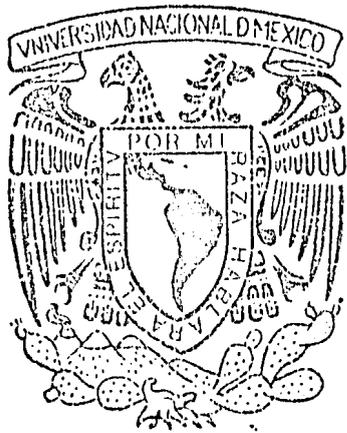


28/11



UNIVERSIDAD NACIONAL

AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"CARACTERIZACION DEL SITIO ACTIVO  
DEL TRANSLOCADOR DE ADENIN  
NUCLEOTIDOS MITOCONDRIAL"

T E S I S

Que para obtener el Titulo de:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P r e s e n t a

FROYLAN MENDOZA GONZALEZ

MEXICO, D. F.

1985



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

INDICE

	Pag.
INTRODUCCION.....	1
MATERIAL Y METODOS.....	55
RESULTADOS.....	61
DISCUSION.....	72
CONCLUSION.....	78
BIBLIOGRAFIA.....	79

## INTRODUCCION.

Una célula viva es en sí misma una organización inestable e improbable, mantiene el maravilloso y específico ordenamiento de su frágil estructura solamente gracias a la utilización constante de energía. Cuando se corta el suministro de energía, la estructura compleja de la célula tiende a degradarse a un estado de desorganización fortuita. Además del trabajo químico necesario para preservar la integridad de su organización, los distintos tipos de células utilizan la energía para realizar diferentes clases de trabajo; mecánicos, eléctricos, químicos y osmóticos que constituyen los procesos vivos de los organismos.

Los organismos vivos han desarrollado tres sistemas diferentes para generar energía en forma de ATP: Las diversas enzimas que catalizan el proceso de la glicólisis y las partículas intracelulares conocidas como cloroplastos y mitocondrias. (1)

En el decenio de los cuarenta se empezó a utilizar con éxito una técnica que se conoce como centrifugación diferencial, para aislar distintas estructuras que forman una célula.

Hogeboom y colaboradores fueron los primeros en obtener una fracción celular altamente enriquecida en organelos intracelulares y que además preservaban su integridad funcional y estructural. (2)

Trabajando con esta preparación mitocondrial Eugene Kennedy y Albert Lehninger demostraron en un trabajo clásico que en esta fracción o sea en las mitocondrias, existen los componentes de la cadena respiratoria, las enzimas del ciclo del ácido cítrico y las de la oxidación de los ácidos grasos. (3)

El trabajo de Kennedy y Lehinger fue de importancia no sólo porque demostró

que determinadas funciones de la célula se llevan a cabo en sitios específicos, sino porque además sirvió de base para el estudio de la transducción energética en membranas. En los años posteriores a la observación de Kennedy y Lehninger, se empieza adesentrañar la manera en que el consumo de oxígeno en las mitocondrias se acompaña de la síntesis de ATP: en la actualidad este proceso se conoce como fosforilación oxidativa.

#### LAS MITOCONDRIAS.

Las mitocondrias, son orgánulos encontrados en todas las células animales y vegetales, son generalmente cuerpos de forma cilíndrica que parecen ser del orden de 0.5 por 3um.

En la célula viva, la mitocondria individual parece alternar su forma de filamento a circular, curva cerrada o esfera. En algunos tejidos, las mitocondrias parecen estar alineadas de manera que se facilita la liberación de ATP a los sistemas que utilizan la energía, por ejemplo, alineadas con las fibras contráctiles de las células del músculo.

El número de mitocondrias varía según el tamaño y los requerimientos energéticos de la célula; por ejemplo, 250 por célula espermática, de 500 a 2000 por célula hepática, y 500,000 en la amiba gigante "Chaos Chaos". En cualquier caso las mitocondrias constituyen los principales componentes de las células animales y vegetales comprometidos en el metabolismo oxidativo: las proteínas mitocondriales de las células del hígado representan aproximadamente el 20% del total proteico de este tejido. (4)

A partir de los estudios de microscopía electrónica de George Palade y Fritjof Sjostrand, se encontró que las mitocondrias poseen dos sistemas membranosos, una membrana externa y una membrana interna. (5)

La membrana interna está doblada (estos dobleces son comunmente llamados "crestas") así que el área superficial de la membrana interna está umenta da grandemente en relación a la membrana externa. (6) (Fig. 1)

La estructura y funcionamiento de las membranas mitocondriales se ha estudiado a la luz de los conceptos actuales que las consideran como conjuntos organizados constituidos principalmente por proteínas y lípidos.

#### ARQUITECTURA DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS

Las membranas biológicas tienen un número de funciones muy importantes en un organismo viviente. Ellas actúan como barreras estructurales que mantienen la integridad de un organismo (7). En las estructuras de las membranas comun mente se encuentran lípidos anfipáticos, que son compuestos con regiones polares y no polares. Tales estructuras son ideales para la formación de inter fases entre un disolvente polar y una región hidrofóbica. Los lípidos que comunmente constituyen las membranas son fosfolípidos, esfingolípidos, glico lípidos y esteroides en células eucarióticas y fosfolípidos y glicolípidos en células procarióticas. (8)

En cuanto a las proteínas membranales su contenido varía con el tipo de membrana constituyendo del 50% al 90% del peso. La excepción conocida es la mie lina con un contenido bajo en proteína del 18%.

Se ha sugerido que las proteínas asociadas con membranas pueden ser clasificadas en dos amplias categorías denominadas periféricas e integrales. El cri terio experimental para esta clasificación esta dado en la tabla I.

En concreto, las proteínas periféricas son aquellas que parecen estar solamen te unidas en forma débil a sus respectivas membranas y no parecen interactuar con los lípidos en la membrana, mientras que las proteínas integrales están ordinariamente más fuertemente unidas a la membrana y exhiben funcionalmente

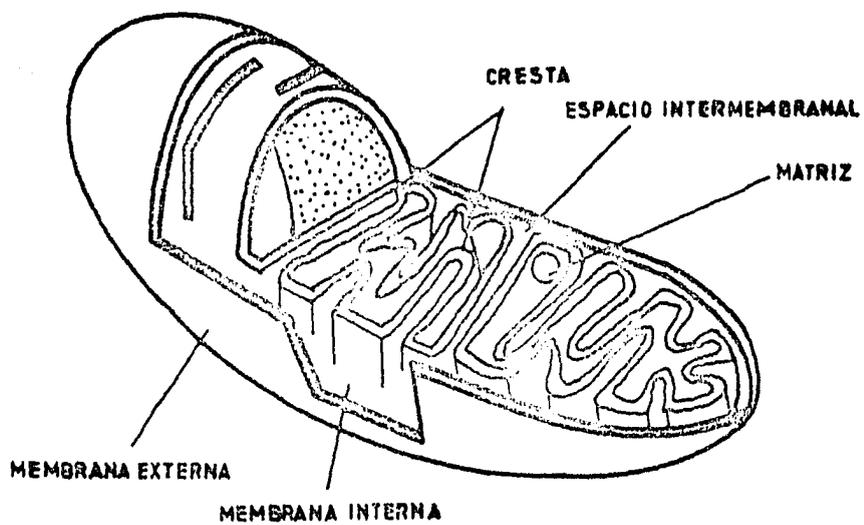


Fig. 1

LA MITOCONDRIA

TABLA I

Criterio para distinguir proteínas membranales, integrales y periféricas.

<u>Propiedad</u>	<u>Proteína Periférica</u>	<u>Proteína Integral</u>
Requerimientos para disociarla de la membrana.	Tratamientos ligeros son suficientes: fuerza iónica alta, agentes quelantes de iones metálicos.	Se requieren agentes que rompan enlaces hidrofóbicos: detergentes, disolventes orgánicos, agentes caotrópicos.
Asociación con lípidos cuando se solubiliza.	Comunmente libre de lípidos cuando está solubilizada.	Comunmente asociada con lípidos cuando está solubilizada.
Solubilidad después de disociarla de la membrana.	Soluble y molecularmente dispersa en soluciones reguladoras acuosas neutras.	Usualmente insoluble o agregada en soluciones reguladoras acuosas neutras.

importantes interacciones con los lípidos de la misma (9) (Fig. 2)

En 1972, G.L. Nicolson y S.J. Singer postularon el modelo de estructura de membrana más satisfactorio de la actualidad, el modelo del "mosaico fluido" (Fig. 3)

Este modelo afirma que los fosfolípidos de las membranas se hallan ordenados en bicapas formando una matriz fluida donde se encuentran las proteínas membranales. En esta bicapa, las moléculas lipídicas individuales pueden moverse lateralmente, dotando a la bicapa de fluidez, flexibilidad y además de una resistencia eléctrica característicamente elevada y de relativa impermeabilidad respecto a las moléculas muy polares. (10)

La rotación de la mayoría de las proteínas y lípidos de un lado a otro de las membranas es un proceso muy lento, que contrasta con su movimiento paralelo al plano de la bicapa. La transición de una molécula desde una superficie de la membrana hasta la otra se denomina difusión transversa o "flip - flop", mientras que la difusión en el plano de una membrana se llama "difusión lateral" . (11)

El modelo de mosaico fluido postula que las proteínas de la membrana son globulares, para interpretar su elevado contenido en  $\alpha$ -hélice. Algunas de las proteínas se hallan parcialmente empotradas o incluidas en la membrana y penetran en la fase lipídica por un lado (periféricas) mientras otras se hallan totalmente sepultadas en ella (integrales).

La extensión que una proteína globular penetra en el interior de la fase lipídica está determinada por la secuencia de aminoácidos de la proteína y la localización sobre su superficie de los grupos R no polares de los aminoácidos. De esta manera, las diversas proteínas de la membrana forman una estructura de tipo mosaico en la bicapa fosfolipídica. Se cree que la viscosidad relativa de la bicapa lipídica es de 100 a 1000 veces superior a la del agua.

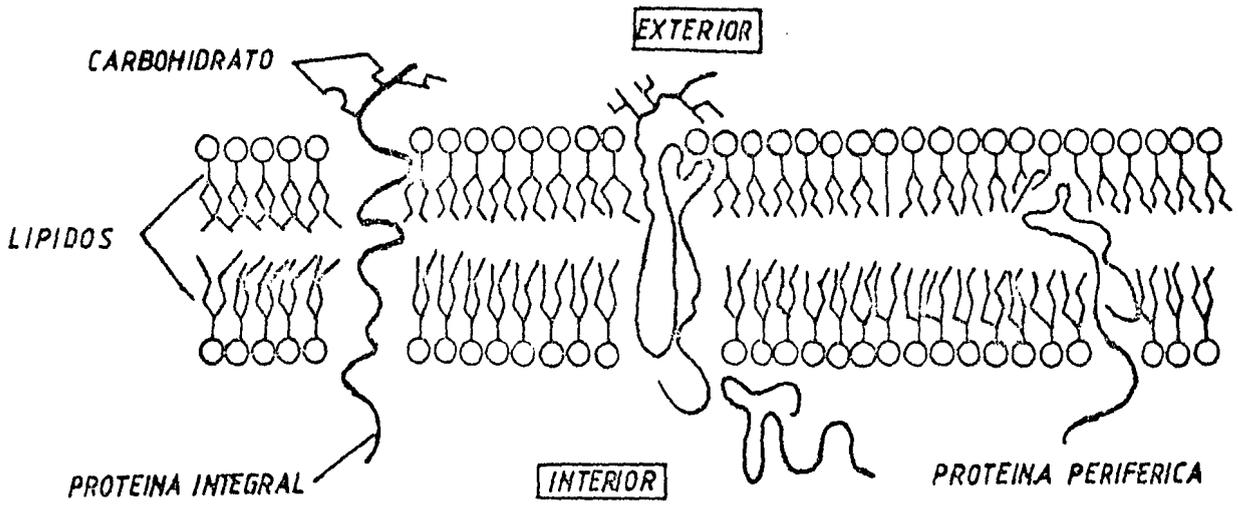


Fig. 2 PROTEINAS DE MEMBRANA

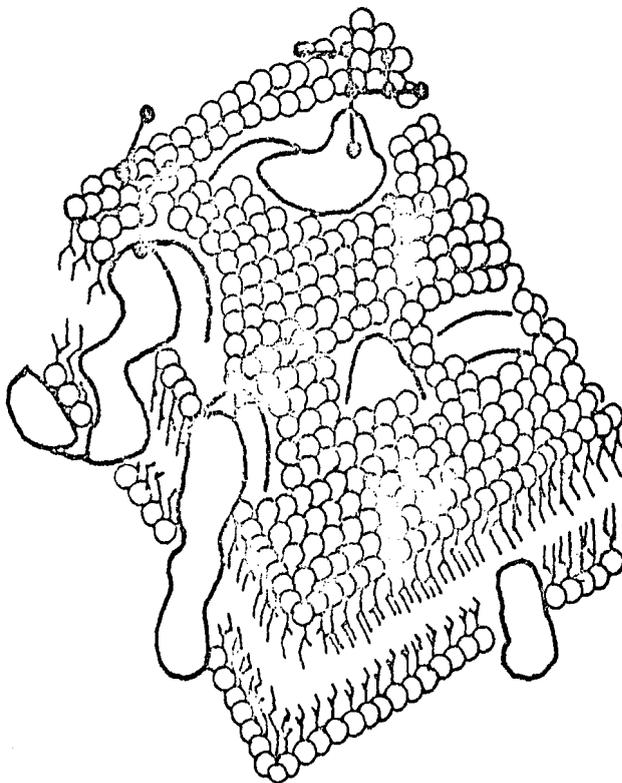


Fig. 3 MODELO TRIDIMENSIONAL DEL MOSAICO FLUIDO

El modelo del mosaico fluido interpreta satisfactoriamente muchas características y propiedades de las membranas biológicas. Es aplicable a membranas con contenidos de proteína muy diferentes por unidad de superficie membranosa; explica la variación de espesor de diferentes tipos de membranas y permite interpretar la asimetría de las membranas naturales, ya que permite que las proteínas de diferentes tipos puedan ordenarse en las dos superficies de la bicapa lipídica.

El modelo interpreta también las propiedades eléctricas y de permeabilidad de las membranas, así como la observación de que algunos componentes proteicos de las membranas celulares se mueven en el plano de la membrana a velocidad muy elevada.

La mayor parte de las membranas son asimétricas, con diferentes tipos y/o número de proteínas específicas sobre cada superficie. En particular, la membrana plasmática de las células eucarióticas posee a menudo una cubierta exterior constituida por cadenas laterales de oligosacáridos, de las glucoproteínas de la membrana, y por los grupos de cabeza oligosacáridos de los glucolípidos de la propia membrana. (10)

#### SISTEMAS DE TRANSPORTE

Los solutos pueden atravesar las membranas, ya sea mediante procesos que requieren la presencia de una proteína específica de unión en la membrana (mediados) o mediante procesos que ocurren de forma espontánea (no mediados).

En este segundo caso, el transporte de un soluto constituye un proceso de simple difusión física a favor de un gradiente. La molécula que difunde, ni es modificada químicamente, ni se asocia con otras especies moleculares en su paso a través de la membrana.

Los procesos de transporte mediados o facilitados se caracterizan por:

- 1.- Presentar una cinética de saturación y
- 2.- Presentar una especificidad por el sustrato.

El transporte mediado puede realizarse gracias a la presencia de proteínas capaces de unir sustratos específicos en forma reversible; estas moléculas de transporte han sido denominadas de varias formas: sistemas de transporte, transportadoras, portadoras o translocasas.

El transporte facilitado pasivo es aquel mecanismo en el que un compuesto se mueve a través de la membrana cuando se encuentra unido a un sistema específico, para el que presenta cinética de saturación, pero que no necesita la energía cedida por ATP o un compuesto equivalente y es a favor de un gradiente.

Transporte activo es el término que define aquellos procesos en los que una molécula se mueve a través de la membrana de forma independiente a la dirección de su gradiente de concentración. La energía necesaria puede ser cedida de dos formas:

- 1) El transporte de un metabolito dado se acopla al movimiento simultáneo de una segunda molécula, la cual se mueve siempre en sentido favorable a su gradiente de concentración, en cuyo transporte se libera una gran cantidad de energía. La segunda molécula puede dirigirse en el mismo sentido que la primera (simport) o en sentido contrario (Antiport).
- 2) La energía es aportada por una hidrólisis simultánea de ATP (actividad ATPásica) o de algún otro compuesto de alta energía situado sobre la superficie de la proteína que actúa como portadora.

Por otra parte, los procesos de transporte a través de membranas, que provocan la transposición de un determinado grupo químico, en vez de proporcionar una molécula o ión inalterados, se denominan de transposición de grupos. (4)

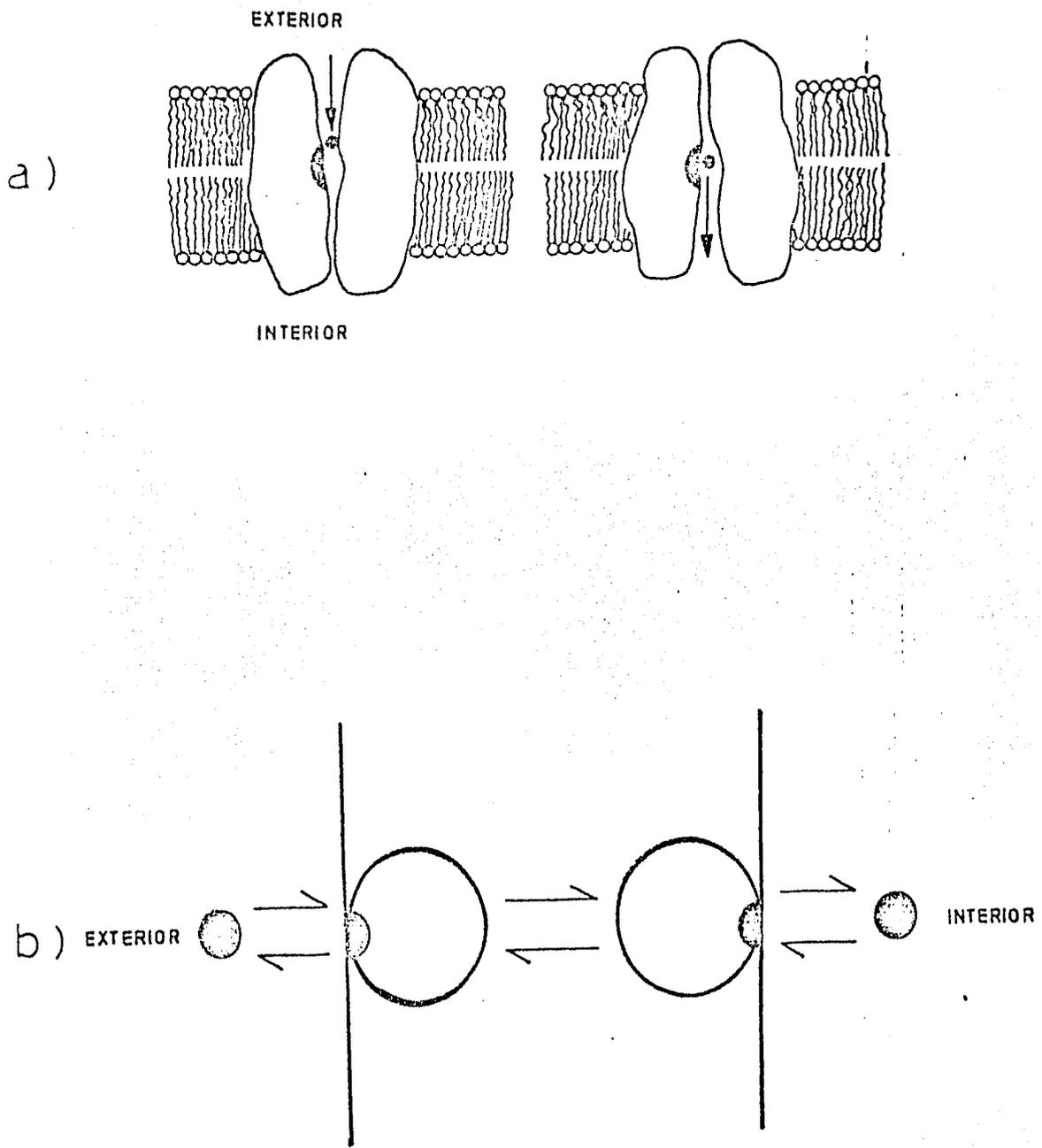
Se ha sugerido que el paso a través de la fase hidrofóbica de la membrana de un grupo polar es un proceso altamente desfavorecido (10). La energía libre de activación requerida es tan grande que la velocidad de este proceso sería muy lenta. Los argumentos termodinámicos son aquellos que conducen a la sugerencia original de que las moléculas de las proteínas integrales de la membrana son generalmente anfipáticas. (12)

Estas consideraciones apoyan los mecanismos involucrados en la difusión facilitada o transporte activo de pequeñas moléculas hidrofílicas a través de membranas. Es virtualmente cierto que estos procesos son mediados por un grupo de proteínas asociadas con la membrana, cada una con sitio característico de unión específico para una pequeña molécula. El problema es saber como es translocada esta pequeña molécula; es decir, ¿Cómo pasa de un lado de la membrana al otro?

Los muchos mecanismos específicos propuestos caen en dos amplias categorías:

- 1.- Mecanismo por acarreador, en el cual el sitio de unión (o sitio activo) consigue pasar de un lado a otro de la membrana mediante rotación de la proteína transportadora entera a través de la membrana, y
- 2.- Mecanismo de poro fijo, en los cuales un cambio conformacional dentro del poro de la proteína transloca el sitio de unión a través de la membrana (Fig. 4)

Los datos experimentales y argumentos termodinámicos discutidos acerca de ésto, podrían estar en contra del mecanismo de acarreador ya que requiere



a) MODELO DE ACARREADOR DE PORO FIJO  
 b) MODELO DE ACARREADOR MOVIL

Fig. 4

rotaciones transmembranales de una proteína integral. (9)

Ha sido demostrado que los acarreadores móviles no pueden funcionar en una membrana fosfolipídica la cual ha sido congelada por debajo de su temperatura de transición. Este fenómeno ha permitido diseñar experimentos para saber si un sistema de transporte funciona como un acarreador móvil o como poro fijo. (40,41)

### MEMBRANAS DE LA MITOCONDRIA

#### LA MEMBRANA EXTERNA.

El paso esencial en la separación de las membranas mitocondriales externa e interna es la destrucción selectiva de la membrana externa por tratamiento físico, químico o enzimático. Estas y otras técnicas complementarias han permitido la localización de muchas de las enzimas mitocondriales (tabla II). Relativamente pocas de estas enzimas han sido localizadas en la membrana externa.

Esta escasez de enzimas ha hecho que la membrana mitocondrial externa sea un objetivo menos interesante para su estudio, esta estructura contiene solamente un pequeño porcentaje de la masa mitocondrial. De 80 a 95% de la proteína total enlazada a la membrana mitocondrial y por encima de 90% de los lípidos mitocondriales están asociados con la membrana interna. Con las pequeñas cantidades que tienen la membrana externa, aún pequeñas cantidades de contaminación a partir de la membrana interna o por otras partículas pueden conducir a serios artefactos.

Finalmente debido a su alta permeabilidad poco común, no es posible el uso de reactivos de bajo peso molecular o moléculas que normalmente no penetran las membranas, en estudios de la topología transversa de la membrana externa.

Está generalmente establecido que esta membrana es libremente permeable a moléculas con peso molecular hasta de 5000. Esta permeabilidad no parece reflejar la composición de la membrana ya que ésta, contiene tanto como dos

TABLA II. LOCALIZACION DE ALGUNAS ENZIMAS EN MITOCONDRIA.

MEMBRANA EXTERNA	ESPACIO INTERMEMBRANAL	MEMBRANA INTERNA	MATRIZ
Citrocromo b <sub>5</sub>	Adenilato Cinasa	Citocromos b, c <sub>1</sub> , c, a, a <sub>3</sub>	Piruvato deshidrogenasa.
Citrocromo b <sub>5</sub> reductasa	Nucleósido difosfoquinasa	NADH deshidrogenasa	Citrato sintasa
Monoamino oxidasa	Sulfito oxidasa	Ubiquinona	Aconitasa
Quinurenina hidroxilasa		Flavoproteína transportadora de electrones	Isocitrato deshidrogenasa.
Derivado acil graso CoA sintetasa.			Fumarasa
Sistema de alargamiento de ácido grasos		ATPasa	α-Cetoglutarato deshidrogenasa
Glicerofosfato acil transferasa.		B <sub>3</sub> -Hidroxi butirato deshidrogenasa	Malato deshidrogenasa
Colina fosfotransferasa		Carnitina-palmitil transferasa	Sistema de oxidación de los ácidos grasos
Fosfolipasa A		Sistema de alargamiento de ácidos grasos.	Fosfopiruvato carboxilasa.
Nucleósido difosfocinasa			Glutamato deshidrogenasa.

---

MEMBRANA  
INTERNA

MATRIZ

---

ADP-ATP translocasa

Aspartato-glutamato  
aminotransferasa.

Pi. -OH-translocasa

Dicarboxilato translo  
casa.

Ornitina  
transcarbamoilasa.

Tricarboxilato trans  
locasa.

$\alpha$ -Cetoglutarato  
translocasa

Piruvato translocasa

Glutamato-aspartato  
translocasa

veces más fosfolípidos, sobre bases de proteína, que la membrana interna y también contiene una cantidad significativa de colesterol, el cual se sabe baja la permeabilidad de membranas artificiales a sustancias insolubles en lípidos.

En contra de esto, se ha argumentado que la alta permeabilidad de la membrana externa es un artefacto, debido quizás a la destrucción de su estructura durante la obtención de las mitocondrias. Sin embargo, la membrana mitocondrial externa prueba ser naturalmente permeable a sustancias muy grandes, esto debe reflejar una topología muy notable. (11)

#### LA MEMBRANA INTERNA

La membrana mitocondrial interna es la membrana intracelular cuya topología enzimática ha sido más intensamente investigada. Esto es debido a que es el sitio donde se encuentra la cadena respiratoria, de naturaleza particulada y altamente organizada, la cual fue descubierta mucho antes que su asociación con la membrana mitocondrial interna fuera demostrada.

Además procesos relacionados a la transducción de energía tales como la síntesis de ATP, transhidrogenación de nucleótido nicotinamida unida a energía y varias translocaciones de iones facilitadas por acarreadores son también catalizados por proteínas localizadas en esta membrana.

La membrana mitocondrial interna es relativamente rica en proteínas, como lo son las membranas transductoras de energía en general. Esta consiste de aproximadamente 75% de proteína y 25% de lípidos. De 60 a 70% de la proteína es "intrínseca" o "integral", lo cual explica la antigua observación de que la extracción de la mayoría de los fosfolípidos de la membrana no altera la apariencia trilaminar de esta membrana en microfotografías electrónicas. Los

lípidos de esta membrana son cerca de 90% de fosfolípidos, las principales especies son, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, y cardiolipina en relaciones molares de aproximadamente 4: 3: 2.

La cardiolipina está presente principalmente si no exclusivamente, en la membrana interna.

Característico de la membrana mitocondrial interna es una permeabilidad muy baja, aún a relativamente pequeñas moléculas.

No electrolitos insolubles en lípidos con un peso molecular cerca de 100 - 150 son virtualmente incapaces de cruzar esta membrana por difusión pasiva; en el caso de moléculas con carga, aún iones tan simples como  $H^+$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Cl^-$  no pueden fácilmente difundir a través de la membrana interna.

Partículas submitocondriales obtenidas de la membrana interna por desintegración con ultrasonido tienen una orientación opuesta a la de las mitocondrias intactas, la superficie externa de muchas de estas partículas corresponde a la superficie interna de la mitocondria intacta (Fig. 5). Esto es una afortunada circunstancia para aquellos interesados en el estudio de la topología de la membrana mitocondrial interna; la superficie externa de esta membrana puede ser investigada usando mitocondrias intactas debido a la alta permeabilidad de la membrana externa (in vitro), mientras la superficie interna está accesible en partículas submitocondriales. (11)

El papel de la estructura de la membrana en el funcionamiento de sistemas multienzimáticos del transporte de electrones y fosforilación oxidativa ha sido objeto de muchas investigaciones e hipótesis por muchos años. (11)

En 1961 Peter Mitchell (premio nobel 1978) enuncia la Hipótesis Quimiosmótica de la fosforilación oxidativa, que introduce en la biología dos conceptos

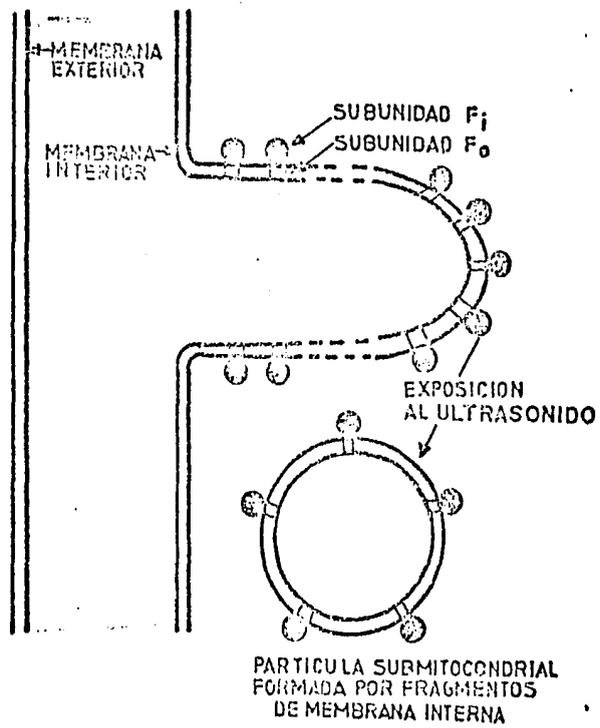


Fig. 5

propios de la física: 1) La vectorialidad de las reacciones químicas, hecho que exige una topografía definida de las proteínas fijadas en la membrana y, 2) La acumulación de energía bajo la forma de un gradiente de potencial electroquímico. La hipótesis quimiosmótica ha permitido interpretar y predecir un gran cúmulo de la información experimental obtenida, durante los últimos veinte años, en los sistemas capaces de conservar energía. (13)

La terminología empleada por Mitchell en su hipótesis parte del concepto de metabolismo vectorial; esta terminología evita la ambigüedad inherente en los conceptos de "transporte activo" y "acoplamiento de energía";

- 1) Translocaciones primarias: son aquellas en las cuales la translocación (translocación: se refiere en sentido general a cualquier movimiento de un lado de la membrana a otro) está directamente unida a una reacción bioquímica, y puede ser de dos clases.
  - a) Translocación de grupos: definida arriba, sucede a nivel de sustrato.
  - b) Translocación de soluto unida a una enzima: es un proceso en el cual el sustrato en sí mismo no participa en la modificación de enlaces covalentes, pero es translocado como resultado de la reacción. Este corresponde a la definición de Kedem de transporte activo y es ejemplificado en el transporte de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  por ATPasas en células de mamíferos.
- 2) Translocaciones secundarias: No están por definición directamente unidas a una reacción química o metabólica, pero lo pueden estar en una forma indirecta.

- a) La más simple es uniport: es la translocación de un solo sustrato por el centro del acarreador, la cual corresponde a "difusión facilitada". El uniport da como resultado el equilibrio del sustrato a través de la membrana, de acuerdo con su potencial electroquímico. (Fig. 6)
- b) Las reacciones "Simport" (o de cotransporte) son aquellas en las cuales dos solutos se equilibran a través de una barrera osmótica de tal manera que la translocación de un soluto es acoplada a la translocación de otro en la misma dirección. En este evento, un gradiente electroquímico el cual impele el movimiento de un sustrato (por ejemplo  $\text{Na}^+$  ó  $\text{H}^+$ ) puede conducir el movimiento de otro sustrato, el cual va sobre el mismo acarreador (un azúcar o un aminoácido), aún cuando este otro sustrato debe moverse contra su propio potencial electroquímico. (Fig. 7)
- c) Las reacciones "Antiport" (contra - transporte): son aquellas en las cuales dos solutos se equilibran a través de una barrera de tal manera que la translocación de un soluto está acoplada a la translocación de otro en la dirección opuesta. Esto es, una distribución asimétrica de un sustrato deberá conducir el movimiento del otro en la dirección opuesta. (Fig. 8)

Por otra parte Transporte concentrativo es un término que se utiliza para denotar la capacidad familiar y ubícua de los seres vivos para mover metabolitos o nutrientes en contra de aparentes gradientes de concentración, sin especificar algún mecanismo (14).

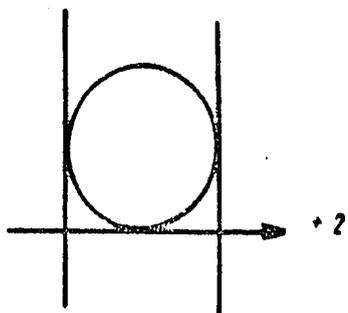


fig. 6

"UNIPORT"

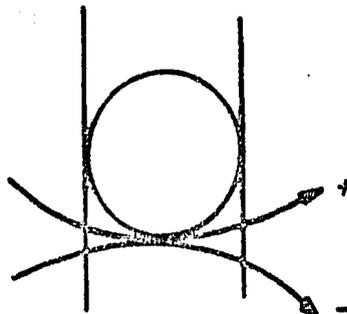


fig 7

"SIMPOR"

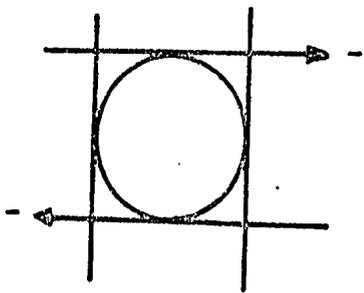
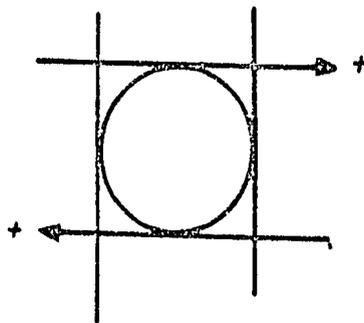


fig. 8

"ANTIORT"



## EL PUNTO DE VISTA QUIMIOSMOTICO

Síntesis de ATP en las mitocondrias. En la cadena respiratoria las reacciones de Oxido - reducción son vectoriales.

La cadena respiratoria es una organización molecular altamente ordenada, formada por proteínas dentro de la membrana mitocondrial interna, y cuya función principal es transferir un par de electrones desde el NADH hasta el oxígeno(4). Sin embargo, por su particular composición química (acarreadores de protones y acarreadores de electrones) y por su distribución asimétrica en la membrana, estas proteínas cumplen, paralelamente, una segunda función: acarrear seis protones desde el interior hacia el exterior de la mitocondria. Esto genera un gradiente de concentración de protones ( $\Delta \text{pH}$ ) que hace a la matriz alcalina con respecto del medio externo. Como los protones no van acompañados por el movimiento de ningún anión, este proceso es también equivalente a la remoción de cargas positivas de la matriz. Se origina así un gradiente de potencial eléctrico ( $\Delta \psi$ ) tal, que el interior de la mitocondria resulta negativo.

Las reacciones de óxido - reducción de la cadena oxidativa van acompañadas por una gran disminución de energía libre.

Desde el punto de vista fisicoquímico ésto constituye una forma de acumular energía ya que la disipación del gradiente permite realizar trabajo (osmótico, químico, conformacional, de transporte etc.).

Así pues, en la mitocondria la energía libre proveniente de las reacciones de óxido-reducción de la cadena oxidativa se acumula como un gradiente de potencial electroquímico.

El gradiente de potencial electroquímico es en parte utilizado para la síntesis de ATP. Pero, ¿Cómo se acopla el flujo de protones a favor de gradiente (disipación del gradiente electroquímico) con la fosforilación de ADP?. Este proceso ocurre en la membrana mitocondrial interna por acción de una enzima,

la ATPasa (E.C.3.6.1.3 fosfohidrolasa), capaz de catalizar la síntesis (o hidrólisis) de una molécula de ATP cuando dos protones son translocados del medio externo a la matriz (o de la matriz al medio externo) vía un canal in trínseco de la proteína. (Fig. 9)

La ATPasa mitocondrial es una enzima oligomérica de peso molecular 500,000 que ha sido aislada y ampliamente estudiada en experimentos de reconstitución en vesículas de fosfolípidos.

La enzima tiene dos porciones, una hidrofílica conocida como  $F_1$  y otra hidrofóbica llamada  $F_0$ . El mecanismo de la síntesis acoplada de ATP no ha sido aún claramente establecido. (13)

La hipótesis quimiosmótica se estableció en 1961, como un ejercicio teórico que requería de cuatro postulados (o requerimientos estructurales y funcionales de la membrana interna mitocondrial. (Fig. 10) para los cuales existía poca o ninguna evidencia. Durante los últimos años se ha logrado un acúmulo de información experimental que avala esos cuatro postulados y conforma las predicciones de la teoría.

Postulado 1.- Existe una ATPasa reversible que sintetiza ATP.

Postulado 2.- Los componentes de la cadena respiratoria están dispuestos en forma de asas, lo que da la orientación adecuada para que ocurra una translocación neta de protones durante el paso de electrones.

Postulado 3.- Existen sistemas de translocadores (porters), acoplados a la transferencia de  $H^+$  que son utilizados para la estabilización osmótica y el transporte de metabolitos.

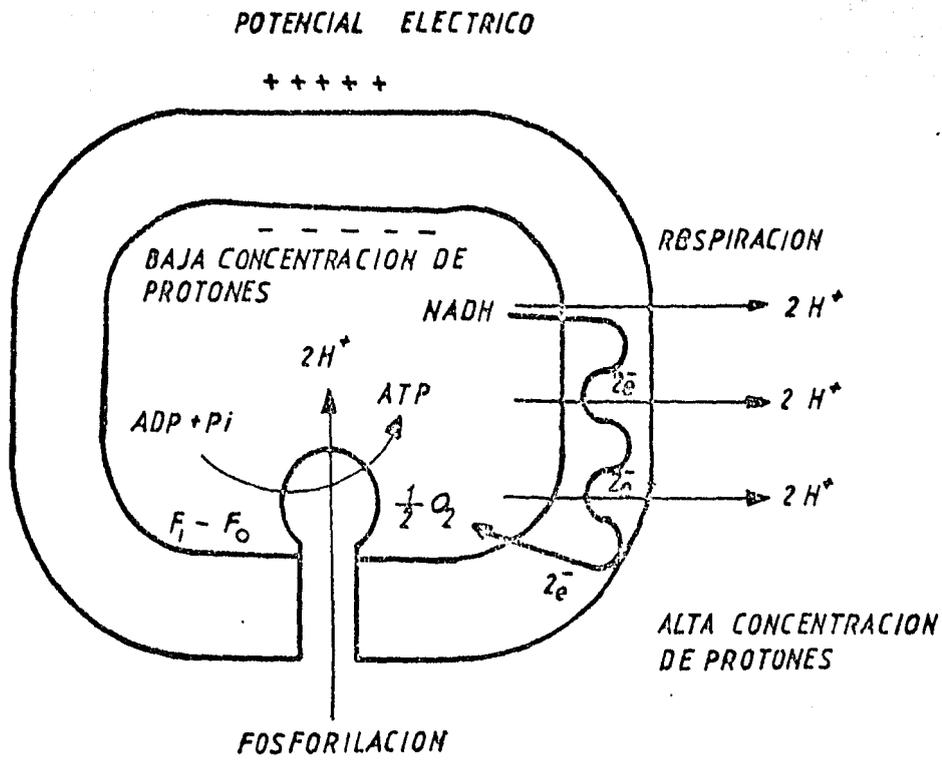


fig. 9

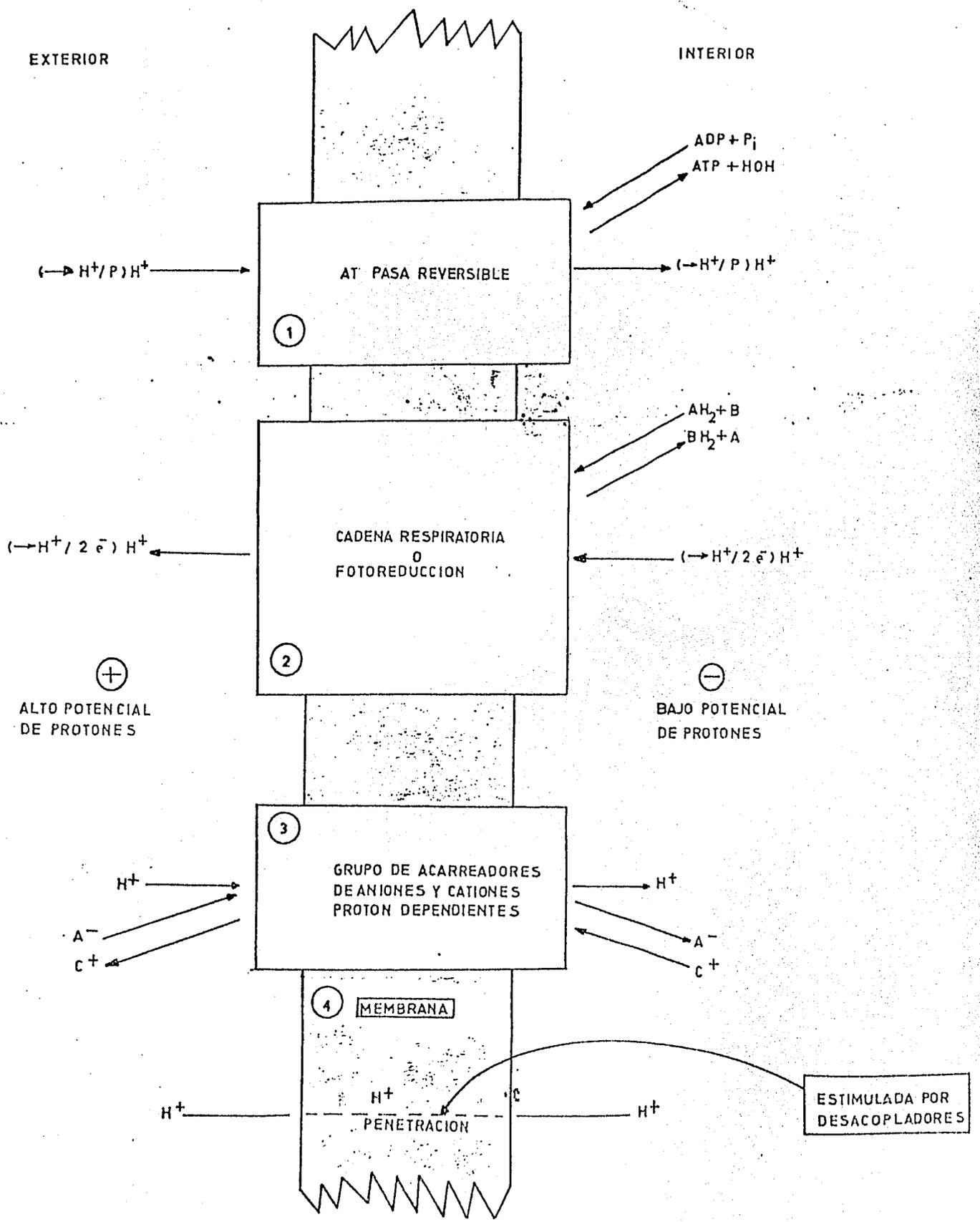


Fig. 10

Postulado 4.-La membrana es impermeable al paso de protones, en ella se encuentran localizados los tres sistemas anteriores. (13)

### IONOFOROS

Los ionóforos son aquellas moléculas que transportan iones a través de las membranas. Se trata de herramientas esenciales en el estudio de los mecanismos quimiosmóticos.

Como ya se ha mencionado, la mayoría de los iones simples son solubles en agua, pero no en la matriz lipídica de las membranas, de forma que las membranas se muestran impermeables a los iones. El ionóforo valinomicina es una molécula cíclica soluble en las membranas y que transporta selectivamente iones de potasio ( $K^+$ ). La nigericina transporta también potasio, pero sólo intercambiándolo por protones; es insoluble en la membrana a menos que un ión esté ligado. Ambos son ionóforos móviles (acarreadores móviles).

La gramicidina A forma un poro en la membrana, compuesto de dos moléculas helicoidales, que es permeable a los iones con una carga positiva como potasio ( $K^+$ ), sodio ( $Na^+$ ) y protón ( $H^+$ ).

Los ionóforos de protones se estudiaron en principio como moléculas clasificadas funcionalmente como "desacoplantes": inhiben la fosforilación pero estimulan la respiración. Este modo de acción se explica por su capacidad de disipar el gradiente de protones. Los ionóforos de protones son ácidos débiles que captan o ceden fácilmente un protón y pueden difundir por la membrana, por ejemplo: dinitrofenol (DNP), carbonilcianuro de p- trifluoro metóxi-fenilhidrazona (FCCP) y 3,5- diterbutil - 4 - metoxibenzilidenmalonitrilo (SF 6847) (15).

### TRANSPORTE EN MITOCONDRIA

durante la actividad metabólica de la mitocondria, se detecta experimentalmente

el movimiento de una impresionante cantidad de protones, así como de cationes, y de aniones. Este hecho exige postular la existencia de moléculas específicas que actuando como canales o acarreadores transloquen especies iónicas y la necesidad de un mecanismo que inicie y module este proceso. Es ahora evidente que los acarreadores de protones de la cadena oxidativa y la ATP sintetasa, son las principales vías para el transporte de  $H^+$  a través de la membrana. Pruebas funcionales concluyentes demuestran también la existencia de acarreadores selectivos en el transporte de nucleótidos, aniones y cationes mono y divalentes. En lo que respecta al mecanismo que inicia y regula el transporte, es útil recordar que el movimiento de moléculas o iones a través de una membrana solamente es espontáneo cuando ocurre en la dirección que tiende a reducir su gradiente de potencial químico o eléctrico (a favor de gradiente), pero que la mitocondria debe incorporar y desechar muchas sustancias contra gradiente, es por ésto que la mayor parte de los procesos de transporte requieren energía. Esta energía es provista por el gradiente electroquímico de protones.

Resulta entonces que, el movimiento de muchos iones está acoplado a las variaciones del gradiente químico de protones o de su potencial eléctrico, y que es el cambio de estos factores energéticos el mecanismo que regula el transporte.

Se sabe que la disipación del  $\Delta pH$  energiza el movimiento de iones.

En el antiport  $Na^+ / H^+$ , los datos experimentales indican que la mitocondria es capaz de intercambiar un ión sodio por un protón. Este intercambio es eléctricamente neutro y no se ve afectado por el  $\Delta \psi$ , ya que si bien éste acelera la entrada de protones, simultáneamente frena la salida de sodio. En cambio, resulta claro que el influjo de protones disipa el  $\Delta pH$  (Fig. 11). Este transporte es mediado por un translocador reversible de tipo antiport, ubicado en la membrana interna y cuya naturaleza química se desconoce. El antiport tiene

" ANTIPORT  $Na^+ / H^+$  "

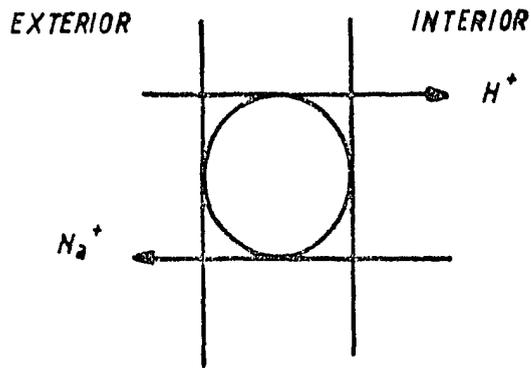


Fig. 11

una selectividad por el  $\text{Na}^+$  mayor que por  $\text{K}^+$ . Su función no ha sido claramente establecida: podría actuar como regulador de la osmolaridad interna y/o de la entrada de aniones a la matriz.

En el simport  $\text{HPO}_4^{2-}/2\text{H}^+$ ; el ión fosfato ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) parece entrar a la mitocondria acompañada por dos protones. Este transporte es eléctricamente neutro y en consecuencia no puede ser controlado por el  $\Delta\psi$ . En cambio, la entrada de protones colapsa al  $\Delta\text{pH}$ . Esta translocación es mediada por un acarreador tipo simport, que es inhibido por Mersalil (Fig. 12).

También se sabe que la disipación del  $\Delta\text{pH}$  energiza el movimiento acoplado de iones. Este tipo de transporte es característico de los sustratos aniónicos. Existe consenso para aceptar que el  $\Delta\text{pH}$  es el componente energético responsable del movimiento y acumulación de aniones dentro de la mitocondria. Sin embargo la evidencia experimental indica que los ácidos di y tri carboxílicos se mueven a través de la membrana mediante un proceso de intercambio anión/anión. Este intercambio es eléctricamente neutro y no parece involucrar al  $\Delta\text{pH}$ . Pero la entrada de los ácidos di y tricarboxílicos a la matriz parece estar acoplado por un mecanismo de tipo cascada al movimiento de fosfato. Y dado que este último ocurre gracias a la disipación de  $\Delta\text{pH}$ , la entrada de los aniones está final y directamente acoplada al consumo de gradiente de protones. Un ejemplo de este movimiento acoplado de iones con disipación de  $\Delta\text{pH}$  es la entrada de citrato a la matriz mitocondrial. (Fig. 13)

Un segundo aspecto del gradiente electroquímico es el que se refiere a la energización del movimiento de iones mediante la disipación del  $\Delta\psi$ .

En el uniport de  $\text{Ca}^{++}$ , el calcio entra electroforéticamente a la matriz mitocondrial atraído por la carga eléctrica negativa interna. El calcio, divalente y positivo, colapsa el  $\Delta\psi$  su entrada, en cambio no modifica el  $\Delta\text{pH}$ . Este

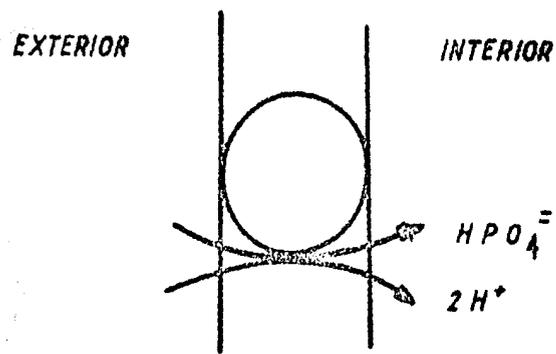


fig. 12

SIMPORT  $HPO_4^{2-} / 2H^+$

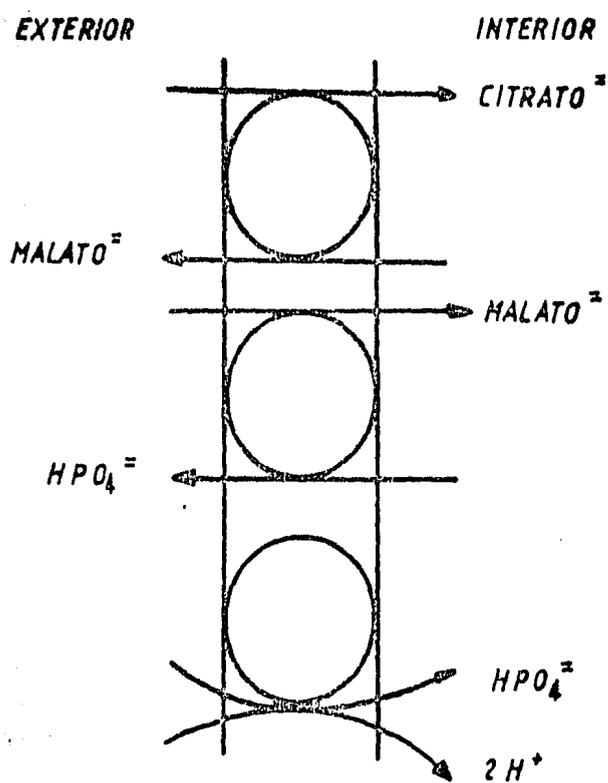


fig. 13

"ENTRADA DE CITRATO A LA  
MATRIZ MITOCONDRIAL"

transporte es mediado por un uniport inhibible con rojo de rutenio y con lantánidos (Fig. 14) (16).

#### EL ACARREADOR $ADP^{3-}/ATP^{4-}$

El transporte de  $ADP^{3-}$  ó  $ATP^{4-}$  a través de la membrana mitocondrial interna es realizado por un sistema de transporte del tipo "antiport", siendo aceptado generalmente que es electrogénico. Este sistema de transporte fue identificado en 1965 gracias al uso de un inhibidor específico, el atractilósido (17). Desde entonces este importante sistema de transporte ha sido estudiado en una amplia variedad de células. Este acarreador funciona intercambiando un nucleótido externo por un interno en una estequiometría 1: 1. Nuestro conocimiento sobre el mecanismo de transporte de  $ADP^{3-}$  y  $ATP^{4-}$  en mitocondrias es el más avanzado en comparación con otros sistemas de transporte. Los resultados están basados en datos obtenidos con el acarreador integrado en la membrana así como en estudios con la proteína purificada.

#### INHIBIDORES

Tres inhibidores específicos son usados comunmente en experimentos sobre transporte de adenín nucleótidos, estos son: atractilósido, carboxiatractilósido y ácido bongkrékico.

El carboxiatractilósido y el atractilósido son toxinas vegetales provenientes del *Atractylis gummifera*, o cardo mediterráneo y el ácido bongkrékico, es un antibiótico formado por un hongo en los restos en putrefacción del bongkrek, una clase de coco comestible utilizada como alimento en Indonesia.

El atractilósido y el carboxiatractilósido son glucósidos cuya aglicona es un diterpeno. Ambas moléculas contiene dos grupos sulfato y un residuo de ácido isovalérico. Otros inhibidores interesantes derivados del atractilósido son apoatractilósido, apocarboxatractilósido y succinilattractilósido (Fig. 15).

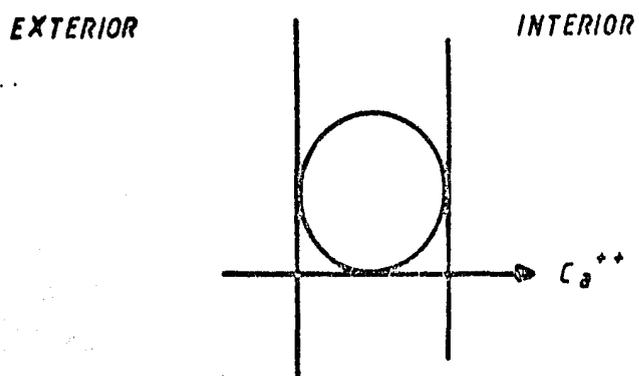


fig. 14

" UNIPORT DE  $Ca^{++}$  "

El ácido bongkrékico (fig. 16), es un ácido graso insaturado de cadena larga, que tiene siete dobles enlaces, tres grupos carboxilos y un grupo metilo. Un isómero del ácido bongkrékico, el ácido isobongkrékico, ha sido recientemente aislado y caracterizado.

El atractilósido es un inhibidor competitivo del transporte de adenín nucleótidos y el carboxiatractilósido es un inhibidor, no competitivo (18). Los ácidos bongkrékico e isobongkrékico son inhibidores incompetitivos. Todos pueden ser marcados radioactivamente, facilitándose de esta forma el estudio de los sitios de unión de estos ligandos.

Los sitios de unión del carboxiatractilósido son saturables teniendo una  $K_d = 10$  nmolar y una concentración de  $0.18 - 0.024$  nmoles/mg proteína.

Los sitios de unión del atractilósido son no saturables teniendo una  $K_d = 20$  nmolar para los sitios de alta afinidad,  $K_i = 0.02-1$  nmolar y una concentración de  $0.18 - 0.024$  nmoles/mg proteínas.

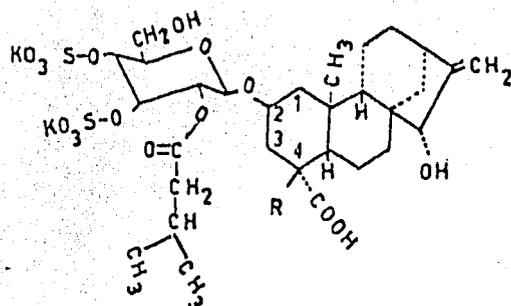
Los sitios de unión del ac. bongkrékico son no saturables teniendo una  $k_d=20$  nmolar para los sitios de alta afinidad. (16)

El ácido agárico (ac.  $\alpha$  - cetilcíttrico), un inhibidor introducido recientemente, inhibe competitivamente el transporte de adenín nucleótidos. (19)

Los ésteres grasos de acil - CoA son inhibidores competitivos, y deben tener una función regulatoria sobre el transporte de adenín nucleótidos en la célula. Recientes experimentos de R.M.N. realizados con ésteres grasos de acil - CoA han revelado el valor de estos compuestos para probar que el translocador de adenín nucleótidos está dentro de la membrana mitocondrial, (20).

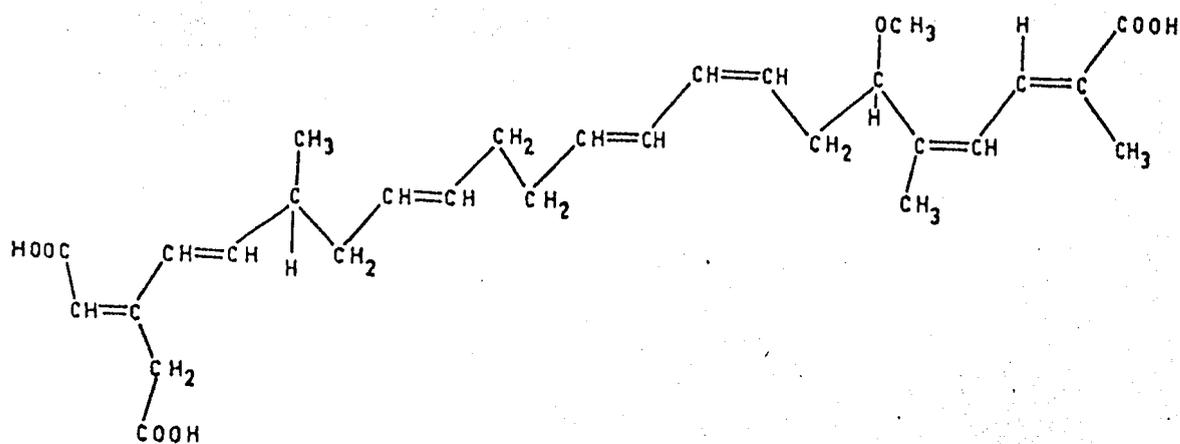
Estos compuestos tienen una  $K_i = 0.2$  nmolar (16).

La interacción de estos inhibidores con el acarreador  $ADP^{3-} / ATP^{4-}$  depende de la presencia de ciertos cationes, particularmente  $K^+$  y  $Mg^{++}$ . (21)



ATRACILOSIDO

Fig. 15



A.C. BONGKREKICO

Fig. 16

El efecto inhibitor del ac. bongkrékico se manifiesta si el pH del medio de incubación es más bajo de 7.0, por tanto, las incubaciones son comúnmente hechas a pH = 6.5. - 6.8, a este pH una fracción significativa de moléculas de ácido bongkrékico están protonadas, ya que el pKa de los tres grupos carboxílicos del ácido bongkrékico es de 5.5. Estudios con ác. ( $^3\text{H}$ ) bongkrékico muestran que el ácido protonado difunde rápidamente a través de la membrana mitocondrial interna y entra a la matriz (22); por lo tanto el ácido bongkrékico debe ser considerado como un inhibidor penetrante.

Por otro lado, atractilósido y carboxiatractilósido se enlazan a la superficie externa de la membrana mitocondrial interna y son por lo tanto inhibidores no penetrantes. El ester de palmitil - CoA. es también un inhibidor no penetrante (20)

#### ESTUDIOS CINÉTICOS

Las características cinéticas del transporte de adenín-nucleótidos son bastante bien conocidas. Como ya se ha mencionado, la estequiometría del intercambio es uno a uno. Los pocos datos sobre acumulación de  $\text{ADP}^{3-}$  ó  $\text{ATP}^{4-}$  en mitocondria pueden ser explicados por reacciones laterales (23). Por ejemplo, existe una toma neta de  $\text{ADP}^{3-}$  por mitocondrias de hígado durante la respiración masiva unida a acumulación de  $\text{Ca}^{++}$  (24).

El transporte de  $\text{ADP}^{3-} / \text{ATP}^{4-}$  tiene una cinética de saturación del tipo de Michaelis - Menten. Dentro de los nucleótidos sólo son transportados  $\text{ADP}^{3-}$  y  $\text{ATP}^{4-}$ , observándose competencia entre ellos. Otros sustratos descritos son: PEP, PPI y posiblemente adenosina (29). Algunos análogos sintéticos de ADP y ATP, modificados en la ribosa o en la cadena de fosfatos, son también transportados, siendo su transporte sensible a atractilósido, aunque las velocidades de intercambio y las afinidades son muy bajas comparadas con las de los adenín nucleótidos naturales (27, 28). El  $\text{ADP}^{3-}$  y el  $\text{ATP}^{4-}$  libres parecen ser

los verdaderos sustratos y no sus complejos con magnesio (26)

El eteno - ATP pese a la modificación sustancial del anillo de purina, puede ser transportado (25).

El acarreador  $ADP^{3-} / ATP^{4-}$  y el acarreador de citrato son capaces de transportar sustratos comunes. Por ejemplo fosfoenol piruvato, el cual se comporta como un sustrato para el acarreador de citrato, es también transportado por el acarreador  $ADP^{3-} / ATP^{4-}$ , aunque su afinidad por éste es mucho más baja. (25).

La velocidad del transporte de ADP depende marcadamente de la temperatura. Con mitocondrias de hígado de rata, la curva de Arrhenius presenta un quiebre a los  $10^{\circ}C$  (27). El valor de la energía de activación es mucho más alto abajo de  $10^{\circ}C$  (49 Kcal/mol) que arriba de  $10^{\circ}C$  (13 Kcal/mol). Estos estudios son interpretados en el sentido de que el quiebre de la curva de Arrhenius corresponde a la fase de transición en la membrana de fosfolípidos. (25).

Los parámetros cinéticos dependen del estado energético de la mitocondria: en estado acoplado la  $K_m$  y  $V_m$  para  $ADP^{3-}$  son 2 - 25  $\mu$ molar y 1-10  $nmol\ mg^{-1}\ min^{-1}$  y para  $ATP^{4-}$  de 100 - 150 y 2 - 10, respectivamente; en estado desoplado la  $K_m$  y  $V_m$  para  $ADP^{3-}$  son de 20 - 35  $\mu$ molar y 3-5  $nmol\ mg^{-1}\ min^{-1}$  y para  $ATP^{4-}$  de 6- 10 y 2 - 3 respectivamente. (29)

#### ASIMETRIA EN EL TRANSPORTE DE $ADP^{3-} / ATP^{4-}$

Es generalmente aceptado que el acarreador de adenín nucleótidos es electrogénico. La separación de cargas a través de la membrana ocurre durante el intercambio de  $ATP^{4-}$  el cual tiene cuatro cargas negativas, por el  $ADP^{3-}$ , que tiene tres cargas negativas. Las evidencias de que el intercambio es electrogénico provienen de diferentes tipos de experimentos. Durante la respiración cuando la mitocondria, sintetiza  $ATP^{4-}$  a partir de  $ADP^{3-}$  y fosfato,

el transporte de  $\text{ADP}^{3-}$  - hacia dentro de la mitocondria es mucho más rápido que el transporte en la misma dirección de  $\text{ATP}^{4-}$  (30). Esto ocurre aún cuando la concentración de ATP afuera es muchas veces más alta que la de ADP. Debido al transporte preferencial hacia dentro del ADP, en presencia de sustratos respiratorios, la relación de ATP/ADP es mucho más alta afuera de la mitocondria que dentro (16). En presencia de agentes desacoplantes (31), esta diferencia desaparece así como la preferencia cinética por  $\text{ADP}^{3-}$ . Datos recientes (32) muestran que la relación de los cocientes ATP/ADP externo e interno, es una función lineal del potencial de membrana con una pendiente de 0.85, cuando el potencial es variado con  $\text{K}^+$  en presencia de valinomicina. El yoduro de 3,3' - depropiltiocarboxiamina, es un colorante que se une a la membrana mitocondrial y produce cambios de fluorescencia en coincidencia con los cambios de potencial de membrana. El intercambio de ATP/ADP a través de la membrana mitocondrial causa cambios transitorios de fluorescencia, lo cual es indicativo de un incremento en el potencial de membrana (32).

Antiguamente se creía que el transportador era parcialmente electrogénico ya que los estudios mostraban que el intercambio de ADP por ATP era compensado sólo en 50% por movimiento de protones.

Estudios más recientes muestran que el acarreador cataliza un intercambio completamente electrogénico de  $\text{ATP}^{4-}$  y  $\text{ADP}^{3-}$  sin cotransporte de protones cuando valinomicina y  $\text{K}^+$  son incluidos en el medio para minimizar el artefacto por movimiento de protones (33). Puesto que el intercambio de ATP/ADP es completamente electrogénico, algunos problemas surgen en el balance de las cargas y movimiento de iones hidrógeno durante la síntesis de ATP. De acuerdo a la proposición original de Mitchell (13), dos protones son bombeados hacia afuera de la mitocondria por cada sitio de acoplamiento de la cadena de transporte electrónico. La síntesis de ATP resulta en el

regreso de esos protones. La utilización de la mitad de esta energía disponible para un proceso de transporte sería termodinámicamente indeseable. Además, el potencial de membrana medido no es suficiente para llevar a cabo la síntesis de ATP (34). Como se sabe la energía disponible del potencial de membrana depende del número de cargas que se mueven a través de la membrana durante la reacción química, muchos estudios recientes sugieren que la estequiometría de protones de la hipótesis quimiosmótica es incorrecta. Mediciones directas del movimiento de protones indican que cuatro son transportados por la cadena respiratoria por cada sitio de síntesis de ATP. Se piensa que tres de estos protones son regresados durante la síntesis de ATP, esto provee la energía necesaria para vencer la gran diferencia de energía entre ADP más fosfato y ATP. Una carga se utiliza para el transporte lo cual deja a la membrana eléctricamente balanceada (16).

El balanceo del movimiento de los protones es algo más complicado. El fosfato es un anión monovalente a  $\text{pH} = 6$  y el transporte electroneutro de fosfato a este  $\text{pH}$  es acompañado por un protón libre por molécula de fosfato. Bajo estas condiciones cuatro protones son transportados fuera de la matriz por la cadena de transporte electrónico, tres retornan durante la síntesis de ATP, y el protón restante entra con el fosfato. Sin embargo a  $\text{pH} 7.0$  más de un protón es liberado por molécula de fosfato. En la práctica no ocurre ningún desbalance, puesto que los protones extra que aparecen en la matriz son consumidos en la síntesis de ATP. Los protones libres que desaparecen del citoplasma, reaparecen cuando el ATP es hidrolizado para las reacciones de la célula que requieren energía (36).

Un reporte reciente sugiere que bajo ciertas condiciones, cuando el ATP entra a la mitocondria para llevar a cabo procesos metabólicos, el transporte debe ser electroneutro debido a cotransporte con fosfato aniónico (35).

INTERACCION CON LA F<sub>1</sub>-ATPasa-

Existen algunas evidencias de que el ATP formado durante la fosforilación oxidativa de ADP es transportado fuera de la mitocondria sin ser liberado dentro de la matriz. Entre otros ejemplos, están los siguientes: 1) después de adición de (<sup>14</sup>C) ADP a la mitocondria durante el curso del estado 3 de la respiración (<sup>14</sup>C) ATP aparece fuera de la mitocondria, mucho más rápido de lo que teóricamente se esperaría si se mezclasen el (<sup>14</sup>C) ADP y el (<sup>14</sup>C) ATP con el "pool" de nucleótidos de la matriz mitocondrial.

2) la adición de ADP a mitocondrias cargadas con arsenato y tratadas con mersalil (para bloquear el transporte de Pi (As), da como resultado la aparición de As fuera de la mitocondria, probablemente en la forma de ADP-As. Una posible explicación es que el ADP-As, después de ser formado en la membrana mitocondrial es transportado fuera directamente. Si el ADP-As fuera liberado a la matriz mitocondrial éste debería ser hidrolizado ahí para dar ADP y As, y el As debería permanecer dentro de la matriz.

3) recientemente se ha encontrado que la interacción del acarreador ADP/ATP con la F<sub>1</sub>-ATPasa depende del estado energético de la mitocondria. La desenergización por carbonilcianuro de p-trifluoro metóxifenilhidrazona (FCCP), pero no por dinitrofenol (DNP), resulta en una pérdida de interacción. Para explicar este hallazgo se postuló que el acarreador ADP<sup>3-</sup>/ATP<sup>4-</sup> puede asumir dos conformaciones dependiendo del estado energético de la mitocondria: durante el estado 3 de la respiración, el acarreador ADP<sup>3-</sup>/ATP<sup>4-</sup> existe en una forma de alta energía, la cual interactúa con la ATPasa mitocondrial. Estos y otros resultados (25) sugieren que el complejo ATPasa y el acarreador ADP/ATP están situados muy cerca dentro de la membrana mitocondrial interna. Aunque no ha sido posible decidir si el transportador y el complejo ATPasa interactúan uno con el otro a través de una subunidad común o si tienen acceso

directo a un espacio microacuoso común que no se equilibra rápidamente con el espacio de la matriz (25).

#### ACARREADOR ADP/ATP Y REGULACION DE LA RESPIRACION DE LA FOSFORILACION OXIDATIVA

Actualmente existe gran controversia acerca del posible papel del transportador de adenín - nucleótidos en la regulación de la fosforilación oxidativa. Evidencias de tipo cinético sugieren que la etapa limitante de la velocidad se localiza en la translocación de ADP. Por ejemplo, la elevada sensibilidad de la respiración del estado fosforilante y de la propia síntesis de ATP al atractilósido y el incremento en la velocidad de síntesis por disminución de la relación ATP/ADP a diferentes concentraciones de  $P_i$ , se ha interpretado como una limitación cinética del transportador de adenín nucleótidos (51). Además se ha demostrado que la inhibición del calcio sobre la fosforilación de ADP se realiza a través de una disminución de la actividad del translocador y no por efecto del catión a nivel de la ATP sintetasa o la cadena respiratoria (25). En este sentido, otros autores han reportado que la síntesis de ATP se encuentra casi en equilibrio termodinámico con los dos primeros sitios de conservación de la energía de la cadena respiratoria. Por tanto han propuesto que la regulación de la fosforilación oxidativa solo puede ser ejercida por la reducción irreversible del  $O_2$  en  $H_2O$  por la citocromo oxidasa en el tercer sitio de la fosforilación (53). En la primera hipótesis, la síntesis mitocondrial de ADP sería regulada por la relación ATP/ADP y en la segunda, por el potencial de fosforilación ( $ATP/ADP + P_i$ ). Dado que ambas hipótesis son aparentemente incompatibles, parece fundamental determinar con precisión cual es la influencia del  $P_i$  en la termodinámica y cinética de la fosforilación oxidativa. Otra posibilidad que no puede descartarse, es que exista un control múltiple a nivel de los acarreadores y de las deshidrogenasas.

Por otra parte, existe una respuesta de la membrana mitocondrial a el funcionamiento de el acarreador ADP/ATP. La adición de ADP o ATP en cantidades mi-

cromolares a las mitocondrias conduce a cambios morfológicos de la membrana mitocondrial interna. Estos cambios son sensibles a atractilósido pero no a oligomicina. (24)

#### AISLAMIENTO DE LA PROTEINA ACARREADORA

La proteína acarreadora de adenín nucleótidos ha sido aislada en varios laboratorios (37,38,39). El método de aislamiento más exitoso utiliza enlace de carboxiatractilósido. Hasta 10% de la proteína de la membrana mitocondrial interna puede ser aislada enlazada a carboxiatractilósido en una forma cromatográficamente pura (42). Los intentos para aislar el acarreador libre de ligandos han sido difíciles de lograr debido a que el acarreador es sensible a digestión proteolítica. Sin embargo usando preparaciones de proteína aislada fresca, de acarreador libre de ligandos, ha sido posible reconstituir algo del transporte de adenín nucleótidos en liposomas artificiales (43,44,45,46, 47).

De experimentos realizados con mitocondrias completas se sabía que el ambiente lipídico del acarreador juega un papel importante en el transporte de adenín nucleótidos (25). Ha sido recientemente demostrado que la actividad en el transporte del acarreador ADP/ATP, cuando es incorporado a liposomas, es incrementada considerablemente en presencia de fosfatidiletanolamina. Se puede especular que este efecto es debido a la interacción específica de la fosfatidiletanolamina con la molécula de proteína o que el reacomodo estructural de la membrana facilita el funcionamiento de el acarreador ADP/ATP(45).

La comparación de datos de diferentes laboratorios (37-39,42,44,47), sugiere que la proteína enlazada a carboxiatractilósido es un dímero de dos subunidades con un peso molecular de 30,000 cada una de ellas,

El ácido bongkrékico también ha sido usado para proteger de desnaturalización a la proteína durante el procedimiento de purificación.

La purificación del acarreador ha permitido dilucidar algunos aspectos del desenmascaramiento de grupos -SH asociados con cambios conformacionales causados por la adición de ADP o ATP (25). La incorporación de N-etilmaleimida (un reactivo específico para grupos -SH que inhibe el transporte de adenín nucleótidos) a la subunidad de P.M. 30,000 es específicamente estimulado por ADP y ATP; la adición de carboxiatractilósido inhibe la incorporación, mientras que el ac. bongkrékico la permite; después de solubilización con tritón (un detergente neutro) la purificación de la proteína marcada con N-etimaleimida es facilitada en presencia de ac. bongkrékico, con carboxiatractilósido, no se logra; ésto está en concordancia con los datos que postulan la existencia de solamente un complejo ac. bongkrékico proteína (25, 49).

#### MODELOS DEL ACARREADOR ADP/ATP

Se sabe que el transportador de adenín nucleótidos mitocondrial es reconocido específicamente por dos inhibidores naturales, atractilósido y ácido bongkrékico. Ellos se enlazan específicamente a el transportador y compiten uno con otro para unirse; además el atractilósido es un inhibidor no penetrante el cual inhibe el transporte de ADP/ATP cuando se une externamente a la membrana mitocondrial interna, mientras que el ácido bongkrékico inhibe el transporte de ADP/ATP solamente bajo condiciones las cuales favorecen su penetración a la matriz mitocondrial (25). En partículas mitocondriales con orientación hacia afuera ("inside out") ocurre la situación inversa, esto indica que la asimetría de enlace del acarreador ADP/ATP con respecto al atractilósido y ac. bongkrékico, no se debe realmente a la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna a los dos inhibidores, si no que es inherente a la topografía o el funcionamiento del acarreador (55). Como ya se ha dicho anteriormente, los modelos para transporte a través de membranas biológicas caen dentro de dos clases: acarreador móvil y de poro fijo, (9).

El acarreador de adenín nucleótidos es una proteína intrínseca de la membrana mitocondrial interna, la cual muy probablemente cruza el ancho de la membrana (54).

El modelo de acarreador móvil satisface; su cinética de transporte; la dependencia de la velocidad de transporte con respecto al ambiente lipídico; la asimetría del transporte de ADP/ATP; y con respecto a los sitios de enlace de los inhibidores.

En contra de este modelo se argumenta que, aunque es una molécula altamente hidrofóbica los residuos iónicos deben hacer su movimiento a través de la membrana termodinámicamente improbable. Además este modelo no explica su proximidad con la  $F_1$  - ATPasa.

El mecanismo de canal de poro fijo explica bastante bien la asimetría del transporte y de la unión de los inhibidores, además está en concordancia con la posición fija del transportador cerca de la  $F_1$  - ATPasa (E.C.3.6.1.3. ATPfosfohidrolasa) (25).

Dos modelos han sido propuestos tomando en cuenta las propiedades de unión de atractilósido y ácido bongkrékico.

En el primero Block y col., asumen que la proteína acarreadora cruza la membrana y posee un sitio de unión para el atractilósido sobre la cara externa (citosólica) y otro para el Ac. bongkrékico sobre la cara interna (matriz); la interacción entre estos sitios debería entonces ser indirecta (56).

Un segundo modelo, es el planteado por Klingenberg y Col., quienes suponen que el atractilósido y el ac. bongkrékico se enlazan en el mismo sitio que ADP o ATP sobre el acarreador el cual está alternativamente orientado hacia dentro y hacia afuera (57).

Esto es, el acarreador puede existir en dos formas, la forma "m" con el sitio

activo hacia el lado de la matriz, la cual enlaza ácido bongkrékico, y la forma "c" con el sitio activo expuesto hacia la superficie citoplásmica, la cual puede enlazar carboxiatractilósido pero no ac. bongkrékico. La forma "c" puede ser convertida a la forma "m" y de esta forma se hace el transporte de ADP a través de la membrana, pero este cambio conformacional solo puede ocurrir cuando el sustrato esta enlazado al acarreador. El aislamiento de estas dos formas del transportador de adenín nucleótidos confirma esta interpretación. Aunque la proteína con carboxiatractilósido y la proteína con ac. bongkrékico tienen el mismo peso molecular y la misma composición de aminoácidos (48), son inmunológicamente diferentes (58). Además difieren en su sensibilidad a reactivos para grupos - SH y la digestión proteolítica. Sin embargo la conformación proteína-carboxiatractilósido puede ser convertida a una conformación proteica que enlace ac. bongkrékico en solución, añadiendo ADP y ac. bongkrékico al medio, uno solo no tiene este efecto (48).

Klingenberg ha visualizado a esta proteína con un centro de fijación de 3 cargas positivas (Fig. 17): de esta manera, al unirse con el  $\text{ATP}^{4-}$  en el lado interno se formaría un complejo con carga negativa de 1 y el potencial (interior negativo) empujaría la proteína hacia el lado citosólico liberando el ATP y asociándose, ahora con  $\text{ADP}^{3-}$ . El nuevo complejo formado sería electroneutro y no respondería al potencial. Este modelo secuencial explica algunas observaciones de tipo cinético, pero supone que sólo existe un sitio de fijación y ésto ha sido cuestionado recientemente (59).

Estudios de fijación con análogos del ATP han revelado la presencia de al menos dos clases de sitios de unión tanto para sustratos como para inhibidores específicos, experimentos cinéticos utilizando un rango amplio de concentración, sugirieron la existencia de una cooperatividad positiva y

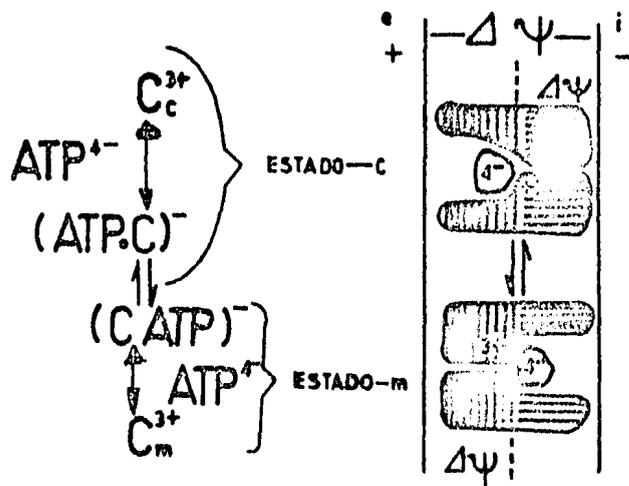


Fig. 17 MODELO DEL  
ACARREADOR ADP/ATP

la consiguiente formación de un complejo ternario nucleótido<sub>2</sub>-proteína (60), (61). De acualquier manera, estas observaciones aún pueden acomodarse suponiendo un sitio de unión.

Recientemente ha sido reportada la secuencia de los residuos aminoácidos de la translocasa ADP/ATP de mitocondria de corazón de res. Una característica importante de esta secuencia, ya que se trata de una proteína integral de transporte integrada en membrana, es su gran número de residuos polares.

De acuerdo a su estructura primaria, el acarreador ADP/ATP contiene 297 residuos de aminoácidos (Fig. 18). Para enumerar los residuos polares es importante hacer notar que de 19 Glx solamente 6 están en forma ácida, mientras que de 23 Asx 15 están en su forma ácida. Estas se contraponen a 23 lisinas y 17 argininas. La diferencia resultante corresponde a una carga neta positiva de 18, considerando el C terminal y el N terminal bloqueado. Esto está de acuerdo con su alto punto isoeléctrico poco común de 9.8, que demuestra la naturaleza catiónica de esta proteína.

La secuencia revela algunas agrupaciones de cargas positivas, un triplete Arg-Arg-Arg (posiciones 234-236) y dobletes Arg-Lis (posiciones 243-244, 258 - 259) y Lis-Lis (posiciones 294-295). Otro triplete catiónico potencial Arg-His-Lis, existe en la posición (104-106). Hay además distintas acumulaciones de cargas positivas y negativas las cuales indican regiones altamente hidrofílicas.

Secuencias hidrofóbicas, o al menos secuencias no interrumpidas por grupos cargados de más de 20 aminoácidos se encuentran de Tir (111) hasta Leu (133) y, como previamente se había duplicado, la Ile (209) hasta Phe (230). Otro candidato para un segmento hidrofóbico se extiende de Gli (171) a Tir (194), interrumpido solamente por Arg (187).

10

H<sub>2</sub>N-Ser-Asp-Gln-Ala-Leu-Ser-Phe-Leu-Lis-Asp-Phe-Leu-Ala-Gli-  
 20

Gli-Val-Ala-Ala-Ala-Ile-Ser-Lis-Thr-Ala-Val-Ala-Pro-Ile-Glu-  
 30 40

Arg-Val-Lis-Leu-Leu-Leu-Gln-Val-Gln-His-Ala-Ser-Lis-Gln-Ile-  
 50

Ser-Ala-Glu-Lis-Gln-Tir- X<sub>1</sub>-Gli-Ile-Ile-Asp-Cis-Val-Val-Arg-  
 60 70

Ile-Pro-Lis-Glu-Gln-Gli-Phe-Leu-Ser-Phe-Trp-Arg-Gli-Asn-Leu-  
 80

Ala-Asn-Val-Ile-Arg-Tyr-Phe-Pro-Thr-Gln-Ala-Leu-Asn-Phe-Ala-  
 90 100

Phe-Lis-Asp-Lis-Tir-Lis-Gln-Ile-Phe-Leu-Gli-Gly-Val-Asp-Arg-  
 110

His-Lis-Gln-Phe-Trg-Arg-Tir-Phe-Ala-Gli-Asn-Leu-Ala-Ser-Gli-  
 120 130

Gli-Ala-Ala-Gli-Ala-Thr-Ser-Leu-Cis-Phe-Val-Tir-Pro-Leu-Asp-  
 140

Phe-Ala-Arg-Thr-Arg-Leu-Ala-Ala-Asp-Val-Gli-Lis-Gli-Ala-Ala-  
 150 160

Gln-Arg-Glu-Phe-Thr-Gli-Leu-Gli-Asn-Cis-Ile-Thr-Lis-Ile-Phe-  
 170

Lis-Ser-Asp-Gli-Leu-Arg-Gli-Leu-Tir-Gln-Gli-Phe-Asn-Val-Ser-  
 180 190

Val-Gln-Gli-Ile-Ile-Ile-Tir-Arg-Ala-Ala-Tir-Phe-Gli-Val-Tir-  
 200

Asp-Thr-Ala-Lis-Gli-Met-Leu-Pro-Asp-Pro-Lis-Asn-Val-His-Ile-  
 210 220

Ile-Val-Ser-Trp-Met-Ile-Ala-Gln-Thr-Val-Thr-Ala-Val-Gly-Leu-  
 230 240

Val-Ser-Tir-Pro-Phe-Asp-Thr-Val-Arg-Arg-Arg-Met-Met-Met-Gln-Ser  
 250

Gly-Arg-Lys-Gly-Ala-Asp-Ile-Met-Tir-Thr-Gli-Thr-Val-Asp-Cis-  
 260 270

Trp-Arg-Lis-Ile-Ala-Lis-Asp=Glu-Gli-Pro-Lis-Ala-Phe-Phe-Lis-  
 280

Gli-Ala-Trp-Ser-Asn-Val-Leu-Arg-Glu-Met-Gli-Gli-Ala-Phe-Val-  
 290

Phe-Val-Leu-Val-Leu-Tir-Asp-Glu-Ile-Lis-Lis-Phe-Val-Oh

Fig. 18 Secuencia de aminoácidos del acarreador ADP/ATP de mitocondria de corazón de res. Se subrayan las posibles agrupaciones de cargas positivas. (62)

Frecuentemente se han implicado segmentos hidrofóbicos de alrededor de 18 aminoácidos en la formación de alfa hélices que atraviesan la membrana. En concordancia con esto, al menos 3 de tales segmentos están presente en el acarreador ADP/ATP, aunque se ha visualizado que la proteína esta completamente embebida en la membrana. Además puede esperarse que la estructura primaria proporcione el dominio estructural del sitio de unión, el cual es característico de los sitios de unión para nucleótidos de varias proteínas (62).

Usando un programa de computación Matti y Walker han propuesto un modelo el acarreador en la membrana suponiendo que existen tres hélices correspondientes a la tres regiones no plares (63).

#### MODIFICACION DE GRUPOS FUNCIONALES EN ENZIMAS.

La comprensión de las bases químicas de la catálisis enzimática continúa representando una parte muy importante de la investigación en bioquímica.

Es muy común en la práctica hablar de especies químicas, las cuales alteran la estructura covalente de un péptido o una proteína de una manera controlable o limitada, como reactivos para un "grupo específico".

El término "grupo específico" representa un nivel de optimismo no siempre alcanzado en la práctica; el término "grupo selectivo" describe más adecuadamente la realidad del éxito en una modificación química de un solo tipo de grupos funcionales en una proteína, la exclusión total de otros tipos de grupos es una excepción, mas que una regla.

Se han hecho numerosos estudios con respecto a la reactividad relativa de aminoácidos hacia un reactivo particular; para ser capaces de demostrar el mismo orden de reactividad de estos aminoácidos en una proteína natural se deberán considerar muchas variables. No solamente es común observar marcadas variaciones o aún inversiones en las velocidades de reacción relativas, sino también encontrar grupos en la macromolécula proteica los cuales son

considerablemente más reactivos que los mismos grupos en compuestos más sim ples. Tal "super-reactivad" puede existir aún cuando el grupo involucrado no tenga relación directa en la función catalítica de una enzima o donde el reactivo no está favorecido para unirse a su sitio específico.

La disminución o aumento de reactividad de un grupo funcional en la proteína puede resultar de:

- a) la influencia de las características del ambiente de la proteína sobre el grupo funcional, o
- b) Interacciones entre el reactivo y el ambiente de la proteína,
- c) o de a) y b) al mismo tiempo.

A continuación se enumeran algunos de los factores que pueden influir en las variaciones de reactivad de grupos funcionales en las proteínas. Estos factores generalmente no son observados en moléculas más simples.

A.-Efectos del ambiente de la proteína sobre grupos funcionales:

- 1.- Protección estérica total por la matriz de la proteína (dando como resultado inaccesibilidad del grupo a cualquier reactivo, sin importar su tamaño). Tal protección también puede ser dada por un cofactor, substrato o inhibidor.
- 2.- Puentes de hidrógeno (generalmente incrementan el pK, y pueden aumentar odisminuir la reactividad de nucleófilos).
- 3.- Efecto del campo eléctrico por grupos cercanos con carga (pueden alterar pK's y reactividades en cualquier dirección).
- 4.- La polaridad del medio ambiente local (las regiones lipofílicas generalmente reprimen la ionización; el efecto sobre la reactividad varía de acuerdo con el tipo de reacción).

5.- Interacciones covalentes reversibles, por ejem: la formación de hemitioacetales (disminuye el carácter nucleofílico).

6.- Interacciones de transferencia de carga de sistemas de electrones (pueden alterar la reactividad en cualquier dirección).

B.- Efectos del ambiente de la proteína sobre el reactivo:

1.- Absorción selectiva del reactivo previa a la reacción (incrementa la reactividad por proximidad y efectos cinéticos).

2.- Interacción electrostática con grupos cargados en la vecindad (pueden atraer o repeler al reactivo de acuerdo a su relación de carga).

3.- Protección parcial estérica por la matriz de la proteína, el grado de protección depende del tamaño y forma del reactivo (conformación).

4.- Polaridad del medio ambiente local (el efecto depende del mecanismo de reacción).

5.- Otros grupos funcionales en la vecindad (pueden favorecer o impedir, dependiendo del mecanismo de reacción).

6.- Restricción conformacional (El grupo funcional puede ser incapaz de alcanzar la conformación necesaria para un mecanismo de reacción particular). (64).

Para evitar ambigüedades en la terminología, se han establecido definiciones operacionales de los terminos empleados en este tipo de estudio.

Sitio activo. Se refiere específicamente a aquellos átomos de las cadenas laterales de las proteínas, directamente involucrados en el paso catalítico, por ejemplo: los procesos de rompimiento o formación de enlaces.

Esto puede involucrar, y comunmente así es, más de un solo átomo o residuo.

Centro activo. Se refiere a aquellos residuos involucrados en la unión y enlace del sustrato, especificidad y catálisis, por consiguiente, esta definición incluye el sitio activo.

Los grupos de unión del sustrato están directamente involucrados en la adhesión no covalente del sustrato al centro activo de una enzima. El número y naturaleza de tales grupos puede variar, dependiendo del sustrato particular, y de aquí que, tales definiciones pueden ser algo arbitrarias. Los sitios efectores están compuestos de grupos topológicamente remotos del centro activo, los cuales pueden interactuar con otros ligandos además del sustrato y de este modo influenciar la unión y actividad, a través de efectos sobre la estructura y conformación.

Así es que, mientras los sitios activos ahora conocidos consisten de un número múltiple de residuos, se requieren además, residuos adicionales para la especificidad en el enlace del sustrato. Esto incrementa grandemente la compleja tarea de interpretar las consecuencias de la modificación química en terminos específicos. No obstante la modificación química de residuos del sitio activo, es el enfoque que ha ganado mas amplia aceptación en el presente (65).

Junto con el incremento en la aplicación de las modificaciones químicas, también se han dado cambios en el enfoque experimental. En estudios antiguos, la intención era bloquear o alterar todos los grupos funcionales disponibles de un tipo particular y entonces observar el efecto de esta modificación sobre la actividad enzimática y propiedades físicas. En estudios más recientes, el objetivo ha sido modificar el mínimo número de grupos, de preferencia uno y determinar el efecto de éste sobre el equilibrio de unión, velocidades catalíticas, alteraciones en la especificidad de sustrato, etc.. La posibilidad de usar una modificación química selectiva y limitada como un medio para

reconocer la estructura terciaria, mapeo topológico y detectar cambios conformacionales ha sido ampliamente reconocida. Bastante información ha sido adquirida al realizar modificaciones limitadas en presencia o ausencia de varios sustratos o inhibidores (64).

En lo que se refiere al mapeo del sitio activo del acarreador ADF/ATP, Block y col. han publicado un trabajo, realizado en mitocondrias de corazón de res, en el cual estudiaron el papel de los residuos aminoácidos, Triptofano y arginina, en el enlace de dos inhibidores específicos de la translocasa (atractilósido (ATR) y ac. bongkrékico (AB) (66).

Ellos investigaron esto por medio de modificaciones químicas con bromuro de 2-hidroxi-5-nitrobenzilo (HNB), un reactivo muy selectivo para residuos de triptofano y con 2,3-butanediona y fenilgloxal, dos reactivos los cuales modifican residuos de arginina.

La unión del atractilósido se inhibió rápidamente con HNB, mientras que la unión del ac. bongkrékico no se vió afectada. La unión de atractilósido fue también rápidamente inactivada por butanediona y fenilgloxal, mientras que la unión de ac. bongkrékico fue inactivada lentamente por estos reactivos. En todos los casos la inactivación disminuyó los sitios de afinidad sin modificaciones de los valores de Kd de los sitios remanente; además se logro mediante preincubación con los ligandos una protección específica de los sitios de unión de el ac. bongkrékico y el atractilósido.

La protección contra la inhibición por HNB mediante preincubación con atractilósido, estuvo en concordancia, con un decrecimiento de la cantidad de HNB enlazado. La sal de sulfonio del HNB no interfiere con el enlace de atractilósido. Como el HNB es un reactivo penetrante en contraste a su sal de sulfonio, y las reactividades químicas de los dos compuestos son

similares, entonces se infiere que los residuos de aminoácidos modificados por HNB están localizados en una región hidrofóbica de la molécula de acarreador ADP/ATP.

Se estudio la inactivación del enlace del ac. bongkrékico y del atractilósido por fenilgloxal como una función del enlace específico de ( $^{14}\text{C}$ ) fenilgloxal, sensible a atractilósido y ácido bonkrékico respectivamente.

Los datos son compatibles con la hipótesis de que el acarreador ADP/ATP es una proteína asimétrica que cruza la membrana mitocondrial interna, siendo esta asimetría reflejada por distintos sitios de unión preexistentes para atractilósido y ac. bongkrékico aunque también se podrían explicar estos resultados en base a la existencia de un solo sitio de unión para ambos ligandos.

Estos resultados ponen de manifiesto que los residuos aminoácidos Trp y Arg juegan un papel importante en el sitio de unión del acarreador, en este punto es importante hacer notar que el grupo guanidino de la Arg se encuentra cargado positivamente, lo que facilitaría la unión de los adenín nucleótidos e inhibidores de la translocasa los cuales, como se sabe, tienen cargas negativas.

Ahora bien, analizando la secuencia de aminoácidos del acarreador ADP/ATP, nosotros observamos que están presentes 20 Lis, además de 17 Arg. El grupo amino primario de la Lis también se encuentra cargado positivamente, lo cual nos hizo pensar que pudiera jugar un papel importante en la unión de los sustratos del acarreador de adenín nucleótidos.

La pregunta concreta fue la siguiente, ¿ que papel juegan los grupos amino en el funcionamiento del acarreador de adenín nucleótidos en la mitocondria?.

Para responder la interrogante se utilizó un reactivo específico para grupos amino primarios, la fluorescamina, (4 - fenilspiro [furano 2 (3), 1' - ftalan - 3,3 - diona), este reactivo forma un enlace covalente con estos grupos y la fluorescamina que no reacciona se hidroliza espontáneamente en el medio para dar subproductos no fluorescentes.

Además el carácter lipofílico de esta sustancia facilita su penetración en la membrana mitocondrial.

Las características anteriores hicieron de la fluorescamina un reactivo adecuado para el mapeo del sitio activo de la translocasa.

MATERIAL Y METODOSMATERIALES

- Sacarosa
- EDTA (ac. etilén diaminotetraacético)
- Tris (hidroxiaminometano)
- $\text{Na}_2\text{CO}_3$
- $\text{CuSO}_4$
- Tertrato de Na-K
- Reactivo de folin (ácido fosfowolfranomolibdico, complejo llamado reactivo de fenol)
- Albúmina bovina
- NaCl
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
- Succinato
- KCl
- ADP
- ATP
- DNP (2,4-dinitrofenol)
- HCl
- NaOH
- Oligomicina
- TCA (ac. tricloroacético)
- $\text{H}_2\text{SO}_4$
- $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$  (molibdato de amonio)

- $\text{FeSO}_4$
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- $[\text{C}^{14}] \text{ADP}$ ,  $[\text{C}^{14}] \text{ATP}$
- ATR (atractilósido)
- Borato de K ( $\text{K}_3\text{BO}_3$ )
- Filtros millipore tipo HA de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.
- líquido de centelleo (tolueno + p - terfenilo).
- Fc (fluorescamina) (4-fenilspiro [furan - 2(3), 1' - ftlan[ - 3,3 - diona),  
esta sustancia reacciona con grupos amino primarios para formar complejos  
intensamente fluorescentes, proveyendo las bases para un método sensible y  
rápido (Fig. 19)
- Corazón de perro.

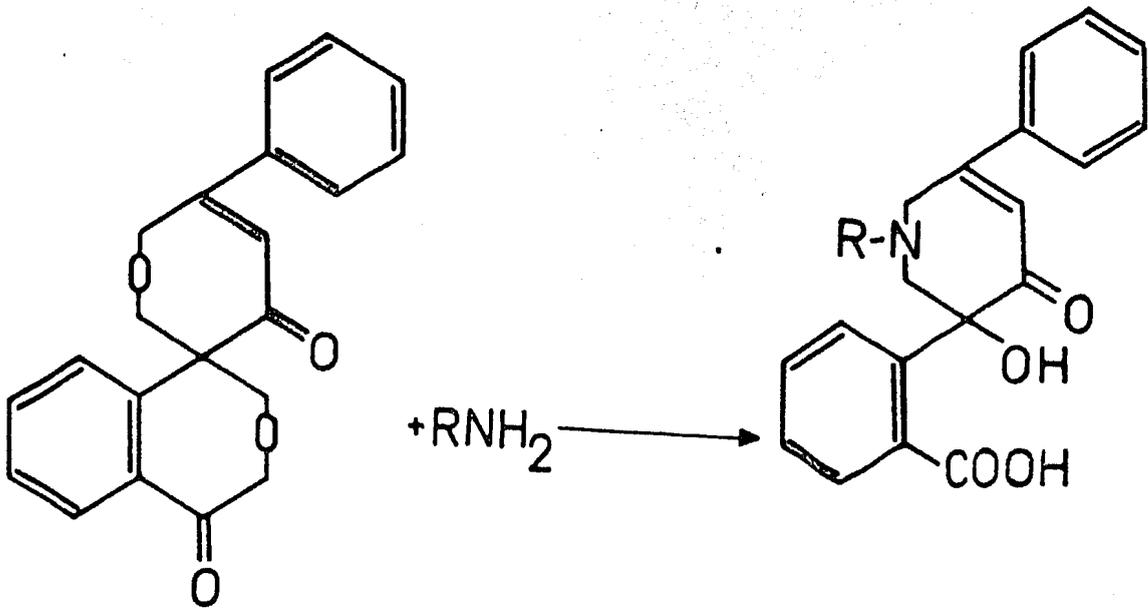


Fig. 19

REACCION DE LA FLUORESCAMINA CON  
GRUPOS AMINO PRIMARIOS

## METODOS

### - Obtención de mitocondrias:

Las mitocondrias de corazón de perro, fueron obtenidas usando un Politrón mezclador, de acuerdo al método de Brierley y Col. (67), en un medio que contenía sacarosa 0.25 molar, EDTA 1 mmolar y ajustado a pH 7.3 con Tris.

### - Determinación de proteína.

La proteína fue determinada por el método de Lowry y Col. (68) usando como estándar albumina bovina cristalizada.

### - Medición del control respiratorio de las mitocondrias.

La respiración mitocondrial fue medida polarográficamente usando un electrodo de oxígeno en un medio que contenía 10 mmolar Pi (fosfato), 10 mmolar succinato y 100 mmolar de KCl, la reacción se iniciaba añadiendo 20 ul de ADP de una solución de ADP de 20 mg/ml.

### - Determinación del transporte de [ $^{14}\text{C}$ ] y [ $^{14}\text{C}$ ] ATP

La velocidad de transporte fue medida siguiendo el recambio de [ $^{14}\text{C}$ ] ADP y [ $^{14}\text{C}$ ] ATP en mitocondrias a temperatura ambiente en un medio que contenía 0.2molar de sacarosa; sal reguladora de borato de potasio 0.01 molar, pH 8.3, 1 mg de proteína mitocondrial y 20 nmol/ml (20 umolar) de [ $^{14}\text{C}$ ] ADP ó [ $^{14}\text{C}$ ] ATP, cuya actividad específica fue de 776 cpm/nmol aproximadamente.

Se incubaba durante un minuto y entonces el transporte era detenido con 20umolar de atractilósido.

Una alícuota de mitocondrias era lavada con 5 ml de KCl 0.5 molar en un filtro millipore de 0.45 um de poro y luego el  $^{14}\text{C}$  se cuantifica en un contador de centelleo.

- Determinación del efecto de la fluorescamina.

La adición rápida y la agitación son esenciales para obtener resultados óptimos. La fluorescamina que no reacciona es hidrolizada en productos no fluorescentes en cuestión de milisegundos. Para ver el efecto de la fluorescamina sobre el transporte de ADP y ATP, se agrega ésta a diferentes concentraciones disuelta en acetona antes de agregar los nucleótidos al medio descrito anteriormente. Los fluoróforos resultantes son estables durante varias horas.

- Determinación de la actividad ATPásica.

La actividad ATPásica mitocondrial fue medida por la determinación de fosfato inorgánico formado a partir de ATP, el fosfato fue cuantificado por el método de Sumner (69).

- Preparación de mitoplastos.

Los mitoplastos fueron preparados usando el método de la digitonina reportado por Green Walt (70).

- La electroforesis de proteínas, fué realizada en geles de poliacrilamida al 7.5% y dodecilsulfato de sodio al 0.1% como lo describieron Weber y Osborn (71).

- Determinación de la fluorescencia en mitoplastos.

La proteína de mitoplastos (10 mg) fue añadida a un medio el cual contenía NaCl 120 nmolar, borato de potasio 2 mmolar, pH 8.3. La fluorescamina fue añadida entonces a este medio en una concentración 270 umolar.

Después de centrifugar se realizó la electroforesis con alícuotas que contenían 150 ug de proteína. De esta manera se obtuvo el patrón de fluorescencia.

En otros medios iguales al descrito arriba, se vió el efecto protector

contra la fluorescamina, que tienen los ligandos ADP y ATP, así como el inhibidor atractilósido añadidos previamente.

## RESULTADOS

- Efecto de la fluorescamina sobre el transporte de adenín nucleótidos.

a) la fig. 20 muestra que la fluorescamina inhibe el recambio de  $[C^{14}]ADP$ , llegando aproximadamente a 70% de inhibición a una concentración de 100 umolar.

En el recuadro, en la gráfica de dobles recíprocas se encuentra el valor de  $K_i$  (71 umolar).

b) Como se ve en la fig. 21 la fluorescamina también actúa como un inhibidor del recambio de  $[C^{14}]ATP$ .

En este caso a una concentración de 100 umolar se alcanza aproximadamente un 80% de inhibición. Y al graficar las dobles recíprocas se encuentra una  $K_i$  del mismo orden que la anterior teniendo un valor de 83 umolar.

c) En la fig. 22 muestra la determinación en forma conjunta de las constantes de inhibición del transporte de adenín nucleótidos, siendo ambas del mismo orden; 16 umolar para ADP y 31 umolar para ATP.

d) La gráfica de Leneweaver-Burk del efecto de la fluorescamina sobre el recambio de  $[C^{14}]ADP$ , nos muestra que la fluorescamina actúa como un inhibidor competitivo. En este experimento se añadió 24 umolar de fluorescamina como se indica en la Fig. 23.

- Comportamiento de la fluorescamina en presencia de atractilósido, un inhibidor específico del acarreador de adenín nucleótidos.

a) La fig. 24 muestra el efecto de la fluorescamina sobre el recambio de  $[C^{14}]ADP$  en presencia de atractilósido.

En este caso, primero se agrego atractilósido de una concentración que da aproximadamente el 50% de inhibición (5 umolar) y luego se puso la fluorescamina a diferentes concentraciones.

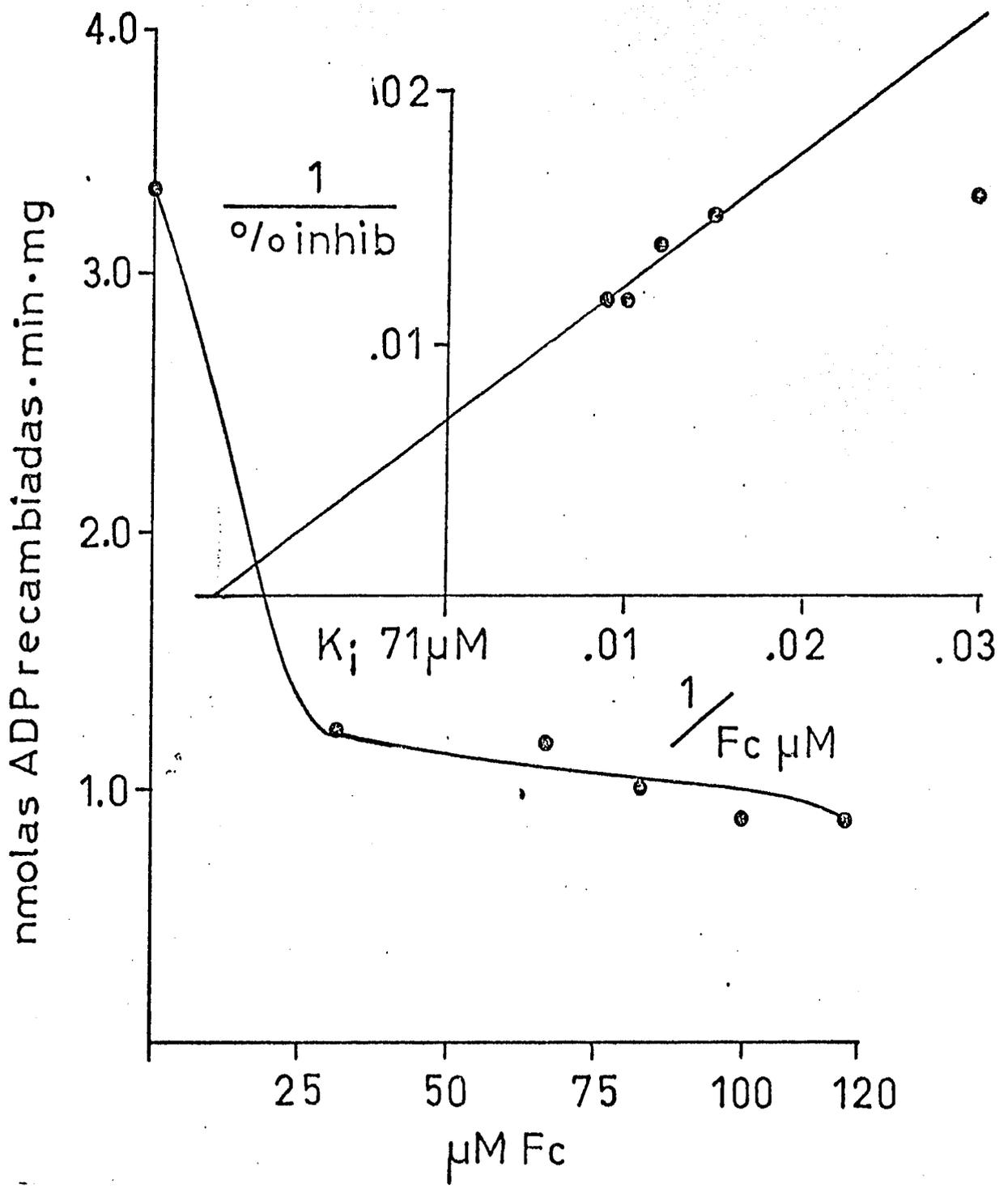


Fig. 20

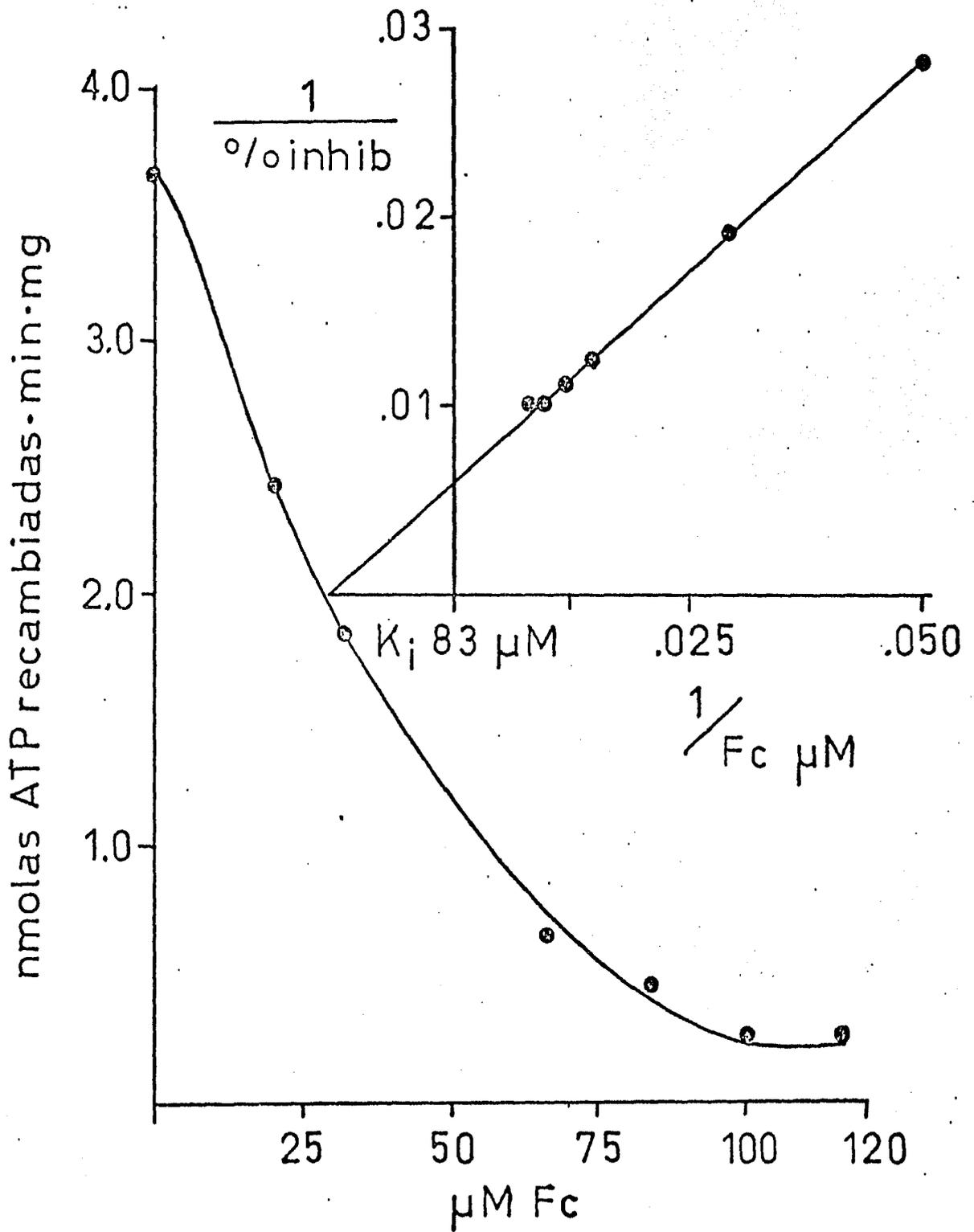


Fig. 21

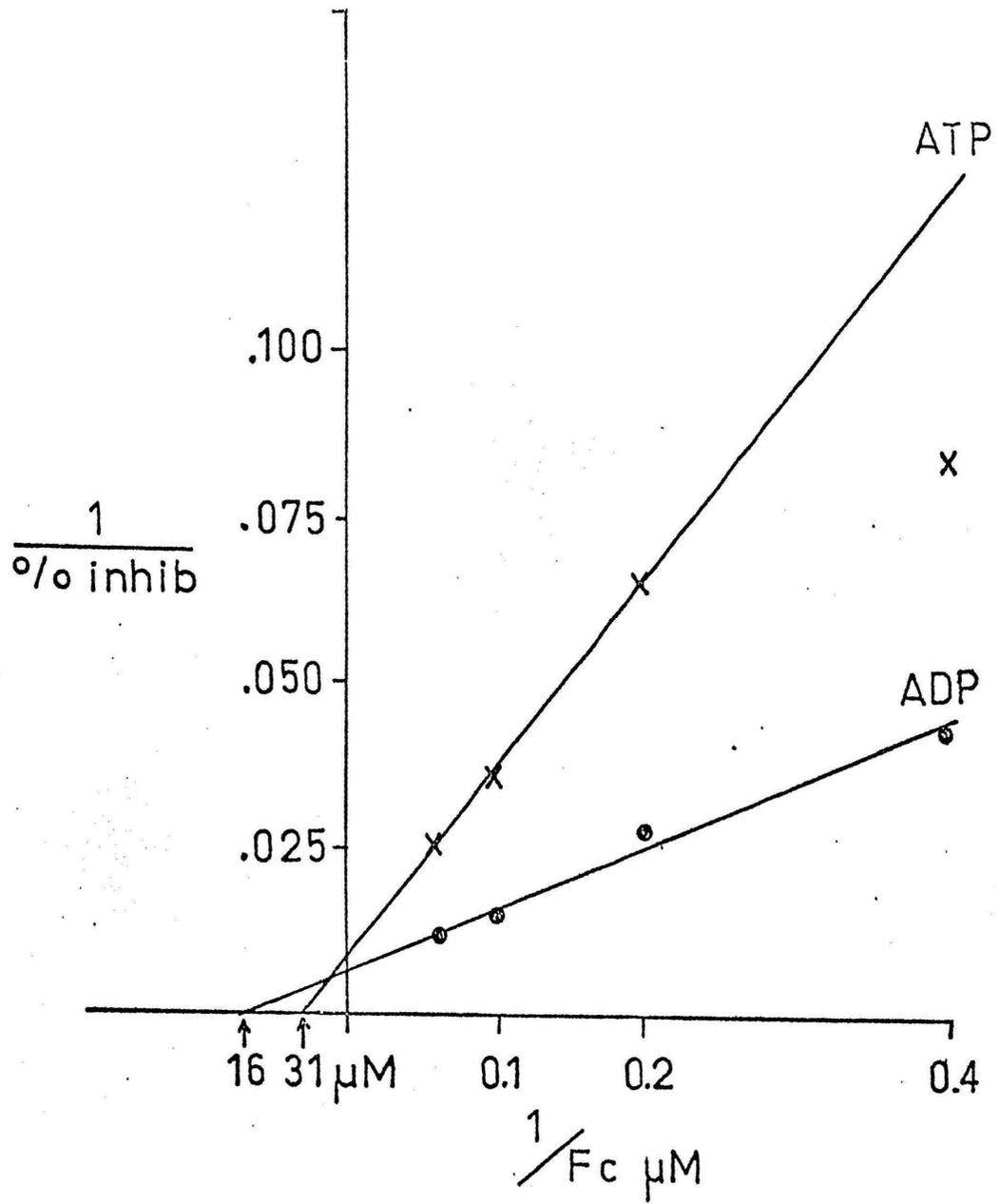


Fig. 22

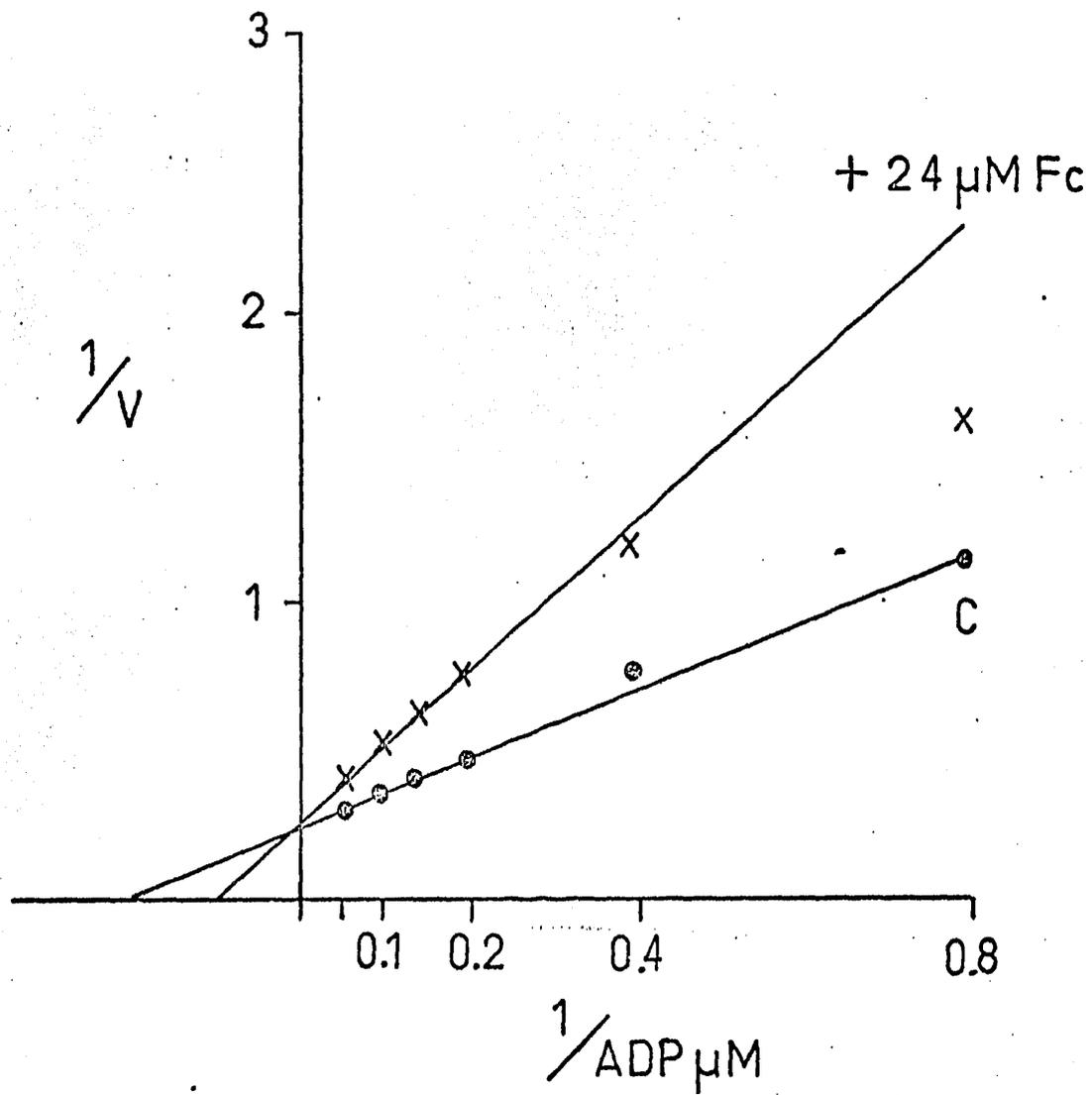


Fig. 23

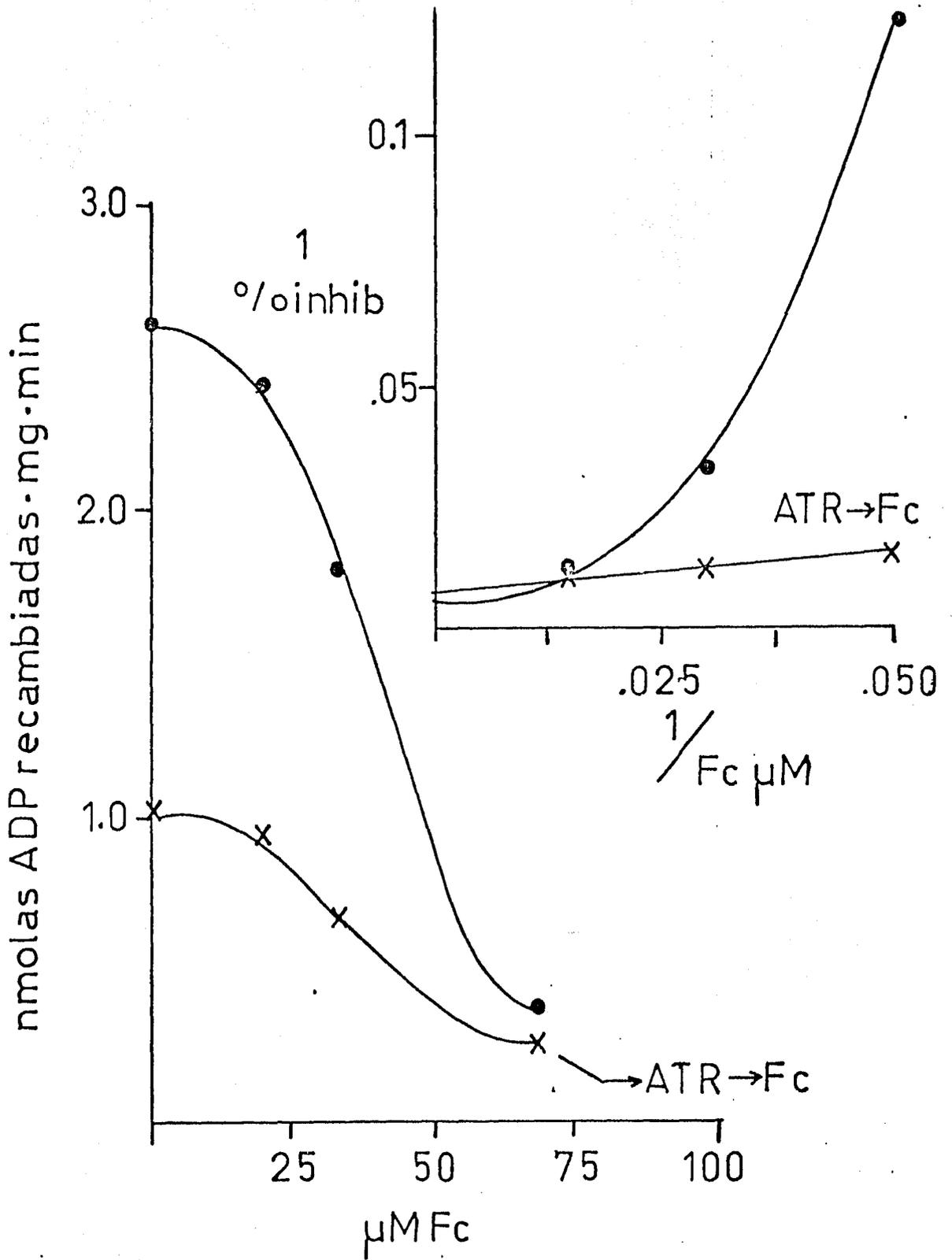


Fig 24

Como puede observarse el atractilósido tiene un efecto protector contra la unión de la fluorescamina. La gráfica de Lineweaver - Burk ( ver el recuadro) muestra que existe una modificación de la  $K_i$  de la fluorescamina.

b) Las condiciones del experimento, mostrado en la fig. 25 son iguales al anterior excepto que en este caso primero se añadió la fluorescamina a diferentes concentraciones y luego el atractilósido a la concentración que inhibe aproximadamente el 50% (5  $\mu$ molar). Aquí se puede observar que la fluorescamina tiene un efecto protector contra la unión del atractilósido, ya que los efectos inhibidores no se suman. En la gráfica de Lineweaver-Burk se puede ver que también existe una modificación de la  $K_i$  de la fluorescamina.

- Determinación del efecto protector contra la unión de la fluorescamina, de los ligandos ADP, ATP, así como del inhibidor Atractilósido, en mitoplastos. Se sabe que el acarreador de adenín nucleótidos tiene un peso molecular aproximado de 30,000, basándonos en ésto se observaron las variaciones que sufre esta banda en un perfil de fluorescencia de mitoplastos, en presencia de ADP, ATP, y ATR.

Como puede observarse en la fig. 26 primero se corrieron dos geles control, el primero es el perfil de proteínas de mitoplastos teñido con azul de Coomasie. En éste, está indicada la banda que corresponde a un peso molecular de 30,000.

A continuación se muestra el efecto que tiene el añadir los ligandos, previamente a la adición de fluorescamina.

La adición de ADP 200  $\mu$ molar (las condiciones experimentales son descritas en Material y Metodos) hace disminuir en una proporción considerable varias bandas de fluorescencia, incluyendo la correspondiente a 30 000.

Como puede verse (en la misma Fig. 26) el ATP a una concentración de 200 umolar tiene una unión más específica que el ADP pues disminuye la fluorescencia en la banda de PM 30 000, dejando fluorescentes a varias bandas en el extremo derecho del perfil.

Se sabe que el atractilósido se une con gran especificidad sobre el acarreador ADP/ATP, en concordancia con esto, se ve como solamente hace disminuir la fluorescencia en la banda de PM 30 000, dejando las demás con gran semejanza al control de fluorescencia.

Los resultados anteriores, parecen indicar que la fluorescamina se une a grupos amino del acarreador en el centro activo.

Otra manera de probar que el ATP protege al acarreador ADP/ATP contra la pegada de la fluorescamina se muestra en la tabla III. (Ver métodos). El ATP está a concentraciones saturantes en todos los casos, ya que la Km del acarreador para el ATP es de 100-150 umolar.

Es importante señalar, que se ha calculado que de la fluorescamina añadida sólo penetra el 2%, de aquí que no pueda afectar directamente la actividad de ATPasa.

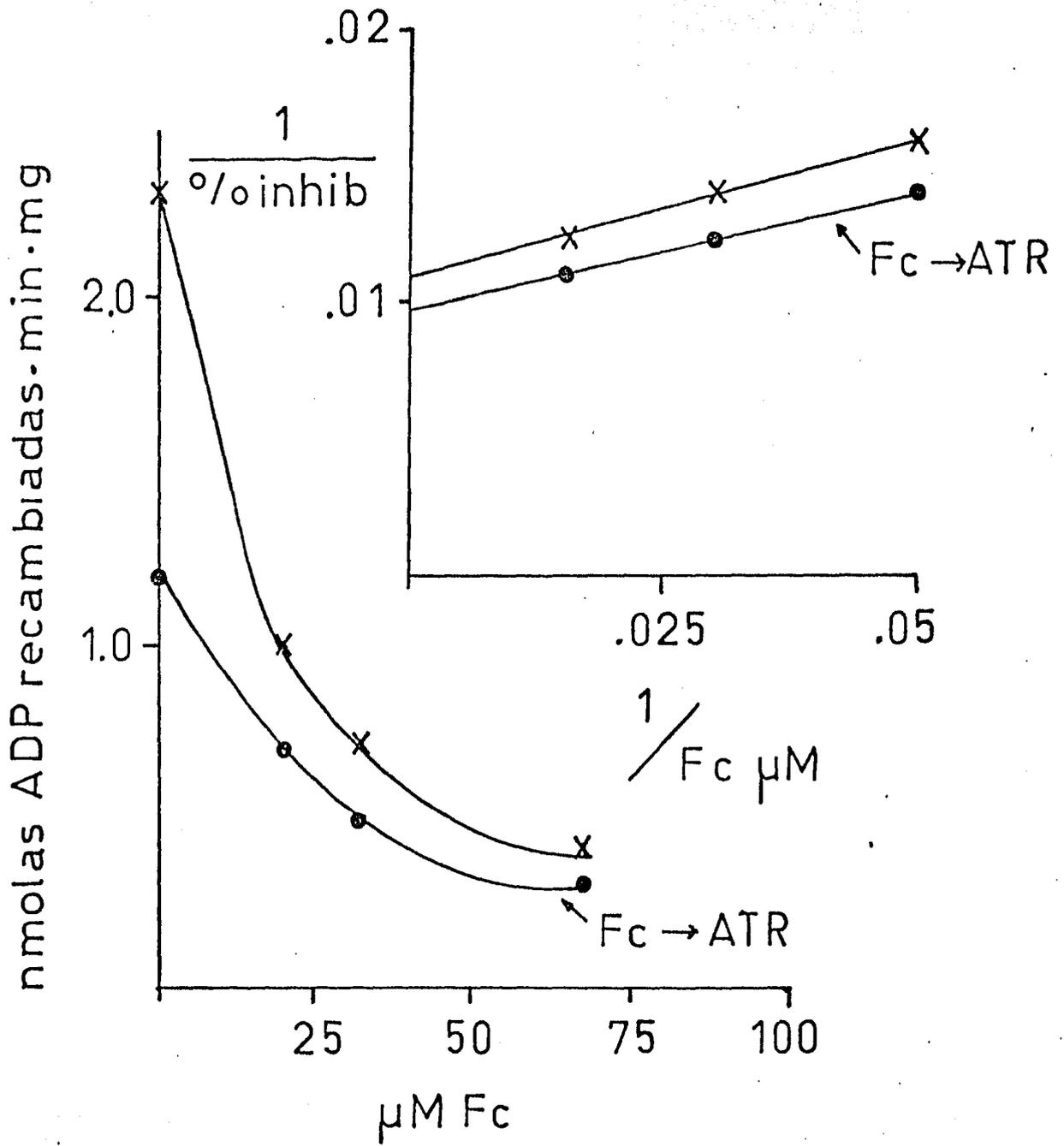


Fig. 25

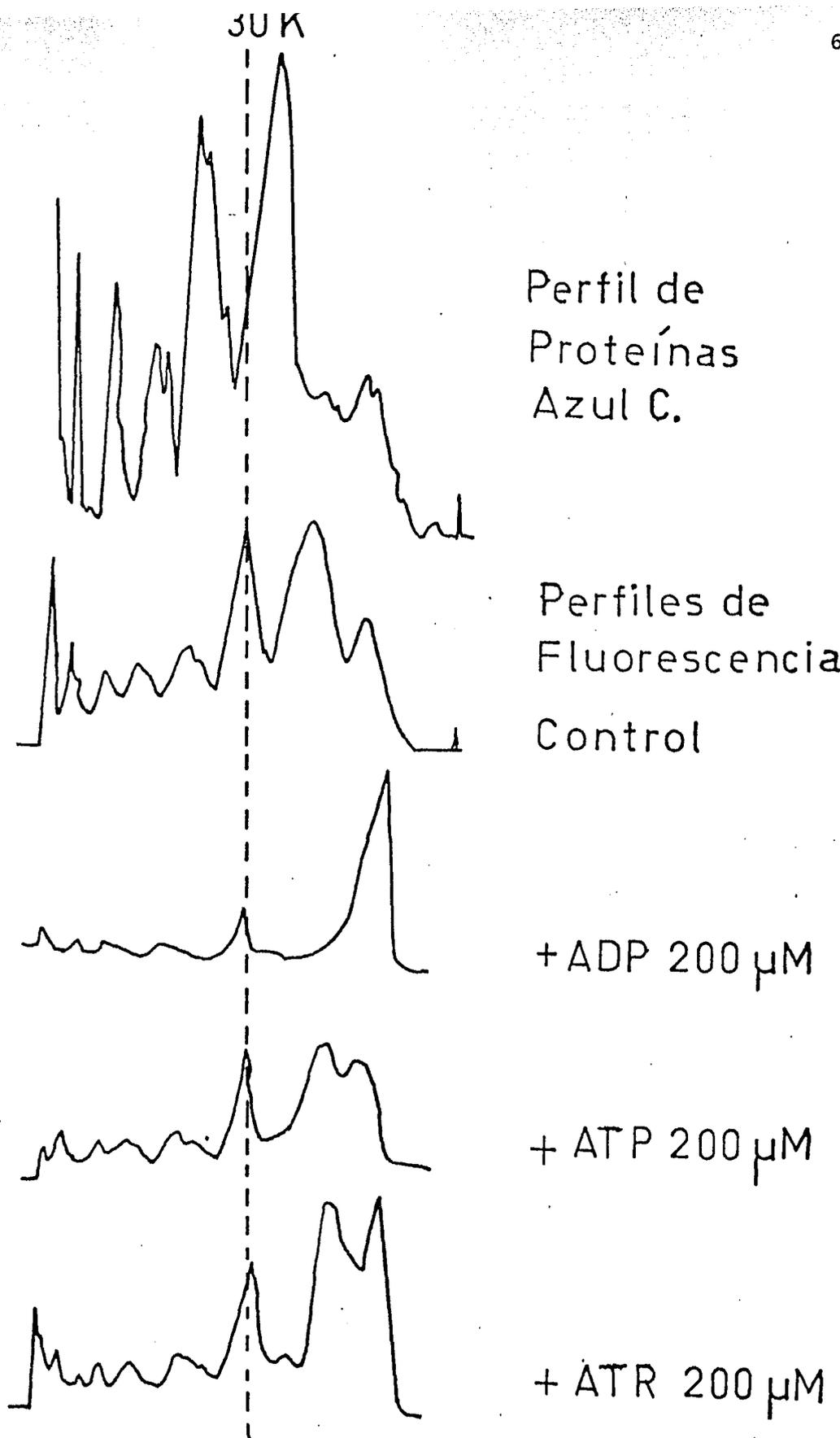


Fig. 26

El ATP (200 umolar) disminuye igualmente la intensidad de la fluorescencia en varias bandas, incluyendo la correspondiente a la banda de 30,000 aunque en menor proporción que el ADP.

El atractilósido (200 umolar), disminuye la fluorescencia en una forma más específica, es decir baja la fluorescencia en la banda de 30K, las demás bandas comparadas con el control de fluorescencia casi no disminuyen.

- Protección del ATP contra la inactivación de la actividad de ATPasa por la fluorescamina.

El acarreador ADP/ATP suministra el sustrato (ATP ó ADP) a la  $F_1 - F_0$  ATPasa para que ésta lleve a cabo su reacción de hidrólisis o de síntesis (ver introducción), de aquí que al verse inhibido el acarreador ADP/ATP, se verá también inhibida la actividad de ATPasa.

Basándonos en esto, se diseñó un experimento el cual se muestra en la tabla III. Se midió la actividad de ATPasa a diferentes concentraciones de ATP, obteniéndose un control, después se añadió en primer lugar fluorescamina 33 umolar y luego ATP a diferentes concentraciones, entonces se determinó la actividad de ATPasa, encontrándose una disminución de la misma.

Al agregar primero el ATP a concentraciones variadas y luego fluorescamina 33 umolar se puede observar que la disminución de la actividad de la ATPasa es menor con respecto al control, en comparación con el experimento anterior.

TABLA III

PROTECCION DEL ATP CONTRA LA INACTIVACION DE  
LA ACTIVIDAD DE ATPasa POR FLUORESCAMINA

<u>ATP mmolar</u>	<u>umolas de Pi Liberadas/mg</u>		
	<u>CONTROL</u>	<u>Fc*+ ATP</u>	<u>ATP + Fc*</u>
22	1.72	1.18	1.29
16	1.34	1.03	1.13
11	1.12	0.97	1.0
5.5	0.97	0.78	0.82
2.75	1.01	0.71	0.75

\*Fc, Fluorescamina 33 umolar

## DISCUSION

La interacción de modificadores químicos en residuos de aminoácidos de los sitios activos de las proteínas es algunas veces difícil de lograr. La pérdida de actividad catalítica, consecuente a la modificación de un residuo de aminoácido particular, generalmente indica la participación del residuo en un proceso catalítico, ya sea porque este residuo está involucrado en la actividad catalítica directamente o porque su alteración puede afectar indirectamente residuos esenciales para la actividad. Esta interpretación válida en principio, requiere de cuidadosas consideraciones en cada caso particular, ya que la modificación puede afectar el centro activo, incluyendo o no el sitio activo y/o los sitios efectores.

En el caso de que la modificación de un aminoácido sea a distancia del sitio activo no solo debe esperarse una alteración en la capacidad de unión sino también en su afinidad.

En el trabajo, sobre el mapeo del sitio activo de la translocasa, realizado por Block y col. (65) (ver introducción), el HNB, la 2,3-butanediona y el fenilgloxal fueron seleccionados sobre la base de que no alteran la  $K_d$  para el atractilósido o el ac. bongkrékico sobre mitocondrias inactivadas parcialmente. Este es un proceso típico de inactivación del "todo o nada", y es una prueba a favor de que la modificación ocurre en el sitio activo (sitio de fijación). Los resultados obtenidos por Block y col. establecen que los residuos de arginina tienen un papel importante en el centro activo del acarreador. Esto está en concordancia con reportes recientes que han identificado residuos de arginina en los sitios activos de varias enzimas que comparten la propiedad de enlazar nucleótidos en su sitio activo, estas son: la carbamoilfosfato sintetasa (70); la creatincinasa (71); las ATPasas de mitocondrias y cloroplastos (72, 73); la tres fosfogliceratocinasa (74); la hexocinasa (75); y la miosina (76).

Además la secuenciación de la translocasa ADP/ATP indica la existencia de 17 argininas.

Tres de ellas están incluidas en un solo triplete de cargas positivas en la posición 234-236, otra está incluida también en un triplete de cargas positivas junto con histidina y lisina en la posición 104-106. En cuanto a los dobletes de cargas positivas existentes, dos de ellos incluyen a la arginina. Es muy probable que algunos de estos residuos de arginina o lisina estén en el centro activo del acarreador ADP/ATP, tomando en cuenta los resultados obtenidos por Block y col. (65), junto con los obtenidos en este trabajo.

El término centro activo aplicado al acarreador ADP/ATP debe ser usado para designar no sólo el sitio de unión de ADP/ATP sino también aquellas regiones del acarreador las cuales controlan la catálisis del transporte, por ejemplo, los sitios de unión del atractilósido y ac. bongkrékico. Aunque hasta ahora no hay pruebas contundentes de que el sitio de unión para ADP, ATP, atractilósido y ac. bongkrékico sea el mismo tampoco hay pruebas de lo contrario.

Se ha propuesto que el acarreador ADP/ATP tiene un centro de fijación con carga positiva de 3 (59), estas cargas podrían pertenecer a grupos amino primarios de los residuos aminoácidos arginina o lisina que probablemente pudieran estar involucrados en el centro activo.

Una manera de averiguar ésto fue usar la fluorescamina que es un reactivo específico para grupos amino primarios. Su carácter hidrofóbico, le facilita la penetración a regiones no polares y de esta manera puede llegar a la proteína acarreadora embebida en la membrana mitocondrial interna.

Es cierto que al estar trabajando con mitocondrias completas, las fluorescamina no solo reaccionará con los grupos amino primarios de la translocasa ADP/ATP,

sino también con los de otras proteínas, pero debe tenerse en cuenta que el porcentaje de proteína acarreadora de adenín nucleótidos en mitocondria de corazón es del 9% de la proteína mitocondrial total, lo cual nos asegura que una buena proporción de la fluorescamina añadida reacciona con los grupos amino primarios del acarreador. Quizá la única objeción que podría tenerse con respecto a la reactividad de la fluorescamina es que es una molécula demasiado grande y podría tener impedimento estérico. Sin embargo los datos experimentales muestran que sí inhibe el transporte de adenín nucleótidos (Figs. 20 y 21)

En cuanto a la inhibición del transporte de ADP/ATP es importante observar que el transporte de ATP es inhibido en un porcentaje mayor en comparación al del ADP. Esto podría explicarse, si en lugar de tener un sitio de fijación de 3+, se tuviera uno de 4+ involucrando quizá 4 grupos amino primarios, que como se sabe a pH fisiológico se encuentran cargados positivamente. El modificar una carga del sitio de fijación permitiría seguir transportando ADP, que es un anión con tres cargas negativas, pero como el ATP es un anión con cuatro cargas negativas ya no podría ser transportado, con lo cual a una misma concentración de fluorescamina su transporte se encuentra más disminuido.

Sin embargo en contra de esta proposición las  $K_i$  para el transporte de ambos nucleótidos son del mismo orden (Fig. 22) lo cual indica que ambos transportes se inhiben en igual grado.

Los resultados experimentales también indican que la fluorescamina es un inhibidor de tipo competitivo. (Fig. 23). Aquí es importante señalar lo siguiente, como la fluorescamina es un inhibidor que se une covalentemente, si se enlazara al sitio activo, debería mantener constante la  $K_m$  y disminuir la  $V_{max}$  del recambio de ADP (es decir comportándose como un inhibidor no competitivo), sin embargo se comporta como un inhibidor de tipo competitivo al incrementar la  $K_m$

aparente de la enzima, y provocando que se precisen concentraciones de sustrato superiores para que se alcance la Vmax. Esto podría explicarse si se propone que la fluorescamina no se une en el sitio de fijación del ADP sino en un lugar muy cercano a él (Fig. 27) dentro del centro activo.

Como el fluoróforo queda con una carga negativa (Fig. 19) dada por el grupo carboxilo, se vería posiblemente atraído por las cargas positivas del sitio de fijación actuando como un inhibidor competitivo contra el ADP debido a un impedimento estérico (Fig. 28).

Por otra parte una prueba en favor de que la fluorescamina se está uniendo en el sitio de unión de nucleótidos de la translocasa, fue ver su comportamiento frente al inhibidor específico atractilósido, durante la inhibición del recambio de ADP. Se ha propuesto que el sitio de unión del atractilósido está en el centro activo del acarreador, el hecho de que el atractilósido proteja contra la unión de la fluorescamina (Fig. 24) y, a la vez que la fluorescamina proteja contra la unión del atractilósido (Fig. 25) se puede tomar como una prueba de que se están uniendo en el mismo sitio o, en sitios muy cercanos. Esto queda muy claro al observar que si a una concentración del 50% de inhibición del atractilósido se le agrega una concentración del 50% de inhibición del fluorescamina, no se obtiene un 100% de inhibición.

Por otro lado las variaciones de la banda en el perfil de fluorescencia debido a la protección por ligandos de la translocasa también proporciona información sobre el sitio de unión de la fluorescamina (Fig. 26).

La razón por la que el ADP hace disminuir varias bandas de fluorescencia en el perfil electroforético de mitoplastos es porque su unión en la membrana mitocondrial interna es muy inespecífica a una concentración de 200 umolar, Pero aquí lo importante es que es muy notable la disminución de la fluorescencia en la banda de PM 30,000.

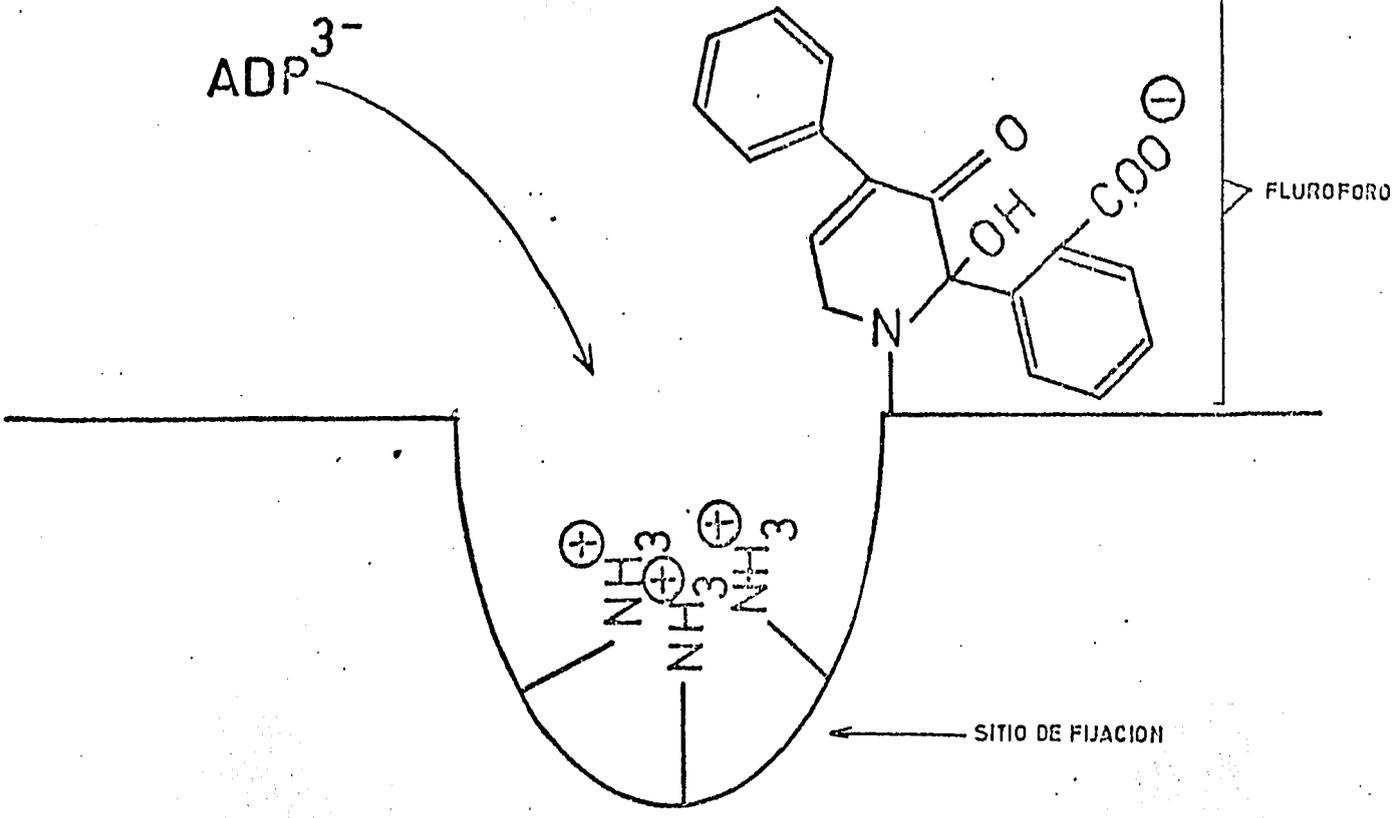


Fig. 27

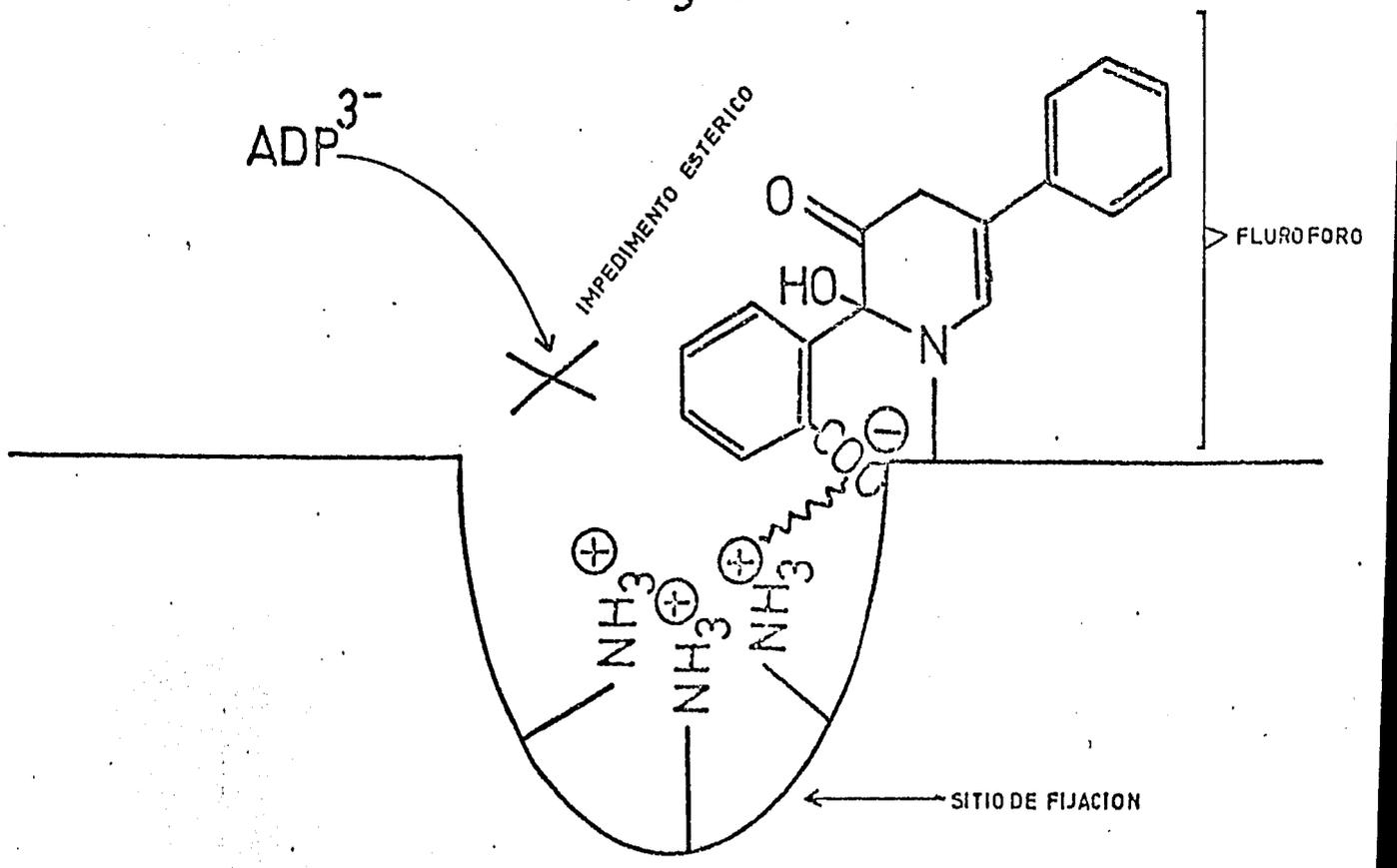


Fig. 28

### CONCLUSION

La conclusión que surge del análisis de este trabajo es que los grupos amino primarios del acarreador de adenín nucleótidos juegan un papel importante en el transporte de ADP/ATP en la mitocondria.

Aunque los resultados presentados no son prueba definitiva de que la modificación causada por la fluoescamina ocurre en el sitio activo (sitio de fijación), si son prueba en favor de esta alternativa. Los grupos amino primarios pudieran ser de los residuos aminoácidos arginina o lisina, o de ambos, estando localizados en el centro activo del acarreador, ya sea en el sitio activo (sitio de fijación) o en un lugar muy cercano a él, pero dentro del mismo centro activo. Además estos grupos amino también juegan un papel importante en la fijación del atractilósido, lo cual coincide con la observación de Block y col. (66) quienes plantean que el ADP,ATP y el atractilósido comparten el mismo centro activo.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Lehninger, A.L. "Selecciones del Scientific American". Ed. Blume la. Ed. 1969 pags. 137 - 150.
- 2.- Hogeboom, G.H., Schneider, W.C. and G.E. Pallade, "Isolation of Intact Mitochondria from Rat liver; some Biochemical Properties of Mitochondria and Submicroscopic Particulate Material", J.Biol. Chem., 172:619-626 (1948)
- 3.- Kennedy, E.P. and A.L. Lehninger, "Oxidation of fatty acids and tricarboxylic acid cycle intermediates by isolated rat liver mitochondria", J. Biol. Chem. 957 - 960 (1949)
- 4.- White, A., Handler, P., Smith L.E.C., Hill Ph.D.R. and Lehman, Ph.D.R. "Principios de Bioquímica", Ed. Mac. Graw Hill 2a. Ed. 1983.
- 5.- Ernster L. and Schatz G., "Mitochondria: A Historical Review the Journal of Cell Biology. Volume 91 No. 3 ptz December 1978 . 227-255.
- 6.- Vander Kooij, G. Biochim. Biophys Acta, 344:307-45 (1974).
- 7.- Andersen. H. C. Ann Rev. Biochem. 47:359-83 (1978)
- 8.- Law J.H., Snyder W.R. In "Membrane Molecular Biology 1972 Ed. C. Fred Fox and A.D. Keith pp3-26  
Sinaver Associates I.N.C. Publishers Stanfor conn.
- 9.- Singer S.L. "The molecular Organization of Membranes". Ann. Rev. Biochem. 43:805-826 (1974)
- 10.- Singer S.J., and Nicolson, G.L. "the fluid mosaic model of the structure of cell membranes". Science 175:720-731 (1972)
- 11.- De Pierre W.J. and Ernster L. "Enzyme Topology of Intracellular Membranes. Ann. Rev. Biochem. 46:201-262 (1977)
- 12.- Lenard, J., Singer, S.J. Proc. Nat. Acad sci USA 56:1828-35 (1966)
- 13.- Michell P. "Vectorial Chemistry and the Molecular Mechanics of Chemiosmotic Coupling: Power Transmission by proticity". Biochem. Soc. Trans. 4:399-430 (1976)

- 14.- Pedersen L.P. "Bioenergetic for graduate students". (lecture outline)  
Johns Hopkins School of Medicine.
- 15.- Hinkle P.C. and Mac Carty R.E. ¿Cómo fabrican ATP las células? . Scientific American (Ed. en español) Mayo pags. 58-75 (1978)
- 16.- Lanove, K.F. and Schoolwerth.: Metabolite transport in mitochondria. Ann. Rev. Biochem. 48:871 (1979).
- 17.- Ptatt, E., Klingenberg, M., Held, H.W. Biochim. Biophys Acta 104:314-15 (1965)
- 18.- Vignais, P.V., Vignais P.M., and Defaye, G. Biochemistry 12:1508-1519 (1973)
- 19.- Chávez, E. and Klapp, M. Biochem. Biophys. Res Commun 67:272-278 (1975)
- 20.- Devaux, P.F., Bienvenue, A., Lauquin, G., Brisson, A. D., Vignais, P.M. and Vignais, P.V. Biochemistry 14: 1272 - 1280 (1975)
- 21.- Meisner, H. Biochemistry, 10:3485-3491 (1971)
- 22.- Lauquin, G.J.M. and Vignais, P.V. Biochemistry (1976)
- 23.- Carafoli, E., Rossi, C.S, and Lehninger, A.L.J. Biol. Chem. 240:2254-2216 (1965)
- 24.- Jung, D.W. and Hanson, J.B. Arch. Biochem. Biophys. 168: 358 - 368 (1975).
- 25.- Vignais P.V. Biochim. Biophys Acta 456: 1-38 (1976)
- 26.- Duszynki, J. and Wojtezak, L. FEBS lett 50:74-78 (1975)
- 27.- Duée, E.D. and Vignais, P.V. J. Biol Chem. 244:3920 -3931 (1969).
- 28.- Schlimme, E., Lamprecht, W., Eckstein, F, Goody, R.S. Eur. J. Biochem 40:485-91 (1973)
- 29.- Barbour, R.L. and Chan, S.H, J. Biol, Chem. 256:1940-45 (1981)
- 30.- Heldt, H.W. Klingenberg, M., Milovanceu, M, Eur. J. Biochem. 30:434-40 (1972)
- 31.- Slater, E.C. Rosing, J, Mol, A. Biochim, Biophys, Acta 292: 534-53 (1973)
- 32.- Laris, P.C, Biochim Biophys Acta 459: 110-18 (1977)
- 33.- La Nove, K., Mizani, S.M., Klingenberg, M,J, Biol, Chem, 253 191-98 (1978)
- 34.- Nicholls, D.G. Eur. J. Biochem. 50: 305-15 (1974)
- 35.- Lehninger, A.L., Reynafarje, B. Proc. Natl. AcadSci. USA 75: 4788-92 (1978)

- 36.- Reynafarje, B. Brand, M.D., Lehninger, A.L. J. Biol Chem 251: 7442-51 (1976)
- 37.- Brandolin, G. Meyer, C., DeFaye G., Vignais, P.M Vignais P.V. FEBS lett.  
46: 149-53 (1974)
- 38.- Riccio, P., Aguila, H., Klingenberg, M. FEBS Lett 56: 129-32 (1975)
- 39.- Bojanovski, D Schlimne, E. Wang, C.S., Alaupovic, P. Eur. J. Biochem  
71: 5349 - 48 (1976)
- 40.- Racker, F. and Hinkle, P.C. J. Membrane Biol. 17: 181 (1974)
- 41.- Krasne, S., Eisenman, G. and Szabo, G. Science 174 :412 (1971)
- 42.- Klingenberg, M., Riccio, P., Aguila, H. Biochim Biophys Acta 503: 193-210  
(1978)
- 43.- Kramer, R., Aquila, H., Klingenberg, M. Biochemistry 16: 4949-53
- 44.- Kramer, R., Klingenberg, M, FEBS Lett. 82: 363-67 (1977)
- 45.- Klaus Beycr and Martin Klingenberg Biochemistry 22: 639-45 (1983)
- 46.- Kramer, R., and Klingenberg, M. FEBS Lett. 119: 257-60 (1980)
- 47.- Kramer, R., Klingenberg, M. Am Chem, Soc, 18: 4209-15 (1979)
- 48.- Aquila, H., Eserman, W. Babel, W. Klingenberg, M, Eur, J, Biochem, 85:549-60  
(1978)
- 49.- Aquila, H., Eserman W. Klingenberg, M, Eur, J, Biochem 122: 133-39 (1982)
- 50.- Aquila, H., Klingenberg, M. Eur. J, Biochem, 122: 141-45 (1982)
- 51.- Lemasters, J.J, y Sowers AE, J. Biol Chem 254: 1248-51(1979)
- 52.- Moreno-Sánchez, R. Biochim, Biophys, Acta 724: 278-85 (1983)
- 53.- Forman NG and Wilson D.F. J. Biol Chem 258-6849-55 (1983)
- 54.- Boulay, F., G.J.M., Lauquin, A, Tsugita, and P.V. Vignais Biochemistry  
22: 477-84 (1983)
- 55.- Lauquin, G.J.M. Villiers, C., Michejda, J.W., Hryniewiecka, L.V. and  
Vignais, P.V. Biochim Biophys Acta 460: 331-345 (1977)

- 56.- Block, M.R., Lauquin G.J.M., and Vignais, P.V. BEBS Lett 104: 425-430  
(1979)
- 57.- Klingenberg M. Enzymes Biol Membr #: 383-438 (1976)
- 58.- Buchanan, B.B., Eiermann, W. Riccio, P., Aquila, H., Klingenberg M. Proc.  
Natl. Acad. Sci. USA 73: 2280-84 (1976)
- 59.- Klingenberg, M.J. Memb. Biol. 56: 97-105 (1980)
- 60.- Brandolin, G., Dupont, Y. and Vignais, P.V. Biochem 21: 6348-53 (1982)
- 61.- Barbour, R.L. and Chan, S.H, J. Boil. Chem 254; 1248-51 (1981)
- 62.- Aquila, H. Misra, D., Eulitz, M. and Klingenberg, M.  
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363: 345-349 (1982)
- 63.- Saraste, M. and Walker, J.E. FEBS Lett 144: 250-54 (1982)
- 64.- Cohen L.A. Ann Rev. Biochem 37: 695-726 (1968)
- 65.- Valee, B.L. and Riordan, J.F. Ann Rev. Biochem 38: 733-794 (1969)
- 66.- Block, M.R., Lauquin G.J.M., and Vignais, P.V.. Biochemistry, 20: 2692-  
2699. (1981)
- 67.- J.M. Scott, K.M. Altschuld, R. Merola, A.J., and Brierley, G.P. Arch.  
Biochem Biophys. 165: 98-113 (1974)
- 68.- Lowry, O.H. Rosebrough, N.J. Farr, A.L., and Randall, R.J. J. Biol. Chem.  
239: 18-30 (1951)
- 69.- Sumner J.B. Science 100: 413 (1944)
- 70.- Powers, S.G. and Riordan, J.F. Proc., Natl. Acad. Sci. U.S.A, 72: 2616-  
2620.
- 71.- Weber, K., and Osborn, M. J. Biol. Chem. 244:4406-4412 (1969)
- 72.- Borders, C.L., and Riordan, J.F. Biochemistry 14: 4699-4704 (1975)
- 73.- Marcus, F., Schuster, S.M and Lardy, H.A. J. Biol. Chem 251:1775-1778  
(1976)

- 74.- Vallecjos, R.H., Viale, A. and Andreo, C.S. FEBS Lett. 84:304-308 (1977)
- 75.- Philips, M., Roustan, C., Fattoum, A., and Pradel, L.A. Biochim Biophys. Acta. 523: 368-376 (1978)
- 76.- Philips, M., Pho, D.B., and Pradel, L.A. Biochim. Biophys. Acta 566: 296-304 (1979).