

11281  
2ej  
②  
①

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

TRANSFORMACION DE NUCLEOTIDOS DE ADENINA EN MITOCONDRIAS  
Y PARTICULAS SUBMITOCONDRIALES DE PLACENTA HUMANA

POR

FEDERICO MARTINEZ MONTES

TESIS

ELABORADA PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS (BIOLOGIA MOLECULAR)

MEXICO, D.F.

AGOSTO 1987.

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## INTRODUCCION

La placenta humana es un tejido que se forma durante el embarazo y su función es mantener la relación materno-fetal (1). Realiza varias funciones, entre las cuales podemos señalar: transporte activo de nutrientes, depuración de sustancias tóxicas y la síntesis de hormonas proteicas y esteroidales (2).

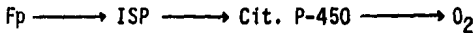
De las hormonas esteroidales, la progesterona es vital para el feto, ya que la falta de su síntesis produce aborto. Por otro lado, la progesterona alcanza valores séricos de alrededor de 600  $\mu\text{g}$  diarios en el último trimestre de la gestación (2).

Es conocido que los tejidos esteroidogénicos, como las glándulas suprarrenales, los ovarios, y los testículos, utilizan a la mitocondria para sintetizar pregnenolona a partir de colesterol (3-7). La pregnenolona así obtenida sufre sus últimas transformaciones en el citoplasma celular hasta obtener la hormona deseada (por ejemplo: cortisona, testosterona, etc).

Es importante señalar que la transformación de colesterol en pregnenolona se realiza en la membrana interna mitocondrial. En el caso de la placenta humana, la mitocondria es capaz de sintetizar progesterona sin la necesidad de usar el citosol (8-12).

La síntesis de progesterona en la placenta humana requiere de equivalentes reducidos del tipo del NADP que se generan dentro de la mitocondria por varias vías, siendo la más importante aquella en donde participa la enzima málica (13). El NADP reducido es el sustrato para la cadena de transporte de electrones acoplada al citocromo P-450, que se encarga de hidroxilar al colesterol en su primera etapa de transformación a pregnenolona. Esta cadena de transporte de electrones

se localiza en la membrana interna, no genera potencial y está constituida de la siguiente manera (3,14-17):



en donde Fp indica una flavoproteína; ISP es una ferrosulfoproteína; Cit. P-450 es el citocromo que rompe la cadena lateral del colesterol; y O<sub>2</sub> indica al oxígeno que es el aceptor final y que produce agua.

Por otro lado, la síntesis de ATP es importante, ya que como se mencionó antes, la placenta realiza funciones de transporte activo de nutrientes de la madre al feto, como por ejemplo de aminoácidos (18). Es importante señalar que la placenta sintetiza varias hormonas proteicas (por ejemplo: gonadotropina coriónica, lactógeno placentario y tirotrópina coriónica), así como otros péptidos de los cuales no se conoce su función, como el péptido PP<sub>5</sub>.

Las mitocondrias de placenta humana han sido estudiadas dando mayor orientación a los aspectos hormonales y poco se ha intentado sobre aspectos bioenergéticos. Por otro lado es interesante estudiar a la placenta humana ya que no se ha investigado en tejidos humanos los aspectos de biosíntesis y degradación de ATP, siendo este tipo de trabajos los que pueden permitir abrir la puerta al estudio de la bioenergética en tejidos humanos.

El presente trabajo tiene como objetivo estudiar las vías de transformación de nucleótidos de adenina en mitocondrias y partículas submitocondriales de placenta humana.

## MATERIAL Y METODOS

Las placentas fueron obtenidas del Hospital "Gea González" y se transportaron al laboratorio en un lapso no mayor de 45 min. El tejido se lavó con una solución fría de 0.25 M sacarosa; 1 mM EDTA, pH 7.3. Los cotiledones fueron disecados y lavados con la misma solución para eliminar la mayor cantidad de sangre. El tejido fue cortado en pequeños fragmentos y homogeneizado en un aparato Polytron. El homogenado se centrifugó a 3,000 g por 10 min y el sobrenadante se centrifugó de nuevo a 7,000 g por 10 min. El paquete así obtenido se resuspendió en la misma solución y se centrifugó a 12,000 g por 10 min obteniendo así las mitocondrias. Las mitocondrias se fijaron en glutaraldehído al 3% y se procesaron para su observación al microscopio electrónico. La observación de estas preparaciones muestra una pureza del 80 al 85%, con mitocondrias que presentan vacuolas. La concentración de proteína se determinó usando el método descrito por Lowry et al. (19).

El recambio de ADP y ATP se realizó utilizando 1 mg de proteína mitocondrial en un medio que contenía: 10 mM Tris-HCl, pH 7.3; 100 mM KCl; 10 µg de oligomicina y las concentraciones de ADP o ATP radiactivo que se indica en cada figura. Después de 1 min de incubación, 40 µl de atractilósido (ATR) se adicionó para detener la reacción y una alícuota de 0.1 ml se filtró a través de una membrana Millipore. El volumen final fue de 1 ml a una temperatura de 25 C.

Las actividades de ATPasa y ADPasa se determinaron en las condiciones indicadas usando una cantidad de proteína conocida en el medio descrito en cada figura. Después de incubar en presencia de ATP o ADP, la reacción se detuvo con la adición de ácido tricloroacético (TCA) al 6% concentración final. Después de centrifugar, una alícuota del sobrenadante se utilizó para determinar la canti-

dad de fosfato liberado usando el método colorimétrico de Sumner (20).

La determinación de nucleótidos de adenina (AdN) se hizo usando el método enzimático descrito por Jawore et al. (21).

## RESULTADOS

El consumo de oxígeno en mitocondrias de placenta humana se muestra en la Fig 1. Se puede observar la capacidad fosforilante de estas mitocondrias; sin embargo, la respuesta a la adición de ADP no es evidente al inicio del trazo (108 a 132  $\text{natO}_2$ ), mejorando la respuesta al ADP y el control respiratorio en las subsecuentes adiciones del nucleótido (control respiratorio de 4.5 a 11). Este resultado se puede explicar suponiendo un comportamiento diferente a los reportados para el transporte de los adenín nucleótidos (AdN), o bien, en la síntesis de ATP.

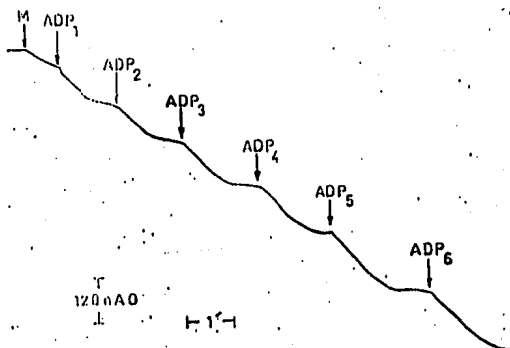


Figura 1. Consumo de Oxígeno en Mitocondrias de Placenta Humana. Las mitocondrias fueron incubadas en un medio que contenía: 100 mM KCl; 10 mM fosfato-Tris, pH 7.3; 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0.1% albúmina sérica de bovino; 10 mM malato y 10 mM glutamato ajustados a pH 7.3 con Tris-base. En donde se indica, 800 nmolas de ADP fueron adicionados. Los números indican las adiciones sucesivas del nucleótido. Volumen final 3 ml. Temperatura 25°C.

El aporte de nucleótidos se realiza por medio de la traslocasa (22-24), cuya función es transportar ADP del citosol hacia el interior de la mitocondria a la vez que transporta ATP del interior de la mitocondria hacia el citosol. Ha

sido reportado (25-28) que la máxima actividad de la ATPasa mitocondrial se obtiene cuando el transporte de nucleótidos se invierte, lo cual se logra en condiciones de desacoplamiento. Bajo esta evidencia experimental se decidió determinar la posible participación del traslocador en los resultados observados.

La actividad de la ATPasa en mitocondrias de placenta humana se muestra en la Fig 2. Es evidente que esta actividad es pobre ( $1.4 \mu\text{mol}$  de  $\text{P}_i \text{mg}^{-1} 10 \text{ min}^{-1}$ ) cuando se compara con la actividad mostrada en mitocondrias de hígado de rata ( $3.8 \mu\text{mol}$  de  $\text{P}_i \text{mg}^{-1} 10 \text{ min}^{-1}$ ). Este resultado sugiere que el transporte de ATP al interior de la mitocondria es deficiente, lo que probablemente indica que el traslocador de AdN es responsable de los resultados obtenidos.

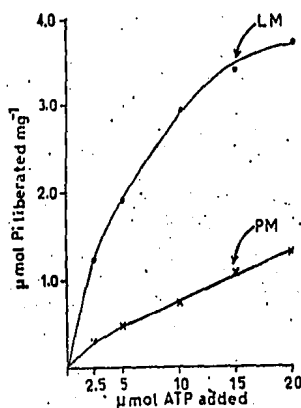


Figura 2. Comparación de la Actividad de la ATPasa en Mitocondrias de Hígado de rata (LM) y Placenta Humana (PH). Las mitocondrias (2 mg de proteína) se incubaron en un medio que contenía: 75 mM KCl; 7.5 mM Tris-HCl, pH 7.3; 1 mM PEP; 5  $\mu\text{g}$  PK; 75  $\mu\text{M}$  DNP y las concentraciones indicadas de ATP. Temperatura 30°C. Volumen final 2 ml.

Para apoyar o descartar esta idea, la misma actividad enzimática se ensayó usando partículas submitocondriales (PSM) conociendo que estas estructuras carecen de la barrera membranal que impide el acceso de ATP a la  $F_1$ -ATPasa.



Los resultados muestran que las PSM de placenta humana tienen una capacidad hidrolítica de ATP similar (6.2 y 7.2  $\mu\text{mol}$  de  $\text{P}_i$   $\text{mg}^{-1}$   $10 \text{ min}^{-1}$ ) a la que presentan las PSM de hígado de rata (Fig 3). Estos resultados apoyan la suposición de que el traslocador proporciona ATP de manera deficiente al interior mitocondrial.

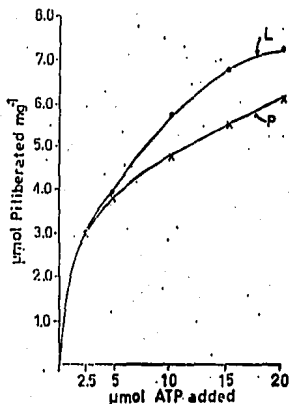


Figura 3. Actividad de la ATPasa de PSM en Hígado de Rata Comparada a la ATPasa de PSM de Placenta Humana. Las PSM fueron incubadas en el siguiente medio de reacción: 75 mM KCl; 7.5 mM Tris-HCl, pH 7.3; 1 mM PEP; 5  $\mu\text{g}$  PK y 10 mM  $\text{MgCl}_2$ . Se adicionó 1 mg de proteína de las PSM en un volumen final de 2 ml. Temperatura 30°C.

Con base en los resultados obtenidos se decidió determinar las características del traslocador de AdN. La Fig 4 muestra el transporte de ADP radiactivo en las mitocondrias de placenta. Se observa una curva bifásica, de 6.25 a 50 y de 100 a 500 nmoles de ATP, que sugiere 2 sitios de unión, o bien, 2 proteínas fijadoras del nucleótido, mientras que el transporte de ATP no presenta esta característica (Fig 5).

La presencia de una curva bifásica para el transporte de ADP sugirió la posibilidad de que estructuralmente el traslocador sea diferente a los reportados.

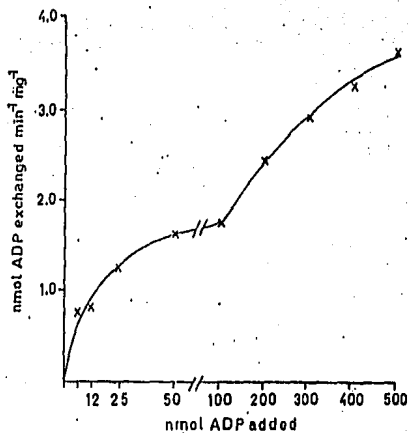


Figura 4. Cinética de Recambio de ADP en Mitocondrias de Placenta Humana. El recambio de nucleótidos se ensayó usando 1 mg de proteína mitocondrial incubada en un medio que contenía: 10 mM Tris-HCl, pH 7.3; [adenosina-8-<sup>14</sup>C]-difosfato con una actividad específica de 1,000 cpm/mol. Atractilósido (40  $\mu$ M) se adicionó después de 1 min de incubación y una alícuota de 0.1 ml se filtró a través de una membrana de Millipore. Temperatura 25°C. Volumen final 1 ml.

Datos de la literatura (22,29-30) demuestran que el ATR es un inhibidor que se une en forma específica al traslocador de AdN. El efecto del ATR sobre el transporte de AdN ha sido estudiado en mitocondrias de diferentes sistemas biológicos, y los resultados muestran un comportamiento de unión similar entre el inhibidor y la traslocasa, lo que habla de la homogeneidad estructural de la proteína en las diferentes mitocondrias estudiadas. Con base a este dato, el ATR se utilizó para determinar el transporte de ADP y conocer si la afinidad de este compuesto por la traslocasa era similar a los reportados en la literatura (22,29). Los resultados muestran que este compuesto produce una inhibición importante (54%) desde 25  $\mu$ M (Fig 6), sugiriendo que la AdN traslocasa es estructuralmente similar a la de otros sistemas mitocondriales.

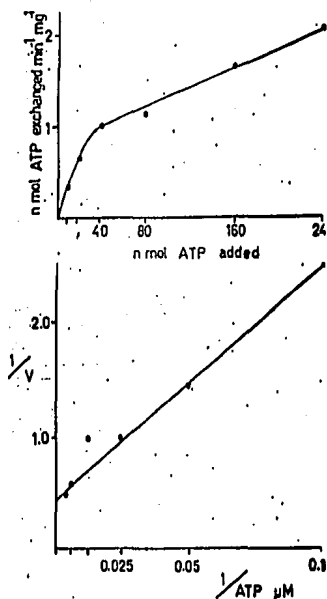


Figura 5. Estudio Cinético del Recambio de ATP en Mitochondrias de Placenta. Las condiciones experimentales fueron similares a las indicadas en la Fig 4. El [2,5,8-<sup>3</sup>H]-ATP tenía una actividad específica de 3,000 cpm/mol. Temperatura 25°C. Volumen final 1 ml.

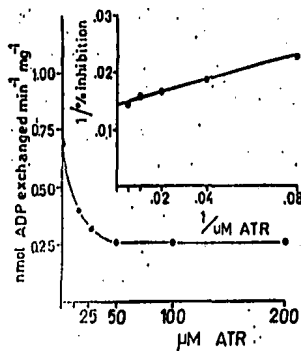


Figura 6. Efecto del ATR sobre el Recambio de ADP en Mitochondrias de Placenta Humana. 1 mg de proteína se incubó en un medio que contenía: 100 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 7.3; 10 μg de oligomicina; 50 nmol de <sup>14</sup>C-ADP y las concentraciones de ATR indicadas.

Ha sido demostrado que la composición lipídica de la membrana afecta el comportamiento de las proteínas embebidas en ella, produciendo aumento o disminución de su función (31,32). Tomando en consideración este antecedente, se planteó como posibilidad que el medio lipídico de la membrana influyera en la movilidad de la traslocasa de AdN. Por otro lado, datos de la literatura indican que en mitocondrias de placenta humana existen concentraciones importantes de esfingomielina (33,34). Considerando lo anterior, se decidió determinar el efecto de la temperatura sobre la AdN traslocasa cuantificando el transporte de ADP.

La Fig 7 muestra que no hay cambios importantes en el transporte de ADP; por otro lado no se presenta punto de inflexión en la gráfica, lo que sugiere una rigidez membranal que pudiera explicar los resultados anteriores. Este dato muestra la importancia de la membrana en las funciones mitocondriales.

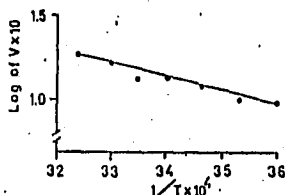


Figura 7. Efecto de la Temperatura sobre la Velocidad de Recambio de ADP en Mitocondrias de Placenta. Un mg de proteína se incubó en un medio que contenía: 100 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 7.3; 10 $\mu$ g de oligomicina y 50 nmol <sup>14</sup>C-ADP. Después de un periodo de incubación de 10 seg, a las temperaturas indicadas, la reacción se terminó con la adición de 40  $\mu$ M de ATR. Una alícuota de 0.1 ml se filtró a través de una membrana Millipore. Volumen final 1 ml.

Para conocer la hidrólisis de ATP en la placenta humana se decidió estudiar su caracterización. En este estudio se emplearon PSM para evitar el lento recambio de los AdN y poder observar la máxima actividad de la ATPasa. La pureza de las PSM se determinó usando enzimas marcadoras como la lactato deshidrogenasa, citocromo oxidasa y miocinasa. La Tabla I muestra los resultados de estas actividades, sugiriendo un enriquecimiento de las funciones mitocondriales y una pobre contaminación con restos celulares.

Tabla I. Determinación de la Pureza de las PSM en Relación a las Mitocondrias de Placenta Humana.

	LDH %	Citocromo Oxidasa	Miocinasa
Mitocondrias	17.15	36	NO
Partículas Submitocondriales	6.60	84	NO

LDH está expresada tomando como 100% su actividad en el homogenado total. La citocromo oxidasa está expresada en  $\text{natO}_2/\text{mg}/\text{min}$ . La presencia de la miocinasa se ensayó cuantificando la actividad de la ATPasa en presencia de adenosín pentafosfato.

El curso temporal de la ATPasa se muestra en la Fig 8. Se observa que a los 20 min de incubación la hidrólisis de ATP (2.5  $\mu\text{mol}$ s añadidas) alcanza un valor aproximado de 6  $\mu\text{mol}$ s de Pi liberado, lo que sugiere la posible presencia de una enzima contaminante que utiliza los productos de hidrólisis de la ATPasa.

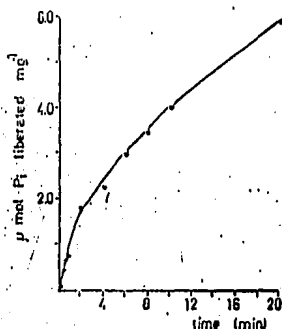


Figura 8. Liberación de Pi por la ATPasa de PSM de Placenta Humana. La actividad de la ATPasa se determinó en un medio que contenía: 100 mM KCl; 30 mM Tris-HCl, pH 7.3; 5 mM MgCl<sub>2</sub> y 2.5  $\mu\text{mol}$ s de ATP y 1 mg de proteína. Después del tiempo de incubación, se adicionó TCA a una concentración final del 6%. Volumen final 1 ml. Temperatura 30°C.

Las enzimas en general presentan su máxima actividad a un determinado pH, lo que permite en determinados casos separar o distinguir varias activida-

des en una misma muestra. Con base en este hecho, se hizo una curva de actividad de ATPasa a diferentes valores de pH. La Fig 9 muestra un pico máximo de actividad a pH 8, sugiriendo la presencia de una sola enzima que hidroliza ATP. Por otro lado, para evitar que la acumulación de productos de hidrólisis afectara los resultados, se tomó como tiempo de reacción 2 min, además de permitirnos trabajar en velocidades iniciales.

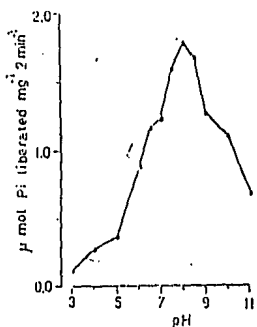


Figura 9. Efecto del pH sobre la Actividad de la ATPasa en PSM de Placenta. La actividad hidrolítica del ATP se determinó en un medio que contenía: 100 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub> y 2.5 µmoles de ATP. Los siguientes amortiguadores fueron empleados: citrato para pH 3-5; MES para 6-6.5; Tris-HCl para 7-8; Borato para 8.5-9 y carbonato/bicarbonato para 10-11. La concentración final de los amortiguadores fue 30 mM. Temperatura 30°C.

Con base en estos resultados, se estudiaron las características cinéticas de la ATPasa en PSM. En la Fig 10 se observa el efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad de esta enzima. Es evidente la curva bifásica que se presenta a los 2 min de incubación. Sin embargo, la misma reacción incubada a 1 y 4 min presenta el mismo comportamiento, lo que sugiere la posibilidad de tener una enzima con dos sitios diferentes de reconocimiento para el sustrato, o bien, dos enzimas (35).

Se ensayó el efecto de la oligomicina ( $10$  y  $20 \mu\text{g mg}^{-1}$ ) sobre la actividad de la ATPasa en estas PSM. Los resultados muestran (Fig 11) una inhibición parcial (36 y 46% respectivamente) de la hidrólisis de ATP, haciendo monofásica la curva de actividad. Las dobles recíprocas presentan un quiebre que puede sugerir la presencia de 2 sitios catalíticos o de reconocimiento del sustrato.

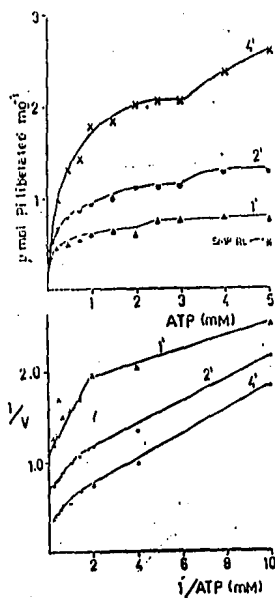


Figura 10. Estudio Cinético de la Hidrólisis del ATP en PSM de Placenta. La actividad se ensayó en un medio que es similar al descrito en la Fig 8 a excepción que el pH fue ajustado a 8. En este experimento se emplearon 3 tiempos diferentes de incubación, al término de los cuales se adicionó TCA 6%, concentración final, para parar la reacción. Temperatura  $30^{\circ}\text{C}$ . Volumen final 1ml.

Otro inhibidor de la ATPasa es el DCCD. La acción de este compuesto se muestra en la Fig 12. Al igual que la oligomicina, el DCCD ( $2$  y  $5 \text{ nmolas mg}^{-1}$ ) presenta una pobre inhibición (33 y 19%), sin embargo, las dobles recíprocas no hacen evidente el quiebre que se presenta en las figuras anteriores, lo que puede indicar un mayor efecto sobre uno de los sitios catalíticos, ya que uno

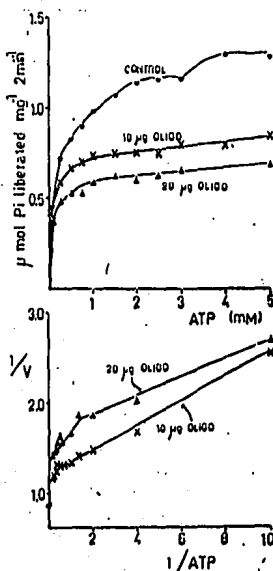


Figura 11. Acción de la Oligomicina sobre la Actividad de la ATPasa de PSM de Placenta. Las condiciones experimentales son iguales que en la Fig 10. La oligomicina se adicionó a las PSM y fueron preincubadas durante 10 a 15 min a 30°C. La reacción se inició con la adición de 2.5  $\mu\text{moles}$  de ATP. Volumen final 1 ml. OLIGO = oligomicina.

de los parámetros cinéticos, el coeficiente de Hill, se aproxima a 1 (Tabla II), sugiriendo un comportamiento Michaeliano, no cooperativo.

En la Fig 9 se observa un pico de máxima actividad para la ATPasa, pero este dato no indica que sólo exista esta enzima en las PSM, lo cual abre la posibilidad de tener presentes otras enzimas capaces de hidrolizar AdN. Ha sido descrito en la literatura la presencia de una ADPasa en placenta humana (36, 37), y ha sido demostrado que esta actividad se inhibe por NaF en concentraciones que van desde 9 hasta 40 mM (38). Al ensayar la actividad de la ATPasa en presencia de este inhibidor (10 mM) se observó una disminución importante de la actividad enzimática (27%), sin embargo, la adición de 10  $\mu\text{g}$  de oligomicina



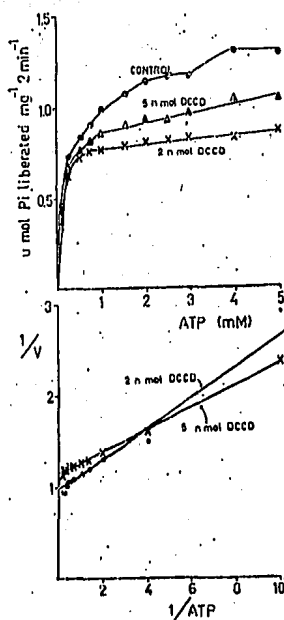


Figura 12. Efecto del DCCD en la Hidrólisis de ATP en PSM de Placenta Humana. Las condiciones experimentales son iguales a las mencionadas en la Fig 10. A las PSM se les adicionó 2 o 5 nmolas de DCCD y se preincubaron durante 30 a 45 min a 30°C. La reacción se inició con la adición de 2.5  $\mu$ molas de ATP. Volumen final 1 ml.

en estas condiciones no inhibe al 100%, alcanzando sólo el 64% de la actividad restante de la ATPasa. Las dobles recíprocas también presentan un quiebre que sugiere la existencia de 2 sitios catalíticos de reconocimiento para el sustrato (Fig 13).

La Tabla II muestra los parámetros cinéticos de los experimentos anteriores. Se observa en el control que en presencia de NaF (10 mM), el factor de Hill permanece cercano a 0.5, lo que sugiere una cooperatividad negativa, la cual permanece aún cuando la ATPasa se ensaya en presencia de oligomicina. La característica que presenta la hidrólisis de ATP como un evento de cooperati-

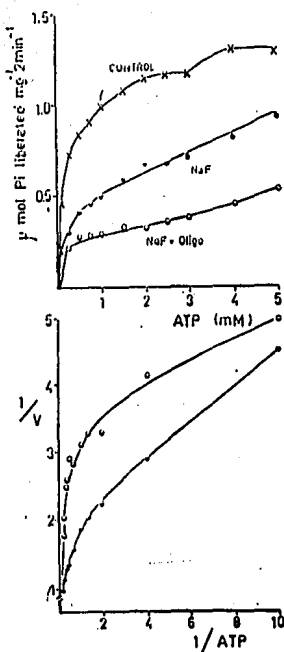


Figura 13. Actividad de la ATPasa de PSM de Placenta Humana en Presencia de NaF. Las condiciones experimentales de ensayo fueron igual a las reportadas en la Fig anterior. La solución de NaF usada se preparó antes de su uso, asegurando que el pH final fuera 8. La concentración del inhibidor fue 10 mM. Cuando se utilizó oligomicina fue a una concentración de 10 µg. Volumen final 1 ml. Temperatura 30°C. Tiempo de reacción 2 min.

Tabla II. Parámetros Cinéticos de la Actividad de la ATPasa en Presencia de Diferentes Inhibidores.

	V <sub>max</sub> µmoles/mg/min	H	S <sub>0.5</sub> mM
Control	0.822	0.550	0.467
Oligomicina 10 µg/mg	0.423	0.850	0.110
Oligomicina 20 µg/mg	0.890	0.270	3.354
DCCD 2 nmoles/mg	0.429	1.000	0.101
DCCD 5 nmoles/mg	0.527	0.930	0.183
NaF 10 mM	0.735	0.550	2.924
NaF 10 mM + Oligo	0.475	0.280	11.352

Los resultados de cada experimento mostrado en las figuras anteriores se emplearon para obtener estos parámetros. V<sub>max</sub> = Velocidad máxima; H = coeficiente de Hill.

dad negativa es sorprendente, ya que reportes de la literatura demuestran que la cooperatividad negativa se observa en la síntesis del ATP y no en su hidrólisis.

La  $F_1$ -ATPasa de mitocondrias de placenta humana ha sido aislada y purificada a homogeneidad (39). La actividad hidrolítica de esta enzima pura al igual que el de otras  $F_1$ -ATPasa aisladas, muestra una alta especificidad para su sustrato, el ATP. Con base en este dato, los resultados mostrados hasta el momento no pueden ser explicados como una consecuencia de la actividad de la  $F_1$ -ATPasa, sino más bien podrían explicarse si pensamos en la presencia de otra enzima, una ADPasa que utilice los productos de hidrólisis de ATP. La ADPasa en varias células y tejidos ha sido demostrada (40-49), incluso en placenta (36, 37); sin embargo, no se han hecho intentos para su caracterización.

La Tabla III muestra la actividad de la ADPasa en diferentes fracciones subcelulares de la placenta humana. Se observa que esta actividad se asocia a las mitocondrias, incrementando su actividad en las PSM. Para conocer la localización de la ADPasa dentro de la mitocondria, se determinó la actividad de esta enzima en mitocondrias íntegras, mitoplastos y membrana externa mitocondrial. Los resultados (Tabla IV) demuestran que la actividad hidrolítica del ADP permanece en los mitoplastos, sugiriendo la presencia de la ADPasa en la membrana interna mitocondrial. Con base en estos resultados se decidió estudiar a la ADPasa en PSM.

Tabla III. Actividad de la ATPasa y ADPasa en Diferentes Fracciones de Placenta Humana.

	ATPasa	ADPasa
Homogenado	100%	100%
Mitocondrias	175%	216%
PSM	348%	270%

Una cantidad constante de proteína (1 mg) se utilizó para determinar la hidrólisis de los nucleótidos. El medio de reacción es igual al usado en la Fig 15. Volumen final 1 ml. Temperatura 30°C.

Tabla IV. Actividad de la ATPasa y ADPasa en Diferentes Fracciones Mitocondriales.

	μmoles mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup>	
	ATPasa	ADPasa
Mitocondrias	0.192	0.127
Mitoplastos	0.343	0.250
Membrana Externa	0.041	0.040

Las mitocondrias se aislaron como se mencionó en Material y Métodos. Los mitoplastos se obtuvieron con digitonina al 0.1%. La membrana externa mitocondrial fue separada de los mitoplastos por centrifugación diferencial. Los resultados están expresados como μmoles de Pi liberado.

A pesar de tener los controles de contaminación celular de las PSM, se decidió determinar si la actividad de ADPasa era resultado de una unión inespecífica a las PSM. Para ello, las PSM fueron lavadas o sonicadas en presencia de 100 mM KCl. La Tabla V muestra que los métodos de lavado no eliminan la actividad de la ADPasa en las PSM, pero si incrementan su actividad, lo que sugiere que la enzima está asociada a la fracción mitocondrial.

Tabla V. Hidrólisis de ATP y ADP en PSM de Placenta Humana Lavadas con KCl.

	ATPasa	ADPasa
	μmoles de Pi mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup>	
PSM control	0.622	0.404
PSM lavadas con KCl	0.649	0.429
PSM sonicadas con KCl	0.685	0.461

Las PSM se lavaron con 100 mM KCl haciendo una dilución de 40 veces. Las PSM diluidas se incubaron en baño de hielo con agitación durante 15 a 20 min y después se recuperaron por ultracentrifugación. Las mismas condiciones se emplearon para la sonicación que fue de 45 seg con intervalos de 60 seg, en 3 ciclos. Al término de la sonicación las PSM se recuperaron por ultracentrifugación.

Como paso siguiente, se decidió determinar las condiciones óptimas de esta actividad. La Fig 14 muestra que la actividad de la ADPasa a diferentes pH presenta 2 picos de actividad, uno a pH de 8 y otro a pH de 10, lo que sugiere la presencia de 2 enzimas. En relación a este resultado, ha sido descrito en otros sistemas, que la ADPasa es dependiente de magnesio (40,41,44). Bajo

este criterio se determinó la capacidad hidrolítica de ADP en PSM en presencia del catión divalente. La Fig 14B muestra que el magnesio es necesario para expresar la actividad a pH 8, mientras que la actividad a pH no se afecta. La eliminación de magnesio del medio de incubación producida por la adición de EGTA inhibe ambas actividades (Fig 14B).

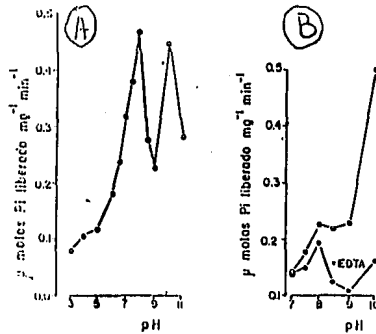


Figura 14. Efecto del pH y la Concentración de  $Mg^{2+}$  sobre la Actividad de ADPasa en PSM de Placenta. La hidrólisis de ADP se ensayó en un medio que contenía: 100 mM KCl; 5 mM  $MgCl_2$  y 2.5  $\mu$ moles de ADP. Para los diferentes pH usados se emplearon los siguientes amortiguadores: citrato para pH 3-5; MES para 6-6.5; Tris-HCl para 7-8; boratos para 8.5-9 y carbonato/bicarbonato para pH 10-11. La concentración de los diferentes amortiguadores fue de 30 mM. En la gráfica B, la actividad de la ADPasa se ensayó en ausencia de magnesio (trazo superior), y en ausencia de magnesio y además en presencia de 10 mM EDTA (trazo inferior). Temperatura 30°C.

Estos resultados sugieren que el pH óptimo de la ADPasa es 8. La actividad observada a pH 10 pudiera ser debida a la presencia de una fosfatasa alcalina, la cual ha sido reportada en este tejido y que es inhibida por EDTA. Sin embargo, la capacidad de reconocimiento de esta fosfatasa sobre el ATP y el ADP es pobre, presentando una insignificante hidrólisis de estos nucleótidos a pH 8.

Para estudiar la hidrólisis de ADP en estas PSM se emplean una serie de inhibidores de la ATPasa y fosfatasa que se ensayan tanto en la hidrólisis de ATP como en la ADPasa. Los resultados se presentan en la Tabla VI. Se observa que los porcentajes de inhibición son similares para ambas actividades, lo cual sugiere que la hidrólisis de ATP y ADP puede radicar en la misma proteína, o bien, que sea un artefacto de enzimas contaminantes.

Tabla VI. Efecto de Diferentes inhibidores sobre la Actividad de ATPasa y ADPasa en PSM de Placenta Humana.

		ATPasa	ADPasa
		% de inhibición	
VAN	100 $\mu$ M	21.90	28.50
DEB	500 $\mu$ M	50.82	36.51
TFE	500 $\mu$ M	35.94	29.02
NaN <sub>3</sub>	10 mM	42.37	40.11
KCN	10 mM	15.15	26.01
LaCl <sub>3</sub>	1 mM	26.42	15.61
DCCD	0.1 mM	44.98	31.80
NaF	100 mM	30.16	34.85
NiCl <sub>2</sub>	1 mM	64.24	60.60
NiCl <sub>2</sub>	10 mM	80.17	64.58
L-Fen	0.8 mM	2.97	5.27
L-Fen	26 mM	6.80	7.05
Oligo	50 $\mu$ g	45.89	35.93

El curso temporal de la hidrólisis de ADP no es lineal, presentando 3 pendientes diferentes que inician a los 2 y 10 min (Fig 15). Estos resultados permiten elegir un tiempo de reacción de 2 min para trabajar en velocidades iniciales.

Los resultados obtenidos inquietan, ya que como se mencionó antes, sugieren la posibilidad de que la hidrólisis de ADP sea un artefacto por contaminación con miocinasa. La Fig 16 presenta un esquema del posible fenómeno que pudiera explicar la actividad de la ADPasa.

A continuación se plantean una serie de experimentos que permitan demostrar la existencia de una ADPasa o de un artefacto en las PSM de placenta humana.

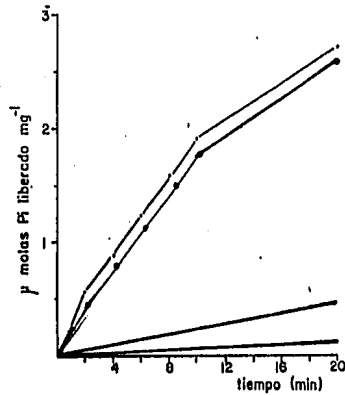


Figura 15. Curso Temporal de la Hidrólisis de ADP en las PSM de Placenta Humana. Una alícuota de 1 mg de proteína de las PSM se incubó en un medio que contenía: 30 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM MgCl<sub>2</sub> y 2.5 µmoles de ADP o p-nitrofenil fosfato (pNFF). Cuando se utilizó la L-fenil alanina su concentración final fue 26 mM. Temperatura: 30°C. Volumen final 1 ml.

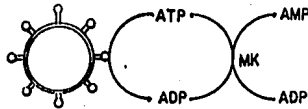


Figura 16. Mecanismo Probable que Puede Explicar la Presencia de la ADPasa en PSM de Placenta Humana. La Figura sugiere la presencia de miocinasa. En estas condiciones, el ADP adicionado al medio de reacción es utilizado como sustrato de la miocinasa que sintetiza ATP, sustrato que es reconocido e hidrolizado por la ATPasa. Si este sistema se encuentra en las PSM de la placenta, se puede inferir que el Pi liberado proviene del ATP y que no existe la ADPasa.

Con base al esquema presentado, se decide cuantificar la síntesis de ATP por estas PSM. La Tabla VII muestra que la producción máxima de ATP es de 12.11 nmolas  $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ . Esta síntesis es sensible a la adición de 8 mM de AMP, logrando una inhibición del 90%. Es claro que las PSM son capaces de sintetizar ATP a través de la miocinasa, sin embargo, esta producción de ATP no explica la velocidad de hidrólisis de ADP que se presenta en las figuras anteriores, que alcanzan valores aproximados de 500 nmolas  $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ , lo cual descarta la posibilidad de que la miocinasa sea la responsable de los resultados de la ADPasa.

Para asegurar la presencia de esta enzima, es decir de la ADPasa, se determina el curso temporal de la hidrólisis de ADP y se cuantifican los AdN y el Pi liberado. La Fig 17 muestra que el ADP desaparece de manera sincrónica a la aparición de Pi, mientras que las cantidades de ATP detectado son pobres, lo que apoya la idea de que la cantidad de ATP sintetizado no es la causa del Pi liberado, y en cambio apoya la idea de que el Pi proviene de la hidrólisis de ADP. Este mismo experimento se realizó en presencia de hexocinasa (HK) y glucosa para capturar el ATP presente. Los resultados obtenidos son iguales en presencia o ausencia del sistema enzimático para capturar ATP.

En esta serie de experimentos, se determinó la actividad de la ADPasa en presencia del sistema HK + glucosa para capturar el ATP pero se varían las concentraciones de ADP. La Fig 18 presenta los resultados de este experimento y sugieren que el Pi liberado proviene del ADP. Sin embargo, la producción de glucosa-6-fosfato que se obtiene del sistema enzimático podría ser sustrato de la fosfatasa contaminante, que como se mencionó antes, presenta una pobre actividad a pH 8.

Para aclarar estos resultados y evitar la producción de posibles sustratos para la fosfatasa, se ensayó la actividad de ADPasa en presencia de AMP,



Tabla VII. Síntesis de ATP por Miotocinasa en PSM de Placenta humana.

mM ADP	ATP μmolas/mg/min	+ AMP 8 mM	% de Inhibición
0.10	3.93	0.00	100
0.25	6.21	0.00	100
0.50	9.47	0.00	99
0.75	0.61	0.80	90
1.00	6.62	0.80	87
1.50	9.95	2.00	79
2.00	10.00	0.80	92
3.00	12.11	1.70	85
4.00	7.39	1.60	78
5.00	8.21	1.60	80

La síntesis de ATP se determinó cuantificando la desaparición de NADP en un sistema enzimático acoplado que contenía: 50 mM Tris-acetato, pH 8; 3 mM acetato de magnesio; 20 mM glucosa; 8 mM  $HPO_4$ ; 170 mM sacarosa; 10 U HK; 10 U G6PDH y las diferentes concentraciones de ADP que se indican. Después de 6 a 7 min de cuantificar la desaparición del NADP, se adicionó al medio 8 mM de AMP para inhibir a la miotocinasa.

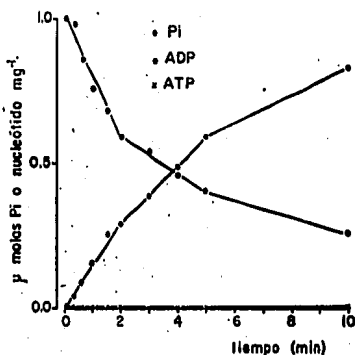


Figura 17. Cuantificación de Nucleótidos de Adenina y Pi Durante la Hidrólisis de ADP por PSM de Placenta. Un mg de proteína de las PSM se incubó en el siguiente medio: 30 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM  $MgCl_2$ ; 1 μmola de ADP; 20 mM glucosa y 10 U HK. Volumen final 1 ml. Temperatura 30°C.

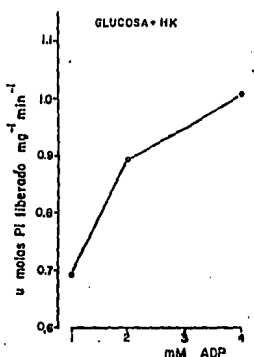


Figura 18. Actividad de la ADPasa en Presencia de Glucosa y HK. Las PSM se incubaron en un medio que contenía: 30 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 20 mM glucosa; 10 U HK y las diferentes concentraciones de ADP. Volumen final 1 ml. Temperatura 30°C.

que como se observó en la Tabla VII es inhibidor de la miocinasa. Los resultados muestran (Fig 19) que a 8 mM de AMP hay una liberación de Pi, lo que sugiere fuertemente la hidrólisis de ADP. Teniendo en cuenta la contaminación de la fosfatasa, este último experimento se repitió en presencia de un inhibidor específico de ésta, la L-fenil alanina a una concentración de 26 mM. Los resultados muestran que la presencia de este inhibidor de la fosfatasa alcalina no afecta la hidrólisis de ADP, y apoya substancialmente que en las PSM de placenta humana existe la actividad de ADPasa.

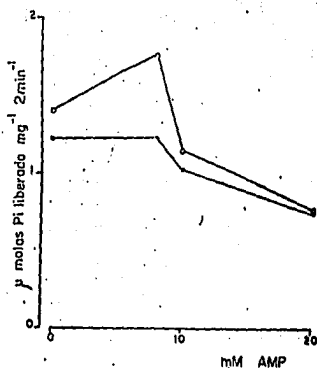


Figura 19. Efecto de la Concentración de AMP sobre la Hidrólisis de ADP en PSM de Placenta Humana. La hidrólisis de ADP se ensayó en un medio que contenía: 30 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM ADP y las diferentes concentraciones de AMP. El trazo inferior se ensayó en presencia de L-fenil alanina (25 mM). Volumen final 1 ml. Temperatura 30°C,

## DISCUSION

Este trabajo presenta la caracterización del transporte de nucleótidos de adenina en mitocondrias y su hidrólisis en mitocondrias y PSM de Placenta Humana.

Datos de la literatura (52,53) muestran que el calcio es un factor que afecta el transporte de AdN, lo cual podría explicar los datos mostrados en la Fig 1. Sin embargo, experimentos de respiración realizados en presencia de 1, 2 o 3 mM EGTA no cambian el estímulo inducido por ADP. También ha sido reportado en mitocondrias de tumores que la respiración estimulada por ADP se afecta por altas concentraciones de calcio intramitocondrial (50,51). En nuestro sistema, la concentración de calcio fue cuantificada dando un valor de  $65 \text{ nmol mg}^{-1}$  mientras que en las mitocondrias de hígado de rata la concentración fue de  $25 \text{ nmol mg}^{-1}$ .

Por otro lado, los resultados presentados muestran claramente que el transporte de ATP y sobre todo el de ADP están disminuidos en mitocondrias de placenta humana cuando se comparan a las mitocondrias de hígado de rata. Datos de la literatura indican que una posible alternativa de esta disminución de la traslocasa es el contenido de nucleótidos de adenina intramitocondriales (54). En este trabajo también se determinó la concentración de estos (ATP 1.24, 3.34; ADP 5.78, 7.63; AMP 1.09, 3.00  $\text{nmol mg}^{-1}$  en placenta e hígado respectivamente) y los resultados mostraron en general una disminución pero no en el grado en el que se ha reportado como causante de un recambio pobre.

También se ha reportado (55) que la composición de la membrana es importante para permitir una función adecuada de las proteínas que en ella se lo-

calizan. Como se mencionó, las mitocondrias de placenta humana muestran una composición lipídica característica, con un incremento substancial de esfingomielina (33,34), y de colesterol. Ha sido demostrado que el incremento de colesterol a nivel de la membrana aumenta la rigidez de ésta produciendo una disminución de la actividad de las proteínas embebidas en ella. Esto sugeriría que la composición de la membrana podría ser el factor principal que interviene en la función del traslocador. Por lo tanto, como se muestra en los resultados, el transporte de ADP a diferentes temperaturas no se ve afectado; esto sugiere que la composición lipídica de la membrana no permite cambios que favorezcan una adecuada función de la traslocasa.

Datos de este laboratorio indican por otro lado, que las mitocondrias de placenta contienen aproximadamente  $30 \mu\text{g}$  de colesterol  $\text{mg}^{-1}$ , mientras que en hígado sólo se cuantifican valores entre 4 a  $6 \mu\text{g}$  de colesterol por mg de proteína. Esta alta concentración (6 veces aproximadamente) de colesterol podría explicar la rigidez que la membrana muestra a las diferentes temperaturas ya que se ha demostrado que el incremento de colesterol en la membrana empaqueta más a los lípidos que en ella se encuentran y esto resulta en una mayor rigidez con el consecuente secuestro de las proteínas y su menor movilidad. Esto explicaría tanto los hallazgos del consumo de oxígeno como del transporte de AdN.

Estos resultados tendrían significado, si consideramos que un aporte de AdN disminuido podría favorecer la síntesis de progesterona, ya que durante el último trimestre del embarazo la producción de esta hormona alcanza valores cercanos a 600 mg en 24 horas (2).

La información obtenida nos hizo determinar las características hidrofílicas de ATP por estas mitocondrias. Es evidente que las PSM presentan una pobre contaminación con restos celulares. Se ha reportado que la  $F_1$ -ATPasa pu-

rificada a homogeneidad de mitocondrias de placenta humana presenta un doble sitio de reconocimiento para el substrato (39), lo que pudiera explicar que la hidrólisis de ATP presente una curva bifásica. Es sorprendente que esta característica de la enzima pura se presente en las PSM. Sin embargo, existe la alternativa de que esta actividad se deba a 2 enzimas, que bien pudieran ser 2 ATPasa. Esta posibilidad carece de suficiente apoyo, ya que como se mencionó la  $F_1$ -ATPasa purificada a homogeneidad presenta esta característica. Posiblemente otro par de enzimas podrían ser la alternativa para explicar la atípica hidrólisis de ATP en las PSM de placenta humana.

Datos de la literatura muestran que en mitocondrias de testículo (56) la oligomicina presenta una pobre inhibición. En el transcurso de esta investigación demostramos que en las PSM de placenta humana la máxima inhibición que presenta la oligomicina y el DCCD es pobre (50 y 33%, respectivamente). Es de interés señalar que el trazo de consumo de oxígeno en presencia de oligomicina inhibe al 100% la respuesta al ADP. En mitocondrias de tejidos tumorales se ha demostrado (57-63) que el DNP estimula eficientemente la respiración pero no así la actividad de la ATPasa. Se ha demostrado que el DNP no estimula esta enzima porque en forma muy rápida el dasacoplante induce la salida de magnesio (62,63). Este ejemplo tal vez podría emplearse para buscar la posible causa de porque estos compuestos (oligomicina y DCCD) son efectivos en inhibir la respiración y no así a la ATPasa.

La presencia de una ADPasa ha sido descrita en la placenta (36,37) y esta proteína podría ser la causante de la falta de inhibición por oligomicina. Es necesario señalar que escasos son los trabajos que han descrito a la ADPasa en placenta, y en estos trabajos no se ha seguido una sistematización de los hallazgos por lo que no se descarta la posibilidad de que esta actividad sea de una fosfatasa. También se ha sugerido que esta ADPasa es sensible a NaF. En los resultados se muestra que la presencia de NaF en el medio de hidrólisis de

ATP produce una disminución importante en la liberación de Pi, sugiriendo que sólo la  $F_1$ -ATPasa sería la enzima que estaría funcionando. Sin embargo, la adición de oligomicina (10  $\mu$ g) no es capaz de bloquear al 100% la hidrólisis de ATP, lo que apoya la idea de que el mecanismo de la ATPasa en ese sentido es diferente a los ya conocidos. Otro dato que también apoya a esta suposición es que el coeficiente de Hill en estas condiciones (la ATPasa en presencia de NaF) no cambia, ya que el valor de 0.5 podría ser consecuencia de la interacción de 2 enzimas, de la ATPasa y de la ADPasa (35).

Por otro lado queda el hecho de que la  $F_1$  aislada de placenta humana presenta un comportamiento similar al de otros sistemas con respecto a la hidrólisis de ATP, en donde el ADP es un potente inhibidor. En este sentido, se hace necesario un estudio cinético más detallado. Una alternativa es que la  $F_1$ -ATPasa no está acoplada, lo que impide que la oligomicina inhiba en forma eficiente; sin embargo, el DCCD que tiene un sitio de unión diferente al de la oligomicina tampoco inhibe en forma eficiente a la ATPasa.

Lo que es interesante de estos resultados es que la inhibición producida por estos agentes es diferente; en lo que la oligomicina mantiene abajo de 1 el coeficiente de Hill, el DCCD lo lleva a la unidad. Esto podría hablar de sitios diferentes de reconocimiento del sustrato en los que actúa el inhibidor. Asociado a este hecho es relevante que el coeficiente de Hill para el control es de 0.5, que indica cooperatividad negativa. Ha sido reportado para la síntesis de ATP (64) que existe una cooperatividad negativa, pero no en la hidrólisis. Por el momento desconocemos la importancia de este fenómeno. Estos resultados podrían explicar la presencia de las curvas bifásicas mostradas en la Fig 10.

En mitocondrias de corteza adrenal se ha descrito la presencia de una ATPasa insensible a oligomicina (65), la cual se asocia a movimientos de calcio.

Esta ATPasa se localiza en la membrana externa de la mitocondria. En los resultados presentados en este trabajo no se puede pensar en una acción similar, ya que a diferencia de los datos de la literatura (65) las mitocondrias de placenta muestran un control respiratorio alto en presencia de magnesio. Lo que se puede suponer es que el sistema de hidrólisis de ATP es diferente al de sus síntesis, o bien, que existe la presencia de otra enzima que hidroliza AdN y que a su vez explica los valores cercanos a 6  $\mu$ molas de Pi liberado cuando inicialmente se emplearon 2,5  $\mu$ molas de ATP (Fig 8).

La posibilidad de tener presente una enzima contaminante no se había descartado, y la ADPasa era el candidato posible; con base a esto se caracterizó dicha enzima. Los resultados demuestran que esta actividad se localiza asociada a las mitocondrias y al parecer, en forma específica a la membrana interna. La actividad de la ADPasa no es el efecto de una contaminación por restos citoplásmicos, ya que el lavado con KCl para desprender proteínas asociadas a la membrana en forma inespecífica no elimina la actividad de esta enzima. Más aún, el lavado y sonicado de las PSM con KCl tampoco induce pérdida de la actividad de la ADPasa. Es importante hacer notar que este último paso se hizo empleando una concentración de 1 M de KCl y la actividad de ADPasa permaneció inalterada. Esta enzima, al igual que otras ADPasas, tiene un pH óptimo de 8 y requiere de la presencia de magnesio (1 mM), pero mayores concentraciones de catión producen inhibición de la enzima.

Como una posible alternativa para explicar la hidrólisis de ADP, se planteó que esta fuera el resultado de una fosfatasa. En la placenta existe una proporción importante de fosfatasa alcalina y ha sido demostrado que se localiza tanto soluble como unida a membrana. También se ha demostrado que esta fosfatasa es inhibida por la presencia de L-fenil alanina. En la Fig 15 se mostró el curso temporal de la actividad de ADPasa y fosfatasa. Es evidente



que la hidrólisis de ADP presenta la mayor liberación de fosfato, mientras que el pNFF no. Este último experimento se repitió en presencia de L-fenil alanina y muestra que la hidrólisis de pNFF se inhibe el 70% a los 20 min, mientras que la hidrólisis de ADP sólo se inhibe un 6%. Es conveniente señalar que las PSM estuvieron preincubadas 5 min en presencia del inhibidor, de tal manera que la unión entre éste y la proteína de las PSM fuera óptima. También es importante señalar que no se puede pensar en que el ADP desplazara a la L-fenil alanina ya que el ADP está a una concentración de 2.5 mM mientras que el inhibidor a 26 mM (10 veces más concentrado). Por otro lado la inhibición que produce la L-fenil alanina es incompetitiva. Esto indica que la fosfatasa no es responsable de la hidrólisis del ADP. Más aun, los diferentes substratos para la fosfatasa muestran velocidades de transformación similar, siendo el pNFF el de mayor afinidad para la enzima. Al hacer el análisis de la hidrólisis de ADP con respecto al pNFF vemos que el ADP se hidroliza 400% más que el pNFF (100%). Por otro lado, ha sido reportado que la fosfatasa alcalina de placenta tiene poca capacidad para hidrolizar ADP y ATP, dato que se confirma en la Fig 15. Por lo anterior es difícil pensar que la fosfatasa sea responsable de la actividad de la ADPasa en las PSM de placenta humana.

La inhibición del 6% que se observa en la hidrólisis del ADP en presencia de L-fenil alanina, se puede explicar a que en cierta medida la fosfatasa hidroliza al AMP que es el producto de la actividad de la ADPasa. Este dato indica que la fosfatasa no interfiere en forma significativa con los resultados obtenidos.

La Fig 16 presenta la posibilidad de que la miocinasa pudiera explicar la actividad de la ADPasa. Sin embargo, bajo este argumento deberíamos esperar una liberación de Pi que correspondiera a la mitad de la concentración de ADP adicionado al medio, ya que se requieren 2 moléculas de ADP para sintetizar.

una de ATP. Es claro que en los resultados mostrados este no es el caso, ya que los valores de Pi liberado corresponden más bien a la hidrólisis de ADP. Por otro lado, se ha demostrado que en la  $F_1$ -ATPasa aislada de placenta humana el ADP produce una inhibición de la hidrólisis de ATP (39). Esto sugiere que si las PSM sintetizan ATP este no podría ser el sustrato de la ATPasa ya que el ADP bloquearía el sitio activo, al menos en los primeros minutos.

A pesar de estas consideraciones fue necesario demostrar experimentalmente la presencia de la ADPasa. La síntesis de ATP máxima que alcanzan las PSM es de  $12 \text{ nmolas mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . Esta producción de nucleótido no explica los valores de 500 nmolas o más de Pi liberado por mg y por min mostrados por la ADPasa.

El ATP producido por las PSM, aunque es poco, fue secuestrado en un sistema acoplado de HK y glucosa para asegurar que la ATPasa nunca encontrara su sustrato; los resultados mostraron que en este sistema donde no aparece ATP disponible, la presencia de ADP en el medio de reacción produce la liberación de Pi, este dato apoya en forma importante la existencia de la ADPasa. Sin embargo, nos vino la idea de que la ADPasa pudiera ser un artefacto producido por la presencia de una fosfatasa. Datos de la literatura (66) demuestran que la fosfatasa alcalina puede hidrolizar nucleótidos de adenina, aunque a una velocidad muy baja. También se mencionó que la L-fenil alanina es su inhibidor. Con base en estos datos y conociendo que el AMP inhibe la síntesis de ATP, se ensayó la actividad de la ADPasa en presencia de estos dos inhibidores. Los resultados mostraron (Fig 19) que el ADP es hidrolizado en estas condiciones, lo que revela en forma concluyente la presencia de la ADPasa en PSM de placenta humana. Este argumento se apoya también en los datos mostrados en la Fig 17, donde claramente se demuestra una estequiometría de un ADP hidrolizado por un Pi liberado.

Una de las incógnitas que queda por resolver es conocer el proceso en que la ADPasa participa, cómo se regula, cómo se relaciona con las funciones mitocondriales y su papel fisiológico en la placenta humana. Es posible que una de las principales funciones de esta ADPasa sea la de participar en los mecanismos de vasodilatación del sistema circulatorio de la placenta, ya que de este órgano y de su eficiencia depende tanto la nutrición como la manutención del feto durante la gestación.

Ha sido postulado en otros tejidos que la ADPasa participa en la degradación de ADP para proporcionar AMP como sustrato de la 5-nucleotidasa en condiciones de isquemia. La nucleotidasa es capaz de producir adenosina, que es liberada al torrente circulatorio en donde la adenosina tiene un efecto vasodilatador.

Por otro lado es posible que la adenosina así producida, juegue un papel importante en la regulación de algunas vías metabólicas que permita que la placenta sea capaz de responder a cualquier tipo de estímulos, de tal manera que la protección del feto sea eficiente.

## BIBLIOGRAFIA

1. Paul, S., Lailkhani, B.L., Gupta, P.D., and Talwar, G.P. (1979). Recent Advances in Reproduction and Regulation of Fertility, Editado por G.P. Talwar, Elsevier-North Holland Biomedical Press, pp 375-385.
2. Simpson, E.R. and McDonald, P.C. (1981). *Ann. Rev. Physiol.* 42: 163-188.
3. Takemoni, S. and Kominami, S. (1981). *TIBS*, sept: 393-396.
4. Shears, S.B. and Boyd, G.S. (1982). *Eur. J. Biochem.* 123: 153-157.
5. Tuckey, R.C. and Stevenson, P.M. (1985). *Eur. J. Biochem.* 148: 379-384.
6. Dimino, M.J. (1977). *Endocrinology* 101: 1844-1849.
7. Burstein, S. and Gut, M. (1973). *Ann. NY Acad. Sci.* 212: 262-275.
8. Ryan, K.J., Meigs, R. and Petro, Z. (1966). *Am. Obst. Gynecol.* 96: 676-682.
9. Morrison, G., Meigs, R.A. and Ryan, K.J. (1965). *Steroids supp II*: 177-188.
10. Mason, J.I. and Boyd, G.S. (1971). *Eur. J. Biochem.* 21:308-321.
11. Bogulawski, W. (1983). *J. steroid. Biochem.* 18:771-775.
12. Das, N.P., Khan-Dawood, F.S. and Dawood, M (1985). *J. steroid. Biochem.* 23: 517-522.
13. Bogulawski, W., Klimek, J. and Zelewski, L. (1972). *FEBS Lett.* 27: 181-183.
14. Cammer, W. and Estabrok, R.W. (1967). *Arch. Biochem. Biophys.* 122: 721-734.
15. Lauquin, G. and Vignais, P.V. (1973). *Biochim. Biophys. Acta* 305: 534-556.
16. Sulimovici, S.F. and Boyd, G.S. (1970). *En: Vitamines and Hormones*, Vol. 27, Academic Press Inc., NY., pp 199-234.
17. Klimek, J., Bogulawski, W. and Zelewski, L. (1979). *Biochim. Biophys. Acta* 587: 362-372.
18. Yudilevich, D.L. and Sweirg, J.H. (1985). *Biochim. Biophys. Acta* 822: 169-201.

19. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
20. Sumner, J.B. (1944). *Science* 100: 413-414.
21. Jawore, K.D., Gruber, W. and Bergmeyer, H.W. (1974). En: *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol 4, Verlag Chemie Weinheim and Academic Press, NY, pp 2101-2109 y 2127-2131.
22. Vignais, P.V. (1976). *Biochim. Biophys. Acta* 456: 1-38.
23. Pfaff, E. and Klingenberg, M. (1968). *Eur. J. Biochem.* 6: 66-79.
24. Winkler, H.H., Bygrave, F.L. and Lehninger, A.L. (1968). *J. Biol. Chem.* 243: 20-28.
25. Heytler, P.G. (1979). En: *Methods in Enzymology*, Vol 55, Academic Press, NY, pp 462-472.
26. McLaughlin, S.G.A. and Dilger, J.P. (1980). *Physiol. Rev.* 60: 825-863.
27. Hanstein, W.G. (1976). *Biochim. Biophys. Acta* 456:129-148.
28. Kraagenhof, R. and Van Dam, K. (1969). *Biochim. Biophys. Acta* 172: 189-197.
29. Janovitz, A., Chávez, E. and Klapp, M. (1976). *Arch. Biochem. Biophys.* 173: 264-268.
30. Vignais, P.V., Vignais, P.M. and Stanislas, E. (1961). *Biochim. Biophys. Acta* 51: 394-396.
31. Daum, G. (1985). *Biochim. Biophys. Acta* 822: 1-42.
32. Ortega, A. and Mas-Oliva, J. (1984). *Biochim. Biophys. Acta* 773: 231-236.
33. Pollow, J., Sokolowski, G., Schmalbeck, J. and Pollow, B. (1974). *Hoppe-Syler s Z, Physiol. Chem.* 355: s. 515-528.
34. Chakraborti, A.S., Bismas, R., Majundar, R. and Mukherjea, M. (1980). *Gynecol. Obstet. Invest.* 11: 294-300.
35. Segel, I.H. (1974). En: *Enzyme Kinetics*, Cap. 2, John Wiley and Sons, USA, pp 35-36.
36. Cerletti, P., Fronticelli, C. and Zichella, L. (1960). *Clin. Chim. Acta* 5: 439-443.
37. Cerletti, P. and Zichella, L. (1960). *Clin. Chim. Acta* 5: 748-752.
38. Olivera, A.A. and Meigs, R.A. (1975). *Biochim. Biophys. Acta* 376: 426-435.
39. Aleksandrowickz, Z. (1980). *Int. J. Biochem.* 11: 165-175.

40. De Vente, J., Velema, J. and Zaagsma, J. (1984). *Arch. Biochem. Biophys.* 233: 180-187.
41. Smith, G.P., Smith, G.D. and Peters, T.J. (1980). *Biochem. J.* 192: 527-535.
42. Lanzara, V., Magre, E. and Grazi, E. (1986). *Int. J. Biochem.* 18: 179-182.
43. Smith, G.P. and Peters, T.J. (1981). *Biochim. Biophys. Acta* 673: 234-242.
44. Smith, G.P., Shah, T., Webster, A.D.B. and Peters, T.J. (1981). *Clin. exp. Immunol.* 46: 321-326.
45. Crutchly, D.J., Eling, T.E. and Anderson, M.W. (1978). *Life Sci.* 22: 1413-1429.
46. Pearsen, J.D., Carleton, J.S. and Gordon, J.L. (1980). *Biochem. J.* 190: 421-429.
47. Dosne, A.W., Legrans, G., Bauvois, B., Bodevin, E. and Caen, J.P. (1978). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 85: 183-189.
48. Elwood, W.K. and Bridges, R.B. (1980). *Comp. Biochem. Physiol.* 65B: 259-265.
49. Tognoli, L. and Marre, E. (1981). *Biochim. Biophys. Acta* 642: 1-14.
50. Thorne, R.F.W. and Bygrave, F.L. (1974). *Biochem. J.* 144: 551-558.
51. Villalobo, A. and Lehninger, A.L. (1980). *J. Biol. Chem.* 255: 2457-2464.
52. Eboli, M.L., Malmström, K., Galeotti, T., López-Alarcón, L. and Carafoli, E. (1979). *Cancer Res.* 2737-2742.
53. Gómez-Puyou, A., Gómez-Poyou, M.T. de, Klapp, M. and Carafoli, E. (1979). *Arch. Biochem. Biophys.* 194: 399-404.
54. Hamman, H.C. and Hynes Jr, R.C. (1983). *Arch. Biochem. Biophys.* 223: 85-94.
55. Kramer, R. and Klíngenber, M. (1980). *FEBS Lett.* 119: 257-260.
56. Vázquez-Memije, M.E., Cparabez-Trejo, A., Gallardo-Trillanes, G. and Delhumeau-Ongay, G. (1984). *Arch. Biochem. Biophys.* 232: 441-449.
57. Knowles, A.F. (1982). *Biochim. Biophys. Acta* 681: 62-71.
58. Pedersen, P.L. and Morris, H.P. (1974). *J. Biol. Chem.* 249: 3327-3334.

59. Kaschnitz, R.M., Hatefi, Y. and Morris, H.P. (1976). *Biochim. Biophys. Acta* 449: 224-235.
60. Hayashi, J., Gotoh, O. and Tagashira, Y. (1980). *Arch. Biochem. Biophys.* 205: 27-35.
61. Knowles, A.F. and Kaplan, N.O. (1980). *Biochim. Biophys. Acta* 590: 170-181.
62. Barbour, R.L. and Chan, H.P. (1978). *J. Biol. Chem.* 253: 367-376.
63. Kolarov, J., Kuzela, S., Krempasky, V. and Ujhazy, V. (1973). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 55: 1173-1179.
64. Matsuno-Yagi, A. and Hatefi, Y. (1985). *J. Biol. Chem.* 260: 14424-14427.
65. Gmaj, P.D., Nowicka, C. and Angielski, S. (1974). *FEBS Lett.* 47: 76-80.
66. Boyer, P.D. (1970). *En : The Enzymes, Vol. 4, Academic Pres, NY.* pp 430-432.

## DECREASED EXCHANGE OF ADENINE NUCLEOTIDES IN HUMAN PLACENTAL MITOCHONDRIA

FEDERICO MARTÍNEZ<sup>1</sup>, EDMUNDO CHÁVEZ<sup>2</sup> and SOLEDAD ECHEGOYEN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina UNAM, Av. Pórcel 70-160, México, D.F., México

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez, México, D.F. 01480, México

(Received 7 July 1986)

**Abstract**—1. The purpose of this work was to study the exchange of adenine nucleotides in mitochondria isolated from human placenta tissue.

2. The results indicate that ADP and ATP are translocated at a lower rate than those reported for rat liver mitochondria.

3. It is proposed that the limited transport is due to the particular lipid composition of placental mitochondria membrane, which induces an arrest in membrane fluidity with the consequent restriction in adenine nucleotide translocase mobility.

### INTRODUCTION

Several studies on ADP and ATP transport mechanism of both animal and plant mitochondria have been published (Janovitz *et al.*, 1976; Pfaff *et al.*, 1968; Vignais *et al.*, 1973). From these studies, it is now known that the physiological translocation of adenine nucleotides is mediated through an adenine nucleotide translocase (Pfaff *et al.*, 1965; Vignais, 1976).

In mitochondria of steroid producing endocrine tissue utilization of the energy derived from substrates for hormonal biosynthesis has been shown to be important (Cammer *et al.*, 1967) and that this event takes precedence over the mitochondrial ATP synthesis. Therefore, adenine nucleotide transport through the mitochondrial membrane must be regulated in such a way to warrant the delivery of reducing equivalents for steroid synthesis or for ATP synthesis.

We decided to study ADP and ATP translocation in mitochondria isolated from human placenta, a tissue actively synthesizing steroids, to get more insight on the mechanism regulating the adenine nucleotide translocase. The results reported show that the affinity of the carrier for its substrates are similar to those reported in mitochondria from rat liver. The  $K_m$  for atractyloside is  $7.3 \mu\text{M}$  and exhibited a linear Arrhenius plot. It is proposed that the lipid composition of the inner mitochondrial membrane could be considered to explain the lower rate of adenine nucleotides transport in placenta mitochondria. On the other hand, the relatively low levels of adenine nucleotides in placenta mitochondria could also contribute to the lower exchange.

### MATERIALS METHODS

Full-term placentas were processed within 60 min of delivery. The tissue (approx 400 g) was minced with scissors and washed with 0.25 M sucrose-1 mM EDTA, pH 7.3, to drain the blood; and the mince was ground for 30 sec in a

Polytron apparatus at 5000 rev/min with 21 of 0.25 M sucrose-1 mM EDTA. The homogenate was filtered through surgical gauze, the pH adjusted to 7.3 with Tris-base, and then centrifuged in a Sorvall RC 5B refrigerated centrifuge at 1000 g for 10 min. The supernatant was centrifuged at 12,000 g/min and the resulting pellet washed once with sucrose-EDTA. Some placental mitochondria preparations were further purified in a Ficoll gradient (Moore and Jobsis, 1970).

Oxygen uptake was estimated polarographically using a Clark type electrode in mixtures made of 100 mM KCl; 10 mM phosphate-Tris, pH 7.3; 0.1% bovine serum albumin and 10 mM of the glutamate-maleate mixture. Exchange of labeled nucleotides was measured as described by Janovitz *et al.* (1976). ATPase activity was analyzed by incubation of mitochondria in the presence of an ATP generating system, and the inorganic phosphate resulting from the reaction was determined according to Sumner (1944). The intramitochondrial content of adenine nucleotides was determined enzymatically as described by Jawore *et al.* (1974). Protein was determined by the method of Lowry *et al.* (1951). Intramitochondrial calcium was analyzed using a flame photometer.

### RESULTS

Figure 1 shows the respiratory control of placenta mitochondria. Stimulation in the oxygen consumption was observed after addition of ADP. Studying the uncoupled stimulated ATPase activity, we found an important diminution in the hydrolytic efficiency of the enzyme with respect to rat liver mitochondria (Fig. 2). Similar results were observed with mitochondria purified through Ficoll gradient. These results could be explained either on the basis of a functional failure in the F<sub>1</sub>-ATPase system, or on the basis of a deficient transport of adenine nucleotides.

To clear this point we decided to analyze the ATPase activity in submitochondrial particles (SMP). The results of this experiment are shown in Fig. 3 and, as observed, the hydrolysis of ATP is very similar in both, placental and liver SMP.



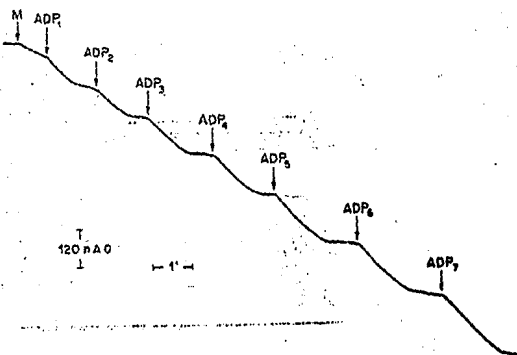


Fig. 1. Oxygen electrode trace illustrating the response of placental mitochondria to ADP addition. Where indicated (M), 5 mg of protein from placental mitochondria were added to the basic medium containing: 100 mM KCl; 10 mM phosphate-Tris, pH 7.3; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.1% bovine serum albumin; 10 mM malate and 10 mM glutamate adjusted to pH 7.3 with Tris-base, as the substrates. Where indicated by arrows, 0.8 μmol of ADP were added; the numerals indicate the successive addition of the nucleotide. Final volume 3 ml. Temperature 22°C.

From these last results, and taking into account that, in SMP, the permeability barrier to ATP is abolished, a functional failure in the adenine nucleotide carrier emerges as the possible primary cause for the atypical response to ATP in the human placental mitochondria studied.

To verify this assumption, we analyzed the ADP exchange across the inner membrane. The results

shown in Fig. 4 indicate that there is a limited rate of ADP exchange, with an unusual biphasic curve. At low concentrations of the nucleotide a saturation-type curve is observed with a maximal velocity at approximately 50 nmol of ADP added; while increasing concentration of ADP disclose an additional  $V_{max}$  with 500 nmol of the nucleotide added. The  $K_m$  of placental mitochondria for ADP is 8 μM.

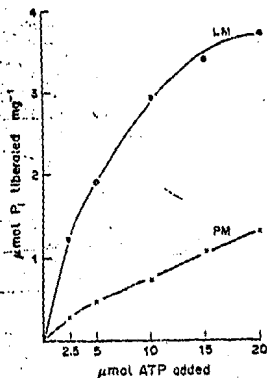


Fig. 2. Comparison of the ATPase activities shown by mitochondria isolated from placenta and rat liver. 2 mg of mitochondrial protein was incubated in a medium that contained 75 mM KCl; 7.5 mM Tris-HCl, pH 7.3; 1 mM phosphoenol pyruvate, 5 μg pyruvate kinase; 75 μM 2,4-dinitrophenol; and the indicated concentrations of ATP. Temperature 30°C. Incubation time 10 min. Final volume 2 ml.

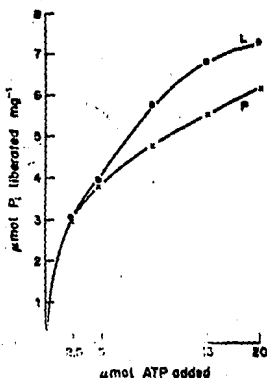


Fig. 3. ATPase activities exhibited by submitochondrial particles prepared from placenta and rat liver mitochondria. The incubation conditions were: 75 mM KCl; 7.5 mM Tris-HCl, pH 7.3; 1 mM phosphoenol pyruvate; 5 μg pyruvate kinase and 10 mM MgCl<sub>2</sub>. 1 mg of submitochondrial protein was added in a volume final of 2 ml. Temperature 30°C. Incubation time 10 min.

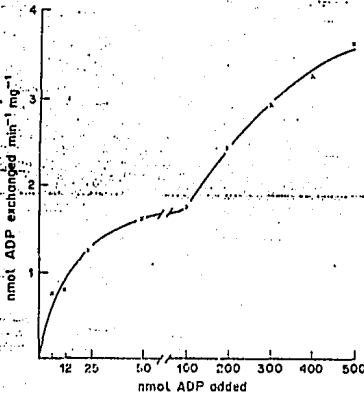


Fig. 4. Kinetics of the exchange of ADP in placental mitochondria. Adenine nucleotides exchange was measured as described in "Methods". 1 mg of mitochondrial protein was incubated in mixtures that contained 100 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 7.3; 10  $\mu$ g oligomycin and the indicated concentrations of [ $\gamma$ -adenosine-8- $^{14}$ C]diphosphate with a specific activity of 1000 cpm per nmol. After one minute of incubation time, 40  $\mu$ M atracyloside was added and 0.1 ml aliquot was passed through Millipore filter. Temperature 25°C. Final volume 1 ml.

The exchange of ATP (Fig. 5) showed a parallel behavior with that shown by ADP with a  $K_m$  of 48  $\mu$ M.

Atracyloside has been a useful tool for the study of adenine nucleotide translocase; considering this, the effect of this inhibitor on the ADP exchange in placental mitochondria was analyzed. The results from this experiment are shown in Fig. 6, atracyloside inhibits successfully the movement of ADP into mitochondria isolated from placenta with a  $K_i$  of 7.3  $\mu$ M.

The adenine nucleotide translocase is a membrane associated system. On this basis, the influence of temperature on the rate of ADP exchange was studied. This experiment, plotted in Arrhenius form (Fig. 7) indicates that placental mitochondria exhibit a lower activation energy than those reported for liver mitochondria at low temperatures, with the additional characteristic that no discontinuity is observed in the trace.

Considering also that the internal pool of adenine nucleotides may influence the extent of this exchange. (Human and Haynes, 1983) the intramitochondrial content of ADP and ATP was determined. The results shown in the Table I indicate that the pool size of these nucleotides in placenta mitochondria was close to that found in liver mitochondria, as previously reported (Pollak and Klingenberg, 1978).

Since internal calcium has been reported to be a factor influencing negatively the rate of adenine nucleotides exchange in mitochondria (Gómez-Puyou *et al.*, 1979), we measured the intramitochondrial calcium content and found moderately

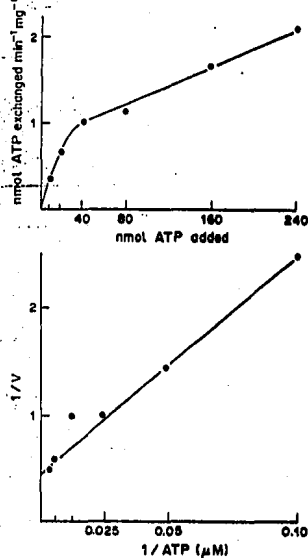


Fig. 5. Study of the kinetics of ATP exchange of placental mitochondria. 1 mg of protein from mitochondria was incubated in mixtures containing 100 mM KCl; 10 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 7.3; 10  $\mu$ g oligomycin and the indicated concentrations of [2,3,8- $^3$ H]ATP (specific activity: 3,000 cpm per nmol). After 1 min of incubation time, 48  $\mu$ M atracyloside was added and the ATP exchange was measured by Millipore filtration. Temperature 25°C. Final volume 1 ml.

higher levels of this divalent cation in placental mitochondria than in liver mitochondria (65 and 25 nmol  $\text{mg}^{-1}$ , respectively).

#### DISCUSSION

Aleksandrowicz (1980) has reported the isolation of F1-ATPase from human placenta. The hydrolysis of ATP by this protein is similar to F1-ATPase from rat liver, suggesting no structural differences between these proteins. This explains that SMP from human placenta reaches the same rate of ATP hydrolysis of SMP from liver (Fig. 3).

The main question arising from this fact is, why does not the adenine nucleotide translocase deliver the substrate for the ATPase in mitochondria?

Several reports related with the physiological regulation of the carrier must be considered. Experiments of Krämer and Klingenberg (1980a) indicate that the primary energy source for the translocation of ADP is the gradient from the mitochondrial electron transport. A smaller membrane potential produces a decrease in the transport of adenine nucleotides. In steroid tissues it has been reported that the electron

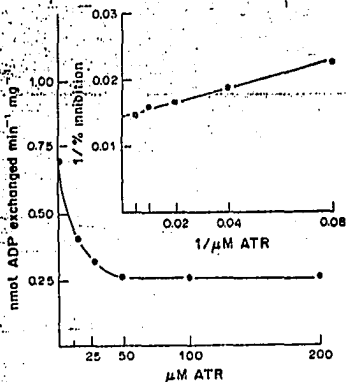


Fig. 6. Effect of atractyloside on the exchange of ADP in human placental mitochondria. The incubation medium contained: 100 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 7.3; 10  $\mu$ g oligomycin; [ $^{14}$ C]ADP 50 nmol and the indicated concentrations of atractyloside. Temperature 25°C. Final volume 1 ml.

flow through the adrenodoxine-Cytochrome P450 redox pathway is ineffective to build up a proton gradient (Lauquin *et al.*, 1973); therefore, during the active synthesis of steroids, the ADP uptake into the ATP-synthetase system is blocked. This could support the lower exchange of adenine nucleotides in placental mitochondria.

Also, since adenine nucleotide transport is an exchange-diffusion process, its rate must be directly related with the internal pool size of ADP and ATP (Hamman and Haynes, 1983). The amount of nucleotides founded in these mitochondria are not as great as to account for the dramatic lower exchange.

It is known that the rate of ADP transport depends markedly on temperature (Kemp *et al.*, 1969), which

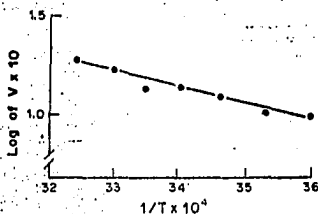


Fig. 7. Arrhenius plot for the effect of temperature on the rate of ADP exchange in placental mitochondria. 1 mg of protein was incubated in a basic medium: 100 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 7.3; 10  $\mu$ g oligomycin and 50 nmol [ $^{14}$ C]ADP. After an incubation period of 10 sec, at the indicated temperatures, the reaction was stopped by the addition of 40  $\mu$ M atractyloside. An aliquot of 0.1 ml was filtered through Millipore system. Final volume 1 ml.

Table 1. Intramitochondrial content of ADP and ATP

Mitochondrial source	nmol nucleotide mg <sup>-1</sup>		
	ATP	ADP	AMP
Placenta	1.24	5.78	1.09
Liver	3.34	7.63	3.0

20 mg of protein from the indicated mitochondria were precipitated by the addition of perchloric acid at a final concentration of 6%. The amount of intramitochondrial adenine nucleotides was determined as referred in the "Materials and Methods" Section.

is a direct consequence of the lipid environment in which the translocase is embedded. Experiments carried out by Krämer and Klingenberg (1980b), in a reconstituted system, showed that a specific composition of the phospholipid membrane is required to get optimal activity of the carrier. It has been reported that placental mitochondria possess a higher content in sphingomyelin (Pollow *et al.*, 1974; Chakraborti *et al.*, 1980).

Accordingly, it is plausible that the limited translocation rate of adenine nucleotides observed in placental mitochondria could be due to a diminution in membrane fluidity. This is sustained by the results presented in Fig. 7, that show the absence of a phase change in the range from 5 to 35°C.

The sensitivity shown by placental mitochondria to atractyloside reinforces that the lipid milieu of the membrane is the main factor responsible for the rate of exchange, since, as has been recognized, the inhibition induced by atractyloside depends on the solubilization of the hydrophobic moiety of the inhibitor in the lipid phase of the membrane (Vignais, 1976; Chávez *et al.*, 1978). The level of inhibition found in placenta indicates a different degree of membrane fluidity. The adenine nucleotides exchange shown in Fig. 7 when atractyloside concentration was zero, is lower than in the previous experiments. This result could be due to technical error, but it does not invalidate the interpretation of the result.

The relatively higher concentration of mitochondria, calcium content and vector contributing to the observed diminished rate of adenine nucleotide exchange as proposed by Gómez-Puyou *et al.* (1979).

It is important to note that mitochondria isolated from human placenta have a respiratory control of about 5, this indicates the integrity of their structure. Also it is important that experiments made with mitochondria purified by Ficoll gradient, showed results which were similar to those presented here.

Finally, the physiological relevance of the limited transport of ADP in placental mitochondria is better understood if we consider that a deficient supply of ADP to the F<sub>1</sub>-ATPase system would reinforce the shunt of substrates toward the adrenodoxine-Cyt P450 redox chain, which are necessary for the synthesis of progesterone in the placenta, reaching highest values, such as 800 mg per 24 hr, in pregnant women at term (Simpson and McDonald, 1981).

**Acknowledgements**—The authors are indebted to Ms Ingrid Mascher for revising the manuscript and Ms Yolanda Amador for typing this paper.

## REFERENCES

- Aleksandrowicz Z. (1980) Mitochondrial adenosine triphosphatase from human placenta—purification and catalytic properties. *Int. J. Biochem.* **11**, 165–175.
- Cammer W. and Estabrok R. W. (1967) Respirator activity of adrenal cortex mitochondria during steroid hydroxylation. *Archs Biochem. Biophys.* **122**, 721–734.
- Chakraborti A. S., Biswas R., Majumdar R. and Mukherjee M. (1980) Relationship between mitochondrial ATPase and membrane lipids from developing human placenta. *Gynecol. Obstet. Invest.* **11**, 294–309.
- Chávez E., Chávez R. and Carrasco N. (1978) The effect of agaric acid on citrate transport in rat liver mitochondria. *Life Sci.* **23**, 1423–1430.
- Gómez-Puyou A., Juana de Gómez-Puyou M., Klapp M. and Carafoli E. (1979) The effect of calcium on the translocation of adenine nucleotides in rat liver mitochondria. *Archs Biochem. Biophys.* **194**, 399–384.
- Hamman H. C. and Haynes R. C. Jr (1983) Elevated intramitochondrial nucleotides and mitochondrial function. *Archs Biochem. Biophys.* **223**, 85–94.
- Janovitz A., Chavez E. and Klapp M. (1976) Adenine nucleotide translocation in cauliflower mitochondria. *Archs Biochem. Biophys.* **173**, 264–268.
- Jawore K. D., Gruber W. and Bergmeyer H. U. (1974) *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 4, pp. 2101–2109 and 2127–2131. Verlag Chemie, Weinheim and Academic Press, New York.
- Kemp A. Jr, Groot G. S. P. and Reitsman J. J. (1969) Oxidative phosphorylation as a function of temperature. *Biochim. biophys. Acta* **180**, 28–34.
- Krämer R. and Klingenberg M. (1980a) Modulation of the reconstituted adenine nucleotide exchange by membrane potential. *Biochemistry* **19**, 556–560.
- Krämer R. and Klingenberg M. (1980b) Enhancement of reconstituted ADP, ATP exchange activity by phosphotidylethanolamine and by anionic phospholipids. *FEBS Lett.* **119**, 257–260.
- Lauquin G. and Vignais P. V. (1973) Adenine nucleotide translocation in yeast mitochondria. Effect of inhibitors of mitochondrial biogenesis on the ADP translocase. *Biochim. biophys. Acta* **305**, 534–556.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275.
- Moore C. and Jobais F. F. (1970) Some studies on the control of respiration in rat brain mitochondrial preparations. *Archs Biochem.* **138**, 295–305.
- Pfaff E. and Klingenberg M. (1968) Adenine nucleotide translocation of mitochondria. I. Specificity and control. *Eur. J. Biochem.* **6**, 66–79.
- Pfaff E., Klingenberg M. and Heldt H. W. (1965) Unspecific permeation and specific exchange adenine nucleotides in liver mitochondria. *Biochim. biophys. Acta* **104**, 312–315.
- Pollak J. K. and Klingenberg M. (1978) The adenine nucleotide translocator in foetal, suckling and adult rat liver mitochondria. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **80** (1), 193–198.
- Pollow J., Sokolowski G., Schmalbeck J. and Pollow B. (1974) Hydroxysteroid-oxidoreduktasen und ihre funktion als katalysatoren des spezifischen wasserstofftransfers zwischen steroidhormonen in humanplacenta. II. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **355**, s. 315–328.
- Simpson E. R. and McDonald P. C. (1981) Physiology of the placenta. *A. Rev. Physiol.* **43**, 163–188.
- Sumner J. B. (1944) A method for the colorimetric determination of phosphorus. *Science* **100**, 413–414.
- Vignais P. V., Vignais P. M., Lauquin G. and Morel F. (1973) Binding of adenosine diphosphate and an antagonist ligand to the mitochondrial ADP carrier. *Biochimie* **53**, 763–778.
- Vignais P. V. (1976) Molecular and physiological aspects of adenine nucleotide transport in mitochondria. *Biochim. biophys. Acta* **456**, 1–38.