



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Por medio del presente, se
informa que se ha
realizado el
trabajo

AL:

**Estudios sobre la actividad ATPasa de la F_1F_0
ATP-sintasa del alga cloroficea incolora *Polytomella sp.***

Realizado por

la estudiante de

para optar por el título de LICENCIADA EN

Realizado en el

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA BÁSICA

PRESENTA

ALEXA VILLAVICENCIO QUEIJEIRO

DIRECTOR DE TESIS: DR. DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
SECRETARÍA DE SERVICIOS ESCOLARES

ACUSE DE CITATORIO

Por medio del presente, los miembros designados como jurado para el examen profesional que tendrá lugar el día 28 de agosto del año en curso a las 12:00 horas en el Auditorio 2 del Edificio de Biofísica y Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, de la alumna:

ALEXA VILLAVICENCIO QUEJEIRO

quien presenta la tesis titulada:

"Estudios sobre la actividad ATPasa de la F₁F₀, ATP-Sintasa del alga clorofícea incolora *Polytomella* sp".

Dirigida por el Dr. Diego González Halphen.

Para optar por el título de: LICENCIADA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

Hacemos constar que hemos recibido la notificación para participar en éste como:

Presidente


Dr. Juan Pablo Pardo Vazquez

Secretario


Dr. Diego González Halphen

Vocal


Dr. Rafael Camacho Carranza

Suplente


Dra Xóchitl Pérez Martínez

Suplente


Dr. Alejandro Sosa Peinado

01220080010

A mi abuelita, la última corcajada de la cumbancho...

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser mi casa estos casi 6 años, por darme todo y más de lo que podría haber esperado, porque soy orgullosamente Puma.

A los miembros de mi jurado, gracias por sus comentarios, por la crítica constructiva, por la disposición, por su tiempo y por ayudarme a mejorar mi trabajo. Gracias al Doctor Juan Pablo Pardo, al Doctor Rafael Camacho, a la Doctora Xóchitl Pérez y al Doctor Alejandro Sosa.

Gracias a mi familia: a mi prunti y a mi papá, por ser mi ejemplo de vida, por ser mi apoyo, por dejarlo y darlo todo por mí y por James, Manse y Aline. Por dejarme ser, sin presión. Por estar para mí hasta cuando ni yo quiero..

A mis hermanitas: James, ¿qué haría sin ti?. Gracias por ser mi hermana, mi consciencia, por estar ahí SIEMPRE. Mansita, gracias por todo lo que he aprendido de ti, por darme ánimos y tanto cariño, por hacer locuras.. Aflicrates, gracias por ser mi herba, por cuidarme, por aguantarme y preocuparte por mí. A las tres por demostrarme que puedo lograr lo que me proponga, por darme la certeza de que me puedo levantar..

Cynthia: Gracias por ser también mi hermanita, por los ánimos continuos, por escucharme y estar ahí cuando ni yo me comprendo, gracias por las teorías, por el "seré una buena semana", por Argentina, por todos estos años!!!

Gracias Lant, lo sabes, ¿no?, gracias por apoyarme, por creer en mí, por estar ahí siempre, no sería la persona que soy sin ti..

Creo que el ser de biomédicas me brindó la oportunidad de conocer tantas personas geniales en estos años, quiero agradecerles a todas ellas: Al Doctor Sánchez por abrirme las puertas en primer año; gracias a Silvita, Ruthila, Laurita y Alonzo por hacer soportable lo insoportable. Gracias al Doctor Pardo, porque ahí comencé mi amor a los "mitos", gracias Erick, por... tanto, tú sabes :), gracias por todo lo que me enseñaste, por aguantarme, por reírte conmigo y también por la confianza. Gracias a Oscar, por el reto, por el pasado y por lo que venga... a Isabel y Genaro por darme un segundo año genial!

Gracias a los Amigos!! A la Doctora Clorinda por la confianza, a Paty, Eari, Perla, Ricardo, Rigoberto y Michael por ayudarme siempre, por la amistad, por que cal "en blandito". Gracias Octavio, por tenerme paciencia y aguantar!! Por enseñarme tanto, por ser tú.. (Arriba los pumas! Ah, no se me olvidan las muertas..)

Y de forma extraña llegué al 324N.. Doctor D., ya trané la chinampina, ahora sí!! Ya estuve.. No tengo cómo agradecerle todo, el haberme adoptado, el tomar el riesgo conmigo, el dejarme echar a perder y al mismo tiempo crecer, el tenerme confianza, Gracias, en verdad, no sabe cuántas..

Gracias Miriam, por perder el cuscus a los biomédicas (espero) conmigo, por enseñarme tanto y ayudarme siempre, por la jaiba, el mezcál, el baile, la camaradería y la cercanía.

Gracias Aracelita por ayudarme desde el principio y siempre tener paciencia y una sonrisa :) Alain, perrado no.. nunca! Gracias por la confianza, las risas con el Toño (no lo visualices en bata), el café, las pláticas, ya sabes.. Gordos: Valentín, Chava y Chare, gracias por todas las construcciones, jajiji incluidas el aplanado y el tiral.. gracias por la amistad, la risa, por aguantarme y soportar la castróloga.

Héctor, fifififa (¿me salió bien?), jajaje gracias por el zumo, el frozen bubble, por ser amigable, amable y siempre ayudarme con mis dudas, no sólo computacionales. Luisinho, siempre animoso (contra todo pronóstico) y dispuesto a ayudar. Adelmira, gracias por ser amigable conmigo desde el principio, por las pláticas en el puente, la confianza, los ánimos y la ayuda. Elizabeth gracias por las galletas jajiji, pero más que eso, por ser toosss amable, por ayudarme con los asuntos Gre-toefloos, gracias.

Sergio, Dr Guerrero jeeje, gracias por ayudarme con mis dudas, con la segunda (bendita) dimensión, por los bailes (nomás tantito) y por hacer divertido el labo.

Paco, gracias por abrir la puerta y dejarme entrar. Gracias por tenderme la mano cuando las cosas andan mal, por estar ahí, gracias por los conicos, sobre todo los azules :)

Señor Alfredo! GRACIAS infinitas, por estar siempre ahí echándome la mano y evitando que me metiera hasta el fondo de la autoclave, por cuidarme y estar siempre dispuesto a ayudar. Choyito, gracias por el cotarrea, el cafecito del lunes, los chocolates, los pastelitos... básicamente gracias por la amistad.

Siempre he creído que los amigos son la familia que uno escoge, y tengo mucha suerte, porque en estos 5 años me hice de una familia muy grande: Amandita, Aypé, Marianita, Raquel, Boris, Oswi, David, Omar y Pablo; gracias a todos ustedes por quererme como soy, por darme ánimos siempre, sobre todo en éste último año (punto Viagra jijiji), porque creo que nuestra generación no hubiera sido igual sin ustedes. Gracias Oswi y Aypé por la complicidad, el chisme, las comidas y básicamente sacarme de mi hostilidad...

Soy una mujer muy afortunada por tener tanta gente en mi vida a la que quiero y que me quiere, de la que he aprendido tanto y que me han ayudado ha ser la persona que soy, no hubiera sido igual sin todos ustedes.

Gracias.

CONTENIDO

ABREVIATURAS

RESUMEN 1

I. INTRODUCCIÓN

- 1. 1 Las Mitocondrias 3
- 1. 2 La cadena respiratoria 4
- 1. 3 El complejo V o ATP sintasa 6
- 1. 4 Las algas clorofíceas 7
- 1. 5 Estructura de la ATP sintasa de las algas clorofíceas 8

II. JUSTIFICACIÓN 13

III. OBJETIVO 13

IV. RESULTADOS

- 4. 1 Evaluación de la actividad de ATPasa 15
- 4. 2 Evaluación de la actividad de ATPasa en presencia de detergentes 16
- 4. 3 Determinación de la I_{50} de oligomicina 20
- 4.4 Evaluación de la actividad de ATPasa en función de concentraciones crecientes de taurocolato 22
- 4.5 Comparación de la actividad dímero-monómero- F_1 en presencia y ausencia de detergentes 23
- 4.6 Ensayos de proteólisis parcial 27
 - 4. 6. 1 Subtilisina 28
 - 4. 6. 2 Tripsina 29
 - 4. 6. 3 Termolisina. 30
 - 4. 6. 4 Pronasa E 31
 - 4. 6. 5 Quimotripsina 32
 - 4. 6. 6 Tabla de resumen de efecto de proteasas 33
- 4.7 Evaluación de la proteólisis por quimotripsina en geles nativos y desnaturalizantes 34
- 4.8 Evaluación de la actividad de ATPasa en el dímero y el monómero proteolizados 37

V. DISCUSIÓN	40
VI. CONCLUSIONES	44
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Cultivo de <i>Polytomella</i> sp	46
2. Obtención de las mitocondrias	47
3. Purificación de la ATP sintasa	47
4. Geles	
4. 1 Geles nativos	49
4. 2 Geles desnaturalizantes de segunda dimensión	51
4. 3 Geles de Tricina – SDS	51 4. 4
Geles de Glicina – SDS	52
5. Ensayos de proteólisis	52
6. Medición espectrofotométrica de la actividad de ATPasa	53
7. Medición <i>in gel</i> de la actividad de ATPasa	54
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
8.1 Artículos	
8.2 Páginas de internet	
8.3 Libros	

ABREVIATURAS

ASA	siglas en inglés de proteína asociada a la ATP sintasa
BN-PAGE	siglas en inglés de electroforesis nativa en geles de poliacrilamida
C₁₂E₈	detergente monodecileter de octaetileno glicol
DMG	detergente decanoil metil glucamida
DMSO	dimetil sulfóxido
DS	detergente dodecanoil sacarosa
FADH	flavin adenín dinucleótido (reducido)
GP	detergente O-β-D-glucopiranosido
LM	detergente n-dodecil β-D-maltósido
NADH	nicotinamida adenín dinucleótido (reducido)
OMG	detergente octanoil metil glucamida
PMSF	fluoruro de fenil metil sulfonilo
SDS-PAGE	siglas en inglés de electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida
T₂₀	detergente Tween 20
T₈₀	detergente Tween 80
TX₁₀₀	detergente Triton X-100
TX₁₁₄	detergente Triton X-114
TLCK	cetona de tosil lisil clorometilo

RESUMEN

La F_1F_0 -ATP sintasa mitocondrial o complejo V es una enzima que se encuentra unida a la membrana y juega un papel esencial en la fosforilación oxidativa. La fosforilación oxidativa en todas las células depende de la síntesis de ATP por la ATP sintasa, cuya estructura catalítica, es decir la del dominio F_1 , está bien establecida. Aunque la enzima funciona en su estado monomérico, existe evidencia de que los monómeros pueden interactuar para formar un supercomplejo dimérico en las mitocondrias en el caso de algunos mamíferos y algunas plantas.

La ATP sintasa mitocondrial de las algas clorofíceas es un complejo dimérico de características únicas; posee las subunidades canónicas catalíticas pero no presenta las subunidades clásicas del estator periférico y las subunidades ortodoxas involucradas en la dimerización. En lugar de las subunidades clásicas contiene nueve polipéptidos en el rango de 10 a 61 kDa que no tienen contraparte en otras ATP sintasas mitocondriales y cuyo origen evolutivo es hasta la fecha desconocido.

En este trabajo se evaluó la actividad de ATPasa de la ATP sintasa de *Polytomella* sp. y el efecto sobre la misma de detergentes y proteasas. Se encontró que la enzima dimérica presenta de manera basal una actividad hidrolítica sumamente pequeña que se incrementa al tratar a la enzima con algunos detergentes no iónicos y con proteasas.

Al valorar la susceptibilidad de la enzima a diversas proteasas, se determinó que las subunidades que se degradan mayoritariamente son ASA3, β , ASA1 y δ . Con menor grado de susceptibilidad, α , ASA2, ASA4 y γ . De manera notable la estructura dimérica es altamente resistente al corte por proteasas, lo que no sucede con la estructura monomérica; lo anterior lleva a concluir que el dímero de la ATP sintasa de *Polytomella* sp. es una estructura compleja con una estabilidad muy alta y que podría estar finamente regulada desde el punto de vista funcional.

I. INTRODUCCIÓN

1. LAS MITOCONDRIAS

Las mitocondrias son quizá los organelos mejor estudiados que están presentes en la gran mayoría de las células eucariontes. Fueron descritas de manera notable en el siglo XIX por Kolliker y Fleming. En 1890 Altman, utilizando verde Jano, logró teñirlas para estudiarlas.

Las mitocondrias son las encargadas de proporcionar a la célula la mayor parte de su energía, tienen la capacidad de oxidar diversos sustratos metabólicos, vía el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la cadena respiratoria y eventualmente dar lugar a la síntesis de adenosín trifosfato (ATP), produciendo así la energía química necesaria para los procesos metabólicos.

Se sabe que las mitocondrias y los cloroplastos presentan un genoma propio, son capaces de dividirse y no se generan *de novo*, además de que cuentan con toda la maquinaria para llevar a cabo la síntesis de algunas proteínas. Las mitocondrias están presentes en mayor número en aquellas células que están metabólicamente muy activas y tienen un mayor requerimiento de energía, como es el caso de los tejidos muscular y cardíaco.

Se piensa que las mitocondrias tuvieron su origen a partir de la endosimbiosis entre una α proteobacteria y su hospedero, el cual pudo haber sido un procarionte o una arquea (Margulis, 1970; Müller y Martin, 1999).

Las mitocondrias, al igual que las bacterias gram-negativas, tienen dos membranas (figura 1). La membrana mitocondrial externa es permeable a moléculas pequeñas ($M_r < 5000$) e iones. La membrana interna es impermeable a la mayoría de moléculas pequeñas e iones, incluido el protón (H^+); las únicas especies que cruzan la membrana interna son aquellas para las que existen transportadores específicos. La membrana interna aloja los componentes de la cadena respiratoria y a la ATP sintasa, mientras que en la matriz mitocondrial se encuentran las moléculas de DNA, los ribosomas y una gran cantidad de enzimas solubles.

La membrana interna se pliega para dar lugar a las crestas mitocondriales, las cuales difieren en tamaño, forma y número, no sólo en diferentes células, sino también en la misma célula, dependiendo de su estadio funcional.

La presencia de las membranas da lugar a dos compartimentos: el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial. La matriz mitocondrial contiene el complejo de la piruvato deshidrogenasa y las enzimas del ciclo del ácido cítrico, de la ruta de la β -oxidación de los ácidos grasos y de las rutas de oxidación de los aminoácidos, es decir, todas las rutas de oxidación de combustibles, excepto la glucólisis.

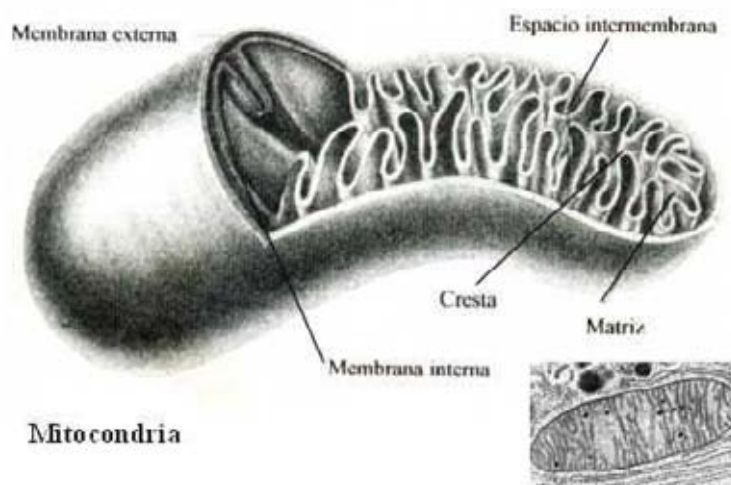


Figura 1. Estructura de las invaginaciones de la mitocondria, se puede observar la membrana externa así como las crestas. (Tomado de <http://laborwoman.blogspot.com>)

2. LA CADENA RESPIRATORIA

La cadena respiratoria mitocondrial consta de una serie de transportadores de electrones que actúan secuencialmente, la mayoría de los cuales son proteínas oligoméricas integrales de membrana con grupos prostéticos capaces de aceptar y donar uno o dos electrones. Ver figura 2.

La oxidación de los sustratos se lleva a cabo en la membrana interna mitocondrial, mediante cuatro complejos enzimáticos multiméricos que se encuentran embebidos en ésta. Estos complejos enzimáticos cuentan con grupos prostéticos, tales como el grupo hemo o las flavinas, y son capaces de llevar a cabo reacciones de óxido-reducción. De esta forma, se transfieren electrones entre los diferentes complejos a partir de sustratos reductores tales como el NADH, el succinato y el FADH₂. Estas moléculas provienen de diferentes rutas metabólicas, principalmente del ciclo de Krebs.

Los transportadores de electrones de la cadena respiratoria se pueden separar físicamente de la bicapa lipídica, mediante el tratamiento de la membrana interna mitocondrial con detergentes suaves, lo cual permite la resolución de cuatro complejos distintos, siendo cada uno de ellos capaz de catalizar la transferencia de electrones a través de una porción de la cadena.

La transferencia de electrones se lleva a cabo de la siguiente manera:

El complejo I, también llamado NADH:ubiquinona oxidoreductasa o NADH deshidrogenasa cataliza dos procesos forzosamente acoplados: la transferencia exergónica de dos electrones del NADH hacia la ubiquinona y

simultáneamente la transferencia de cuatro protones de la matriz hacia el espacio intermembranal. Éste complejo es el más grande, en mamíferos posee entre 38 y 43 subunidades, mientras que en las bacterias sólo cuenta con 13 subunidades.

El complejo II o succinato deshidrogenasa, es más sencillo y pequeño que el complejo I, contiene cinco grupos prostéticos de dos tipos y cuatro subunidades proteicas diferentes. Cataliza la transferencia de electrones del succinato a la poza de quinonas. Esta enzima cuenta con cuatro subunidades de las cuales dos son hidrofílicas y dos son membranales.

El complejo III, ubiquinona:citocromo *c* oxidorreductasa o complejo bc₁ acopla la transferencia de electrones desde el ubiquinol (QH₂) al citocromo *c* con el transporte vectorial de protones de la matriz al espacio intermembranal. El mecanismo de transporte de electrones acoplado a la translocación de protones, es conocido como el ciclo Q. La enzima mitocondrial cuenta con once subunidades.

Finalmente, el complejo IV o citocromo *c* oxidasa transporta electrones desde el citocromo *c* al oxígeno molecular, reduciéndolo a agua. Este complejo es muy grande, posee trece subunidades en los mamíferos y en las bacterias está presente una forma más sencilla, con sólo tres o cuatro subunidades.

Con excepción del complejo II, los demás complejos bombean protones durante la transferencia de electrones, los cuales forman un gradiente electroquímico que es utilizado para la síntesis de ATP por la ATP sintasa o complejo V.

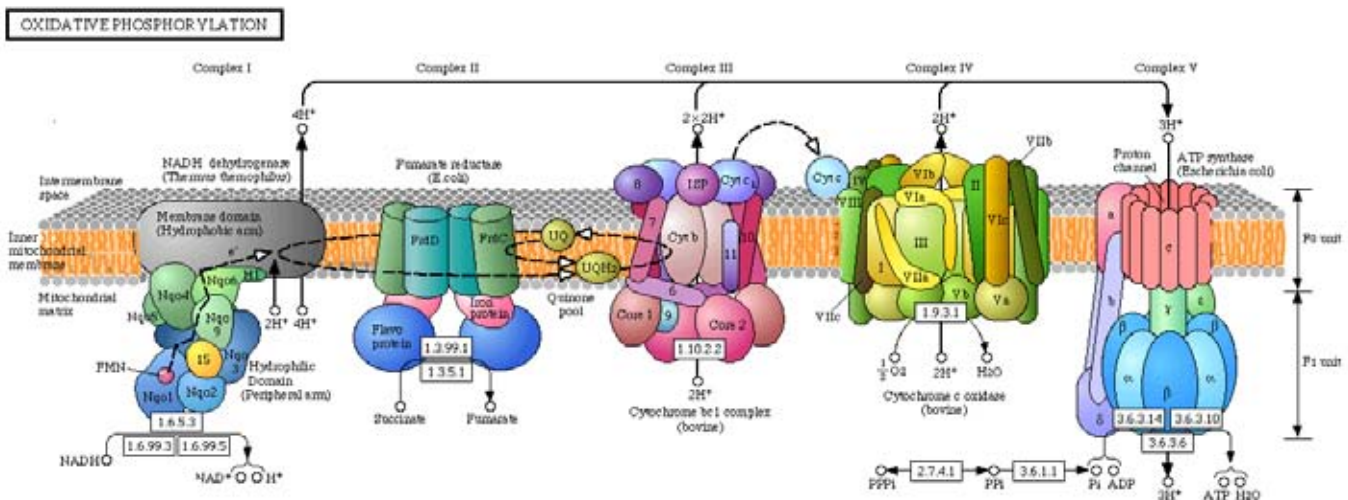


Figura 2. Cadena respiratoria; cuatro complejos supramoleculares transportan electrones de las moléculas reductoras hasta el oxígeno, formando un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana interna mitocondrial, que es utilizado por la ATP sintasa para sintetizar ATP. Tomado de <http://www.genome.d.jp/kegg/pathway.html>

3. ATP SINTASA

De manera significativa, las ATP sintasas de transporte se encuentran en los animales, las plantas y las bacterias. Existen varios tipos: P, F, V y ABC (Pedersen and Carafoli 1987; Pedersen 2002, 2005). Presentan tres características en común: existen en las membranas biológicas, hidrolizan ATP y transportan por lo menos una sustancia a través de una membrana biológica, a expensas de la hidrólisis de ATP. Son consideradas de hecho, nano-máquinas (tipos P y ABC) o dobles nano-máquinas (tipos F y V). La principal función de las ATP sintasas de transporte es llevar a cabo el tráfico de sustancias necesarias para las células.

En la mayoría de las células aeróbicas, las ATP sintasas tipo F, llamadas también F_1F_0 , funcionan no sólo como ATP sintasas, sino también como ATP sintasas (Pedersen 2005; Stock et. al. 2000). Esto es, que sintetizan ATP a partir de ADP y P_i en presencia de Mg^{++} , en respuesta a un gradiente electroquímico de protones, que se genera por la cadena de transporte de electrones.

Las ATP sintasas se localizan en la membrana interna de las mitocondrias y las bacterias y en la membrana tilacoidal de los cloroplastos en las plantas. Se ha reportado que algunas subunidades de la ATP sintasa pueden encontrarse en la superficie de células endoteliales, pero el papel fisiológico de dichos péptidos no es del todo claro (Moser et al. 1999; Kenan and Wahl 2005).

La F_1F_0 -ATP sintasa mitocondrial o complejo V es una enzima que se encuentra unida a la membrana y juega un papel esencial en la fosforilación oxidativa. Esta enzima está constituida por dos dominios de varias subunidades, una fracción soluble denominada F_1 y la porción asociada a la membrana, F_0 (base y estator periférico), que contiene la zona por donde se translocan los protones y que se piensa es el estator mecánico (Alfonzo et al., 1981). Es también un motor molecular en el cual un rotor central [$\gamma/\delta/\epsilon/c_{10}$] (subunidades de bovino) rota alrededor de un eje de manera perpendicular al plano de la membrana, mientras que otros polipéptidos dan lugar a los elementos fijos del estator, la subunidad a , el centro catalítico [$\alpha\beta/\beta\beta$], el brazo periférico [OSCP/ $b/d/F_6$] y las llamadas subunidades menores [A6L/ $e/f/g$] (Golden y Pedersen, 1998; Ko et al., 2000; Walker y Dickson, 2006).

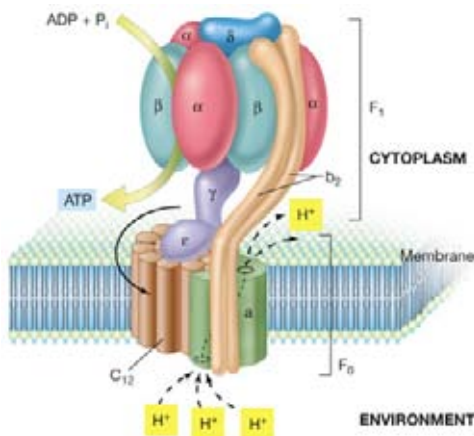
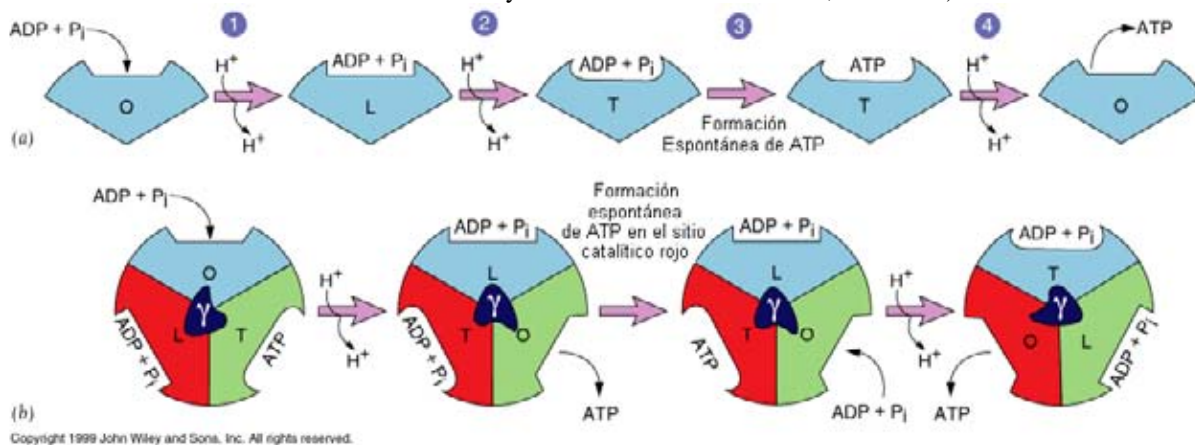


Figura 3. La estructura de la ATP sintasa bacteriana, la más sencilla

conocida.

El flujo de protones a través de la subunidad a ocasiona la rotación del anillo de subunidades c_{10} , que están embebidas en la membrana y de las cuales protruye el eje central $[\gamma/\delta/\epsilon]$. En un ciclo completo, tres movimientos secuenciales de 120° de la subunidad γ inducen cambios conformacionales consecutivos en las tres subunidades β , lo que conlleva a la unión del sustrato (ADP + P_i), la síntesis de ATP y la liberación de ATP (Itoh et al., 2004) (ver Figura 4). Otras subunidades adicionales juegan un papel regulatorio, como es el caso de la proteína inhibidora IF_1 (Gledhill y Walker, 2005); o están implicadas en la formación y estabilización del complejo dimérico, como es el caso de las subunidades e y g (Brunner et al., 2002; Fronzes et al., 2006).

Figura 4. Modelo de la catálisis de la ATP sintasa en sus tres sitios catalíticos. (Modificado de Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level, 3ª edición)



4. LAS ALGAS CLOROFÍCEAS

Las algas verdes se asemejan a las plantas superiores en que tienen clorofila y almidón como material de reserva. La mayoría son unicelulares o coloniales y dominan una buena parte de los hábitats de agua dulce.

Chlamydomonas reinhardtii es un alga clorofícea biflagelada, cuenta con una pared celular, cloroplastos y mitocondrias. Se conoce la secuencia completa de su genoma mitocondrial, el cual es lineal y muy compacto, de solamente 15.8 Kb (Michaelis et al., 1990). También se dispone de la secuencia completa de su genoma nuclear (Merchant et al., 2007) y del genoma cloroplastídico (Stern et al., 1991), éste protista puede crecerse de manera rápida y la manipulación genética es relativamente sencilla, lo que aunado a las características antes mencionadas la hacen un buen modelo de estudio.

Polytomella sp. es otra alga clorofícea unicelular e incolora que presenta una forma ovoide bastante regular, constituida por una masa de protoplasma color amarillo pálido, carece de pared celular y presenta a su vez cuatro flagelos encargados de su movilidad (Aragao, 1910). *Polytomella* mide aproximadamente 11 micras de largo y 8 micras de ancho, mientras que los flagelos miden cerca de 22 micras.

Esta alga tiende a enquistarse en su etapa de reposo o en condiciones ambientales desfavorables. El inicio del enquistamiento se caracteriza por el aumento progresivo de microgránulos en el protoplasma.

El linaje de las algas clorofitas se divide en 4 clases: clorofíceas, prasinofíceas, trebouxifíceas y ulvofíceas. Algunos autores consideran un grupo adicional: las pedinofíceas. *C. reinhardtii* y *Polytomella sp.* pertenecen a la clase de las clorofíceas, *Polytomella sp.* evolucionó a partir de un alga ancestral fotosintética y en algún momento perdió los cloroplastos por un evento evolutivo secundario. La ausencia de cloroplastos y de pared celular facilita la obtención de mitocondrias de esta alga y la purificación de los complejos de la fosforilación oxidativa.

5. ESTRUCTURA DE LA ATP SINTASA EN LAS ALGAS CLOROFICEAS

La estructura del dominio F_1 de la ATP sintasa, está ya bien establecida; este sector se encuentra unido al subcomplejo F_0 mediante el rotor central, en tanto que el estator periférico previene la rotación fútil del dominio globular durante la catálisis. Aunque la enzima funciona en su estado monomérico, existe evidencia de que los monómeros pueden interactuar para formar un supercomplejo dimérico en las mitocondrias.

Comparada con otras ATP sintasas mitocondriales, la de las algas clorofíceas presenta varias características únicas; primero, las subunidades catalíticas α y β , en *Chlamydomonas reinhardtii* y en *Polytomella sp.*, presentan extensiones peculiares en sus regiones amino y carboxilo, respectivamente, ya que en un gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) ambas subunidades migran con una masa molecular mayor, comparada con la de otras especies. Al analizar la estructura primaria se observó que esta diferencia se debe a la presencia de una extensión de 15 a 18 residuos en el extremo N-terminal de α y de 60 a 70 residuos en el extremo C-terminal de β (Franzén y Falk, 1992; Nurani y Franzén, 1996).

La extensión en β , se ha propuesto que pudiera fungir como la proteína inhibidora IF_1 . En un análisis de alineamiento múltiple, se compararon diferentes secuencias de IF_1 de varias fuentes y se encontró una región de 8 aminoácidos que alinea dentro de la secuencia mínima conocida que funciona como proteína inhibidora (Atteia et. al., 1997).

Segundo, ambas ATP sintasas al solubilizarse con una concentración de 1-2% de lauril maltósido migran en un gel BN-PAGE exclusivamente como un dímero de aproximadamente 1600 kDa (Atteia et al., 2003; van Lis et al., 2003, 2005). Esto contrasta con las ATP sintasas mitocondriales de bovino, levadura y planta, las cuales en presencia de 1% del detergente presentan dos formas, la monomérica, de aproximadamente 600 kDa y el sector F₁ de 400 kDa (Jänsch et al., 1996, Arnold et al., 1998; Eubel et al., 2003).

Tercero, la ATP sintasa de *C. reinhardtii* al separarse mediante electroforesis en gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) presenta nueve proteínas de entre 10 y 61 kDa que no tienen similitud con las subunidades de otras ATP sintasas mitocondriales.

En tanto que la forma dimérica posiblemente sea la especie preponderante *in vivo* (Schägger, 2002), el complejo V de varias fuentes, incluida la de mamíferos, hongos y plantas superiores, migra como un monómero de 550–600 kDa en electroforesis en geles nativos azules de poliacrilamida (BN-PAGE) (Schägger, 1994). Aunado a esto, se ha visto que la enzima se disocia parcialmente con la concomitante aparición de un sector F₁ libre (Jänsch et al., 1996; Arnold et al., 1998; Eubel et al., 2004). En amplio contraste, el Complejo V de *Chlamydomonas reinhardtii* y *Polytomella* sp. migra en BN-PAGE como un dímero altamente estable de 1,600 kDa (van Lis et al., 2003; van Lis et al., 2005; Dudkina et al., 2005).

En dos estudios independientes de microscopia electrónica se obtuvieron las estructuras de dos ATP sintasas diméricas; la de bovino (Minauro-Sanmiguel et al., 2005), que presenta asociaciones entre los monómeros a nivel de los sectores F₁ y F₀, con mayor cercanía en la interfase F₀-F₀, y un ángulo de aproximadamente 40°. Por su parte, la estructura dimérica de *Polytomella* sp. presenta dos brazos periféricos robustos que protruyen desde la membrana hasta la región donde se localizan las porciones F₁ formando un ángulo de casi 70° (Dudkina et al., 2005). En conjunto estos estudios sugieren que existen grandes diferencias estructurales entre ambas ATP sintasas, aún cuando las dos son diméricas (ver figura 5).

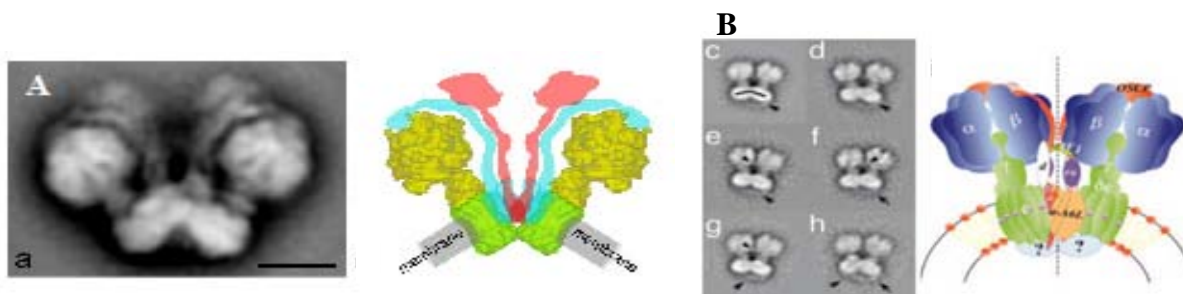


Figura 5. Se muestran las imágenes de las ATP sintasa de *Polytomella* sp. en el panel A (Dudkina et. al. 2005) y de bovino en el panel B, la línea punteada indica el eje de simetría (Minauro-Sanmiguel et. al, 2005). Como se puede apreciar la estructura general es similar pero los monómeros se unen con un ángulo distinto, aun cuando ambas ATP sintasas son díméricas. También es notoria la presencia de dos robustos brazos periféricos en la enzima dimérica del alga que están ausentes en los dímeros de la enzima de bovino.

Subunit Name	Viridiplantae									
	Metazoa	Fungi	Streptophyta	Chlorophyta						
				Prasinophyceae	Trebouxiophyceae	Ulvothyceae	Chlorophyceae			
	<i>B.t.</i>	<i>S.c.</i>	<i>A.t.</i>	<i>N.o.</i>	<i>P.w.</i>	<i>P.a.</i>	<i>S.o.</i>	<i>C.r.</i>	<i>P.s.</i>	<i>V.c.</i>
α (ATP1)	○	○	●	●	●	●		○	○	○
β (ATP2)	○	○	○					○	○	○
γ (ATP3)	○	○	○					○	○	○
δ (ATP16)	○	○	○					○	○	○
ϵ (ATP15)	○	○	○					○	○	○
OSCP (ATP5)	○	○	○					○	○	○
A6L (ATP8)	●	●	●	●	●	●		-	-	-
F6	○	○	-					-	-	-
IF ₁	○	○	○					-	-	-
F _A d (24 kDa)	-	-	○					-	-	-
<i>a</i> (ATP6)	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○
<i>b</i> (ATP4)	○	○	●	●	●	●		-	-	-
<i>c</i> (ATP9)	○	●	●	●	●	●	●	○	○	○
<i>d</i>	○	○	○					-	-	-
<i>e</i>	○	○	○					-	-	-
<i>f</i>	○	○	○					-	-	-
<i>g</i>	○	○	○					-	-	-
ASA1	-	-	-					○	○	○
ASA2	-	-	-					○	○	○
ASA3	-	-	-					○	○	○
ASA4	-	-	-					○	○	○
ASA5	-	-	-					○	○	○
ASA6	-	-	-					○	○	○
ASA7	-	-	-					○	○	○
ASA8	-	-	-					○	○	○
ASA9	-	-	-						○	

Tabla 1. Composición polipeptídica de la F₁F₀-ATP sintasa mitocondrial de diferentes especies. Las subunidades marcadas con (●) son codificadas en la mitocondria y las marcadas con (○) se codifican en el núcleo. Las subunidades no presentes están marcadas con (-) recuadros sombreados representan a las subunidades altamente conservadas. Abreviaturas: *B.t.*, *Bos taurus*; *S.c.*, *Saccharomyces cerevisiae*; *A.t.*, *Arabidopsis thaliana*; *N.o.*, *Nephroselmis olivacea*; *P.w.*, *Prototheca wickerhamii*; *P.a.*, *Pseudodendroclonium akinetum*; *S.o.*, *Scenedesmus obliquus* y *C.r.*, *Chlamydomonas reinhardtii*

Cuando se llevó a cabo el análisis de la composición polipeptídica de la ATP sintasa de *C. reinhardtii*, se identificaron ocho polipéptidos: α , β , γ , δ , a (ATP6), c (ATP9) y OSCP, pero no se encontraron homólogos para las subunidades ϵ , b , d , e , f , g , IF1, A6L y F6. Los otros siete polipéptidos, nombrados ASA1 (por las siglas en inglés **A**TP **S**ynthase **A**sociated protein), ASA2, ASA3, ASA4, ASA5, ASA6 y ASA7, presentes en *C. reinhardtii* no tienen contrapartes en otras enzimas de plantas y animales (Ver Tabla 1), lo cual sugiere que hay proteínas asociadas a las ATP sintasas mitocondriales en las algas clorofíceas que son atípicas (Cardol et al., 2005). Posteriormente se demostró que la composición de las subunidades de la ATP sintasa de *Polytomella* sp. es similar a la de *C. reinhardtii* y que existen dos polipéptidos adicionales; ASA8 y ASA9. Se sabe también que todas estas características dan lugar a un dímero altamente estable en la ATP sintasa de estas algas, y que son los polipéptidos ASA los que dan lugar a las diferencias que se aprecian al comparar las estructuras obtenidas por Dudkina et. al. y Minauro-Sanmiguel (ver Tabla 1 y Figura 5).

Se ha demostrado que los componentes canónicos del estator están ausentes en las algas clorofíceas y que probablemente las porciones F_0 están unidas a través de sus subunidades a por el subcomplejo [ASA1/ASA3/ASA5/ASA8], en tanto que los brazos que protruyen están formados por dos subcomplejos de [ASA2/ASA4/ASA7/OSCP] que a su vez forman al estator que estabiliza a los sectores F_1 (ver Figura y Tabla 2).

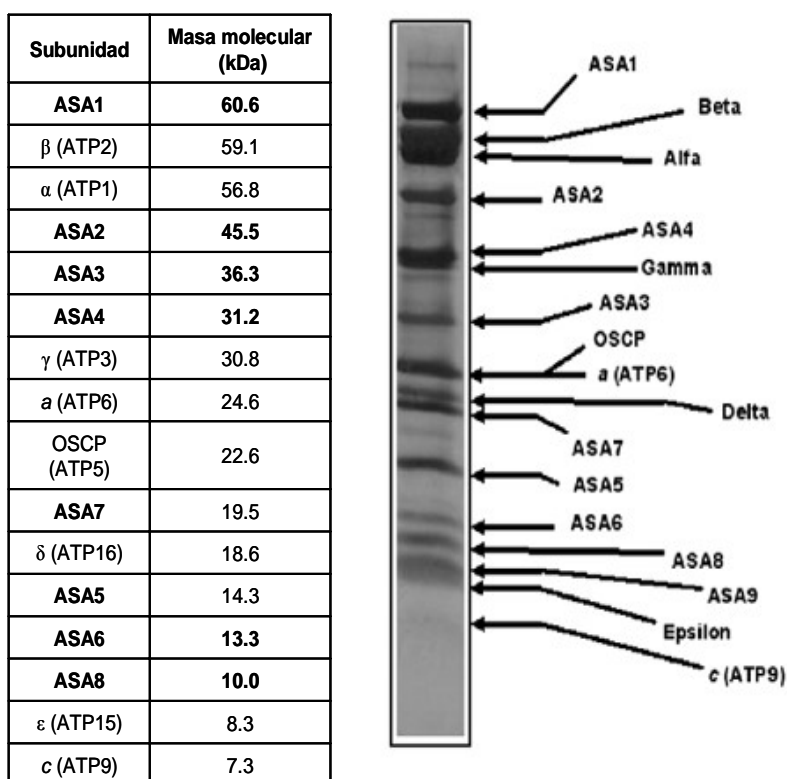


Tabla 2 y Figura 6. Composición peptídica y patrón electroforético en un gel SDS-PAGE de la F_1F_0 -ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella* sp. Las masas moleculares se calcularon de la secuencia de la proteína madura de *C. reinhardtii* (Tomado de Vázquez-Acevedo et.al 2006.)

Mediante el uso de agentes entrecruzadores, la Maestra en Ciencias Araceli Cano Estrada obtuvo una aproximación de la topología de la ATP sintasa de *Polytomella* sp. Ésta técnica se ha empleado en el estudio de complejos mitocondriales, por ejemplo la ATP sintasa de bovino (Joshi y Burrows, 1990), la ATP sintasa de levadura (Velours y Arselin, 2000) y el complejo bc₁ de bovino (González-Halphen *et. al.*, 1998). Los agentes entrecruzadores son capaces de unir covalentemente proteínas cercanas, gracias a que cuentan con dos grupos reactivos unidos por una cadena hidrocarbonada. Estos grupos pueden ser idénticos (entrecruzadores homobifuncionales) o diferentes (entrecruzadores heterobifuncionales).

Con el análisis de los entrecruzamientos obtenidos en su trabajo de Maestría y tomando en cuenta la imagen de microscopía electrónica obtenida por Dudkina y colaboradores (Dudkina *et. al.* 2005), Araceli Cano Estrada construyó el modelo topológico que se muestra en la figura 7. Como se puede apreciar, las subunidades ASA1 a 9 intervienen en la formación del dímero, éstas subunidades sólo están presentes en el linaje de las algas clorofíceas. Las subunidades ASA4, ASA 2 y ASA7 se encuentran cercanas y forman parte del estator de la enzima, junto con la subunidad OSCP. ASA4 forma se asocia de forma dimérica, por su parte las subunidades ASA5,ASA6,ASA8 y ASA9 presentan cruces transmembranales, lo que las localizaría embebidas en la membrana. La subunidad ASA6 es la responsable de la dimerización del complejo. ASA1 y ASA3 poseen una estructura globular y se localizarían de manera periférica a la membrana. Las subunidades α , β , γ , ϵ , a y c se ilustran de acuerdo al modelo cristalográfico de la enzima de levadura (Stock et al. 1999).

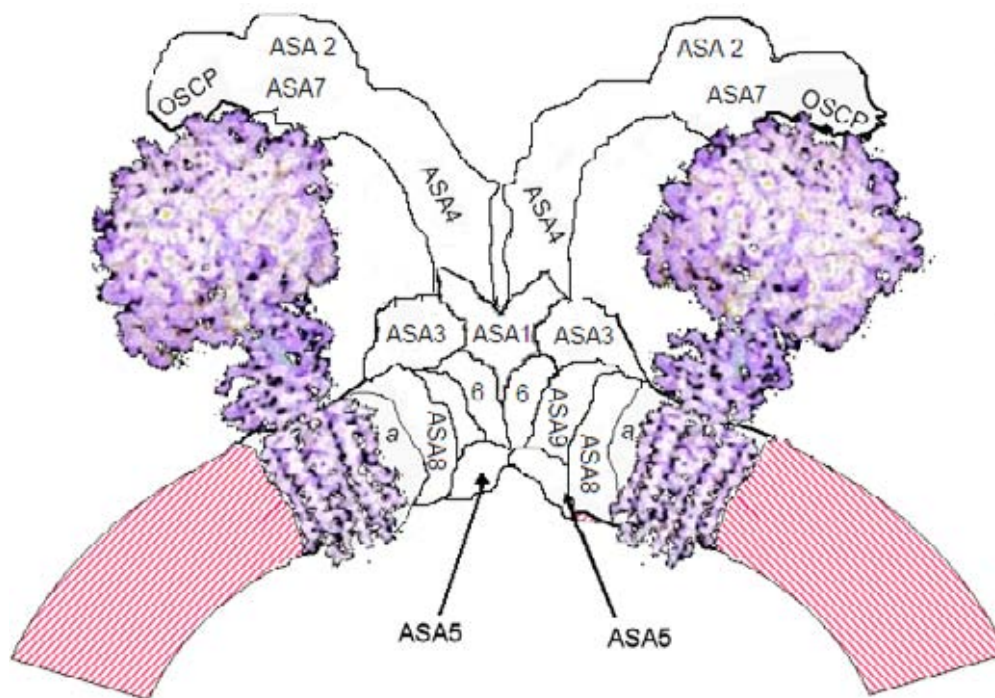


Figura 7. Modelo de la estructura dimérica de la F₁F₀-ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella* sp. (Modificado de Vázquez-Acevedo *et.al* 2006 basándose en el trabajo de Maestría de la I.B. Araceli Cano Estrada.

II. JUSTIFICACIÓN

En nuestro grupo de trabajo se han estudiado ampliamente los complejos de la fosforilación oxidativa de las algas clorofíceas, éste grupo de protistas resulta particularmente interesante dado que algunos de los genes que codifican para los componentes de los complejos mitocondriales han migrado al núcleo y ya no están codificados en el genoma mitocondrial.

Estudios anteriores han demostrado que la ATP sintasa mitocondrial de algas clorofíceas presenta una composición polipeptídica atípica. Así mismo el genoma mitocondrial de *Chlamydomonas reinhardtii* y *Polytomella sp.* carece de genes que codifican para polipéptidos de la ATP sintasa. Con los trabajos realizados por nuestro grupo de trabajo se ha logrado establecer la topología de la ATP sintasa pero hasta el momento no se ha llevado a cabo ningún estudio donde se caracterice la actividad de esta enzima mitocondrial, el presente trabajo pretende abordar este aspecto.

III. OBJETIVO

Caracterizar funcionalmente la actividad hidrolítica (actividad ATPasa) de la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella sp.* De manera particular se evaluará el efecto de surfactantes (detergentes no iónicos) y proteasas sobre dicha actividad.

VII . MATERIALES YMETODOS

1. CULTIVO DE *Polytomella sp.*

Se cultivó el alga *Polytomella sp.* en 2 litros de medio MAP (pH 7.0) utilizando matraces de fondo ancho de 2.5 litros de capacidad. Se adicionaron al medio 200 µl de la solución madre de vitaminas. Las células se incubaron durante 48 horas a 25°C sin agitación en condiciones aeróbicas.

MEDIO MAP (2L)

Beijerincks	100X	10 ml
Elementos traza		2 ml
Fosfato de Potasio	1M	2 ml
MES		15.6 g
Acetato de sodio		8 g

Solución madre de vitaminas

Tiamina B1	2 mg
Cianocobalamina	0.1 mg

Pesar todo y aforar 10 ml. Filtrar en esterilidad.

Solución 100X de Beijerincks 1L

NH ₄ Cl	8 g
CaCl ₂ · H ₂ O	1 g
MgSO ₄	1.3g

Elementos Traza 1L

Cu ₂ SO ₄	0.25 g
H ₃ BO ₃	0.02 g
FeCl ₂ · 6H ₂ O	0.1 g
MnSO ₄	0.2 g
NaMo · 2H ₂ O	0.1 g
ZnSO ₄	0.2 g

2. OBTENCIÓN DE LAS MITOCONDRIAS

Se extrajeron las células de *Polytomella sp.* retirando el medio por centrifugación a 2000 x g durante 5 minutos en el rotor F10-6x500y marca Fiberlite. Se lavaron con amortiguador de sacarosa y se centrifugaron a 2000 x g por 5 minutos utilizando el rotor F14-6x250y. El paquete obtenido se resuspendió nuevamente en amortiguador de sacarosa y posteriormente se rompieron las células mecánicamente con un homogeneizador de vidrio con vástago de teflón, pasando la solución 5 a 8 veces.

El lisado celular se centrifugó por 10 minutos a 2000 x g, recuperando el sobrenadante, dado que es en éste donde se localizan las mitocondrias. El sobrenadante se centrifugó a 17000 x g en un rotor SS34 durante 10 minutos. Finalmente se resuspendieron las mitocondrias en una pequeña cantidad de amortiguador; se congelaron y se almacenaron para recolectar una cantidad suficiente para, posteriormente, purificar la ATP sintasa.

Amortiguador de Sacarosa 1L

Sacarosa	0.3 M	126.65 g
K-EDTA	4 mM	1.473 g
Tris	20 mM	2.42 g

Ajustar el pH a 7.4

3. PURIFICACIÓN DE LA ATP SINTASA

Se determinó la concentración de proteína de las mitocondrias mediante el método de Lowry (Lowry et al., 1951). Posteriormente se diluyeron las mitocondrias a una concentración final de 10 mg/ml de proteína, con amortiguador de solubilización y n-dodecil- β -D-maltósido(LM), a una concentración final de 2 g de LM/g de proteína, para solubilizar las membranas mitocondriales y liberar así los complejos enzimáticos embebidos en la membrana interna. El solubilizado se dejó en agitación por 30 minutos a 4°C, a continuación se centrifugó a 90 000 x g por 20 minutos en el rotor 60Ti. Se recuperó el sobrenadante y se dializó de 1 a 2 horas en amortiguador de diálisis. Se colocaron aproximadamente 150 ml de muestra en 1L de amortiguador de diálisis.

El dializado se cargó en una columna de intercambio aniónico DEAE Biogel A con un volumen de columna de aproximadamente 80 ml, previamente se equilibró la resina a pH 8.0. Una vez cargada la muestra, se lavó con 3 o 4 volúmenes del mismo amortiguador utilizado para equilibrar la columna. La ATP sintasa se eluyó con un gradiente de 0 a 125 mM de cloruro de sodio en el mismo amortiguador anterior. Se colectaron las fracciones y se midió la absorbancia a 280 nm para detectar los máximos correspondientes a las proteínas de interés. Simultáneamente se corrió un gel de tricina-SDS con las diferentes fracciones recolectadas, principalmente con aquellas que presentaran máximos de absorción. La citocromo c oxidasa y el complejo bc₁ eluyeron con 200 y

400 mM de cloruro de sodio, respectivamente. Se concentraron todos los tubos con ayuda de un ultrafiltro Amicon, usando una membrana YM100. Después se cargó la muestra a un gradiente continuo de glicerol del 15 al 40% para purificar ulteriormente la enzima. Se centrifugó el gradiente a 40 000 x g por 17 horas en el rotor SW-28. Se utilizó el amortiguador de Lutter modificado para la preparación del gradiente. Se colectaron las fracciones del gradiente y se detectó la ATP sintasa por medio de un gel desnaturizante de poliacrilamida. Finalmente se concentraron las fracciones donde se encontraba la enzima y se cuantificó la proteína por el método de Lowry.

Amortiguador de solubilización 250 ml

Tris	50 mM	1.513 g
MgSO ₄	1 mM	0.061 g
NaCl	100 mM	1.46g
PMSF	1 mM	200 µl solución madre 1M*
TLCK	50 µg/ml	1.25 ml solución madre 10 ^{mg/ml} **

Ajustar el pH a 8.0 con HCl

* Solución madre 1M PMSF

Pesar 1.742 g de PMSF y disolverlos en 10 ml de DMSO. Almacenar a 4°C hasta su uso.

** Solución madre 10^{mg/ml} de TLCK

Pesar 0.1 g de TLCK y disolverlos en 10 ml de agua destilada. Almacenar a 4°C hasta su uso.

Amortiguador de diálisis 2L

Tris	50 mM	12.11 g
MgSO ₄	1 mM	0.492 g

Ajustar el pH A 8.0 con HCl

Amortiguador de equilibrio de la columna DEAE Biogel A 500ml

Tris	50 mM	3.027 g
MgSO ₄	1 mM	0.123 g
Lauril maltósido	0.1 ^{mg/ml}	0.05 g
PMSF	1 mM	400 µl solución madre 1M
TLCK	50 ^{µg/ml}	2.5 ml solución madre 10 ^{mg/ml}

Ajustar el pH a 8.0 con HCl

Amortiguador de elución 250 mL

Tris	50 mM	1.513 g
MgSO ₄	1 mM	0.061 g
Lauril maltósido	0.1 ^{mg} / _{ml}	0.025 g
PMSF	1 mM	200 µl solución madre 1M
TLCK	50 ^{µg} / _{ml}	1.25 ml stock
NaCl	125 mM	1.826g

Ajustar el pH 8.0 con HCl

Amortiguador de Lutter modificado 250 ml

Tris	20 mM	0.605 g
ATP	2 mM	0.275 g
Lauril maltósido	0.1 ^{mg} / _{ml}	0.25 g
EDTA-Na	1 mM	0.093 g

Ajustar el pH 7.5 con HCl

4. GELES

4.1 GELES NATIVOS

Gradiente para geles azules nativos.

Para cámaras de electroforesis GibcoBRL Vertical (VI6). (1.5mm de espesor)

	Acrilamida (H%)			Acrilamida (L%)			Concentrador
	10%	12%	15%	4%	5%	8%	4%
48.5% Acrilamida-1.5%Bis-acrilamida	3.8 ml	4.6 ml	5.7 ml	1.6 ml	1.9 ml	3.07 ml	0.5 ml
Amortiguador de gel 3X		6.2 ml			6.2 ml		2.0 ml
Glicerol 80%		4.73 ml			1.2 ml		0 ml
Agua destilada	3.8 ml	3.04 ml	1.9 ml	9.5 ml	9.2 ml	8.1 ml	3.44 ml
TEMED		18 µl			18 µl		9 µl
Persulfato de Amonio 10%		50 µl			50 µl		32 µl
En el formador de gradientes		18.6 ml			18.6 ml		

Para cámaras de electroforesis Bio Rad Mini Protean JJ o Hoefer Mighty Small (1.5mm de espesor)

	Acrilamida (H%)			Acrilamida (L%)		Concentrador
	10%	12%	15%	5%	8%	4%
48.5% Acrilamida-1.5%Bis-acrilamida	0.72 ml	0.87 ml	1.08 ml	0.36 ml	0.58 ml	0.25 ml

Amortiguador de gel 3X	1.17 ml	1.17 ml	2.0 ml
Glicerol 80%	1.0 ml	0.25 ml	0 ml
Agua destilada	0.6 ml	0.44 ml	0.23 ml
TEMED	6 µl	6 µl	6 µl
Persulfato de Amonio 10%	18 µl	18 µl	18 µl
En el formador de gradientes	3.5 ml	3.5 ml	

El gradiente de acrilamida debe ajustarse al tamaño de las proteínas o complejos que se desean estudiar. En el caso de los complejos proteicos de mas de 100kDa se recomienda usar un gradiente del 4 al 12%, si el rango es de 20 a 500kDa el gradiente del 6 al 18% es el más adecuado. También pueden usarse geles de una sola concentración.

El gel concentrador puede ser pequeño: 0.5 cm debajo de los pozos en un gel pequeño o para los geles grandes 1 cm. Es preferible colocar el gel concentrador inmediatamente sobre el separador, sin dejar que polimerice, esto garantiza una corrida constante.

PREPARACIÓN DEL GEL.

- Preparar las soluciones para el gel separador y concentrador en presencia del TEMED. Agregar el APS posteriormente
- Poner el formador de gradientes sobre un agitador magnético, arriba de una plataforma ajustable, a una altura aproximada de 20 cm.
- Cerrar ambas válvulas del formador de gradientes antes de agregar las soluciones. Para facilitar el flujo conectar una jeringa al tubo de salida.
- Agregar la solución de alta concentración de acrilamida en el cilindro más cercano a la salida y colocar un agitador.
- Agregar el APS a la solución de baja concentración, agitar y colocar en el otro cilindro del formador de gradientes. En adelante debe trabajarse rápidamente para evitar la polimerización.
- Agregar el APS a la solución de alta concentración y mezclar fuertemente con el agitador magnético.
- Bajar la velocidad del agitador.
- Remover las burbujas de aire atrapadas entre ambos cilindros.
- Abrir la válvula entre ambos cilindros.
- Abrir la válvula de salida y poner rápidamente la manguera entre los vidrios.
- Asegurarse de que el nivel de ambas soluciones baja a la misma velocidad, de no ser así, disminuir la velocidad de agitación.
- Si se agrega la solución del concentrador inmediatamente, agregar el APS y vaciarla cuidadosamente sobre la solución de separación y colocar el peine. Si no se desea colocar el concentrador inmediatamente, poner sobre la solución separadora agua o Sec-butanol y dejar polimerizar. Posteriormente adicionar la solución concentradora y poner el peine.
- Lavar de inmediato el formador de gradientes para evitar que se polimericen los residuos dentro de los cilindros y se tape.
- Remover con cuidado el peine sin dañar los pozos.
- Si no se usará el gel inmediatamente, cubrirlo con papel plástico y guardarlo a 4°C hasta por 24 horas.

SOLUCIONES

Amortiguador de geles 3X (100ml) pH 7.0 HCl

Ácido ε amino caproico	1.5M	19.68 g
Bis-Tris/ Imidazol	150/75 mM	3.14 / 0.51 g

Amortiguador cátodo (1L)

Tricina	50 mM	8.96 g
Bis-Tris/ Imidazol	15 /7.5 mM	3.14 / 0.51 g
Azul de Coomassie Serva G	0.02 %	200 mg

Amortiguador cátodo 2 (1L)

Tricina	50 mM	8.96 g
Bis-Tris/ Imidazol	15 /7.5 mM	3.14 / 0.51 g
Azul de Coomassie Serva G	0.002 %	20 mg

Amortiguador ánodo (1L) pH 7.0 HCl

Bis-Tris/ Imidazol	50 / 25 mM	10.46 / 1.7 g
--------------------	------------	---------------

Amortiguador de muestra (50ml) pH 7.0 HCl

Ácido ε amino caproico	7(50 mM	4.92 g
Bis-Tris/ Imidazol	50/25 mM	0.52 / 0.09 g

Mezcla para los pozos (1ml)

Azul de Coomassie Serva G	5 %	50 mg
---------------------------	-----	-------

Cargado y corrida del gel

La electroforesis debe correrse a una temperatura de 4°C, es importante asegurarse de que los amortiguadores y el gel están equilibrados a esa temperatura. Es recomendable marcar los pozos en el vidrio con un plumón indeleble de cualquier color, excepto azul, esto facilita cargar las muestras.

Correr el gel a corriente constante, a 15 mA si es un gel pequeño y 25 mA si es un gel grande. El tiempo de corrida va desde 1 a 1.5 horas para los geles pequeños y de 3 a 5 horas para las cámaras grandes.

4.2 GELES DESNATURALIZANTES DE SEGUNDA DIMENSIÓN (2D-SDS SPAGE)

La segunda dimensión desnatura con SDS los complejos de la primera dimensión y separa las subunidades de los complejos de acuerdo a su masa molecular. Se coloca de forma horizontal el carril completo de un gel de primera dimensión nativa y se corre un gel desnaturante.

Existen dos métodos para los geles desnaturantes: el método de Laemmli (Laemmli 1970) que usa glicina y el de Schagger y Von Jagow (1987) que utiliza tricina. Los geles con tricina permiten una resolución de bandas definidas y una mejor separación de las proteínas pequeñas, en tanto que los geles de Laemmli permiten una mayor resolución de proteínas de alto peso molecular.

Para correr un gel de segunda dimensión se recomienda:

- Cortar un carril de un gel azul nativo e incubarlo por 30 minutos en amortiguador del cátodo (1X) o agua con SDS y β mercaptoetanol al 1% en agitación constante.
- Transcurrido el tiempo de incubación, abrir las placas y colocar la banda arriba del gel concentrador, cortando un pozo de los destinados al control. Evitar la formación de burbujas que pudieran impedir la corrida constante.
- Cerrar los vidrios y correr normalmente, a 50V y una vez que el frente haya pasado del concentrador subir a 100V.
- Teñir posteriormente con azul de Coomassie o con plata.

Si se quiere evaluar un complejo en particular en vez de un carril nativo completo, se puede cortar sólo esa banda y colocarla en un gel con un peine de pozos en lugar de uno ciego. Si se requiere una gran cantidad de proteína se pueden apilar hasta 2 cm de bandas en cada pozo.

4.3 Geles de Tricina SDS-PAGE (Von Jagow)

	Acrilamida geles							
	10%	Acrilamida			chicos		Concentrador	
		12%	14%	16%	12.5%	16%	Grande	Chico
30% Acrilamida-0.98%Bis-acrilamida	10 ml	12 ml	14 ml	16 ml	3 ml	4 ml	1.6 ml	400 µl
Amortiguador electroforético	16 ml	14 ml	12 ml	10 ml	3.4 ml	2.5 ml	3 ml	750 µl
Glicerol 79.5%	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml	1 ml	1 ml	0 ml	0 ml
Agua destilada	0 ml	0 ml	0 ml	0 ml	0 ml	0 ml	7.4 ml	1.85 ml
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	2.5 µl	2.5 µl	10 µl	2.5 µl
Persulfato de Amonio 10%	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	25 µl	25 µl	100 µl	25 µl

SOLUCIONES

Solución madre de acrilamida (100ml)

Acrilamida	30%	30 g
Bis-acrilamida	0.98%	0.98 g
*Filtrarla y guardar a 4°C		

Amortiguador electroforético (500ml)

Tris	3 M	181.7 g
HCl	1 N	40.3 ml
SDS	0.3%	1.5 g

Amortiguador cátodo (3L)

Tris	0.1 M	36.3 g
Tricina	0.1 M	53.8 g
SDS	0.1%	3 g

Amortiguador ánodo (3L) pH 8.9

Tris-HCl	0.2 M	72.7 g
----------	-------	--------

Solución digestora (Amortiguador de carga 25 ml)

SDS	10%	2.5 g
Glicerol	30%	7.5 ml
Tris-HCl	100 mM	1.25 g
Azul Bromo fenol	0.3%	75 mg
β Mercapto etanol	4%	1 ml

4.4 Geles de Glicina SDS-PAGE(Laemmli)

	Acrilamida geles							
	Acrilamida			Concentrador	chicos			Concentrador
	10%	12%	14%	4%	10%	12%	14%	4%
30% Acrilamida-0.8%Bis-acrilamida	12 ml	14.4 ml	16.8 ml	1.6 ml	3 ml	3.6 ml	4.2 ml	400 µl
Tris 3M pH 8.8		4.5 ml				1.13 ml		

Tris 0.5M pH .8	0 ml	0 ml	0 ml	3 ml	0 ml	0 ml	0 ml	750 µl
SDS 20%		100 µl		0 ml		25 µl		0 ml
	19.5	17.1	14.7		4.8	4.2	3.6	
Agua destilada	ml	ml	ml	7.4 ml	ml	ml	ml	1.85 ml
TEMED		25 µl		25 µl		6 µl		2.5 µl
Persulfato de Amonio 10%		150 µl		100 µl		40 µl		25 µl

SOLUCIONES

Solución madre de acrilamida (100ml)

Acrilamida	30%	30 g
Bis-acrilamida	0.8%	0.8 g

*Filtrarla y guardar a 4°C

Los amortiguadores son los reportados por Laemmli (Laemmli 1970)

5. ENSAYOS DE PROTEÓLISIS

Para estudiar la proteólisis sobre la ATP sintasa de *Polytomella* sp. se probaron 5 proteasas: subtilisina, tripsina, termolisina, pronasa E y quimotripsina, en dos concentraciones 1:1000 y 1:100 (^{peso}/peso proteasa : ATP sintasa). Se disolvieron en Tris-HCl 20mM, se alicuotaron y se congelaron a -70°C.

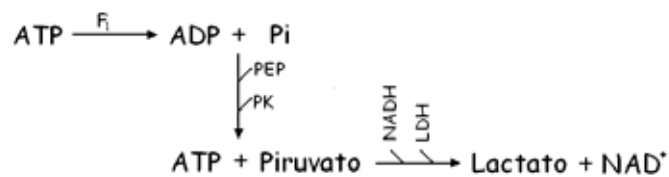
Los experimentos se llevaron a cabo incubando a temperatura ambiente a la ATP sintasa en presencia de la proteasa de elección durante el tiempo determinado, después de adicionar el volumen de proteasa, se agitó manualmente o en el nivel 2 del vórtex el tubo. Concluido el tiempo de incubación se paró la reacción con los inhibidores PMSF (fluoruro de fenil metil sulfonil) y TLCK (cetona de tosil lisil clorometilo) a una concentración de 1mM, disueltos en DMSO, en el caso del PMSF y en agua el TLCK. Las soluciones madre de los inhibidores también fueron alicuotados y almacenados a -70°C.

Para cargar las muestras al gel SDS PAGE, se agregó amortiguador de carga en una proporción 1:1 (v/v). Se pusieron controles de la enzima intacta en ambos extremos. Se corrió a 50V y ya que entró la muestra se subió el voltaje a 100V, se dejó correr hasta aproximadamente 0.5 cm por sobre el extremo del gel. Se fijó por 30 minutos y se tiñó con Azul de Coomassie.

6. MEDICIÓN DE ACTIVIDAD DE ATPasa

Se utilizó el método reportado por Pullman et al., 1960, modificado por Mariel Zarco Zavala y la Doctora Marieta Tuena de Gómez-Puyou. Las modificaciones llevadas a cabo, permitieron optimizar el ensayo para adecuarlo al estudio de la ATP sintasa de *Polytomella* sp. Se utilizó un sistema regenerador, en el cual, se adicionan en un amortiguador de sulfatos fosfoenolpiruvato (PEP), ATP y NADH, además de las enzimas piruvato cinasa (PK) y lactato deshidrogenasa (LDH).

La reacción que se lleva a cabo en el sistema es la siguiente:



En esta reacción, la hidrólisis de ATP por la ATP sintasa libera ADP, el cual es reconvertido a ATP por la acción de la piruvato cinasa, manteniéndose así una concentración constante de ATP y una baja concentración de ADP, que es un potente inhibidor de la hidrólisis. La producción de piruvato, catalizada por la piruvato cinasa es

monitoreada como el nivel de oxidación del NADH al acoplar la reacción a la lactato deshidrogenasa.

Las condiciones que se utilizaron fueron las siguientes:

Medio de ATP sintasa (100 ml)

Solución madre	ml	Concentración final
sulfato de magnesio 300mM	1 ml	3mM
Sulfato de potasio 500 mM	6 ml	30 mM
Tris-SO ₄ 2M pH 8	1.25 ml	25 mM

SOLUCIONES

sulfato de magnesio	300mM	30 ml	2.2184 g
sulfato de potasio	500mM	50 ml	4.3575 g
Tris-SO ₄ pH 8.0	2M	50 ml	12.11 g

**Se toma el volumen indicado de cada una de las soluciones madre y se guarda en el refrigerador hasta su uso.

Medio de la cubeta (10 ml)

Medio de ATP sintasa	9.76 ml	Concentración Final
ATP 300 mM	100 µl	3 mM
PEP 300 mM	100 µl	1.5 mM
PK	41.265 µl	3 U
DHL	41.265 µl	4.5U
NADH 30mM	100 µl	0.3 mM

ATP	pH 8.0 (Tris)	300mM	10 ml	1.6533 g
PEP		300mM	5 ml	4.3575 g
NADH		30mM	10 ml	238 mg

*El ATP se disuelve en agua destilada, y el pH se ajusta adicionando base de Tris en polvo. El PEP y el NADH se disuelven en medio de ATP sintasa. Se alicuotaron todos y se congelaron en el REVCO a -70°.

** Para las enzimas se utilizó una solución madre comercial que contenía a ambas, de la marca Sigma con 727 U/ml de piruvato cinasa y 1100 U/ml de lactato deshidrogenasa.

El medio de la cubeta se incubó a 37°C en un baño de temperatura constante.

Para calcular la actividad específica de ATPasa se utilizó la siguiente fórmula:

Donde:

$$\mu\text{molas min}^{-1} \text{ mg}^{-1} = \frac{\Delta A_{340} / \text{min}}{\epsilon \text{ mg de enzima} / \text{volumen mezcla reacción}}$$

ΔA_{340} : Cambio de absorbancia a 340 nm

ϵ : coeficiente de extinción micromolar del NADH = 6.22 $\mu\text{mol} / \text{min}$

Se trazó sobre los datos obtenidos e impresos del espectrofotómetro Shimadzu la pendiente más lineal y sostenida y a partir de esta se sustituyeron los valores en la fórmula.

7. MEDICIÓN DE ACTIVIDAD DE ATPasa *in gel*

Se utilizó el método reportado por Zerbetto et. al (Zerbetto et. al, 1997), modificado por Schäger, las modificaciones consistieron en el uso de geles claros (CN-PAGE) en los casos donde se evaluó la sensibilidad a oligomicina, dado que se ha visto que el azul de Coomassie puede interferir. También se pre-incubaron los geles durante tres horas en un amortiguador que incrementa la actividad. El principio de ésta técnica se basa en la formación de precipitados de plomo, al hidrolizarse el ATP, el nitrato de plomo que se adiciona en el amortiguador reacciona con el fosfato inorgánico liberado para formar fosfato de plomo, que se aprecia a simple vista como un precipitado blanquecino.

Lo que se hace es correr normalmente el gel, ya sea azul o claro; como ya se mencionó los geles claros son mejores si se quiere evaluar la sensibilidad a oligomicina. Es necesario recordar que el patrón electroforético en un gel claro es distinto al de un gel azul, dado que el azul de Coomassie confiere carga a las proteínas, en ausencia del colorante las proteínas corren sólo con su carga intrínseca. Al terminar la corrida del gel se pre incubó durante 3 horas en el amortiguador de incubación (270mM glicina, 35mM Tris, pH 8.4) en agitación, esto aumenta la actividad 2 a 4 veces, es en esta preincubación donde se adiciona la oligomicina a una concentración final de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Posteriormente éste amortiguador se cambia por uno donde se evalúa la hidrólisis de ATP (270mM glicina, 35mM Tris, 8mM ATP, 14mM MgSO_4 y 0.2% $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, pH 8.4). Se deja proceder la reacción hasta que se observa el precipitado, la reacción se para con una solución de metanol al 50%. Para retirar el excedente de precipitado se adicionó una solución de metanol al 50% y 10% ácido acético. Al terminar se digitalizaron las imágenes de los geles y se procedió a teñir con azul de Coomassie.

SOLUCIONES

Amortiguador de Incubación pH 8.4 500ml

Glicina	270mM	10.13445g
Tris	35mM	2.11925g

Amortiguador de Actividad pH 8.4 500ml

Glicina	270mM	10.13445 g
Tris	35mM	2.11925 g
ATP	8mM	400 μl stock 2mM
MgSO_4	14mM	1.725486 g
$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	0.2%	1 g

Se preparó el amortiguador y se almacenó en el refrigerador hasta su uso, el ATP se preparó aparte y se adicionó al amortiguador hasta el momento del ensayo.

Solución para detener la reacción 500ml

Metanol	50%	250ml
Agua	50%	250ml

Solución para disolver los precipitados 500ml

Metanol	50%	250ml
Ácido acético	10%	50 ml
Agua	50%	200ml

IV. RESULTADOS

Para evaluar la actividad hidrolítica de la ATP sintasa de *Polytomella* sp., se llevaron a cabo ensayos de actividad, con el sistema acoplado de piruvato cinasa - deshidrogenasa láctica midiendo espectrofotométricamente a 340 nm la oxidación del NADH. Este protocolo se describe ampliamente en la sección Materiales y Métodos.

4.1 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ATP sintasa

Se evaluó la actividad de ATP sintasa del dímero, el monómero y el sector F_1 . La preparación que se obtiene al purificar la enzima es dimérica, por lo que no se requiere mayor tratamiento. En el caso del monómero, éste se obtiene al incubar durante 30 minutos en hielo a la enzima dimérica en presencia del detergente iónico taurodesoxicolato de sodio a una concentración final de 3%. En estas condiciones se sabe que la enzima se monomeriza sin que haya una liberación considerable del sector F_1 . A su vez, la F_1 se obtiene calentando a la enzima dimérica a 60°C por un periodo de 2 minutos, en estas condiciones la enzima se disocia liberando al sector F_1 y subunidades individuales. A continuación se muestra en la figura 1 la actividad específica obtenida para estas tres preparaciones, colocando en el ensayo $20\ \mu\text{g}$ de proteína.

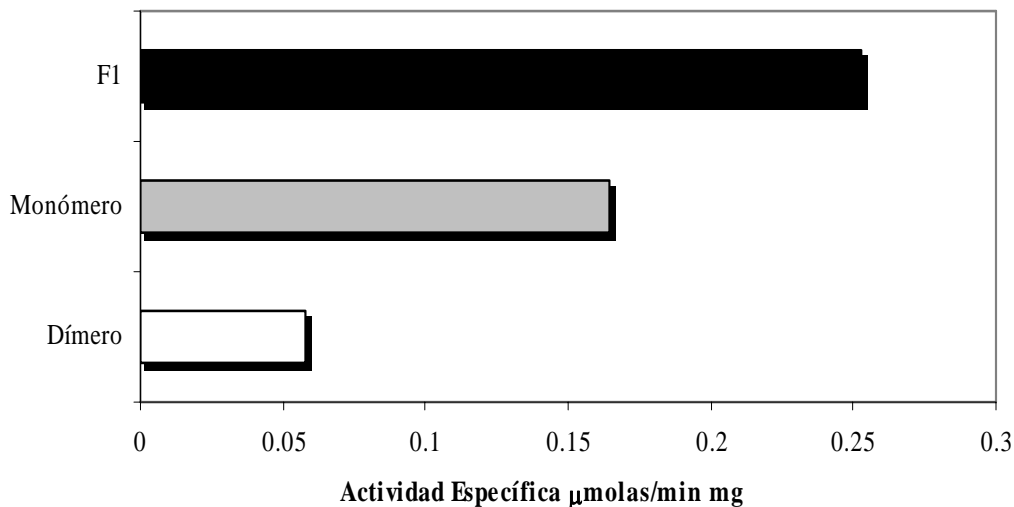


Figura 1. Actividad específica de la enzima en su estado dimérico, monomérico y del sector F_1 .

Como se puede observar, la actividad del dímero es muy baja [$0.06\ \mu\text{molas} \times (\text{min mg})^{-1}$] comparada con la del monómero [$0.17\ \mu\text{molas} \times (\text{min mg})^{-1}$] y con la F_1 [$0.25\ \mu\text{molas} \times (\text{min mg})^{-1}$]. De hecho ésta actividad es considerablemente más baja que la reportada para otras ATPasas puras (Sector F_1): ATPasa mitocondrial de corazón de bovino: $70\ \mu\text{molas} \times (\text{min mg})^{-1}$ (Tuena de Gómez-Puyou, 1977), ATPasa mitocondrial de hígado de rata: $28\ \mu\text{molas} \times (\text{min mg})^{-1}$ (Pedersen, 1975), ATPasa de cloroplasto de espinaca: $7.45\ \mu\text{molas} \times (\text{min mg})^{-1}$ (Vambutas et. al., 1965), ATPasa de levadura $63\ \mu\text{molas} \times (\text{min mg})^{-1}$ (Shatz et.al., 1967).

4.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ATPasa EN PRESENCIA DE DETERGENTES.

Como se aprecia en la gráfica anterior la actividad de la ATP sintasa es muy baja, por lo que se decidió evaluarla en presencia de detergentes no iónicos, los cuáles fueron seleccionados en base a su disponibilidad. Se probaron los siguientes detergentes: n-Dodecil- β -D Maltósido (LM), Tween 20 (T_{20}), Tween 80(T_{80}), Triton X-100 (TX_{100}), Triton X-114 (TX_{114}), O- β -D-glucopiranosido (GP), Dodecanoil sacarosa (DS), Monodecileter de octaetileno glicol($C_{12}E_8$), Decanoil metil glucamida (DMG) y Octanoil metil glucamida (OMG), adicionándolos en el medio de ensayo a una concentración final de 0.01% (peso x volumen⁻¹). Se evaluó la actividad en presencia del inhibidor oligomicina, incubando las muestras durante 30 minutos en hielo con una concentración de 10 $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ o en presencia del vehículo, dimetilsulfóxido (DMSO). En el medio de reacción también se adicionó oligomicina a una concentración de 5 $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ o la cantidad equivalente de DMSO en el control. Preincubando la enzima con el inhibidor y agregando el mismo inhibidor en el medio de ensayo, la inactivación de la enzima es prácticamente total (ver figura 2).

En la figura 2 se compara la actividad de la ATP sintasa en presencia y ausencia del detergente, así como en 3 condiciones de inhibición; sólo pre-incubando a la enzima; pre-incubándola y colocando oligomicina en el medio de ensayo o sólo adicionando el inhibidor en el medio de ensayo (sin pre-incubar). Para cada caso se muestra también el porcentaje de actividad residual.

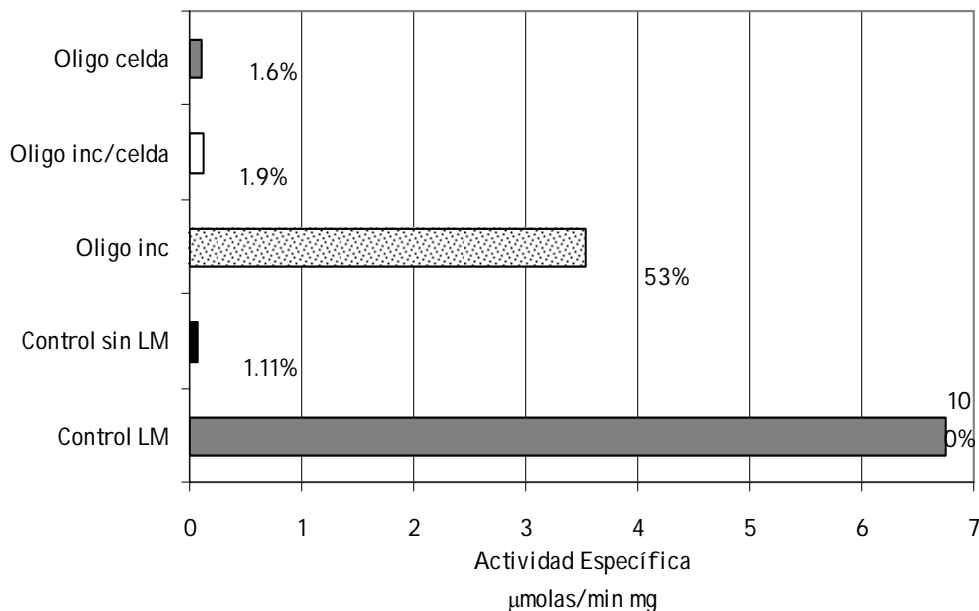


Figura 2. Actividad específica del dímero en ausencia (■) o presencia (▒) de lauril maltósido al 0.01%. Se muestran también 3 barras de inhibición: pre-incubando a la enzima 30 minutos con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de oligomicina(▨) pre-incubándola (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y adicionando 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en el medio (□) o sólo adicionándola el medio (■)

Como se muestra en la Figura 2, es necesario y suficiente para inhibir a la enzima adicionar el inhibidor en el medio de ensayo, la sola pre-incubación logra inhibir un 47% de la actividad pero no es suficiente para lograr la inhibición total.

Se puede observar en la figura 3 que al poner a la enzima en contacto con una concentración final de 0.01% de diferentes detergentes no iónicos, no todos los detergentes activan por igual a la enzima; los que activan considerablemente son lauril maltósido, Tween 20, Tween 80, Decanoil sacarosa y C₁₂E₈, por su parte Triton X-100 y Triton X-114 activan de manera moderada. Los detergentes O-β-D-glucopiranosido, Decanoil metil glucamida y Octanoil metil glucamida no muestran un efecto significativo.

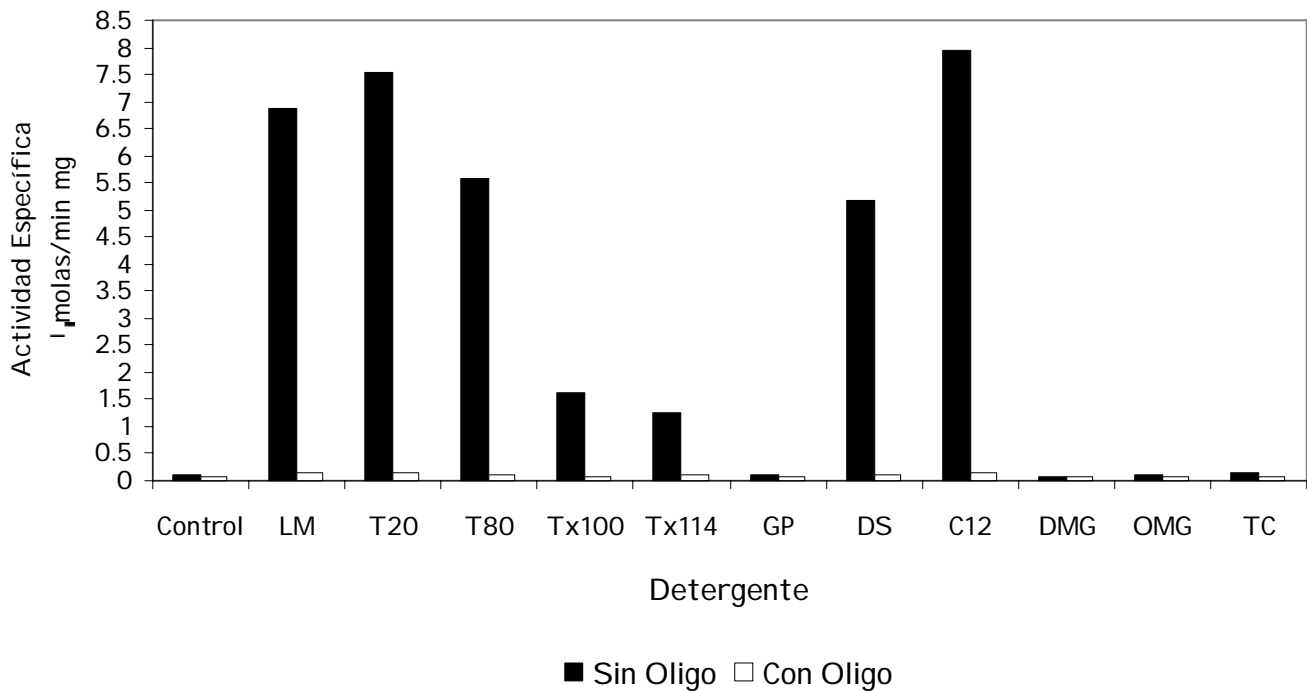


Figura 3. Actividad específica del dímero en presencia de los detergentes indicados a una concentración final de 0.01% en el medio de ensayo. Las barras negras son los valores de actividad específica en ausencia de oligomicina y las barras blancas en presencia del inhibidor. (10^{10} g/ml). Abreviaturas: **LM**- n-Dodecil-β-D Maltósido; **T₂₀** - Tween 20; **T₈₀**-Tween 80; **TX₁₀₀** - Triton X-100; **TX₁₁₄** - Triton X-114; **GP** - O-β-D-glucopiranosido; **DS** - Dodecanoil Sacarosa; **C₁₂E₈** - Monodecileter de Octaetileno glicol; **DMG** - Decanoil metil glucamida; **OMG** - Octanoil metil glucamida; **TC** - Taurodesoxicolato de sodio.

Dados los resultados obtenidos se decidió hacer una curva de concentración de dos detergentes en particular: n-β-D Maltósido (LM) y Monodecileter de octaetileno glicol(C₁₂E₈); el primero dado que es el que se utiliza en la purificación de la proteína y el segundo porque fue el que presentó mayor activación en comparación con el control.

Los datos obtenidos se muestran en la figura 4, como se puede apreciar desde concentraciones muy bajas del detergente ya se presenta una activación sensible a oligomicina, que llega a su punto máximo en la concentración 0.01% y después disminuye un poco. Por este motivo se decidió continuar los experimentos posteriores de medición de actividad en presencia de 0.01% de lauril maltósido.

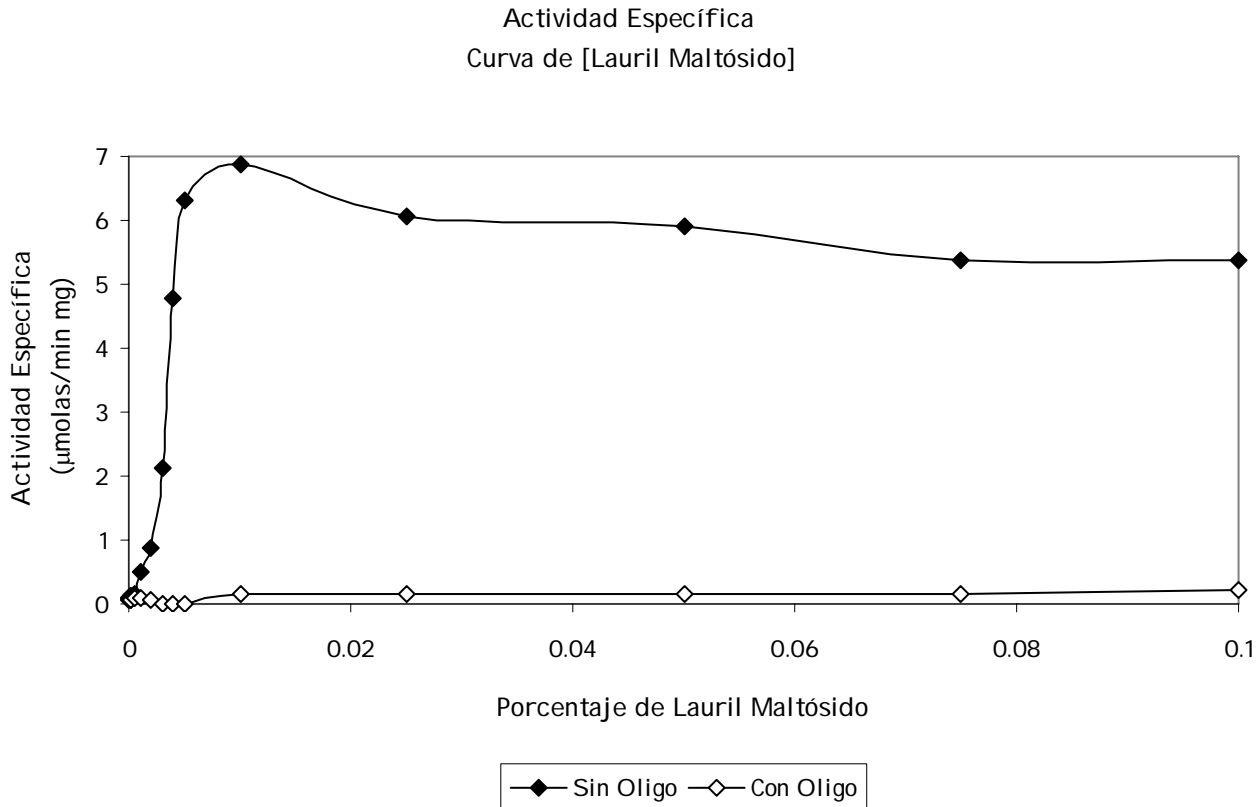


Figura 4. Actividad específica del dímero en presencia de concentraciones crecientes del detergente lauril maltósido, los círculos negros son en ausencia de oligomicina y los blancos en presencia de oligomicina ($10^{\mu\text{g}}/\text{ml}$).

Se decidió valorar si el efecto de activación podía deberse a una monomerización. Para ello se incubaron $100 \mu\text{g}$ de la enzima en concentraciones crecientes del detergente, durante un periodo de 30 minutos en hielo y se evaluó el patrón electroforético en un gel azul nativo para tratar de detectar una posible monomerización de la enzima. Como se puede apreciar en la figura 5, sólo en la concentración de 10% se distingue una banda característica del monómero.

En las concentraciones menores, de 0 a 1 por ciento no se ve más que la banda del dímero. Aunque se trata de un detergente no iónico, se sabe que a concentraciones altas los detergentes no iónicos también pueden llegar a desestabilizar a las proteínas.

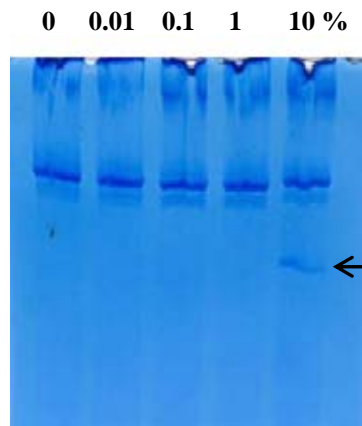


Figura 5. Gel BN PAGE 4-12% teñido con Coomassie. Se observa la presencia sólo de dímero, excepto en el último carril donde se aprecia un poco de monómero, señalado con la flecha. En la parte superior se muestra la concentración final de lauril maltósido agregado a la muestra.

En la figura 6 se muestra la curva de concentración del detergente $C_{12}E_8$, llevada a cabo en condiciones similares a la curva de lauril maltósido. Como se puede notar, en el caso de este detergente también hay una activación desde concentraciones muy pequeñas y un máximo de activación en 0.01% pero concentraciones crecientes del detergente producen una menor activación de la enzima.

Actividad Específica Promedio
Curva de Monodecileter de Octaetileno glicol

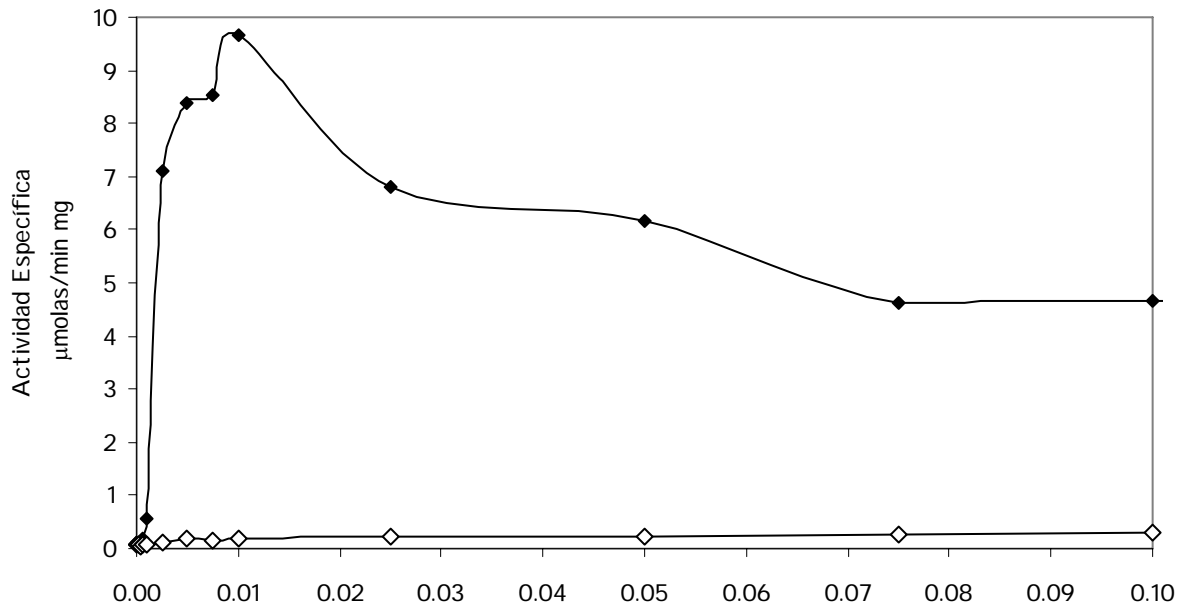


Figura 6. Actividad específica del dímero en presencia de

concentraciones crecientes del Porcentaje de Monodecileter de Octaetileno glicol detergente $C_{12}E_8$, los rombos negros son en ausencia de oligomicina y los blancos en presencia de oligomicina ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$).

4.3 DETERMINACIÓN I₅₀ DE OLIGOMICINA

La oligomicina es un macrólido producido por bacterias del tipo *Streptomyces*, actúa específicamente bloqueando el paso de los protones del segmento F₀ a F₁, impidiendo la transmisión de la señal del gradiente de protones, mediante este mecanismo inhibe la fosforilación oxidativa. Se ha reportado para otras ATP sintasas una concentración inhibitoria de oligomicina de 10 µg x ml⁻¹ por lo que se hizo también una curva de sensibilidad a oligomicina, incubando a la enzima (20 µg) durante al menos 30 minutos en hielo y adicionando la misma concentración en el medio de ensayo. Como se puede apreciar en la figura 7, la concentración I₅₀ (0.05 µg x ml⁻¹) es similar a la reportada para otras ATP sintasas (Pedersen, 1975)

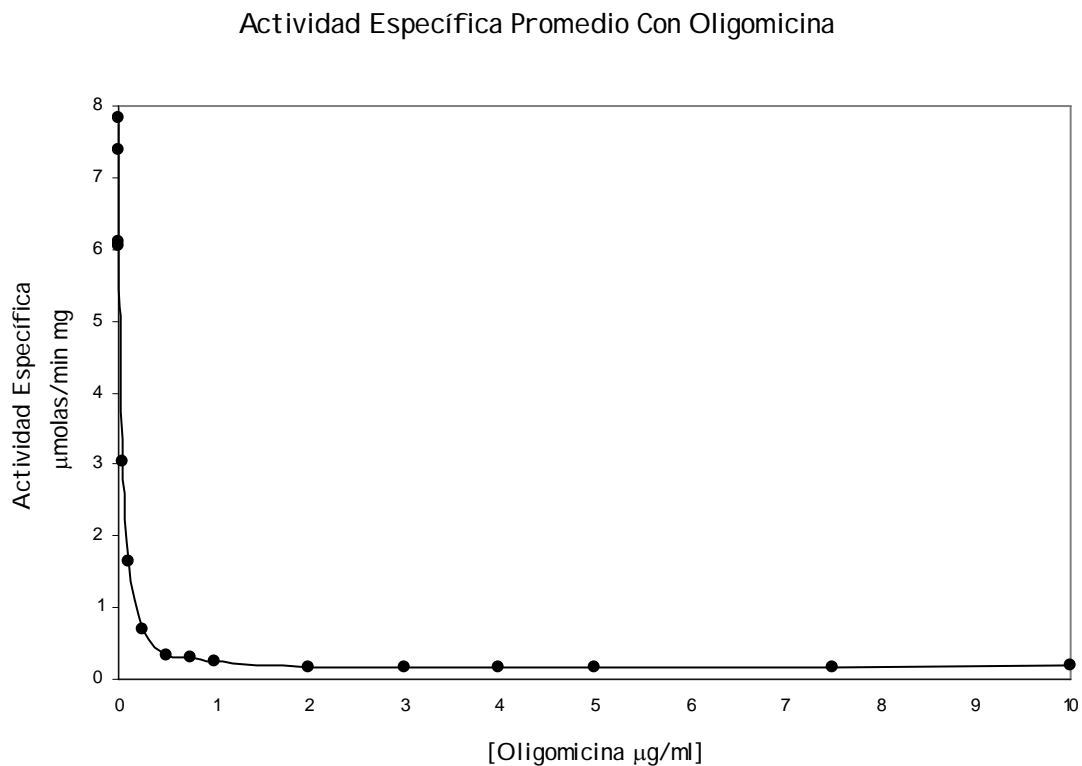


Figura 7. Actividad específica del dímero en presencia de concentraciones crecientes de oligomicina (0-10^{µg}/ml).

Como ya se mencionó, el taurodesoxicolato de sodio causa la monomerización de la ATP sintasa, esto se ilustra en la figura 8 con un gel azul nativo del 4 al 12% donde se incubaron 100µg de ATP sintasa con concentraciones crecientes del detergente desde 0 a 10% por un periodo de 30 minutos en hielo y posteriormente se cargaron en un gel azul nativo. Este se fijó y se tiñó con azul de Coomassie. El gel de la figura 8 muestra claramente que a concentraciones crecientes del detergente disminuye la cantidad de dímero y aumenta la de monómero, y que a concentraciones de 1.5% de taurodesoxicolato o mayores comienza a aparecer el sector F₁ libre.

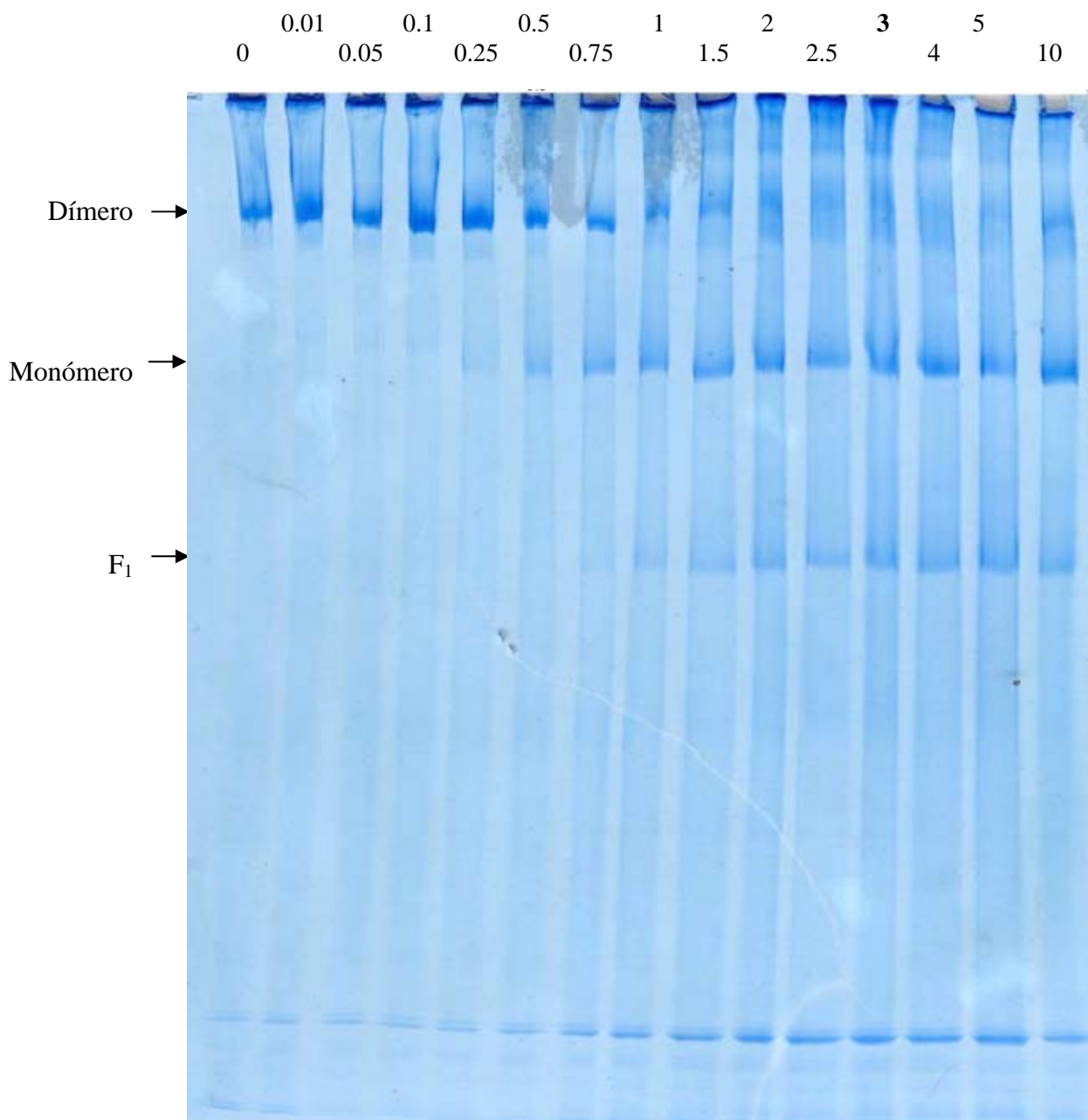


Figura 8. Gel BN PAGE, teñido con azul de Coomassie, en la parte superior se muestra la concentración final (porcentaje) de taurocolato con la cual se incubó a la ATP sintasa.

4.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ATPasa EN FUNCIÓN DE CONCENTRACIONES CRECIENTES DE TAUROCOLATO

Se evaluó la actividad de la ATP sintasa en función de concentraciones crecientes de taurodesoxicolato, dado que como se aprecia en la figura 8, la enzima se disocia al ir aumentando la concentración del detergente.

Se adicionó al medio de reacción lauril maltósido a una concentración final de 0.01% para activar a la enzima. Los datos obtenidos se muestran en la figura 9, al ir aumentando la concentración de taurocolato la actividad específica va disminuyendo y se va perdiendo la sensibilidad a la oligomicina, esto debido a la liberación del sector F_1 , a ésta liberación se debe el aumento de actividad que se observa en presencia de oligomicina en el trazo de los rombos vacíos.

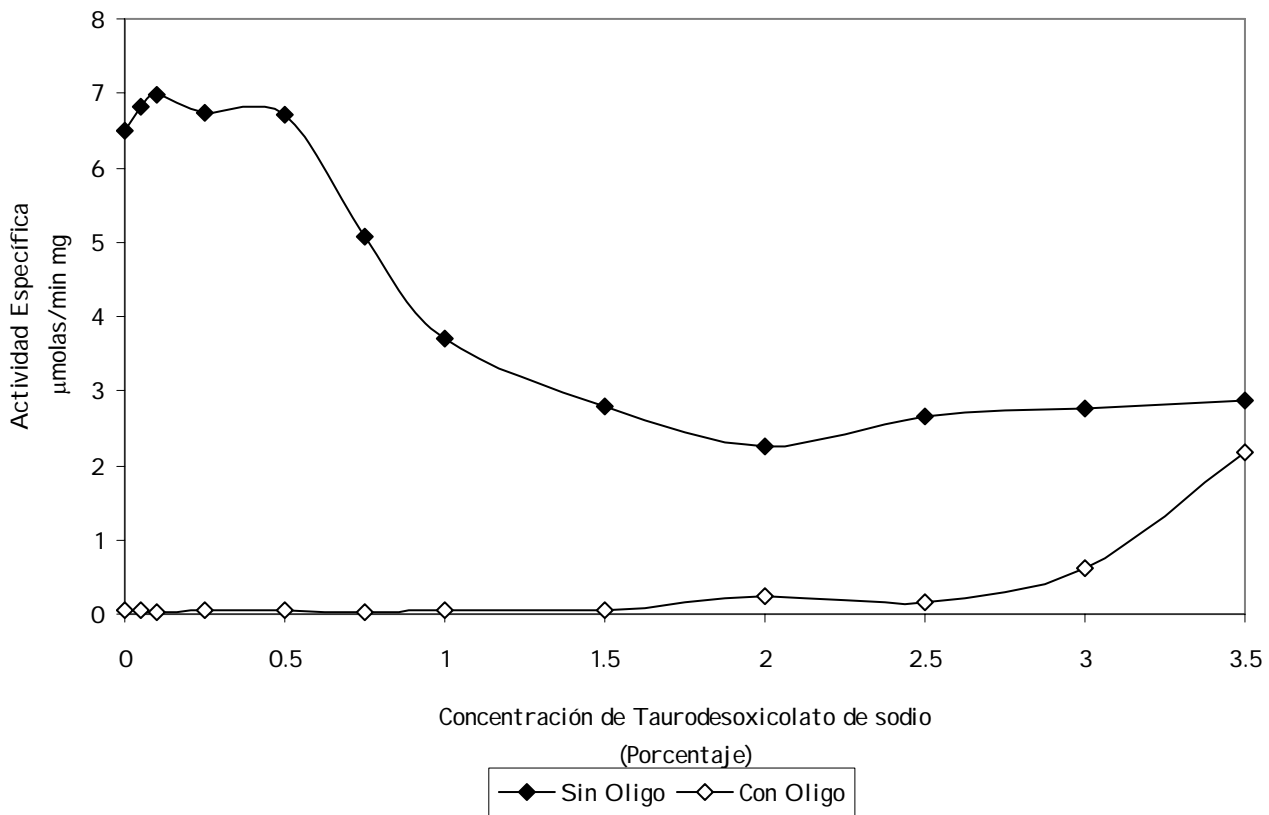


Figura 9. Actividad específica en presencia de concentraciones crecientes del detergente Taurocolato, los rombos negros son en ausencia de oligomicina y los blancos en presencia de oligomicina ($10 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$).

La activación por lauril maltósido también fue evaluada en un gel nativo, en el cual se disoció a la enzima con concentraciones crecientes de taurocolato. Se incubaron 100 µg de ATP sintasa durante 30 minutos en hielo y posteriormente se cargaron a un gradiente de acrilamida en gel azul nativo del 4 al 12%. La actividad se evaluó mediante el método reportado por Zerbetto et al. (Zerbetto, 1997), modificado por Schägger (Wittig et. al, 2005), al seguir la aparición de un precipitado blanquecino (ver Materiales y Métodos para más información). Después de aproximadamente 3 horas se adicionó 0.1% de lauril maltósido en el amortiguador de actividad, observándose un notable incremento en la actividad de las bandas.

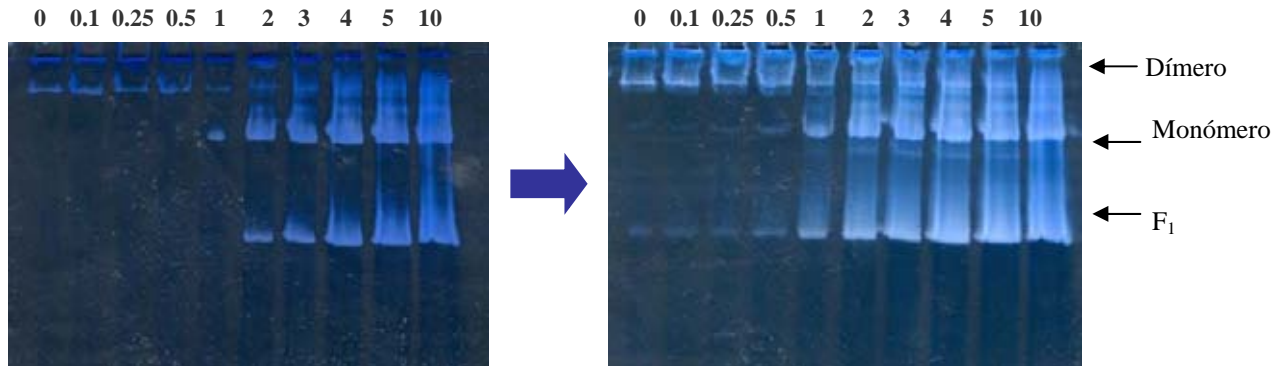


Figura 10. Gel BN PAGE 4-12%, revelando actividad de ATP sintasa por el método de Zerbetto et al. (Zerbetto 1997), modificado por Schägger, el panel de la izquierda es en ausencia de lauril maltósido y el panel derecho muestra el mismo gel colocando 0.01% del detergente en el amortiguador de la reacción.

4.5 COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL DÍMERO, DEL MONÓMERO Y DE LA F₁ EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE DETERGENTE

Al observar que la actividad del dímero aumentó en presencia del detergente lauril maltósido, se decidió evaluar si éste aumento también podía darse en el monómero y en el sector F₁. Se comparó la actividad del dímero, del monómero y del sector F₁ en presencia y ausencia del detergente lauril maltósido en el medio de ensayo, a una concentración de 0.01%. El monómero se formó incubando a la enzima dimérica con una concentración de 3% de taurocolato durante 30 minutos en hielo. El sector F₁ se obtuvo calentando a la enzima dimérica 2 minutos a 60°C. Se probó también una concentración de 0.5% de taurocolato, la cual monomeriza en menor proporción a la enzima. Se evaluó también la sensibilidad a oligomicina en todos los casos.

En la figura 11 se muestra el resultado obtenido al medir la actividad en ausencia de lauril maltósido. La actividad específica va aumentando a medida que se incrementa la concentración de taurocolato y, por tanto, de especies disociadas de la enzima. Esto es más evidente en el caso de la F₁ obtenida por calentamiento, donde la disociación es completa.

Como se puede apreciar en condiciones sin detergente, la oligomicina parece tener un efecto inhibitorio muy pobre sobre la enzima. Es importante observar la escala y compararla con la figura 12, para notar el efecto potenciador del detergente lauril maltósido sobre la actividad.

Actividad Específica de ATPasa en un medio sin Lauril maltósido

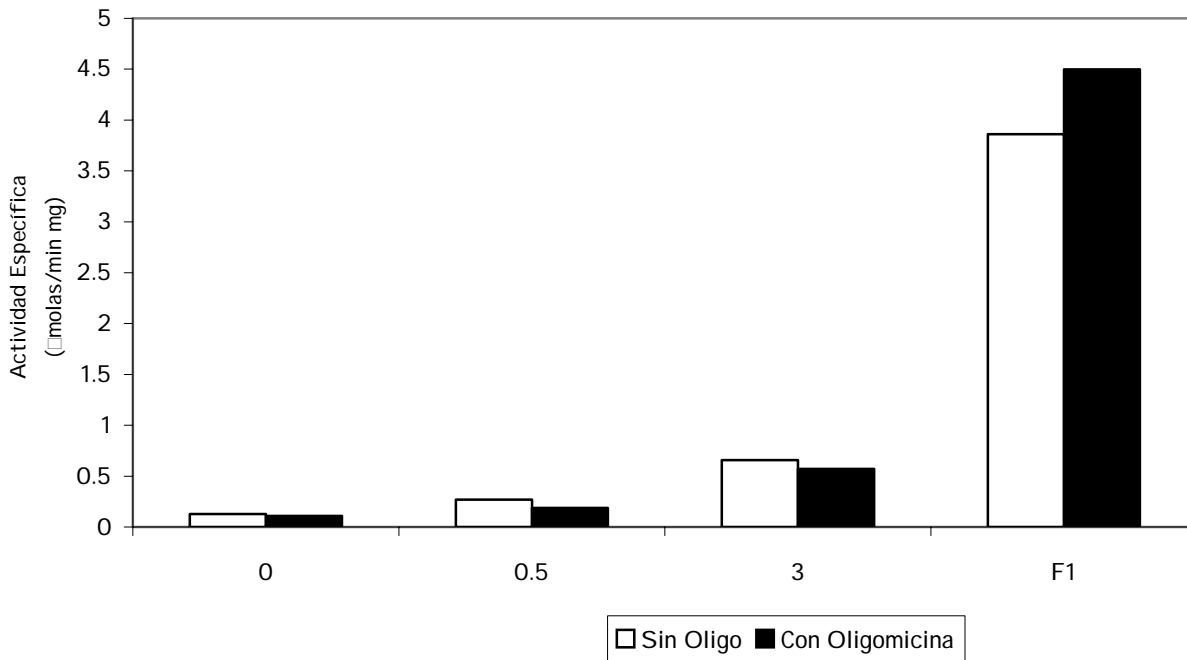


Figura 11. Actividad específica del dímero, entre paréntesis se muestra el porcentaje de taurocolato adicionado a la ATP sintasa: (0%), monómero(3%) y del sector F₁ en un medio sin detergente. Se muestra también la concentración intermedia de 0.5%. Las barras blancas son en ausencia de oligomicina y las negras en presencia de oligomicina (10^{μg}/ml). Los valores indicados en el eje de las ordenadas representan la concentración final de taurodesoxicolato adicionada a la ATP sintasa.

En la figura 12 se muestra un ensayo similar al de la figura 11, en el cual se obtuvo el monómero se incubando a la enzima dimérica con una concentración de 3% de taurocolato durante 30 minutos en hielo. El sector F₁ se obtuvo calentando a la enzima dimérica 2 minutos a 60°C. Se probó también una concentración de 0.5% de taurocolato, la cual monomeriza en menor proporción a la enzima. Se evaluó también la sensibilidad a oligomicina en todos los casos. La diferencia entre éste ensayo y el que se ilustra en la figura 11 es que en éste caso se adicionó 0.01% de lauril maltósido en el medio de ensayo.

Actividad Específica ATPasa en un medio con Lauril maltósido al 0.01%

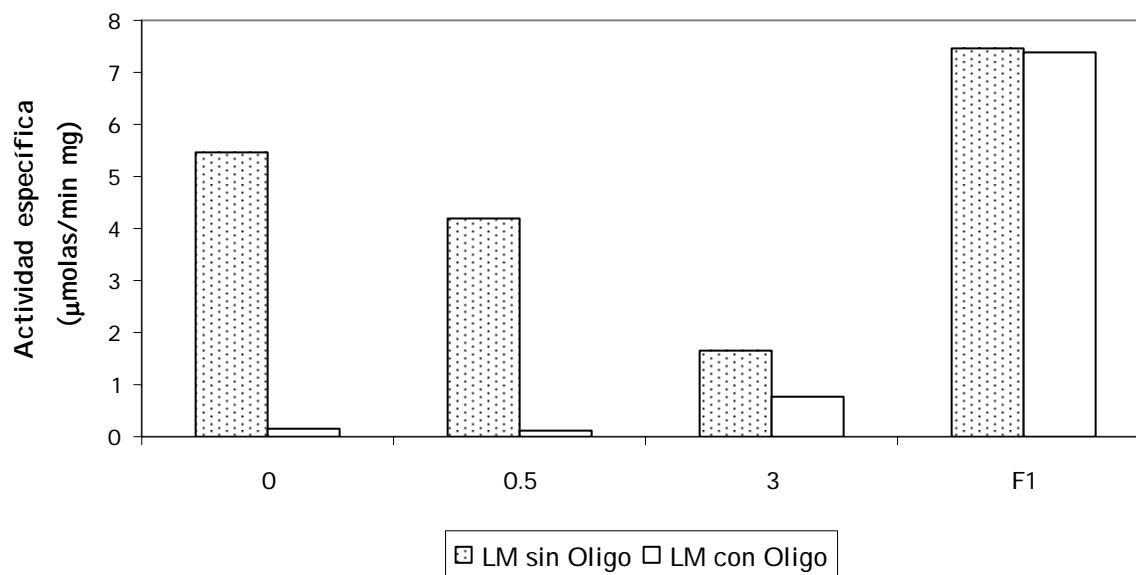


Figura 12. Actividad específica del dímero entre paréntesis se muestra el porcentaje de taurocolato adicionado a la muestra: (0%), monómero(3%) y del sector F₁ en un medio con 0.01% de Lauril maltósido. Se muestra también la concentración intermedia de 0.5%. Las barras punteadas son en ausencia de oligomicina y las blancas en presencia de oligomicina (10^{μg}/ml). Los valores indicados en el eje de las ordenadas representan la concentración final de taurodesoxicolato adicionada a la ATP sintasa.

En la figura 13, puede compararse la actividad en ausencia y presencia del detergente. En ausencia del detergente la actividad del dímero es de 0.13 unidades contra 6 en presencia del detergente. En el caso de la concentración 0.5%, en ausencia de lauril maltósido, la actividad es de 0.27 unidades y de 4.5 en presencia del detergente. Con 3%, 0.65 unidades sin detergente contra 1.72 con detergente. Incluso el sector F₁ presenta un aumento de actividad, de 4 unidades sin detergente a 8.3 en presencia del lauril maltósido.

Se puede observar que en ausencia del detergente la actividad del monómero es ligeramente mayor que la del dímero, pero se activa en menor proporción en presencia del detergente. De manera sorprendente, la actividad del sector F₁ también aumenta considerablemente en presencia del detergente.

En comparación con las condiciones anteriores, al adicionar el detergente al medio de ensayo la actividad del dímero se incrementa de manera evidente y esta actividad es sensible a oligomicina, excepto en la concentración de 3% y en la F₁ obtenida por calentamiento.

Actividad Específica ATPasa con vs sin lauril maltósido

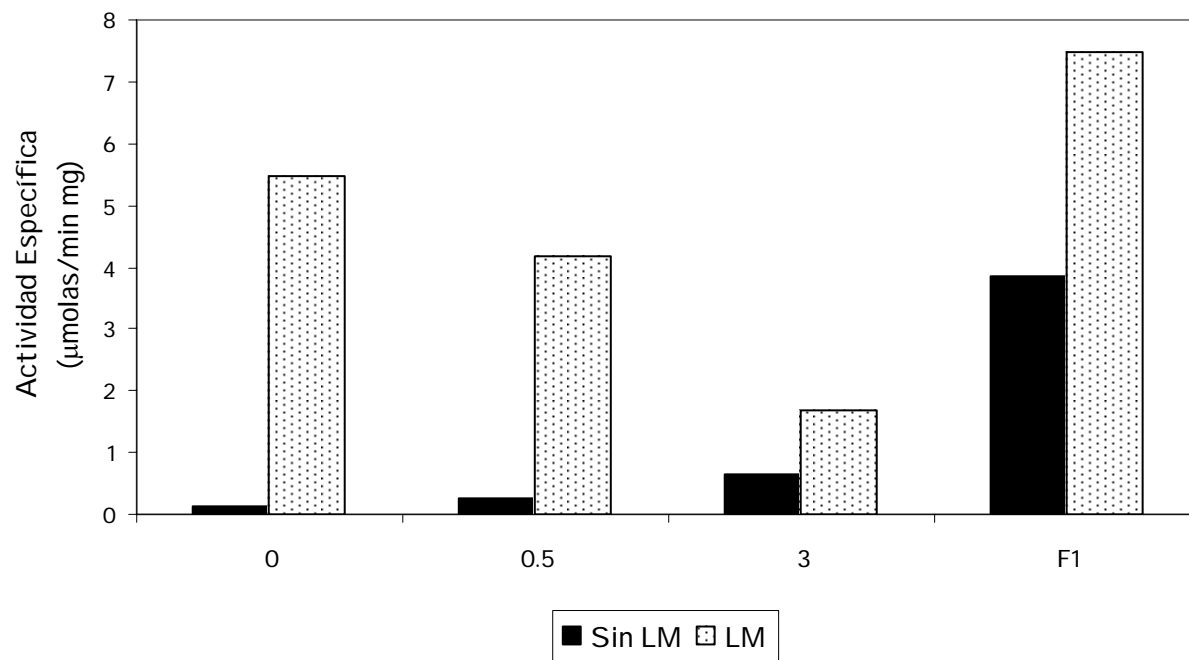


Figura 13. Comparación de la actividad específica del dímero, entre paréntesis se muestra el porcentaje de taurocolato adicionado a la ATP sintasa: (0%) monómero (3%) y el sector F₁ en ausencia (barras negras) y presencia (barras punteadas) de Lauril maltósido. Se muestra también una concentración intermedia de 0.5%. Los valores indicados en el eje de las ordenadas representan la concentración final de taurodesoxicolato adicionada a la ATP sintasa.

4.6 ENSAYOS DE PROTEÓLISIS PARCIAL

Las peptidasas o proteasas son enzimas que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas. Usan una molécula de agua para hacerlo y por lo tanto se clasifican como hidrolasas. Las peptidasas rompen enlaces peptídicos específicos, dependiendo en la secuencia de aminoácidos de la proteína. La proteólisis puede ser limitada o ilimitada, esto en función de la estructura terciaria de la proteína y de los sitios sensibles al corte que se exponen en la conformación que una proteína adopta al plegarse.

Dado que en la literatura se ha descrito que la proteólisis limitada o parcial de una ATP sintasa puede incrementar su actividad específica (Tuena de Gómez-Puyou, 1977), se estudió el efecto de cinco proteasas sobre la ATP sintasa de *Polytomella* sp. Se probaron las siguientes proteasas: subtilisina, tripsina, termolisina, pronasa E y quimotripsina en dos concentraciones; 1:1000 y 1:100 (peso x peso⁻¹ proteasa : ATP sintasa).

Las proteasas se disolvieron en Tris-HCl 20mM pH 7.0. Se hicieron soluciones madre de 10 mg x ml⁻¹, se fraccionaron y se almacenaron en el REVCO a -70°C. Los inhibidores se disolvieron en DMSO en el caso del PMSF y en agua destilada el TLCK. En los controles correspondientes se adicionaron los volúmenes de Tris-HCl, DMSO y agua equivalentes a los tiempos de incubación. El procedimiento consistió en incubar 80µg de la enzima en presencia de la concentración de proteasa indicada durante un curso de tiempo de hasta 60 minutos, después de transcurrido el tiempo, se inhibió a la proteasa con 1mM de PMSF y TLCK. Las muestras se cargaron en geles Tricina SDS-PAGE al 14% y se tiñeron con azul de Coomassie.

4.6.1 SUBTILISINA

La subtilisina es una proteasa de serina del grupo B, pertenece a la familia de las bacteriocinas, que son sustancias químicas con actividad bactericida de naturaleza proteica producidas por células procariontes y eucariontes. La peptidasa es producida por *Bacillus subtilis*, sus sitios de corte son después de triptofano, tirosina, fenilalanina, leucina y metionina pero se sabe que también puede dar lugar a cortes inespecíficos. En la figura 14 se muestra el patrón electroforético de las incubaciones con subtilisina en el tiempo a dos concentraciones que se probaron; 1:1000 y 1:100 (peso x peso⁻¹ proteasa : ATP sintasa). Como se observa, la subtilisina digirió de manera importante a varias subunidades del complejo, con 1:1000 – ASA1, β , α y ASA3 y con la concentración 1:100 - ASA1, β , α , ASA2, ASA4, ASA3 y δ .

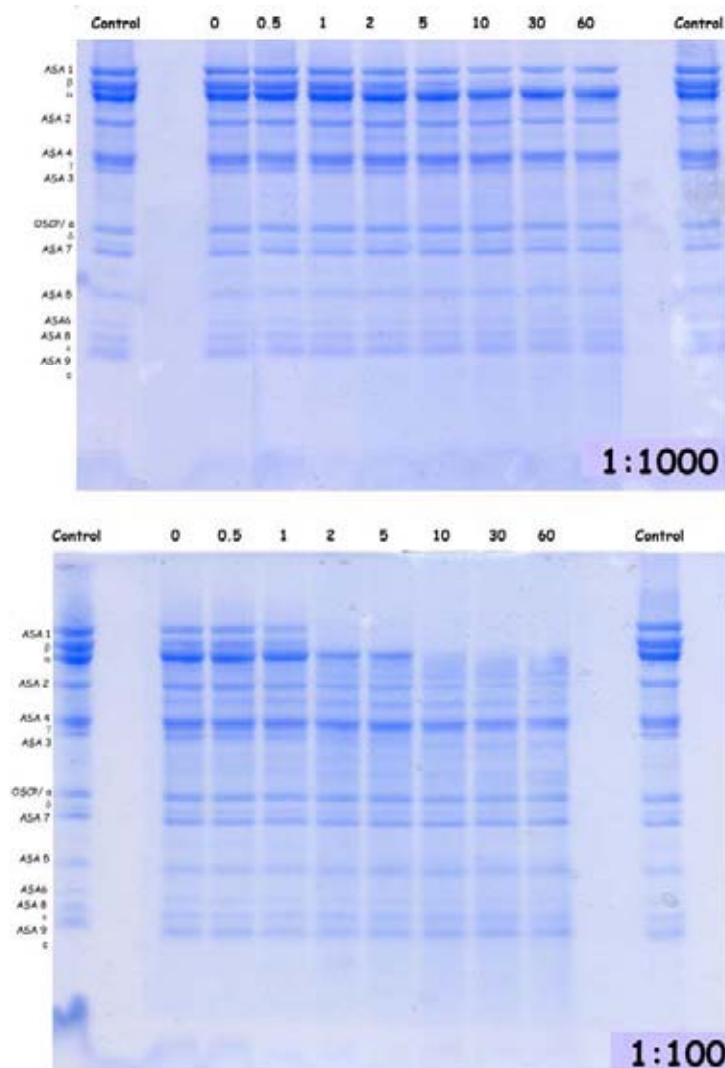


Figura 14. Patrón electroforético de la ATP sintasa incubada con subtilisina a diferentes tiempos, indicados en la parte superior de los geles (minutos). Gel de tricina-SDS al 14% teñido con azul de Coomassie, en la parte superior con una concentración 1:1000 y en la parte inferior, 1:100 (^{w/w} proteasa/ATP sintasa)

4.6.2 TRIPSINA

La tripsina es una proteasa de serina del grupo A, es producida en el páncreas y secretada en el duodeno, donde es esencial para la digestión. El pH óptimo para su actividad es 8.0 y la temperatura óptima es 37°C. Es una enzima específica ya que corta en el extremo carboxilo detrás de la lisina y la arginina, ambos aminoácidos con grupos R cargados positivamente, excepto cuando hay una prolina enseguida. Como se aprecia en la figura 15, en la parte superior se muestra la ATP sintasa incubada a diferentes tiempos con tripsina 1:1000, en esta concentración las subunidades que se degradan son ASA1, β , ASA2, ASA4, ASA3, OSCP/ α , δ y ASA7. En la parte inferior, se ilustra la concentración 1:100, la cual degrada a las subunidades ASA1, β , α , ASA2, ASA4, γ , ASA3, OSCP/ α , δ y ASA7.

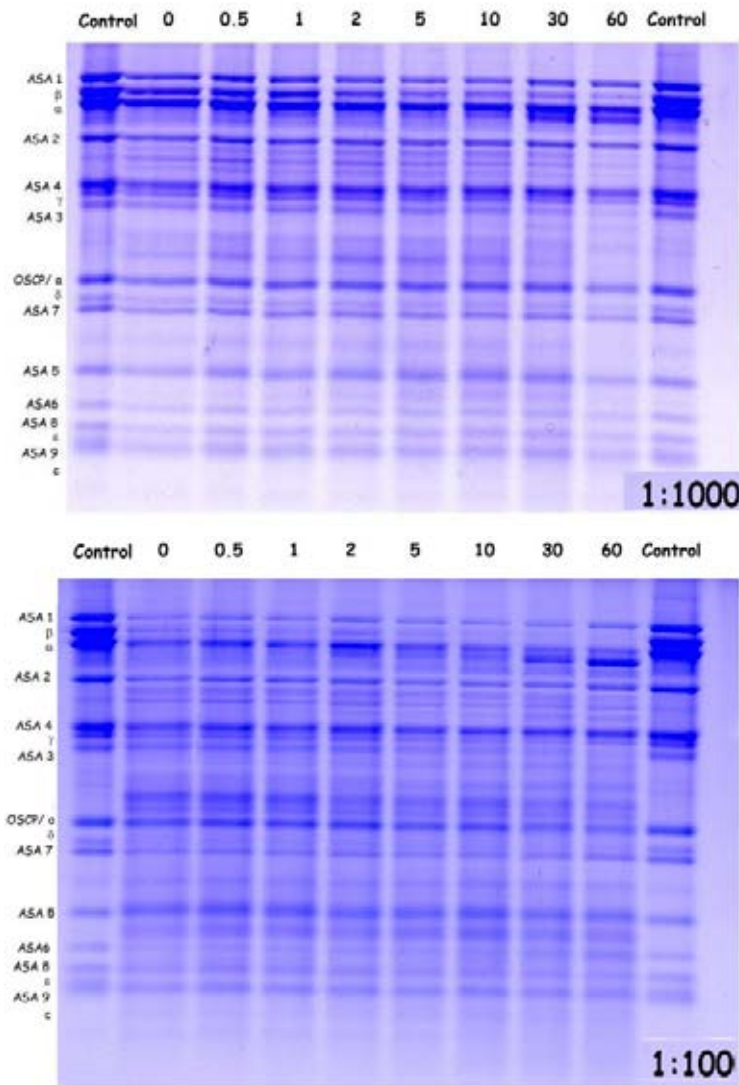


Figura 15. Patrón electroforético de la ATP sintasa incubada a diferentes tiempos indicados en la parte superior de los gels (minutos) con tripsina. Gel de tricina-SDS al 14% teñido con azul de Coomassie, en la parte superior con una concentración 1:1000 y en la parte inferior, 1:100 ($^w/w$ proteasa/ATP sintasa).

4.6.3 TERMOLISINA

La termolisina es una metaloproteasa producida por *Bacillus thermoproteolyticus*, corta delante de aminoácidos aromáticos y alifáticos (con cadena lateral de hidrocarburo simple) siempre que sean ramificados: fenilalanina, tirosina, triptofano, isoleucina y valina. Si hay una prolina antes del residuo la peptidasa es incapaz de cortar. Como se puede apreciar en la figura 16, la termolisina prácticamente no digiere a la enzima. Se probó con otro lote de termolisina y se observó el mismo patrón. Esto indica que en la estructura nativa no hay asas expuestas que sean sensibles al corte por termolisina, a pesar de que se predicen múltiples sitios de corte en la proteína completamente desnaturalizada.

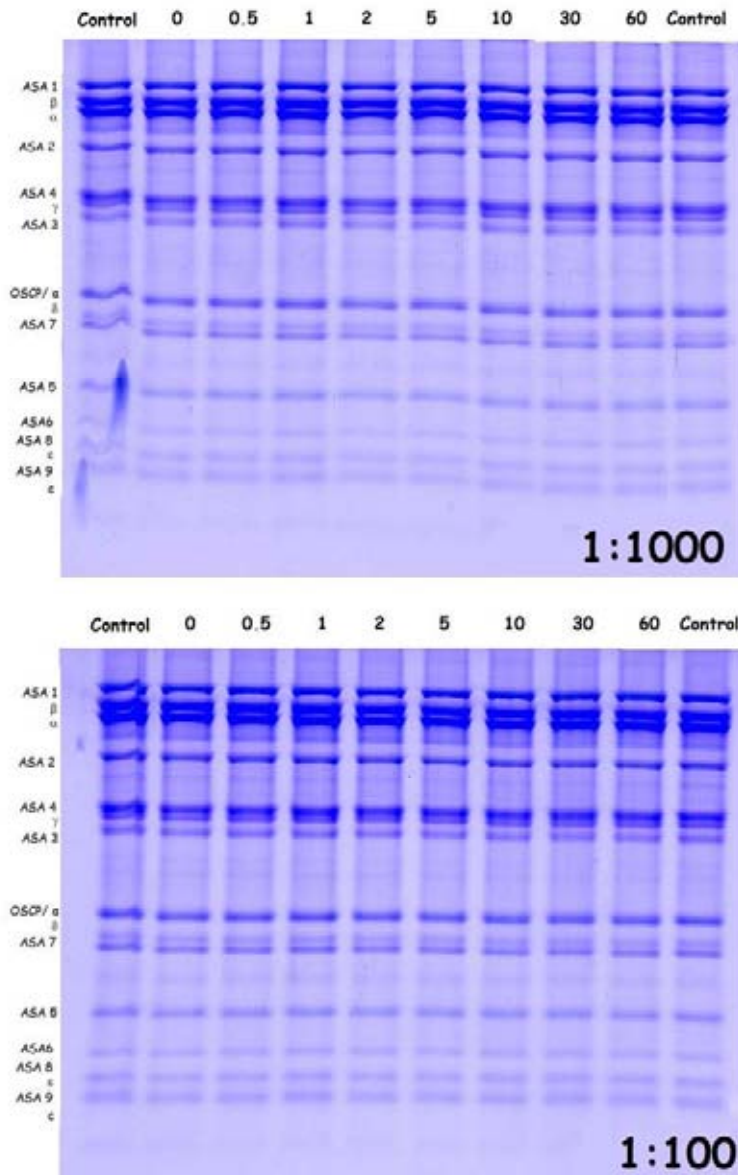


Figura 16. Patrón electroforético de la ATP sintasa incubada con termolisina a diferentes tiempos indicados en la parte superior de los geles (minutos). Gel de tricina-SDS al 14% teñido con azul de Coomassie, en la parte superior con una concentración 1:1000 y en la parte inferior, 1:100 ($^{w/w}$ proteasa/ATP sintasa).

4.6.4 PRONASA E

Es una peptidasa que proviene de *Streptomyces griseus*, en realidad es una mezcla de tres actividades proteolíticas que incluye una proteasa de serina. Presenta un amplio rango de especificidad que se cree está mediado por un sitio activo compuesto por un residuo de aspartato, uno de histidina y serina. Hidroliza preferentemente enlaces en el extremo carboxilo del ácido glutámico o aspártico. En el caso de esta peptidasa, en una concentración baja (1:1000), degrada las subunidades β , ASA3 y δ . Su acción es muy generalizada a una concentración 1:100 donde se puede apreciar una proteólisis casi total. Las subunidades que parecen resistir más la acción de la pronasa son: ASA4, ASA5, ASA7 y ASA9.

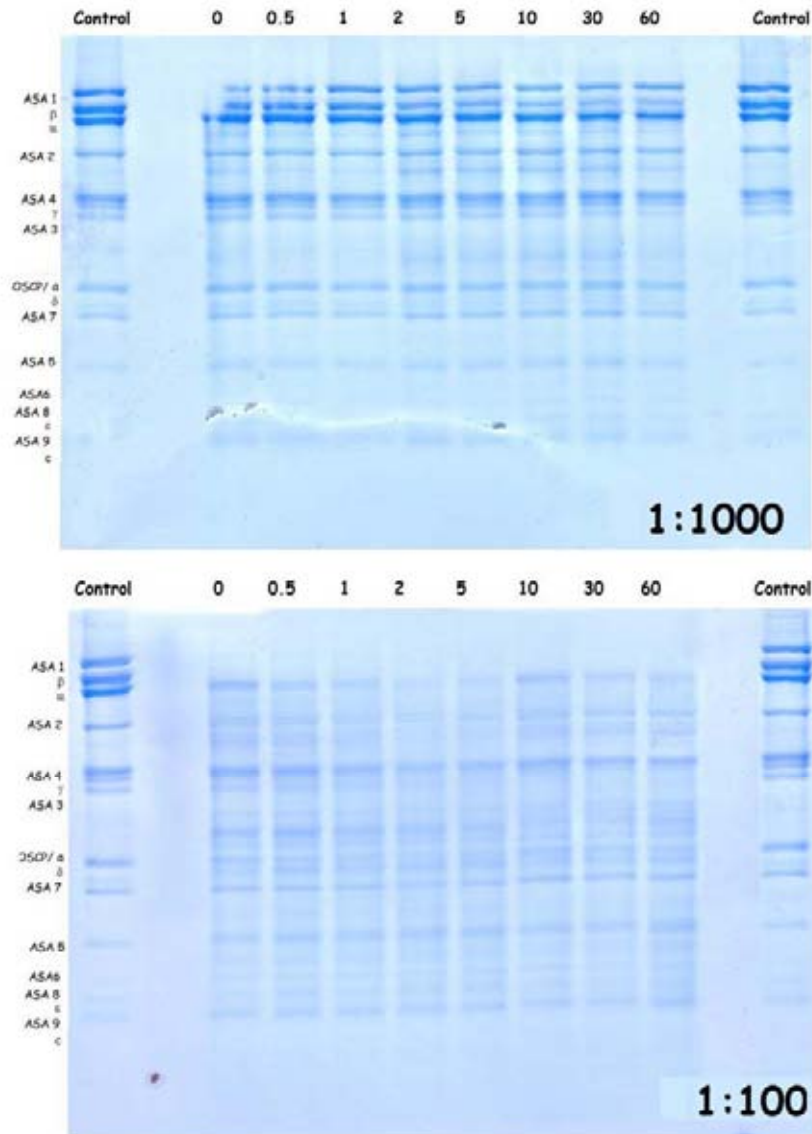


Figura 17. Patrón electroforético de la ATP sintasa incubada con pronasa E a diferentes tiempos, los cuales se indican en la parte superior de los geles (minutos). Gel de tricina-SDS al 14% teñido con azul de Coomassie, en el panel superior con una concentración 1:1000 y en la parte inferior, 1:100 (w/w proteasa/ATP sintasa).

4.6.5 QUIMOTRIPSINA

La quimotripsina *in vivo* es una enzima proteolítica que actúa en los sistemas digestivos de los mamíferos y otros organismos. Sus principales sustratos son aminoácidos aromáticos o muy hidrofóbicos, como triptofano, tirosina, fenilalanina, metionina y leucina, que son hidrolizados en su extremo carboxilo terminal. Se puede notar en la figura 18 que esta peptidasa presenta un efecto parcial sobre la ATP sintasa. En el panel superior se muestran tiempos de incubación con la proteasa a una concentración 1:1000; como se puede notar, la única subunidad degradada es ASA3, en tanto que con 1:100 se degradan β y ASA3.

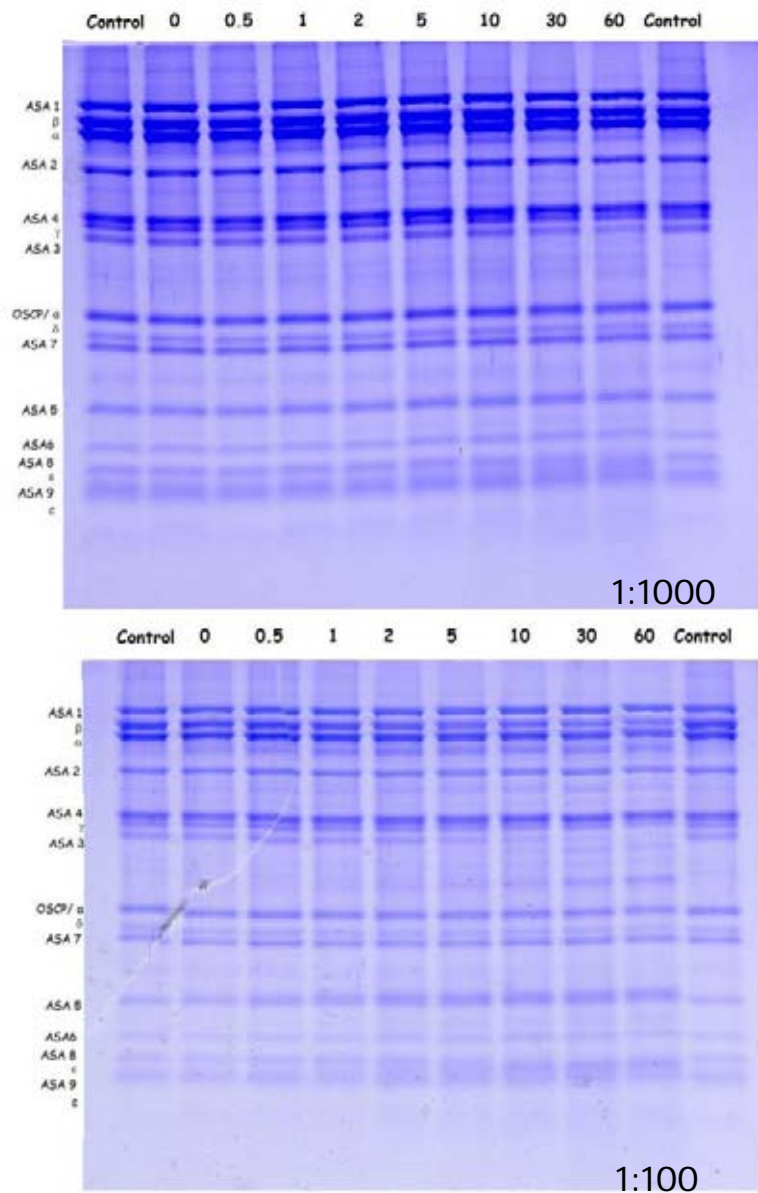


Figura 18. Patrón electroforético de la ATP sintasa incubada con quimotripsina a diferentes tiempos indicados en la parte superior de los geles (minutos). Gel de tricina-SDS al 14% teñido con azul de Coomassie, en la parte superior con una concentración 1:1000 y en la parte inferior, 1:100 (^w/_w proteasa/ATP sintasa).

4.6.6 COMPARACIÓN DEL EFECTO DE LAS PROTEASAS SOBRE LAS SUBUNIDADES DE LA ATP SINTASA

A continuación se muestra una tabla que resume las subunidades que se proteolizan en presencia de las diferentes proteasas en ambas concentraciones. Como se aprecia las subunidades más susceptibles a ser degradadas son ASA 1, β , α , ASA 2, ASA 3 y δ . OSCP/ a y ASA 7 son menos susceptibles, pero también se degradan. Por su parte, ASA 5, ASA 6, ASA 8, ASA 9, ϵ y c, parecen mantenerse intactas. La proteasa que degrada más a la enzima es la tripsina, seguida por la subtilisina, mientras que la termolisina pareciera no degradar ninguna subunidad. La quimotripsina es la peptidasa que presenta una proteólisis limitada sobre la proteína, aún a altas concentraciones.

Subunidad	Subt	Subt	Trp	Trp	Termo	Termo	Pron E	Pron E	Quimo	Quimo
	1:1000	1:100	1:1000	1:100	1:1000	1:100	1:1000	1:100	1:1000	1:100
ASA1	+	+	+	+				+		
β	+	+	+	+			+	+		+
α	+	+		+				+		
ASA2		+	+	+				+		
ASA4		+	+	+						
γ			+	+				+		
ASA3	+	+	+	+			+	+	+	+
OSCP/a			+	+				+		
δ		+	+	+			+	+		
ASA7			+	+						
ASA5										
ASA6										
ASA8										
ASA9										
ϵ										
C										

Tabla 2. Se muestra una comparación de las subunidades que se degradan (+) con las 5 diferentes proteasas en ambas concentraciones (1:1000 y 1:100 ^{w/w} proteasa : ATP sintasa). Subt – subtilisina; Trp – tripsina; Tm-termolisina; PE – pronasa e; Qt-quimotripsina

4.7 EVALUACIÓN DE LA PROTEÓLISIS EN GELES NATIVOS Y DESNATURALIZANTES

Como se puede concluir de los experimentos anteriores, la quimotripsina es la peptidasa cuyo efecto sobre la ATP sintasa está limitado al corte de unas cuantas subunidades. Por lo anterior se decidió evaluar cuál es el efecto de la proteasa sobre la estructura oligomérica de la ATP sintasa.

Se evaluó el efecto de la quimotripsina (1:1000 y 1:100) sobre la estructura dimerica y sobre el monómero, obteniéndose éste al incubar la enzima durante 30 minutos con taurocolato al 3% en hielo y adicionando después la proteasa en la concentración deseada. Se fueron tomando las muestras a los tiempos indicados y se inhibió la reacción con 1mM de PMSF y 1 mM de TLCK. Posteriormente las muestras se cargaron en geles azules nativos con un gradiente del 4 al 12 % de acrilamida. Se incluyó un carril con F₁, obtenida al calentar la misma cantidad de proteína que en los otros carriles durante 2 minutos a 60°C.

Como se puede apreciar en la figura 19, el dímero no se proteoliza drásticamente, sólo se observa la degradación del monómero, que está presente en baja proporción en la enzima purificada desde el principio. Señalado con dos asteriscos (* *) se muestra que la proteasa degrada las bandas de bajo peso molecular (contaminante) presentes en la preparación.

Por su parte, el monómero es altamente susceptible a la acción de la proteasa, ya que desde 30 segundos se aprecia claramente la aparición del sector F₁, el cual se enriquece fuertemente desde el minuto 20 en la concentración de quimotripsina 1:1000 (^w/_w proteasa/ATP sintasa) y al minuto 5 con una concentración de proteasa 1:100 (^w/_w proteasa/ATP sintasa).

Para comparar el efecto de la proteasa sobre el dímero y el monómero, se llevó a cabo un experimento similar pero en geles desnaturizantes de tricina-SDS al 14%. Se siguió el mismo procedimiento que para los geles nativos. El resultado se muestra en la figura 20, donde se puede apreciar que con esta concentración de proteasa las subunidades que se degradan en el dímero son β y ASA3, como ya se había establecido, pero en el caso del monómero es notable que la proteólisis es mucho más amplia; se degradan ASA1, β, α, ASA2, ASA4, ASA3, OSCP, δ, ASA7, ASA5, ASA6.

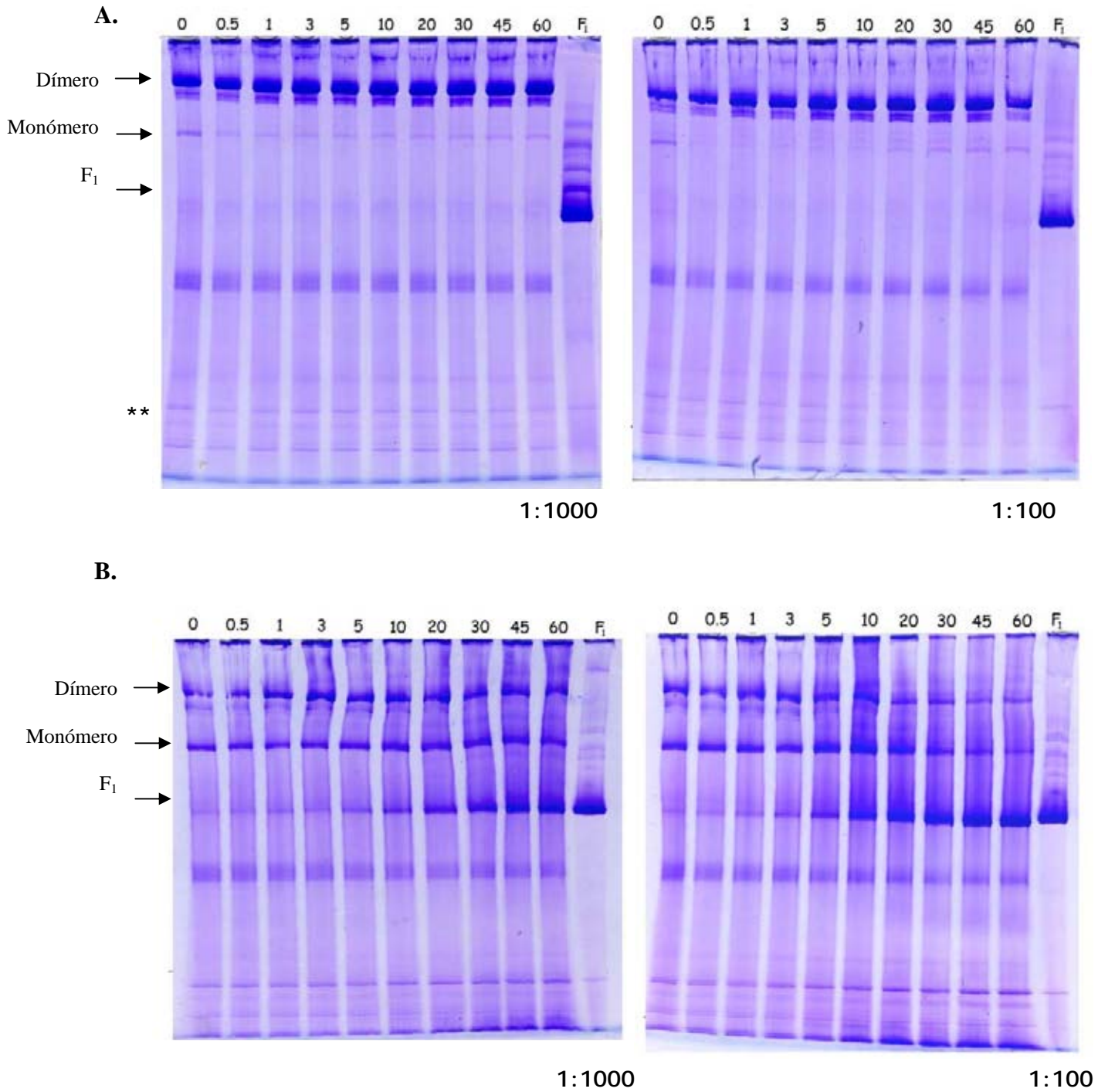
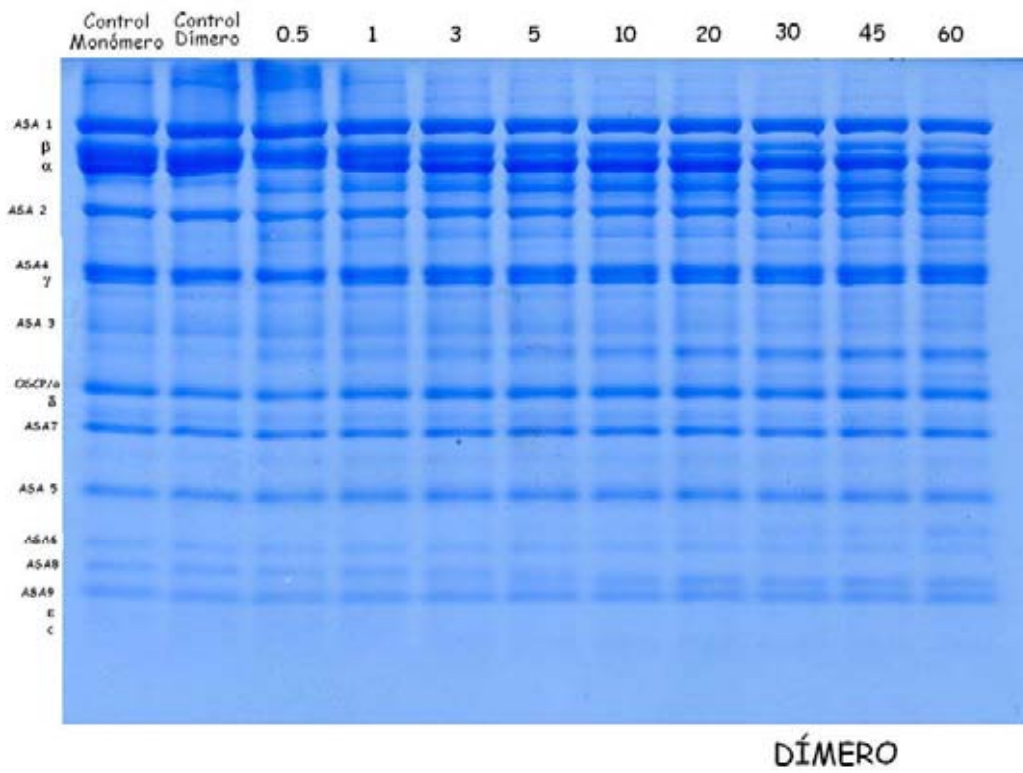


Figura 19. Patrón electroforético en geles azules nativos del 4 al 12% de acrilamida de la proteólisis con quimotripsina 1:1000 y 1:100 del dímero (Panel A) y del monómero (Panel B). Se indica el tiempo de proteólisis en minutos en la parte superior de los ges. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie.

A.



B.

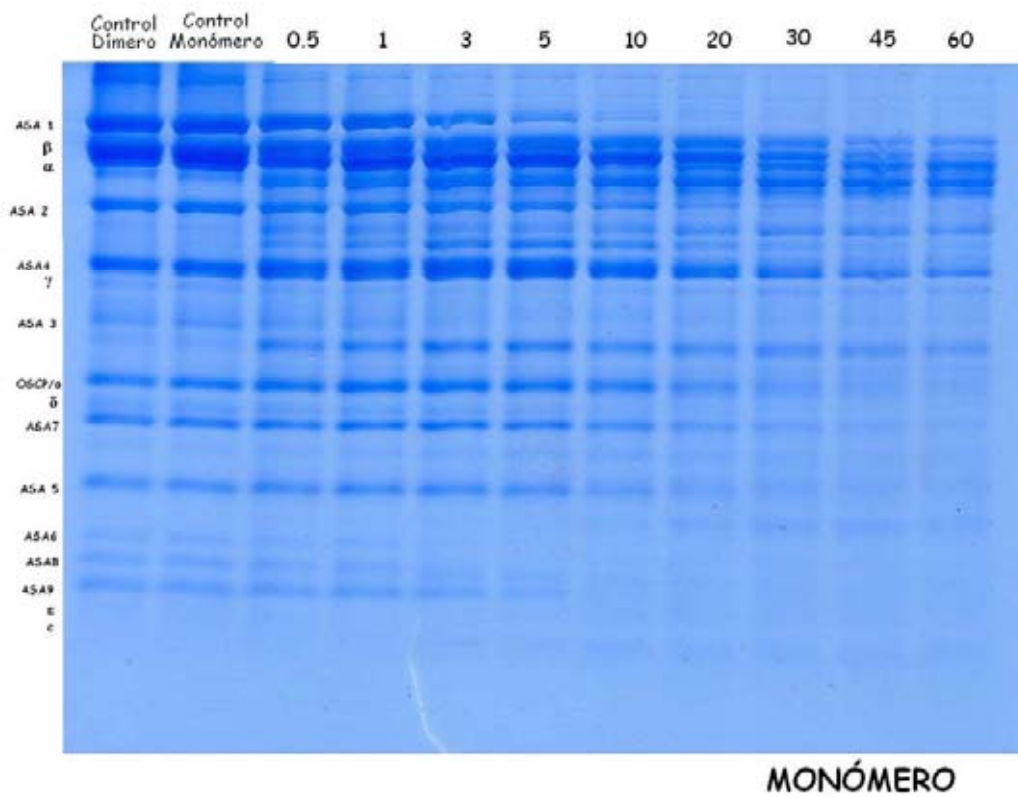


Figura 20. Patrón electroforético en un gel de tricina-SDS al 14% de una curva de tiempo de proteólisis con quimotripsina 1:100 del dímero (Panel A) y del monómero (Panel B). Se indica el tiempo en minutos en la parte superior. El gel se tiñó con azul de Coomassie.

4.8 EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ATPasa EN EL DÍMERO Y MONÓMERO PROTEOLIZADOS

Se evaluó espectrofotométricamente la actividad de ATPasa de ambas preparaciones; dímero y monómero, al proteolizarlas con quimotripsina en una proporción de 1:100 (w:w proteasa : ATP sintasa). Los ensayos se llevaron a cabo adicionando lauril maltósido en el medio del ensayo a una concentración final 0.01%. Como se puede apreciar en la figura 21, la actividad del dímero parece mantenerse constante durante todo el tiempo de proteólisis en tanto que la del monómero aumenta al irse proteolizando la proteína. La liberación del sector F₁ probablemente sea la responsable del aumento en la actividad.

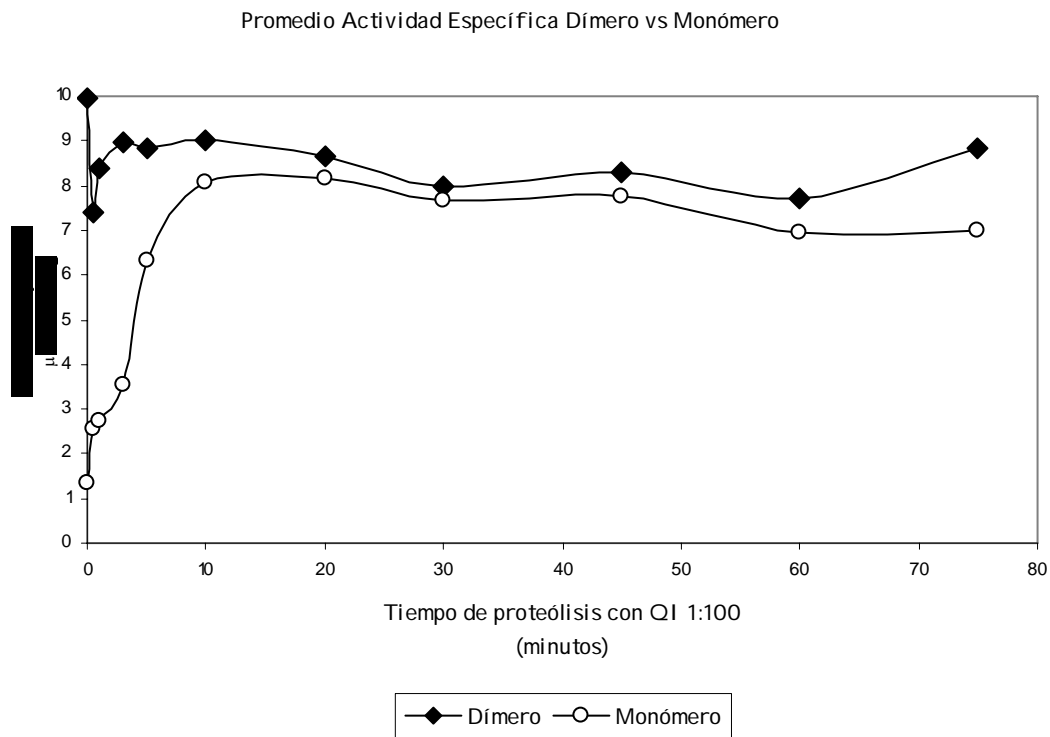


Figura 21. Comparación de la actividad específica del dímero (rombos negros) y el monómero (círculos blancos), al ser proteolizados con quimotripsina a una concentración de 1:100 ($\frac{\text{peso}}{\text{peso}}$ ATP sintasa : proteasa).

Dado que se sabe que el monómero es más susceptible al corte por quimotripsina y eventualmente es degradado hasta F₁, se continuó evaluando únicamente al dímero con ambas concentraciones de quimotripsina (1:1000 y 1:100), en ausencia del detergente. Esto para evaluar si la proteasa por sí misma causa un aumento de actividad. Como se puede notar en la figura 22, sí se presenta una ligera activación en el tiempo con ambas concentraciones de quimotripsina. Por otra parte en la figura 23 se aprecia que la activación de la enzima no es tan grande como la que se obtiene cuando hay lauril maltósido en el medio.

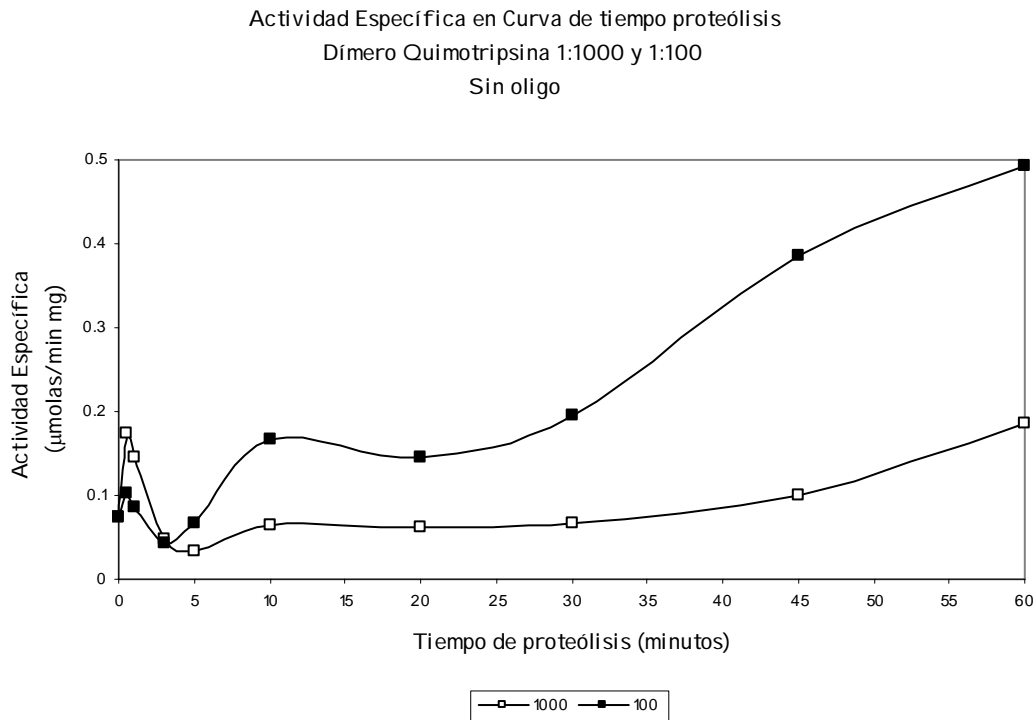


Figura 22. Actividad específica del dímero al ser proteolizado con quimotripsina a una concentración de 1:1000 (cuadros blancos) y 1:1000 (cuadros negros).

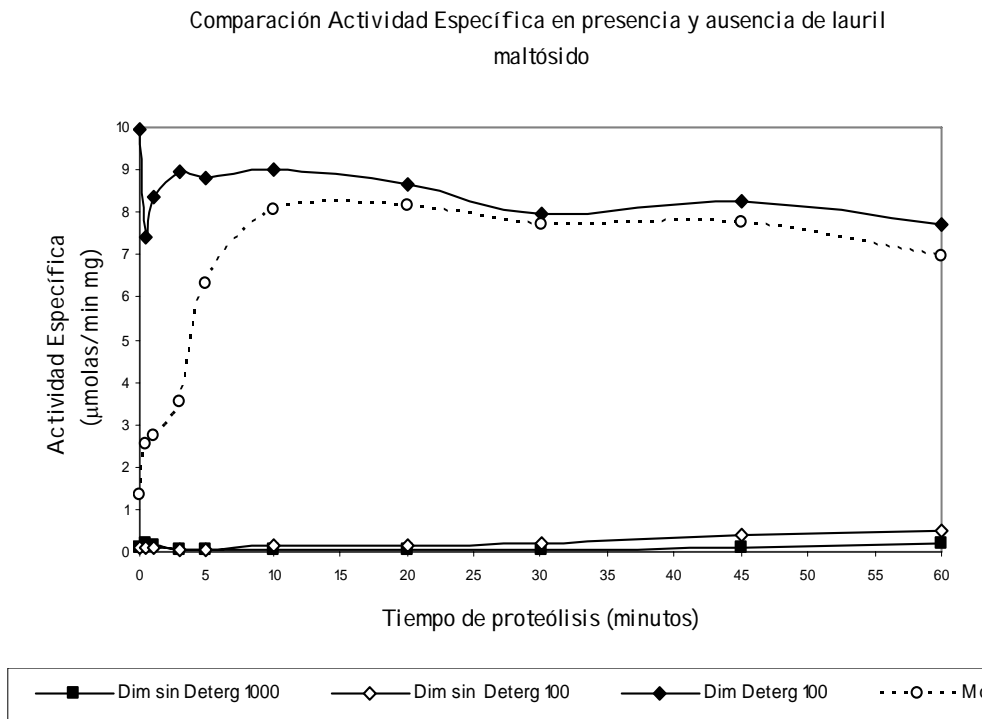


Figura 23. Comparación de las figuras 21 y 22. Actividad específica del dímero con y sin detergente (1:100), sin detergente (1:1000) y el monómero con detergente (1:100). Al ser proteolizados con quimotripsina. Los datos son los mismos que se muestran en las figuras 21 y 22.

A partir de los datos presentados en la figura 23 se puede concluir que la proteólisis no logra activar a la enzima al mismo nivel que el detergente. Lo anterior sugiere que aunque la proteasa sí es capaz de activar a la enzima, el corte no es suficiente para alcanzar el nivel obtenido con detergente, lo que plantea dos posibilidades: que el efecto activador del lauril maltósido y de la proteasa esta dado por dos fenómenos distintos o que en la estructura oligomérica el sitio que podría estarse liberando por el detergente no está accesible a la quimotripsina.

V. DISCUSIÓN

La ATP sintasa es una enzima que está involucrada en la transducción de energía, altamente conservada y universalmente distribuida. Posee una arquitectura extensamente modificada, con respecto a las ATP sintasas mejor caracterizadas como la de *Escherichia coli* y *Bos taurus*, en un linaje particular de eucariontes: las algas clorofíceas.

Las algas clorofíceas han reclutado 9 polipéptidos (ASA1-9) a su ATP sintasa mitocondrial, manteniendo algunos componentes ortodoxos; en el centro catalítico [$\alpha 3/\beta 3$], en el cuello central [$c_{10}/\gamma/\delta/\epsilon$] y las subunidades que unen al brazo periférico (*a* y OSCP). De tal forma que durante el curso de la evolución las algas clorofíceas han diseñado un motor molecular en el cual se mantienen los componentes catalíticos pero se modifica sustancialmente la composición arquitectónica del brazo periférico. De manera notable, todas estas modificaciones dan lugar a un dímero altamente estable. Se sabe que la ATP sintasa está presente en forma dimérica y oligomérica en mitocondrias de levadura, bovino, rata y algunas plantas, pero se cree que ésta se encuentra en una poza inactiva y que la oligomerización es una forma de regular su actividad.

De manera basal, la ATP sintasa de *Polytomella* sp. presenta una actividad hidrolítica sumamente pequeña ($0.07-1 \mu\text{molas} \times (\text{min mg})^{-1}$), comparada con la de otras ATP sintasas; ATP sintasa mitocondrial de hígado de rata: $28 \mu\text{molas} \times (\text{min mg})^{-1}$ (Pedersen, 1975), ATP sintasa de cloroplasto de espinaca: $7.45 \mu\text{molas} \times (\text{min mg})^{-1}$ (Vambutas et. al., 1965), ATP sintasa de *Sacharomyces cereviseae*: $63 \mu\text{molas} \times (\text{min mg})^{-1}$ (Shatz et.al., 1967).

Al adicionar el detergente no iónico lauril maltósido en el ensayo ésta actividad aumenta más de 10 veces y es sensible a oligomicina. Este comportamiento también se presenta con el detergente monodecileter de octaetilen-glicol. Al probar diversos detergentes no iónicos, se observó que no todos los detergentes activan a la enzima, lo cual indica que este efecto no es inespecífico. Analizando la estructura de los detergentes se aprecia que tanto el lauril maltósido como el monodecileter de octaetilen-glicol presentan cadenas largas y que los detergentes que no tuvieron efecto sobre la enzima poseen cadenas pequeñas, quizás pudiera esto explicar el porqué no todos los detergentes activan a la enzima o tal vez el hecho de que posean estructuras distintas conlleve a la formación de micelas distintas y ésto pudiera estar implicado.

Cabe resaltar que el efecto activador del lauril maltósido sobre la enzima no se debe a que la enzima se esté disociando, como se comprobó en el gel azul nativo, donde la enzima permanece dimérica. Además de que, como puede apreciarse en las gráficas de actividad, la actividad se mantiene completamente sensible a oligomicina.

De manera notable, la enzima está en contacto con el lauril maltósido durante todo el proceso de purificación, aunque en una proporción mucho menor a la del ensayo, por tanto, esta activación debe estar dada por un rearrreglo local dentro de la enzima. Por el trabajo del Doctor Alfredo Torres Larios, se sabe que la ATP sintasa se encuentra en estado agregado al ser purificada, por lo que el detergente debe estar promoviendo la desagregación de la misma o la liberación de sitios restrictivos dentro de la enzima.

Por su parte, el detergente iónico taurodesoxicolato de sodio permite disociar a la enzima en una población enriquecida de monómero que presenta un valor de actividad basal del doble que el dímero en ausencia del detergente. Al adicionar lauril maltósido el monómero es capaz de activarse, pero no tanto como el dímero, si se supusiera que la activación por el detergente está dada simplemente por la desagregación, entonces podría esperarse que el monómero alcanzara niveles de activación similares o mayores al dímero. Lo cierto es que solamente el dímero parece alcanzar una actividad específica alta en presencia de detergente, y que el monómero ya no se activa tanto.

En este sentido, al realizar un análisis de la estructura primaria de la subunidad β se observó que ésta presenta una extensión de 60 a 70 residuos en el extremo C-terminal (Franzén y Falk, 1992; Nurani y Franzén, 1996), que sólo se ha observado en las subunidades de *Chlamydomonas* y *Polytomella*. Al comparar esta extensión con la región mínima inhibitoria de la proteína inhibidora de bovino, se vio que existe un alineamiento de algunos aminoácidos y más aún que en ambas algas clorofíceas está presente el motivo altamente conservado en la interfase de las subunidades α - β con el que se sabe interactúa la proteína inhibidora (Atteia et al., 1997). Tomando en consideración las observaciones hechas con el dímero de la ATP sintasa de bovino, en el que se cree que ambos monómeros se asocian a través de la proteína inhibidora (García JJ et al, 2006 y Minauro-Sanmiguel et al., 2005), podría existir la posibilidad de que en el dímero de *Polytomella* sp. los monómeros se asociaran también a través de las extensiones presentes en las subunidades β . Sin embargo la distancia entre los sectores F_1 que se observa en la microscopía electrónica hacen que esta hipótesis sea poco probable. También es posible que las extensiones en β actúen como proteínas inhibitoras introduciéndose en la interfase entre las subunidades α y β . El detergente estaría desestabilizando estas asociaciones o liberando la interacción en la interfase α - β .

A su vez, encontramos que la quimotripsina degrada parcialmente a la subunidad β . El discreto aumento de la actividad de ATPasa que se aprecia debe estar dado por ésta degradación parcial, aunque este aumento es muy pequeño comparado con el que ocurre en presencias de lauril maltósido. Dado que en ausencia del detergente la enzima se encuentra en estado agregado, es posible que la quimotripsina pueda degradar únicamente aquellas extensiones que se encuentran desagregadas. Otra posibilidad es que en la estructura dimérica la extensión se

encuentre parcialmente embebida por lo que la proteasa degradaría únicamente lo que está accesible y esta pequeña degradación no implica un aumento significativo en la actividad hidrolítica.

El valor tan pequeño de actividad basal sugiere que la actividad hidrolítica de la enzima está altamente regulada *in vivo*, dado que de no ser así se estaría llevando a cabo un ciclo fútil de síntesis e hidrólisis de ATP. El uso del detergente permite expresar la actividad de ATP sintasa y evaluarla.

El uso de proteasas permite, a la vez, estudiar la estructura de la enzima y caracterizarla. De manera notable, el dímero es una estructura altamente estable que resiste incluso la acción de proteasas, en tanto que el monómero aún con una baja concentración de quimotripsina y a tiempos muy cortos se disocia hasta formar el sector F_1 . Resulta sumamente interesante que la asociación de dos monómeros de lugar a una estructura robusta y resistente, pero que los monómeros de manera individual sean tan lábiles.

Se cree que la oligomerización de la ATP sintasa puede estar involucrada de manera directa en la actividad catalítica de la misma o de manera indirecta puede afectar al estado metabólico de las células. Cuando se impide la dimerización de la ATP sintasa en la levadura, al interrumpir los genes que codifican para las subunidades *e* y *g*, las mitocondrias presentan morfología de las crestas alterada, con un aspecto de cebolla (Arselin et al., 2004). Los estudios llevados a cabo por Minauro-Sanmiguel et al. y Dudkina et al., acerca de la estructura de las ATP sintasas diméricas de bovino y *Polytomella*, respectivamente, mostraron que existe un ángulo pronunciado, de aproximadamente 40° en el caso de bovino y 70° para *Polytomella* sp., entre los sectores F_0 de cada monómero. Se cree que esta asociación monómero-monómero conlleve a la curvatura de la membrana interna mitocondrial y por tanto contribuya a la morfología de las crestas mitocondriales.

La ATP sintasa de *Polytomella* sp., es una enzima cuya arquitectura única la convierte en un modelo de estudio muy interesante. La enzima es capaz de proveer a la célula de una gran parte de la energía necesaria para sus procesos, evitar el ciclo fútil de síntesis-hidrólisis por mecanismos aún no caracterizados y al mismo tiempo modelar las crestas mitocondriales.

El presente trabajo puede ayudar para que con futuros experimentos puedan develarse las interrogantes que permanecen: ¿cómo esta regulada la enzima?, ¿cómo es la actividad del monómero?, ¿cuál es el papel que juega la extensión del carboxilo terminal de la subunidad β ?

VI. CONCLUSIONES

- La ATP sintasa de *Polytomella* sp. presenta de manera basal una actividad hidrolítica sumamente pequeña, comparada con la de otras ATP sintasas. La actividad del dímero es muy baja [$0.06 \mu\text{mol} \times (\text{min} \times \text{mg})^{-1}$] comparada con la del monómero [$0.17 \mu\text{mol} \times (\text{min} \times \text{mg})^{-1}$] y con la F_1 [$0.25 \mu\text{mol} \times (\text{min} \times \text{mg})^{-1}$]. De hecho ésta actividad es considerablemente más baja que la reportada para otras ATPasas puras (Sector F_1): ATPasa mitocondrial de corazón de bovino: $70 \mu\text{mol} \times (\text{min} \times \text{mg})^{-1}$, ATPasa mitocondrial de hígado de rata: $28 \mu\text{mol} \times (\text{min} \times \text{mg})^{-1}$, ATPasa de cloroplasto de espinaca: $7.45 \mu\text{mol} \times (\text{min} \times \text{mg})^{-1}$, ATPasa de levadura $63 \mu\text{mol} \times (\text{min} \times \text{mg})^{-1}$.
- La ATP sintasa de *Polytomella* sp. puede activarse con algunos detergentes no iónicos, preferentemente de cadena larga.
- El detergente lauril maltósido permite evaluar la actividad hidrolítica de la ATP sintasa de *Polytomella* sp. a una concentración en que no disocia a la enzima. Posiblemente el efecto sea de relajación de la estructura y/o de liberación de los extremos carboxilo terminal de las subunidades β .
- El detergente iónico taurodesoxicolato de sodio permite disociar a la enzima y evaluar una población enriquecida de monómero.
- La estructura dimérica es altamente estable y resistente a proteasas en tanto que el monómero es muy lábil y es rápidamente degradado por proteasas.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARTÍCULOS

Alfonzo M, Kandrach MA, Racker E. (1981). Isolation, characterization, and reconstitution of a solubilized fraction containing the hydrophobic sector of the mitochondrial proton pump. *J Bioenerg Biomembr.* (5-6), 375-91.

Aragaos, H. de B. (1910) Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2, 45-57

Arnold I, Pfeiffer K, Neupert W, Stuart RA, Schagger H. (1998) Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *EMBO J.* 24, 7170-8.

Atteia A., Dreyfus G. and González-Halphen D. (1997) Characterization of the alpha and beta-subunits of the F0F1-ATPase from the alga *Polytomella* spp., a colorless relative of *Chlamydomonas*. *Biochim Biophys Acta.*1320, 275-84.

Burwick NR, Wahl ML, Fang J, Zhong Z, Moser TL, Li B, Capaldi RA, Kenan DJ, Pizzo SV. (2005). An Inhibitor of the F1 subunit of ATP synthase (IF1) modulates the activity of angiostatin on the endothelial cell surface. *J Biol Chem.* 280, 1740-5.

Brunner S, Everard-Gigot V, Stuart RA. (2002) Subunit e of the yeast F1Fo-ATP synthase forms homodimers. *J Biol Chem.* 50, 48484-9

Burwick NR, Wahl ML, Fang J, Zhong Z, Moser TL, Li B, Capaldi RA, Kenan DJ, Pizzo SV. (2005). An Inhibitor of the F1 subunit of ATP synthase (IF1) modulates the activity of angiostatin on the endothelial cell surface. *J Biol Chem.* 280, 1740-5.

Cardol P, González-Halphen D, Reyes-Prieto A, Baurain D, Matagne RF, Remacle C. (2005). The mitochondrial oxidative phosphorylation proteome of *Chlamydomonas reinhardtii* deduced from the Genome Sequencing Project. *Plant Physiol.* 137, 447-59.

Dudkina NV, Heinemeyer J, Keegstra W, Boekema EJ, Braun HP. (2005). Structure of dimeric ATP synthase from mitochondria: an angular association of monomers induces the strong curvature of the inner membrane. *FEBS Lett* 579, 5769-72

Dudkina NV, Sunderhaus S, Braun HP, Boekema EJ. (2006). Characterization of dimeric ATP synthase and cristae membrane ultrastructure from *Saccharomyces* and *Polytomella* mitochondria. *FEBS Lett.* 580, 3427-32.

Eubel H, Jansch L, Braun HP. (2003). New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II. *Plant Physiol.* 133, 274-86.

Eubel H, Heinemeyer J, Sunderhaus S, Braun HP. (2004). Respiratory chain supercomplexes in plant mitochondria. *Plant Physiol Biochem.* 42, 937-42

Franzén LG, Falk G. (1992). Nucleotide sequence of cDNA clones encoding the beta subunit of mitochondrial ATP synthase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: the precursor protein encoded by the cDNA contains both an N-terminal presequence and a C-terminal extension. *Plant Mol Biol.* 19, 771-80.

Fronzes R, Weimann T, Vaillier J, Velours J, Brèthes D. (2006) The peripheral stalk participates in the yeast ATP synthase dimerization independently of e and g subunits. *Biochemistry*. 45, 6715-23.

García JJ, Morales-Ríos E, Cortés-Hernandez P, Rodríguez-Zavala JS. (2006). The inhibitor protein (IF1) promotes dimerization of the mitochondrial F1F0-ATP synthase. *Biochemistry*. 45, 12695-703.

Gledhill JR, Walker JE. (2005). Inhibition sites in F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Biochem J*. 386, 591-8.

González-Halphen D, Lindorfer MA, Capaldi RA. (1988) Subunit arrangement in beef heart complex III. *Biochemistry*. 27, 7021-31.

Golden TR, Pedersen PL. (1998). The oligomycin sensitivity conferring protein of rat liver mitochondrial ATP synthase: arginine 94 is important for the binding of OSCP to F1. *Biochemistry* 37, 13871-81.

Itoh H, Takahashi A, Adachi K, Noji H, Yasuda R, Yoshida M, Kinoshita K. (2004). Mechanically driven ATP synthesis by F1-ATPase. *Nature*. 427, 465-8.

Jansch L, Kruft V, Schmitz UK, Braun HP. (1996). New insights into the composition, molecular mass and stoichiometry of the protein complexes of plant mitochondria. *Plant J*. 9, 357-68.

Joshi S, Burrows R. (1990). ATP synthase complex from bovine heart mitochondria. Subunit arrangement as revealed by nearest neighbor analysis and susceptibility to trypsin. *J Biol Chem*. 265, 14518-25.

Kindle KL, Richards KL, Stern DB. (1991). Engineering the chloroplast genome: techniques and capabilities for chloroplast transformation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88, 1721-5.

Ko YH, Hullihen J, Hong S, Pedersen PL. (2000) Mitochondrial F₀F₁ ATP synthase. Subunit regions on the F₁ motor shielded by F₀, Functional significance, and evidence for an involvement of the unique F₀ subunit F₆. *J Biol Chem*. 275, 32931-9.

Lowry O.H., Rosemnbrough, N.J, Farr A.L. y Randall R. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.

Margulis L. (1970). Recombination of non-chromosomal genes in *Chlamydomonas*: assortment of mitochondria and chloroplasts? *J Theor Biol*. 26, 337-42.

Merchant (2007). The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*. 318, 245-50.

Michaelis G, Vahrenholz C, Pratje E.(1990). Mitochondrial DNA of *Chlamydomonas reinhardtii*: the gene for apocytochrome b and the complete functional map of the 15.8 kb DNA. *Mol Gen Genet*. 223, 211-6.

Minauro-Sanmiguel F, Wilkens S, García JJ. (2005). Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: novel F₀ bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis. *Proc Natl Acad Sci*. 102, 12356-8.

Moser TL, Stack MS, Asplin I, Enghild JJ, Højrup P, Everitt L, Hubchak S, Schnaper HW, Pizzo SV. (1999). Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci* 96, 2811-6.

Müller M, Martin W. (1999). The genome of *Rickettsia prowazekii* and some thoughts on the origin of mitochondria and hydrogenosomes. *Bioessays*. 21, 377-81.

Nurani G, Franzén LG. (1996). Isolation and characterization of the mitochondrial ATP synthase from *Chlamydomonas reinhardtii*. cDNA sequence and deduced protein sequence of the alpha subunit. *Plant Mol Biol*. 31, 1105-16.

Pedersen PL. (1975). Adenosine triphosphatase from rat liver mitochondria: separate sites involved in ATP hydrolysis and in the reversible, high affinity binding of ADP. *Biochem Biophys Res Commun*. 64, 610-6.

Pedersen PL, Williams N, Hullihen J. (1987) Mitochondrial ATP synthase: dramatic Mg²⁺-induced alterations in the structure and function of the F₁-ATPase moiety. *Biochemistry*. 26, 8631-7.

Pedersen PL. (2002). Transport ATPases in biological systems and relationship to human disease: a brief overview. *J Bioenerg Biomembr*. 34, 327-32.

Pedersen PL. (2005). Transport ATPases: structure, motors, mechanism and medicine: a brief overview. *J Bioenerg Biomembr*. 37, 349-57.

Pullman ME, Penefsky HS, Datta A, Racker E. (1960). Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. I. Purification and properties of soluble dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase. *J Biol Chem*. 235, 3322-9.

Schägger H, Cramer WA, von Jagow G. (1994). Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal Biochem*. 217, 220-30.

Schägger H. (2002). Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim Biophys Acta*. 1555, 154-9.

Schatz G, Penefsky HS, Racker E. (1967). Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. XIV. *J Biol Chem*. 242, 2552-60

Stock D, Gibbons C, Arechaga I, Leslie AG, Walker JE. (2000). The rotary mechanism of ATP synthase. *Curr Opin Struct Biol*. 10, 672-9.

Tuena De Gómez-Puyou M, Gómez-Puyou A. (1977). A simple method of purification of a soluble oligomycin-insensitive mitochondrial ATPase. *Arch Biochem Biophys*. 182(1), 82-6.

Vambutas VK, Racker E. (1965). Partial Resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. I. Stimulation of photophosphorylation by a preparation of a latent Ca⁺⁺ dependent Adenosine Triphosphatase from Chloroplasts. *J Biol Chem*. 240, 2660-7.

van Lis R, Atteia A, Mendoza-Hernández G, González-Halphen D. (2003). Identification of novel mitochondrial protein components of *Chlamydomonas reinhardtii*. A proteomic approach. *Plant Physiol*. 132, 318-30.

van Lis R, González-Halphen D, Atteia A. (2005). Divergence of the mitochondrial electron transport chains from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and its colorless close relative *Polytomella* sp. *Biochim Biophys Acta*. 1708, 23-34

Vázquez-Acevedo M, Cardol P, Cano-Estrada A, Lapaille M, Remacle C, González-Halphen D. (2006). The mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae contains eight subunits of unknown origin involved in the formation of an atypical stator-stalk and in the dimerization of the complex. *J Bioenerg Biomembr.* 38, 271-82.

Velours J, Arselin G. (2000). The *Saccharomyces cerevisiae* ATP synthase. *J Bioenerg Biomembr.* 32, 383-90.

Walker JE, Dickson VK. (2006). The peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase. *Biochim Biophys Acta.* 1757, 286-96.

Wittig I, Schägger H. (2005). Advantages and limitations of clear-native PAGE. *Proteomics.* 5, 4338-46.

Zerbetto E, Vergani L, Dabbeni-Sala F. (1997). Quantification of muscle mitochondrial oxidative phosphorylation enzymes via histochemical staining of blue native polyacrylamide gels. *Electrophoresis.* 18, 2059-64.

2. PÁGINAS DE INTERNET CONSULTADAS

<http://expasy.org>

<http://www.chlamy.org/>

<http://expasy.org/tools/peptidecutter/>

<http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway.html>

<http://laborwoman.blogspot.com>

3. LIBROS

Lehninger: Principios de bioquímica

David L. Nelson, Michael M. Cox

4ª edición. Freeman ed.

Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level

Donald J. Voet, Judith G. Voet, Charlotte W. Pratt

3ª edición. Wiley Science

Mitocondria: Una Mirada a la evolución de los conceptos básicos y modernos

Vázquez Memije, Martha Elisa – Tuena de Gómez Puyou, Marieta

Ed. Prado 2002