 (7)	8.43 \pm 1.90 (5)	3.54 \pm 0.98 (6)

Tabla II. Datos de actividad hidrolítica específica del ATP e ITP como sustratos en ambos tipos de partículas submitocondriales

CURVA DE PROTEÍNA

La medida de la actividad hidrolítica a diferentes concentraciones de proteína, se realizó de acuerdo al protocolo anterior, se varió sólo la concentración de proteína, lo que permitió saber cual era el intervalo de proteína mas adecuado para los experimentos, dado que la velocidad de catálisis con ambos tipos de partículas submitocondriales diferente. Se tuvo cuidado de que la absorbancia de las muestras se encontrara dentro del intervalo de la curva de Pi. Por lo que el intervalo de proteína considerado en los experimentos para ambos sustratos fué de 50 a 100 μg de proteína en las partículas submitocondriales controladas y de 1 a 7 μg de proteína en las partículas submitocondriales activadas (Fig. 11 *a* y *b*).

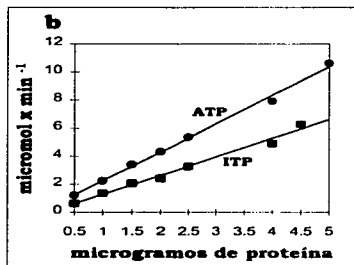
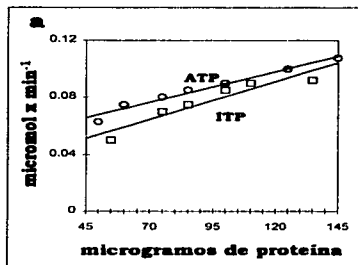


Figura 11. Efecto de la concentración de proteína en la velocidad de hidrólisis del ATP e ITP en partículas submitocondriales controladas (a) y en las partículas submitocondriales activadas (b). La velocidad de hidrólisis se midió a partir de la determinación del Pi producido durante 10 minutos de reacción a 30°C y leído a 660 nm. El medio de reacción contenía: 3 mM de acetato de magnesio, 30 mM de acetato de potasio, 7 mM fosfoenol piruvato, sacarosa 250 mM, tris 50 mM, 4 unidades de la enzima piruvato cinasa, 1 μM de FCCP, ATP 3 mM (O y ●) y 3 mM ITP (□ y ■) a pH 8.0. La concentración de proteína se midió por el método de Lowry a 560 nm.

CURVA DE TIEMPO A DIFERENTES TEMPERATURAS

La medición de la actividad hidrolítica a lo largo del tiempo permitió saber hasta que intervalo de tiempo el sistema regenerador es eficiente, y para complementar el estudio se realizaron curvas a diferentes temperaturas a pH 8.0 (Fig. 12 a y b), para saber como se afectaba la velocidad de hidrólisis en la ATPsintasa de las partículas controladas, ya que se sabe que la proteína inhibidora se desplaza de su sitio inhibitorio durante la hidrólisis a temperaturas altas.

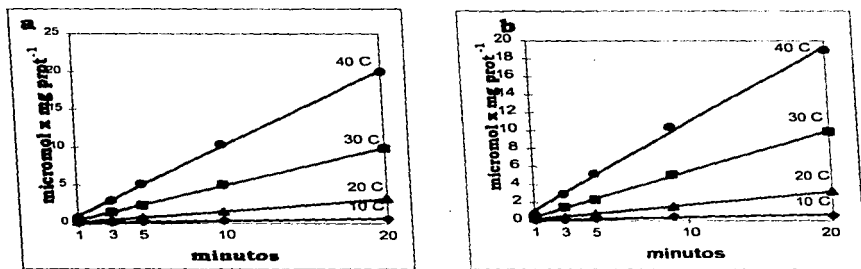


Figura 12 Efecto de la temperatura en la velocidad de hidrólisis del ATP (a) e ITP (b) en las partículas submitocondriales controladas. La reacción se detuvo a diferentes tiempos a una temperatura constante de 10 (◆), 20 (●), 30 (■) y 40 °C (●). La mezcla de reacción contenía: 3 mM ATP en (a) o bien, 3 mM ITP para (b), más 8 unidades de P.K., 1 μ M de FCCP, 3 mM de acetato de Mg, 30 mM de acetato de potasio, 7 mM fosfoenol piruvato, sacarosa 250 mM y tris 50 mM a pH 8.0. A una concentración de proteína de 20 μ g/ml.

El efecto de la temperatura en las partículas activadas mostró que la actividad máxima de hidrólisis está dentro del rango esperado para el contenido de F_1 en partículas (aproximadamente 10 % de la proteína total) y fue alrededor de 8.5 μ mol \times min⁻¹ \times mg proteína⁻¹ (Fig. 13 a y b).

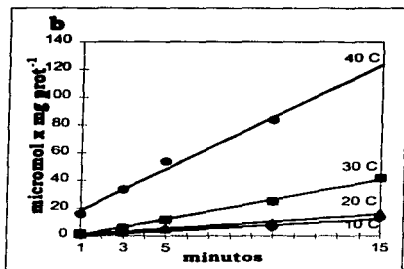
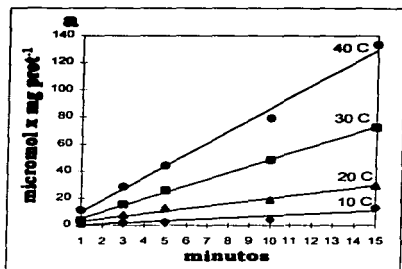


Figura 13. Efecto de la temperatura en la velocidad de hidrólisis del ATP (a) e ITP (b) en las partículas mitocondriales activadas. La reacción se detuvo a diferentes tiempos a una temperatura constante de 10 (●), 20 (◆), 30 (■) y 40 °C (●). La mezcla de reacción contenía: 3 mM de ATP en (a) y 3 mM ITP para (b), más 8 unidades de piruvato cinasa, 1 μM de FCCP, 3 mM de acetato de Mg, 30 mM de acetato de potasio, 7 mM de fosfoenol piruvato, sacarosa 250 mM y tris 50 mM a pH 8.0. y se preincubó durante 10 minutos, con una concentración de proteína de 2 μg/ml.

El comportamiento fue lineal durante el tiempo en el que se midió la hidrólisis en las diferentes temperaturas. Se decidió trabajar con un tiempo de 5 minutos en las determinaciones de velocidad con respecto al pH y a 30°C, de acuerdo al protocolo para la determinación de la actividad máxima de hidrólisis.

EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA VELOCIDAD DE HIDRÓLISIS EN UN TIEMPO DETERMINADO

A partir de los datos anteriores, fué posible calcular la energía de activación (E_a) de acuerdo a la ecuación de Arrhenius:

$$E_a = 2.3 R \log \frac{V_{max_2}}{V_{max_1}} \frac{(T_1 - T_2)}{(T_2 - T_1)}$$

y que representa un valor aparente o medio de las constantes que determinan la velocidad. Cada una de éstas puede responder de forma diferente bajo el cambio de temperatura. La energía de activación para una reacción catalizada puede representarse como el log de V_{max} frente a $1/T$ (Figura 14). A partir de la cual se obtuvieron los valores de E_a (Tabla III).

Energía de activación calorías/mol	Partículas submitocondriales controladas		Partículas submitocondriales activadas	
	ATP	ITP	ATP	ITP
	19,282	23,856	12,107	22,847

Tabla III. Valores de la energía de activación para la hidrólisis de ATP e ITP en ambos tipos de partículas, a un tiempo de cinco minutos de reacción a partir de las curvas de temperatura, pH 8.0, con el protocolo descrito en métodos para la determinación de la energía de activación.

El cambio en la energía de activación con ATP como sustrato al removerse la proteína inhibidora nos podría indicar la energía necesaria de 7,175 calorías para este paso, también es importante observar que esta diferencia no se obtiene con ITP.

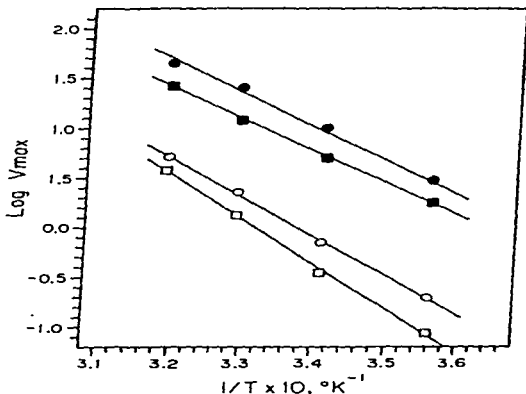


Figura 14. La curva de Arrhenius se obtiene con los datos del log de la Vmax sobre el inverso de la temperatura. Se realizó a partir de los valores de las curvas de temperatura para el ATP (○) y el ITP (□) en las partículas submitocondriales controladas y para el ATP (●) y el ITP (■) en el caso de las partículas submitocondriales activadas. Las condiciones experimentales se mencionaron en el pie de figura de las curvas de temperatura (figs. 12y 13).

EFFECTO DEL pH EN AMBOS TIPOS DE PARTÍCULAS SUBMITOCONDRIALES CON ATP e ITP

Se observaron diferencias del efecto del pH, el caso más sencillo es el de las partículas activadas que hidrolizan ITP (Fig. 15 b) en que se observa que la enzima cataliza a la misma velocidad desde pH 6.0 a 8.0 sin presentar un máximo, lo cual podría indicar que no existe un aminoácido cargado que sea esencial para la actividad observada, al no encontrarse un pK en esta condición. La interpretación más sencilla de los datos cinéticos sería que los sitios catalíticos están siendo ocupados por ITP en presencia de un sistema regenerador del nucleótido y sin inhibición por producto, ya que el IDP no inhibe (Vasilieva *et al.*, 1980) y además existe un sistema regenerador del ITP. Los sitios no catalíticos tampoco están siendo recambiados por el ITP debido a que son específicos para nucleótidos de adenina (Schuster *et al.*, 1975 y Esch y Allison, 1978). La enzima se encuentra en un estado catalítico basal e ideal en donde el paso limitante es la ruptura del ITP y no la salida del IDP y Pi.

La enzima sin proteína inhibidora al hidrolizar el ATP (Fig. 15 b), tiene una clara respuesta máxima al pH entre 7.0 y 7.6, ya reportada anteriormente para la enzima soluble y para otras preparaciones de partículas en las que no se tomó en cuenta la presencia o ausencia de la proteína inhibidora (Bullough, 1986 a). En la hidrólisis del ATP se alcanza la velocidad máxima de la enzima y lo que podría sugerir es que existe un aminoácido cargado que toma parte importante en la reacción de hidrólisis.

En contraste, la conducta cinética de la enzima en presencia de la proteína inhibidora (Fig. 15 a), es diferente en cuanto al pH. Con ITP se podría explicar la curva de disociación de la proteína inhibidora sin el problema de atrapamiento del IDP en los sitios catalíticos, que dificulta la interpretación de los datos cinéticos, la curva muestra que en el pH ácido la proteína inhibidora tiene su máxima expresión inhibitoria y que en el medio paulatinamente más alcalino se va disociando hasta alcanzar una meseta entre 7.6 y 8.1 (Fig. 15 a).

En presencia de la proteína inhibidora y ATP (Fig. 15 a) se sobreponen muchos efectos como el de la disociación de la proteína inhibidora y el efecto del recambio en los sitios no catalíticos. A pH entre 7.9 y 8.1, el más alcalino utilizado, la enzima se comporta como en las partículas activadas.

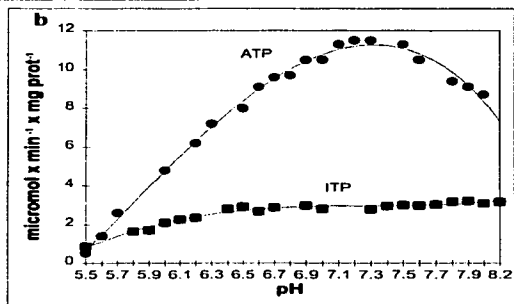
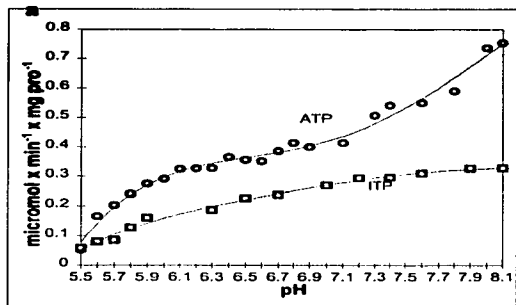


Figura 15. Efecto del pH en la actividad específica de hidrólisis del ATP e ITP en las partículas submitocondriales *controladas* (a) y en las partículas submitocondriales *activadas* (b). La velocidad de hidrólisis se midió a partir de la determinación de Pi a 660 nm, a 30°C, durante 10 minutos de reacción. El amortiguador contenía: ácido cacodílico 50 mM y el ajuste del pH se realizó con ácido acético en el intervalo de 5.5 a 7.5 y con ácido bórico en el intervalo de 7.6 a 8.5; además, el medio de reacción contenía: 3 mM de acetato de magnesio, 30 mM de acetato de potasio, 7 mM de fosfoenol piruvato, sacarosa 250 mM, 4 unidades/ml de piruvato cinasa, 1 μ M de FCCP, ATP 3 mM (O y ●) e ITP (□ y ■). Con una concentración de proteína en las partículas submitocondriales controladas de 92 μ g/ml, y de 7 μ g/ml en las partículas submitocondriales activadas la cual fue determinada por el método de Lowry a 560 nm.

EFFECTO DEL pH EN LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA HIDRÓLISIS

Para ahondar un poco más sobre el efecto de la presencia de la proteína inhibidora en la actividad de la enzima, se hicieron determinaciones a diferentes concentraciones de sustratos ATP (Fig. 16) e ITP (Fig. 17) en ambas partículas al pH óptimo (8.0), de la cual se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla IV.

pH 8.0	partículas submitocondriales controladas		partículas submitocondriales activadas	
	ATP	ITP	ATP	ITP
Km (mM)	0.174	1.19	0.14	2.83
Vmax ($\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg prot}^{-1}$)	0.758	0.49	6.44	4.32
Kcat / Km	4.35	0.41	46	1.81

Tabla IV. Parámetros cinéticos medidos a pH 8.0 en ambos tipos de partículas con ATP e ITP.

De acuerdo a la tabla IV, para la medida de la hidrólisis del ITP a pH 8.0, se puede observar que la presencia de la proteína inhibidora no modifica sensiblemente la Km del sustrato y aumenta la Vmax. Con ATP la Vmáx aumenta un orden de magnitud, pero no se modifica la afinidad por la presencia de la proteína inhibidora. El aumento de la Vmax con ambos sustratos al quitar la proteína inhibidora es aproximadamente un orden de magnitud.

Las modificaciones de la Vmax indican que la presencia de la proteína inhibidora influye en la transformación del complejo enzima-sustrato (E-S) al complejo enzima + producto (E+P), y al parecer, no actúa en la formación del complejo E-S, debido a que no altera la Km para los dos sustratos, en ambas partículas. Esto se confirma con la observación de la estructura cristalina, que muestra que el sitio de interacción de la proteína inhibidora está alejado del sitio catalítico y que la presencia o ausencia de esta proteína no modifica la entrada del sustrato.

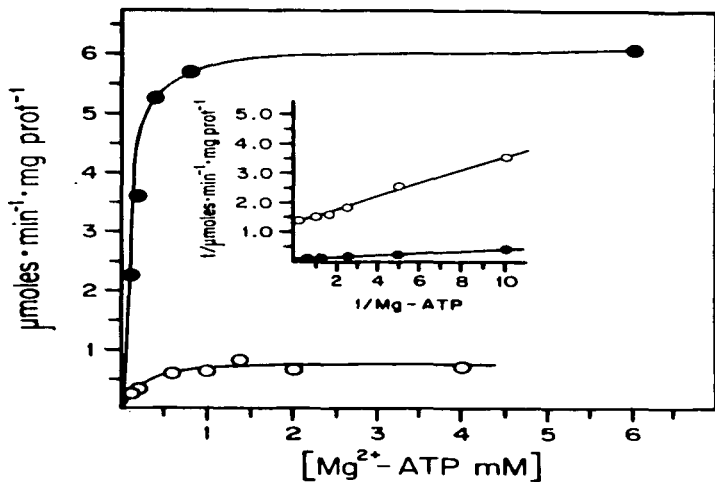


Figura 16. La curva de concentración de sustrato sobre la velocidad de hidrólisis en partículas submitocondriales *controladas* (O) y partículas submitocondriales *activadas* (●), para obtener los parámetros cinéticos $V_{\text{máx}}$ y K_m , cuando se emplea como sustrato ATP. El experimento se realizó a una concentración de sustrato de 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 1.0, 2.0 y 4.0 mM de Mg-ATP. Las constantes $V_{\text{máx}}$ y K_m se determinaron por el método de Lineweaver-Burk mediante el paquete EnzfIt, a partir de la determinación de fosfato liberado durante los 5 minutos de reacción a 30°C. La mezcla de reacción contenía: 4 unidades de piruvato cinasa, 1 μM de FCCP, 30 mM de acetato de potasio, 5 mM fosfoenol piruvato, sacarosa 250 mM y 50 mM Tris/acetato de 8.0. A una concentración de proteína entre 80 y 90 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para las partículas controladas y entre 5 y 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para las partículas activadas.

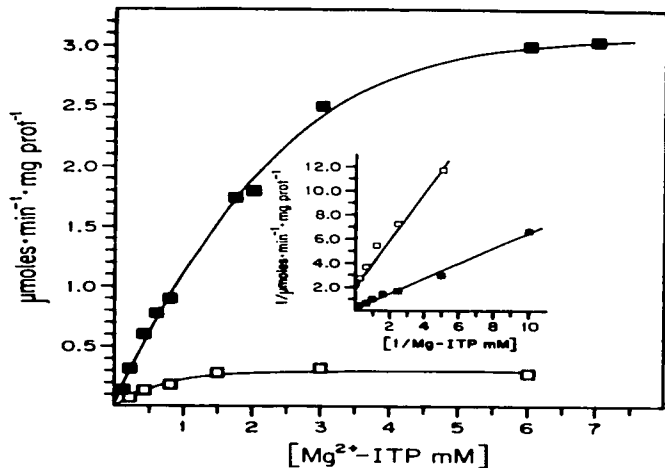


Figura 17. La curva de concentración de sustrato sobre la velocidad de hidrólisis en partículas submitocondriales *controladas* (□) y partículas submitocondriales *activadas* (■) para obtener los parámetros cinéticos $V_{m\acute{a}x}$, K_m , cuando se emplea como sustrato ITP. El experimento se realizó a una concentración de sustrato de 0.2, 0.4, 0.8, 1.5, 3.0, 6.0 y 9.0 mM de ITP para la actividad de ITPasa. Las constantes $V_{m\acute{a}x}$ y K_m se determinaron por el método de Lineweaver-Burk mediante el paquete Enzfif, a partir de la determinación de fosfato liberado durante los 5 minutos de reacción a 30°C. La mezcla de reacción contenía 4 unidades de piruvato cinasa, 1 μ M de FCCP, 30 mM de acetato de potasio, 5 mM fósfoenol piruvato, sacarosa 250 mM y 50 mM Tris/acetato de 8.0. A una concentración de proteína entre 80 y 90 μ g/ml para las partículas controladas y entre 5 y 7 μ g/ml para las partículas activadas.

EFFECTO DEL pH EN LOS PARÁMETROS CINÉTICOS K_m , V_{max} y V_{max}/K_m

Para estudiar el efecto del pH sobre los parámetros cinéticos K_m y V_{max} se hicieron determinaciones de actividad a diferentes concentraciones de sustratos (ATP e ITP) a distintos pH, tanto en las partículas controladas, como en las activadas.

Se sabe que, al utilizar un criterio general, la K_m expresa la formación del complejo E-S y es una medida aproximada de la afinidad de la enzima por el sustrato. Por otro lado la V_{max} expresa la velocidad de disociación del complejo E-S a E+P, que expresa la constante catalítica o K_{cat} , que mide la velocidad de la enzima para llevar a cabo la reacción, también, es interpretada como el número de recambio, el cual se define como el número máximo de moléculas de sustrato convertidas a producto por sitio activo, por unidad de tiempo, o bien, el número de sitios catalíticos por unidad de tiempo.

Por último, con los valores de K_m y K_{cat} se puede establecer la relación K_{cat}/K_m o V_{max}/K_m , que expresa la afinidad, especificidad y eficiencia de la reacción por el sustrato, entre mayor sea la relación (K_{cat} o V_{max} / K_m) mayor es la especificidad de la enzima por el sustrato (Tabla V).

Constante cinética	Partículas submitocondriales CONTROLADAS		Partículas submitocondriales ACTIVADAS	
	ATP	ITP	ATP	ITP
	pK		pK	
K_m (mM)	constante *	7.7	constante *	7.1
V_{max} ($\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg prot}^{-1}$)	6.5-6.7	7.0	6.7	6.9
V_{max}/K_m	6.9-7.0	constante *	constante *	constante *

Tabla V. Valores de pK obtenidos de la determinación de las constantes cinéticas a diferente pH. (*) no se aprecia ninguna dependencia en el intervalo de pH en el que se determinaron las constantes.

La variación de las constantes cinéticas con el pH pueden indicar la K de ionización preferente de la forma activa de la enzima o del sustrato y la K_m , la V_{max} y la relación K_{cat}/K_m se afectan por el pH de forma diferente, según si se trata de la enzima o del complejo enzima-sustrato.

Aunque las enzimas tienen muchos grupos ionizables, generalmente, sólo presentan uno o dos máximos, esto se debe a que en la catálisis sólo los grupos ionizables que intervienen en ésta son

importantes, ya sea en el sitio activo en la interacción enzima-sustrato, o bien, en la conformación activa de la enzima.

La enzima presenta grupos ionizables que se pueden titular y es posible determinarlos al medir los parámetros cinéticos bajo el efecto del pH. Generalmente es posible detectar la forma activa de la enzima y el paso limitante no se ve alterado con el pH.

La variación de la V_{max} con el pH (Figs. 18 y 19) generalmente indica la constante de ionización del complejo enzima-sustrato a enzima-producto, y en las partículas activadas (fig. 18) se muestra, que con ambos sustratos se tiene un pK aproximado entre 6.7 y 6.9, lo que indica que existe probablemente un residuo que participa en el proceso de transformación del ATP o del ITP a productos y podría tratarse de una histidina que pueda ser importante en la ionización, pero independiente de la base nitrogenada del nucleótido (adenina o inosina).

Con la presencia de la PI en las smp controladas (Fig. 18), las variaciones de la V_{max} con el sustrato ITP muestran un pK de 7.0, muy cercano al observado en ausencia de la proteína inhibidora con el mismo sustrato a 6.9; con ATP el pK observado también es muy cercano al observado sin la PI y es entre 6.5 y 6.7, lo que muestra que la presencia de la proteína inhibidora no afecta la ionización del residuo del sitio catalítico.

La K_m permanece constante a todos los pH empleados con el sustrato ATP, en ambas partículas (Fig. 20). Si hubiera variaciones en la K_m , ésta representaría los cambios del complejo enzima-sustrato, las cuales son de un intervalo tan pequeño que se requeriría de mejores datos cinéticos para precisar si en verdad existe el pK de algún aminoácido que participe.

En ambas smp, pero en presencia de ITP (Fig. 21), la K_m , con respecto al pH, muestra variaciones un poco más evidentes que con el ATP, y existe un pK aproximadamente entre 7.7 y 7.8, en donde la afinidad por el ITP a pH 8.0 es menor (K_m 2.2 mM) con respecto a lo obtenido a pH 6.0 (K_m 0.6 mM) en las partículas controladas. En las partículas activadas la K_m podría indicar un grupo con una constante de ionización de aproximadamente 7.1 en la formación del complejo E-S. En las partículas controladas la condición de la disociación de la proteína inhibidora y su dependencia al pH podría influir en la disminución de la K_m por el ITP.

Las variaciones de la K_{cat}/K_m o V_{max}/K_m (Figs. 22 y 23) se refieren a la K_m de la enzima libre, y con ATP, que es el sustrato más específico, la mayor afinidad está nuevamente entre el pK 6.9 y 7.0, lo que apunta a la presencia de una posible histidina en el sitio catalítico. La proteína inhibidora no parece influir en este parámetro cinético. Con el sustrato ITP existe un máximo aparente y las variaciones son muy pequeñas para obtener alguna conclusión.

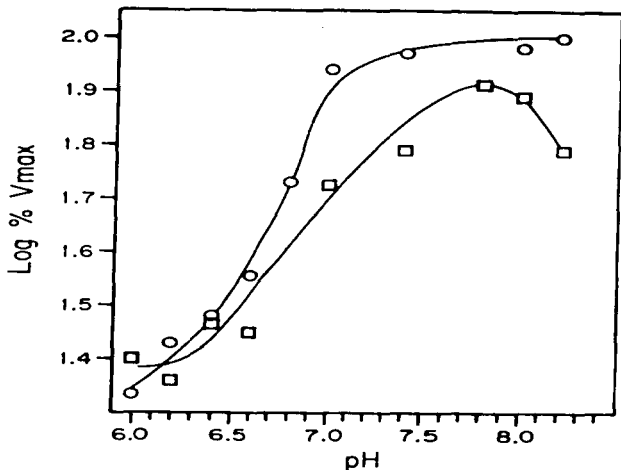


Figura 18 Perfil del log % de V_{max} de la actividad de ATPasa e ITPasa a lo largo del pH en las partículas submitocondriales controladas. De las curvas de concentración de sustrato 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 1.0, 2.0 y 4.0 mM de Mg-ATP para el ensayo de ATPasa (O) y de 0.2, 0.4, 0.8, 1.5, 3.0, 6.0 y 9.0 mM de ITP para la actividad de ITPasa (□), realizadas a los diferente pH se determinó por el método de Lineweaver-Burk la V_{max} por medio del paquete Enzfite. A partir de la determinación de fosfato liberado durante los 5 minutos de reacción a 30°C. La mezcla de reacción contenía: 4 unidades de piruvato cinasa, 1 μ M de FCCP, 30 mM de acetato de magnesio, 5 mM fosfoenol piruvato, sacarosa 250 mM y 50 mM de amortiguador (Tris/acetato de 7.4 a 8.2; Mops de 6.4-7.6; y Mes de 6.0 a 6.4). Los valores que se encuentran en la gráfica se obtuvieron del promedio de V_{max} para cada pH, estos se normalizaron con respecto al valor máximo de V_{max} alcanzado para ambos sustratos, el cual fue de 0.69 ± 0.063 micromol \times $min^{-1} \times$ mg de proteína $^{-1}$ del ATP. A una concentración de proteína entre 80 y 100 μ g/ml.

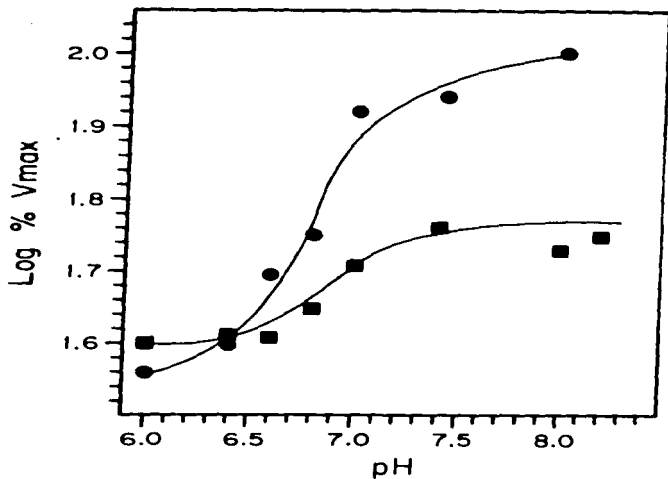


Figura 19. Perfil del log % de V_{\max} de la actividad de ATPasa e ITPasa a lo largo del pH en las partículas submitocondriales activadas. De las curvas de concentración de sustrato 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 1.0, 2.0 y 4.0 mM de Mg-ATP para el ensayo de ATPasa (●) y de 0.2, 0.4, 0.8, 1.5, 3.0, 6.0 y 9.0 mM de ITP para la actividad de ITPasa (■), realizadas a los diferente pH se determino por el método de Lineweaver-Burk la V_{\max} mediante el paquete Enzfite. A partir de la determinación de fosfato liberado durante los 5 minutos de reacción a 30°C. La mezcla de reacción contenía: 4 unidades de piruvato cinasa, 1 μM de FCCP, 30 mM de acetato de potasio, 5 mM fosfoenol piruvato, sacarosa 250 mM y 50 mM de amortiguador (Tris/acetato de 7.4 a 8.2; Mops de 6.4 a 7.6; y Mes de 6.0 a 6.4). Los valores que se encuentran en la gráfica se obtuvieron del promedio de V_{\max} para cada pH, éstos se normalizaron con respecto al valor máximo de V_{\max} para ambos sustratos el cual fue de 6.5 ± 0.482 micromol \times min^{-1} \times mg de proteína $^{-1}$ de la ATPasa. Con una concentración de proteína entre 2 y 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

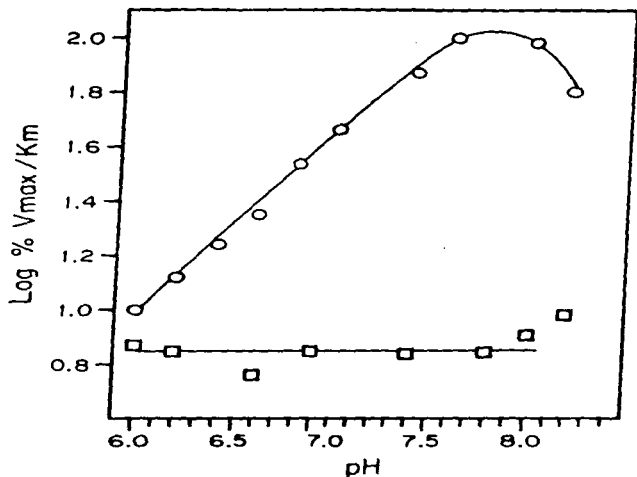


Figura 20. El perfil de la K_m de la actividad de ATPasa e ITPasa a lo largo del pH en las partículas submitocondriales controladas. Se obtuvo a partir de las curvas de concentración de sustrato a 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 1.0, 2.0 y 4.0 mM de Mg-ATP para el ensayo de ATPasa (O) y de 0.2, 0.4, 0.8, 1.5, 3.0, 6.0 y 9.0 mM de ITP para el de ITPasa (□); se determinó el Pi liberado durante los 5 minutos de reacción a 30 °C. La mezcla de reacción contenía: 4 unidades de piruvato cinasa, 1 μ M de FCCP, 30 mM de acetato de potasio, 5 mM fosfoenol piruvato, sacarosa 250 mM y 50 mM de amortiguador de acuerdo a su intervalo de funcionamiento (Tris/acetato de 7.4 a 8.2; Mops de 6.4 a 7.6; y Mes de 6.0 a 6.4). A una concentración de proteína entre 80 y 100 μ g/ml. Los valores de la gráfica se obtuvieron del promedio de los valores de K_m para el ATP e ITP por cada pH, determinado por el método de Lineweaver-Burk mediante el paquete Enzfit.

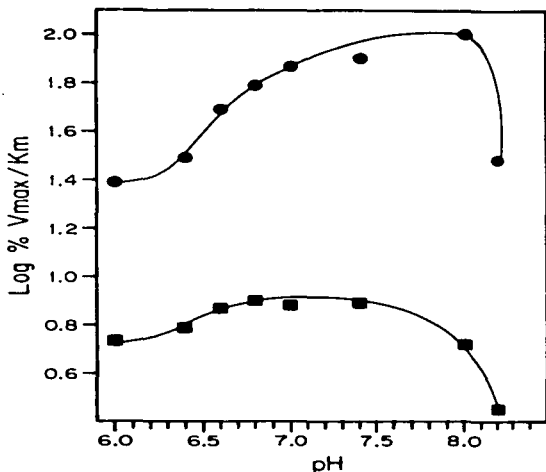


Figura 21. El perfil de la K_m de la actividad de ATPasa e ITPasa a lo largo del pH en las partículas submitocondriales *activadas*. Se calcularon a partir de las curvas de concentración de sustrato a 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 1.0, 2.0 y 4.0 mM de Mg-ATP para el ensayo de ATPasa (●) y de 0.2, 0.4, 0.8, 1.5, 3.0, 6.0 y 9.0 mM de ITP para el de ITPasa (■); por determinación del P_i liberado durante los 5 minutos de reacción a 30 °C. La mezcla de reacción contenía 4 unidades de piruvato cinasa, 1 μ M de FCCP, 30 mM de acetato de potasio, 5 mM fosfoenol piruvato, sacarosa 250 mM y 50 mM de amortiguador de acuerdo a su intervalo de efectividad (Tris/acetato de 7.4 a 8.2; Mops de 6.4 a 7.6; y Mes de 6.0 a 6.4). A una concentración de proteína entre 2 y 7 μ g/ml. Los valores de la gráfica se obtuvieron del promedio de los valores de K_m para el ATP e ITP por cada pH, determinado por el método de Lineweaver-Burk por medio del paquete Enzfif.

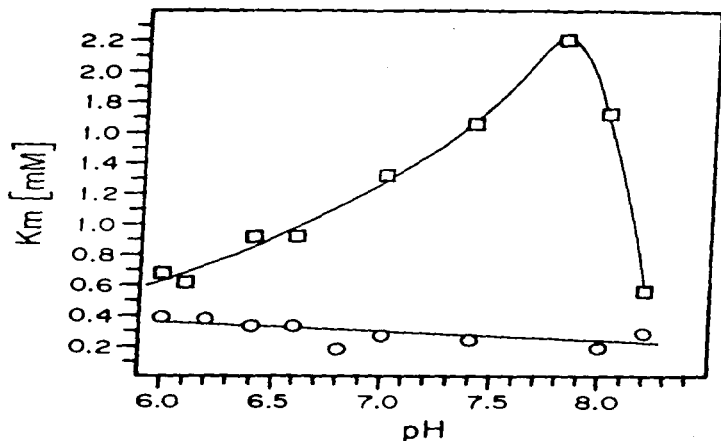


Figura 22. Perfil de log % V_{max} / K_m de la actividad de ATPasa (O) e ITPasa (□) a lo largo del pH en las partículas submitocondriales controladas. Las condiciones experimentales de este perfil, en donde se expresa la relación V_{max}/K_m , se menciona en las curvas de log de V_{max} y K_m contra el pH. Los valores de K_m y V_{max} se determinaron de acuerdo al método de Lineweaver-Burk, estos se promediaron para cada valor de pH, se normalizaron de acuerdo al valor máximo alcanzado para ambos sustratos en el valor de V_{max} 0.69 ± 0.063 micromol \times min^{-1} \times mg de proteína $^{-1}$ de ATP a pH 8.0 y para la Km 2.19 ± 0.4 mM de ITP a pH 7.8. A una concentración de proteína entre 50 y 100 $\mu g/ ml$.

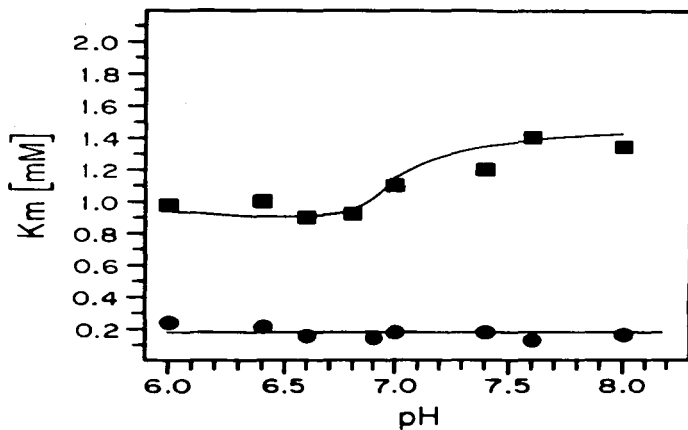


Figura 23. Perfil del $\log \% V_{\max} / K_m$ de la actividad de ATPasa (●) e ITPasa (■) a lo largo del pH en las partículas submitocondriales *activadas*. Las condiciones experimentales de este perfil, en donde se expresa la relación V_{\max}/K_m , se mencionan en las curvas de V_{\max} y K_m contra el pH. Los valores de K_m y V_{\max} se determinaron de acuerdo al método de Lineweaver-Burk, estos se promediaron para cada valor de pH, se normalizaron de acuerdo al valor máximo alcanzado para ambos sustratos en el valor de V_{\max} de 6.5 ± 0.482 micromol \times min⁻¹ \times mg de proteína⁻¹ de ATP a pH 8.0 y para la K_m 3.27 ± 0.305 mM de ITP a pH 7.8. A una concentración de proteína entre 2 y 7 μ g/ml.

VI CONCLUSIONES

1 - EFECTO DE LA TEMPERATURA

a) Sobre la energía de activación.

De acuerdo al análisis de la temperatura a partir de la curva de Arrhenius, no existen cambios significativos con el ITP, dado que presenta un valor en calorías/mol muy semejante en ambos tipos de partículas en un tiempo de 5 minutos. Sin embargo con ATP en presencia y ausencia de la proteína inhibidora la energía de activación disminuye en aproximadamente 7.0 Kcal/mol que podría indicar que este es el valor energético necesario para desplazar a la proteína inhibidora.

b) Actividad máxima encontrada en partículas submitocondriales activadas de acuerdo al contenido de F_1 en las partículas.

La velocidad máxima de hidrólisis del ATP e ITP en este tipo de partículas se encontró dentro del intervalo del 10 % de la proteína total de F_1 en las partículas submitocondriales, con un valor de aproximado de $9 \mu\text{molas} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg de proteína}^{-1}$.

2 - EFECTO DEL pH EN LA HIDRÓLISIS

a) En las partículas submitocondriales activadas con ITP no hay un pH óptimo, el paso limitante es la ruptura del ITP y no la salida del IDP, en estas condiciones la reacción no se altera por las variaciones del pH externo.

b) En las partículas submitocondriales activadas con ATP, se tiene un máximo entre 7.0 y 7.6, lo cual sugiere un grupo cargado en ese intervalo de pK, probablemente una histidina. Sin embargo, como con ATP hay recambio en sitios reguladores, éstos bien podrían influir en el pH óptimo.

c) En las partículas submitocondriales controladas con ITP, la actividad máxima alcanzada, a pH alcalino, podría indicar la curva de disociación de la proteína inhibidora. Con ATP el efecto de los sitios reguladores muestra diferencias, sin embargo hay mayor actividad a pH alcalino, que es el pH en el que la proteína inhibidora se disocia del sitio inhibitorio.

3 - PARÁMETROS CINÉTICOS

a) A pH óptimo:

1 - Solo se modifica la V_{max} un orden de magnitud por la remoción de la proteína inhibidora, lo que indica que al mover la proteína inhibidora con ATP se acelera la salida del ADP y con ITP la entrada de agua. La K_m no se modifica, lo que indica que la proteína inhibidora no tiene efecto sobre la formación del complejo E-S, lo que se confirma con la estructura cristalográfica.

2 - Existe una diferencia de la especificidad (V_{max}/K_m) con ATP comparado con ITP, que indica una mayor eficiencia de formación del complejo E + P con ATP, la que se hace mucho más evidente al eliminar el freno catalítico de la proteína inhibidora.

b) A distinto pH:

1 - La K_m para el ATP no varía con el pH.

2 - La K_m con ITP muestra una ligera diferencia que requiere estudios más finos para ver si es significativa.

3 - La presencia de la PI no modifica los pK.

4 - La V_{max}/K_m muestra un pK con ATP entre 6.9 a 7.0 compatible, con una histidina en el paso de formación del complejo E-S al complejo E-P. La proteína inhibidora no modifica esta conducta cinética.

4 - DIFERENCIAS DE LA ENZIMA SOLUBLE

Allison encuentra que con el análogo de ATP (FSBA) en la enzima soluble, es posible localizar a pH de 6.5 y 8.0 a los aminoácidos involucrados en la hidrólisis del ATP y con el análogo del ITP (FSBI), él observo un único pK a pH 5.9, lo cual no coincide con nuestros resultados al medir V_{max}/K_m en las partículas submitocondriales obteniendo un pK de 6.9-7.0.

No es extraño que en nuestro sistema de enzima completa F_0-F_1 anclada a la membrana no se encuentre la misma conducta de las constantes de ionización de los aminoácidos con respecto a la enzima soluble que en un sistema más sencillo. Sin embargo nuestros datos parecen sugerir la existencia de una histidina del sitio catalítico que reacciona al pH externo.

VII PERSPECTIVAS

De acuerdo a la estructura del cristal de la MF₁, se observó que existe un tunel con forma cónica, a través del cual, el sustrato se dirige hacia el sitio catalítico (Abrahams *et al.*, 1994). Muy cercano a este sitio se localizan las His-177 y la His-198. Estas histidinas de acuerdo a la secuencia de aminoácidos para la subunidad β de varias especies tipo F, se encuentran conservadas. En el caso de *Bacillus* PS-3 se encuentran las histidinas en la posición 179 y en la 200, las cuales se localizan en la entrada del tunel conico (Penefsky y Cross, 1991). Por medio de estudios de resonancia magnética nuclear (Tozawa *et al.*, 1995), se investigó la dinámica conformacional de ambas histidinas, observando que se ven afectadas por la temperatura, el pH y la utilización de un análogo del ATP el AMP-PNP; estos efectos podrían deberse a la unión de un hidrógeno en el grupo imidazol, al modificarse su carga por el pH. En *Saccharomyces cerevisiae*, se ha identificado a la β His-211 como importante para mantener la estructura del complejo catalítico de la enzima, cuando fue sustituida por cinco aminoácidos diferentes (Asp, Ile, Ala, Asn y Lys), y al considerarse las constantes cinéticas V_{max} y K_m para cada una de las cinco mutantes, bajo el efecto del pH, se observó modificado el pK de las mutantes con respecto a la enzima normal, lo que sugirió la importancia de este aminoácido para mantener la conformación activa de la enzima, al estabilizar la estructura terciaria de la F₁, aunque también, se comprobó que no se requiere para la catálisis (Schnizer y Schuster, 1996). De los estudios realizados con la His-177 de la MF₁, se sabe que se localiza en el asa P, rica en glicinas, que participa en la unión del nucleótido (Garboczi *et al.*, 1988) y que se encuentra muy cercano al sitio catalítico de acuerdo a la estructura cristalográfica (Abrahams *et al.*, 1994).

Nosotros observamos que la presencia o ausencia de la PI durante la hidrólisis de ATP e ITP, no modifica la K_m de la enzima ante el sustrato y por lo tanto no está relacionado con la formación del complejo enzima-sustrato (E-S). Aunque entre ambos sustratos, ya sea en las partículas mitocondriales controladas como en las activadas, se observan diferencias entre los sustratos que pueden deberse a una conformación distinta de la enzima al existir recambio de ATP o ADP en los sitios reguladores al hidrolizarse el ATP, que no existe con ITP.

De acuerdo a nuestros resultados podría ser una histidina la que influye en el pK observado a lo largo del perfil de pH. Respecto a los datos reportados en otras enzimas tipo F en la β His-177, podría tener la importancia de conservar la estructura de la conformación activa en la MF₁, como sucede con otras enzimas que mantienen conservada a esta histidina. Cabe mencionar que esta histidina

no interviene en la catálisis de formación del complejo enzima sustrato, debido a que no encontramos cambios en la K_m a lo largo del pH.

Por lo que sería muy interesante:

Obtener curvas de sustrato a diferentes temperaturas en ambos tipos de partículas submitocondriales, con ATP e ITP y estudiar más a fondo el efecto de la temperatura sobre las constantes cinéticas a diferente pH. Para poder hacer el seguimiento del efecto de los sitios reguladores.

Resultaría muy importante analizar el número de sitios reguladores ocupados en la enzima, por medio de sustratos marcados radiactivamente, para cada una de las preparaciones de partículas submitocondriales con las que se trabaja, lo cual permitiría tener un control y una visión más amplia del efecto de los sitios no catalíticos en la regulación.

Para poder detectar más precisamente el efecto del pH solo sobre la hidrólisis del ATP e ITP a partir de las curvas de sustrato a diferente pH, sin dejar de trabajar con el complejo F_0-F_1 sería muy adecuado, realizar estas determinaciones en un sistema más controlado, como la reconstitución del complejo F_0-F_1 en liposomas, o bien, en membranas unilaminares, lo cual evitaría tener grupos ionizables, no controlados, como en el caso de las partículas submitocondriales. Lo que nos permitiría trabajar con una concentración de enzima controlada, y poder calcular constantes cinéticas precisas.

Así, como el de medir el recambio en los sitios reguladores con los sustratos ATP e ITP a diferentes valores de pH tanto en la enzima con proteína inhibidora, como en ausencia de ésta.

VIII REFERENCIAS

1. Abrahams, J.P., Lutter, R., Todd, R.J., Raaij, M.J., Leslie, A.G.W. y Walker, J.E. (1993). Inherent asymetry of the structure of F_1 -ATPase from bovine heart mitochondria at 6.5 Å resolution. *EMBO. J.* 12, 775-1780.
2. Abrahams, J.P., Leslie, A.G.W., Lutter, R. y Walker, J.E. (1994). Structure at 2.8 Å resolution of F_1 -ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature.* 370, 621-628.
3. Allison W., Bullough, D.A. y Andrews W.W. (1986). Identification of esential residues in the F_1 -ATPase by chemical modification. *Methods in Enzimology* 126, 741-761.
4. Amzel, L. M., y Pedersen, P.L. (1983). Proton ATPases: structure and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* 52, 801-824.
5. Baubichon, H., Godinot, C., Di Pietro, A. y Gautheron, D.C. (1981). Competition between ADP and nucleotide analogues to occupy regulatory site(s) related to hysteretic inhibition of mitochondrial F_1 -ATPase. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 100, 1032-1038.
6. Bianchet, M., Ysern, X., Hüllihen, J., Pedersen, P.L. y Amzel, M. (1991). Quaternaty structure of F_1 moiety at 3.6 Å determined by X-ray diffraction analysis. *J. Biol. Chem.* 266, 21197-21201
7. Beltrán, C., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A. y Darszon, A. (1984). Release of the inhibitory action of the natural ATPase inhibitor protein on the mitochondrial ATPase. *Eur. J. Biochem.* 144, 151-157.
8. Boyer, P. (1989). A perspective of the binding chance mecanism for ATP synthesis. *FASEB. J.* 3, 2164-2178.
9. Bullough, D.A. y Allison, W.S. (1986 a). Three copies of the β subunit must be modified to achieve complete inactivation of the bovine mitochondrial F_1 -ATPase by 5'-*p*-fluorosulfonylbenzoyl adenosine. *J. Biol. Chem.* 261, 5722-5730.
10. Bullough, D.A. y Allison, W.S. (1986 b). Inactivation of the bovine heart mitochondrial F_1 -ATPase by 5'-*p*-fluorosulfonylbenzoyl [3 H] inosine is accompanied by modification of tyrosine 345 in a single β subunit. *J. Biol. Chem.* 261, 14171-14177.
11. Bullough, D.A. Verburg, J., Yoshida, M. y Allison, W.S. (1987). Evidence for functional heterogeneity among the catalytic site of the bovine heart mitochondrial F_1 -ATPase. *J. Biol. Chem.* 262, 11675-11683.

12. Bullough, D.A., Brown, E.L., Saario, J.D. y Allison, W.S. (1988). On the location and function of the noncatalytic sites on the bovine heart mitochondrial F_1 -ATPase. *J. Biol. Chem.* 263, 14053-14060.
13. Bullough, D.A. y Allison, W.S. (1989). Localization of sites modified during inactivation of the bovine heart mitochondrial F_1 -ATPase by quinacrine mustard using [3 H] anilina as a probe. *J. Biol. Chem.* 264, 9155-9163.
14. Cross, R.L. (1981). The mechanism and regulation of ATP synthesis by F_1 -ATPase. *Annu. Rev. Biochem.* 50, 681-714.
15. Cross, R.L. y Nalin, C.M. (1982). Adenine nucleotide binding sites on beef heart F_1 -ATPase. *J. Biol. Chem.* 257, 2874-2881.
16. Cross, R.L., Grubmeyer, C., y Penefsky, H. S. (1982). Mecanism of ATP hydrolysis by beef heart mitochondrial ATPase. *J. Biol. Chem.* 257, 12101-12105.
17. Cross, R.L., Cunningham, D., Miller, C.G., Xue, Z., Zhou, J-M., y Boyer, P.D. (1987). Adenine nucleotide binding sites on beef heart F_1 -ATPase: photoaffinity labeling of β -subunit Tyr-368 at a noncatalytic site and β Tyr-345 at a catalytic site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84, 5715-5719.
18. Dreyfus, G., Gómez-Puyou, A. y Tuena de Gómez-Puyou. (1981). Electrochemical gradient induced displacement of the natural ATPase inhibitor protein from mitochondrial ATPase as directed by antibodies against the inhibitor protein. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 100, 400-407.
19. Dreyfus, G. y Satre, M. (1984). The epsilon subunit as an ATPase inhibitor of the F_1 -ATPase in *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 229, 212-219.
20. Di Pietro, A., Penin, F., Godinot, C., y Gautheron, D.C. (1980). "Histeretic" behavior and nucleotide binding sites of pig heart mitochondrial F_1 adenosine 5'-triphosphatase. *Biochemistry.* 19, 5671-5678.
21. Di Pietro, A., Godinot, C. y Gautheron, D.C. (1981). Interaction between catalytic and regulatory site of mitochondrial F_1 adenosine-5'-triphosphatase as monitored by the differential effects of inhibitors and nucleotide analogues on the "histeretic" behavior of the enzyme. *Biochemistry.* 20, 6312-6318.
22. Dunn, S.D. (1980). ATP causes a large charge in the conformation of isolated α subunit of *Escherichia coli* F_1 -ATPase. *J. Biol. Chem.* 255, 11857-11860.
23. Dunn, S.D. y Futai, M. (1980). Reconstitution of a functional coupling factor from the isolated subunits of *Escherichia coli* F_1 -ATPase. *J. Biol. Chem.* 255, 113-118.
24. Ebel, R.E. y Lardy, H.A. (1975). Stimulation of rat liver mitochondrial adenosine triphosphatase by anions. *J. Biol. Chem.* 250, 191-196.

25. Edell, C.M., Hartog, A.F. y Berden, J.A. (1993). Identification of an exchangeable non-catalytic site on mitochondrial F_1 -ATPase which is involved in the negative cooperativity of ATP hydrolysis. *Biochem. Biophys. Acta.* 1142, 327-335.
26. Esch, F.S. y Allison, W.S. (1978). Identification of a tyrosine residue at a nucleotide binding site in the β subunit of the mitochondrial ATPase with *p*-fluorosulfonil [14 C]-benzoyl-5'-adenosine. *J. Biol. Chem.* 253, 6100-6106.
27. Falson, P., Di Pietro, A. y Gautheron, D.C. (1986). Chemical modification of thiol groups of mitochondrial F_1 -ATPase from the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 261, 7151-7159.
28. Fellous, G., Godinot, C. Baubichon, H., Di Pietro, A. y Gautheron, D.C. (1984). Photolabeling on β -subunit of the nucleotide site related to hysteretic inhibition of mitochondrial F_1 -ATPase. *Biochemistry.* 23, 5294-5299.
29. Ferguson, S.J., Lloyd, W.J., Lyons, M.H. y Radda, G.K. (1975). The mitochondrial ATPase. Evidence for a single essential tyrosine residue. *Eur. J. Biochem.* 54, 117-126.
30. Fersht, A. (1985). *Enzyme Structure and Mechanism*. Second Edition. Freeman. 466 p.
31. Fillingame, R. H. (1980). The proton-translocation pumps of oxidative phosphorylation. *Annu. Rev. Biochem.* 49, 1079-1113.
32. Fillingame, R. H. (1992). Subunit *c* of $F_1 F_0$ ATP synthase: structure and role in transmembrane energy transduction. *Biochim. Biophys. Acta.* 1101, 240-243.
33. Frangione, B., Rosenwasser, E., Penefsky, H.S. y Pullman, M.E. (1981). Amino acid sequence of the protein inhibitor of mitochondrial adenosine triphosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 7403-7407.
34. Futai, M., Sternweis, P.C. y Heppel, L.A. (1974). Purification and properties of reconstitutively active and inactive adenosinetriphosphatase from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 71, 2725-2729.
35. Futai, M. (1977). Reconstitution of ATPase activity from the isolated α , β , and γ subunits of the coupling factor, F_1 , of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 79, 1231-1237.
36. Futai, M., Nuomi, T. y Maeda, M. (1989). ATP synthase (H^+ -ATPase): Result by combined biochemical and molecular biological approaches. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 111-136.
37. Futai, M., Park, M.-Y., Iwamoto, A., Omote, H. y Maeda, M. (1994). Catalysis and energy coupling of H^+ -ATPase (ATP synthase): molecular biological approaches. *Biochim. Biophys. Acta.* 1187, 165-170.
38. Garboczi, D.N., Shenbagamurthi, P., Kirk, W., Hullihen, J. y Pedersen, P.L. (1988). Interaction of a synthetic 50-amino acid, β -subunit peptide with ATP. *J. Biol. Chem.* 263, 812-816.

39. Grant, W.D. (1987). The enigma of the alkaliphile. *Microbiol. Sci.* 4, 251.
40. Gómez-Puyou, A., Tuena de Gomez-Puyou, M. y Ernster, L. (1979). Inactive to active transitions of the mitochondrial ATPase complex as controlled by the ATPase inhibitor. *Biochem. Biophys. Acta.* 547, 252.
41. Gornall, A.G., Bardawill, C.J. y David, M.M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 77, 751-766.
42. Gresser, M.J. Myers, J.A. y Boyer, P.D. (1982). Catalytic site cooperativity of beef heart mitochondrial F_1 adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 257, 12030-12038.
43. Grubmeyer, C., y Penefsky, H.S. (1981). Cooperativity between catalytic site in the mechanism of action beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 256, 3728-3734.
44. Guerrieri, F., Zanotti, F., Capozza, G., Colaianni, G., Ronchi, S. y Papa, S. (1991). Structural and functional characterization of subunits of the F_0 sector of the mitochondrial F_0F_1 -ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1059, 348-354.
45. Hatefi, Y. (1985). The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Ann. Rev. Biochem.* 54, 1015.
46. Jencks, W.P. (1975). Utilization of binding energy and coupling roles for active transport and other coupled vectorial processes. *Methods. Enzymol.* 171, 145-164.
47. Jackson, P.J. y Harris, D.A. (1988). The mitochondrial ATP synthase inhibitor protein binds near the C-terminus of the F_1 β -subunit. *FEBS. Lett.* 229, 224-228.
48. Kagawa, Y., Sone, N., Yosida, M., Hirata, H. y Okamoto, H. (1976). Proton-translocating ATPase of a thermophilic bacterium. Morphology, subunits, and chemical composition. *J. Biochem.* 80, 141-151.
49. Kagawa, Y. y Nukiwa, N. (1981). Conversion of stable ATPase to labile ATPase by acetylation, and the $\alpha\beta$ and $\alpha\gamma$ subunit complexes during its reconstitution. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 100, 1370-1376.
50. Khananshvil, D. y Gromet-Elhanan, Z. (1985). Evidence that the Mg-dependent low affinity binding site for ATP and Pi demonstrated on the isolated β subunit of the F_0F_1 ATP synthase is a catalytic site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82, 1886-1890.
51. Kanazawa, H., Nuomi, T., Futai, M. y Nitta, T. (1983). *Escherichia coli* mutants in the γ subunit of proton-translocating ATPase: intracistronic mapping of the defective site and the biochemical properties of the mutants. *Arch. Biochem. Biophys.* 223, 521-532.

52. Kasho, V.N. Allison, W.S. y Boyer, P.D. (1993). Study of the mechanism of MF_1 atpase inhibition by Fluorosulfonyl inosine, quinacrine mustard, and efrapeptin usin intermediate ^{18}O exchange as a probe. Arch. Biochem. Biophys. 300, 293-301.
53. Kimura, T., Nakamura, K., Kajiura, H., Hattori, H., Nelson, N. y Asahi, T. (1989). Correspondence of minor subunits of plant mitochondrial F_1 -ATPase to F_0F_1 -ATPase subunits of other organism. J. Biol. Chem. 264, 3183-3186.
54. Kironde, F., y Cross, R.L. (1987). Adenine nucleotide binding sites on beef heart F_1 -ATPase. J. Biol. Chem. 262, 3488-3495.
55. Klein, G., Satre, M., Dianoux, A.C. y Vignais, P.V. (1980). Radiolabeling of natural adenosine triphosphatase inhibitor with phenyl (^{14}C) isothiocyanate and study of its interaction with mitochondrial adenosine triphosphatase. Localization of inhibitor binding sites and stoichiometry of binding. Biochemistry 19, 2919-2925.
56. Lebowitz, M. S. y Pedersen, P. L. (1996). Protein inhibitor of mitochondrial ATP synthase: Relationship of inhibitor structure to pH-dependent regulation. Arch. Biochem. Biophys. 330, 342-354.
57. Lee, C.P. y Ernster, L. (1967). Energy-coupling in nonphosphorylating submitochondrial particles. Methods. Enzymol. 10, 543-548.
58. Lehninger, A. L. (1993). Principles of Biochemistry W.A. Benjamin. N.Y. 1013 p.
59. Löw, H. y Valin, J. (1963). Succinate-linked diphosphopyridine nucleotide reduction in submitochondrial particles. Biochim. Biophys. Acta 69, 361-374.
60. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
61. Lunardi, J. y Vignais, V. (1979). Adenine nucleotide binding site in chemically modified F_1 -ATPase inhibitory effect of 4-chloro-7-nitrobenzofurazan on photolabeling by arylazido nucleotides. FEBS. Lett. 102, 23-28.
62. Lutter, R., Abrahams, J.P., Raaij, M.J. van, Todd, R.J., Lundqvist, T., Buchanan, S.K., Leslie A.G.W. y Walker, J.E. (1993). Crystallization of F_1 -ATPase from bovine heart mitochondria. J. Mol. Biol. 229, 787-790.
63. Mitchell, P. (1965). Stoichiometry of proton translocation through the respiratory chain adenosine triphosphatase system phosphorylation. Nature. 208, 147-151.
64. Mitchell, P. (1966). Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. Biol. Rev. Camb Philos Soc. 41, 445-502.

65. Moradi-Ameli, M. Julliard, J.H. y Godinot, C. (1989). Inhibition of mitochondrial F_1 -ATPase activity by anti- α subunit monoclonal antibody which modifies interactions between catalytic and regulatory sites. *J. Biol. Chem.* 264, 1361-1367.
66. Nalin, C.M., Snyder, B., McCarthy, R.E. (1985). Selective modification of an α subunit of chloroplast coupling factor I. *Biochemistry.* 24, 2318-2324.
67. Penefsky, H. S. (1979). Mitochondrial ATPase. *Adv. Enzymol.* 49, 223-280.
68. Penefsky, H. S. (1985). Energy-dependent dissociation of ATP from high affinity catalytic sites of beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 260, 13735-13741.
69. Penefsky H.S., y Cross, R.L. (1991). Structure and mechanism of F_0F_1 -type ATP synthases and ATPases. *Adv. Enzymol.* 64, 173-214.
70. Perlin, D.S., Latchney, L.R., Wise, J.G. y Senior, A.E. (1984). Specificity of the proton adenosinetriphosphatase of *Escherichia coli* for adenine, guanine, and inosine nucleotides in catalysis and binding. *Biochemistry.* 23, 4998-5003.
71. Pougeois, R., Satre, M.y Vignais, P.V. (1979). Reactivity of mitochondrial F_1 -ATPase to dicyclohexylcarbodiimide. Inactivation and binding studies. *Biochemistry.* 18, 1408-1413.
72. Pullman, M.E., Penefsky, H. S, Datta, A. y Racker, E. (1960). Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 235, 3322-3329
73. Pullman, M.E. y Monroy, G.C. (1963). A naturally occurring inhibitor of mitochondrial adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 238, 3762-3769.
74. Sah, J.F., Kumar, C. y Mohanty P. (1993). pH dependent conformational changes modulate functional activity of the mitochondrial ATPase inhibitor protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194, 1521-1528.
75. Schnizer, R.A., y Schuster, S.M. (1996). Mutations at histidine 211 of the yeast F_1 -ATPase β -subunit affect the stability and assembly of the ATPase and the structure of the active site. *Arch. Biochem. Biophys.* 326, 126-136.
76. Schnizer, R.A., Vann Hecke, G., Amatore, D. y Schuster, S.M. (1996). Histidine-49 is necessary for the pH-dependent transition between active and inactive state of the bovine F_1 -ATPase inhibitor protein. *Biochim. Biophys. Acta.* 1292, 241-248.
77. Schwerzmann, K. y Pedersen, P.L. (1986). Regulation of the mitochondrial ATP synthase/ATPase complex. *Arch. Biochem. Biophys.* 250, 1-18.

78. Schuster, S.M., Ebel, R.E. y Lardy, H.A. (1975). Kinetic studies on the rat liver heart mitochondrial ATPase. *J. Biol. Chem.* 250, 7848-7853.
79. Slater, E.C., Kemp, A., Van Der Kraan, I. Muller, J.L. M., Rovcri, O.A., Verschoor, G.J., Wagenvoord, R.J. y Wielders, J.P.M. (1979). The ATP and ADP binding in mitochondrial coupling F_1 and their possible role in oxidative phosphorylation. *FEBS Lett.* 103, 7-11.
80. Segel, I.H. (1976). *Cálculos de Bioquímica*. Ed. Reverte. España. 275-412.
81. Senior, A.E. (1988). ATP synthesis by oxidative phosphorylation. *Physiol. Rev.* 68, 178-231.
82. Smith, A.R., Latchney, L.R. y Senior, A.E. (1985). Tight divalent metal binding to *Escherichia coli* F_1 -adenosinetriphosphatase. *Biochemistry.* 24, 4490-4494.
83. Sutton, R y Ferguson, S.J. (1985). Identification of an essential β chain lysine residue from bovine heart mitochondrial ATPase specifically modified with nitrobenzofurazan. *FEBS Lett.* 179, 283.
84. Strayer, L. (1992). *Bioquímica*. Freeman. 3ª Edición 183-289, 321-336, 403-432.
85. Sumner, J.B. (1944). A methods for the colorimetric determination of phosphorus. *Science.* 2601, 413-414.
86. Tager, J. M., Wanders, R.J.A., Groen, A. K., Kunz, W., Bohnsack, R., Küster, U., Letko, G., Böhme, G., Duszynski, J y Wojtczak, L. (1983). *FEBS Lett.* 151, 1-9.
87. Tiedge, H., Schäfer, G. y Mayer, F. (1983). An electron microscopic approach to the quaternary structure of mitochondrial F_1 -ATPase. *Eur. J. Bioch.* 132, 37-45.
88. Tozawa, K., Sekino, N., Soga, M., Yagi, H., Yoshida, M. y Akutsu, H. (1995). Conformational dynamics monitored by His-179 and His-200 of isolated thermophilic F_1 -ATPase β subunit which reside at the entrance of the "conical tunnel" in holoenzyme. *FEBS Lett.* 376, 190-194.
89. Trevan, M.D. (1989). *Principios de Biotecnología*. Acribia. España.
90. Tuena de Gómez-Puyou., Nordenbrand, K., Muller, U., Gómez-Puyou, A. y Ernster, L. (1980). The interaction of mitochondrial F_1 -ATPase with the natural ATPase inhibitor protein. *Biochim. Biophys. Acta.* 592, 385-395.
91. Tuena de Gómez-Puyou., M., Muller, U., Dreyfus, G., Ayala, G. y Gómez-Puyou, A. (1983). Regulation of the synthesis and hidrolisis of ATP by mitochondrial ATPase. *J. Biol. Chem.* 258, 13680-13684.
92. Vasilyeva, E. Minkov, I.B., Fitin, A. y Vinogradov A.D. (1982). Kinetic mechanism of mitochondrial adenosin triphosfatase. *Biochem. J.* 202, 9-14.

93. Walker, J.E., Saraste, M. y Gay, N.J. (1984). The unc operon. Nucleotide sequence, regulation and structure of ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta.* 768, 164-200.
94. Walker, J.E., Lutter, R., Dupuis, A. y Runswick, M.J. (1991). Identification of the subunits of F_0F_1 -ATPase from bovine heart mitochondria. *Biochemistry.* 30, 5369-5378.
95. Wikström, M. y Saraste, M. (1984). The mitochondrial respiratory chain. *Bioenergetics. Ernter.* 3, 49-94.
96. Wise, J.G. y Senior A.E. (1985). Catalytic properties of *Escherichia coli* proton-adenosine triphosphatase: evidence that nucleotide bound at noncatalytic sites is not involved in regulation of oxidative phosphorylation. *Biochemistry.* 24, 6949-6954.
97. Wong, S.Y., Galante, Y.M. y Hatefi, Y. (1982). Equilibrium binding of ^{125}I -labeled adenosinetriphosphatase inhibitor protein to complex V of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *Biochemistry.* 21, 5781-5786.
98. Yoshida, M. Okamoto, H., Sone, N., Hirata, H. y Kagawa, Y. (1977). Reconstitution of thermostable ATP-ase capable of energy coupling from its purified subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74, 936-940.