

00381

52

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO



FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

PURIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES DEL SISTEMA DE
TRANSPORTE DE ENTRADA DE CALCIO EN MITOCONDRIAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

P R E S E N T A

M. en C. Ana Cecilia Zazueta Mendizábal

Director de tesis: Dr. Edmundo Chávez Cossio

202204



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS.

Este trabajo lo dedico a la memoria de mi padre y a mi familia:

A mi mamá, Martha, Gaby e Israel, que siempre me han alentado a continuar. A Carlos, Ale y Karlis por su confianza, paciencia y cariño incondicional. Gracias a todos ellos por ser mis más queridos compañeros.

Al Dr. Edmundo Chávez, mi más profundo agradecimiento, por su guía, consejos, enseñanzas y apoyo, que me han llevado a superarme y a obtener muchos logros y satisfacciones,

A mis compañeros de laboratorio por su entusiasta colaboración y por considerar que mis opiniones pueden ser valiosas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, que me otorgó beca durante el posgrado y que aportó financiamiento a este estudio a través del donativo 28666N.

Al Instituto Nacional de Cardiología, donde me he desarrollado profesionalmente y en el cual se llevó a cabo la presente investigación.

RESUMEN.

En este trabajo se presenta la purificación del uniportador que cataliza la entrada de calcio a la mitocondria. Se reconstituyó el transporte en vesículas de citocromo oxidasa, que en presencia de un sustrato oxidable pueden generar un potencial de membrana negativo interno. Las proteínas mitocondriales incorporadas en este sistema reconstituido conservan algunos de los atributos cinéticos y de regulación que operan en mitocondrias intactas. En la fracción más pura obtenida por isoelectroenfoque preparativo y que tiene una actividad específica de 14,888 nmol Ca^{2+} /mg proteína/5 min, se observan principalmente dos proteínas de 18-20 kDa y de 70 kDa. A partir de estas fracciones semipurificadas con actividad de transporte se produjeron anticuerpos policlonales capaces de inhibir el transporte en mitoplastos y en liposomas. Estos anticuerpos reconocieron a las dos proteínas mencionadas, en una mezcla de proteínas de partículas submitocondriales. Los anticuerpos específicos que reconocen a la proteína de 18-20 kDa inhiben en un 70% la actividad de transporte en mitoplastos.

Se caracterizó cinéticamente al complejo Ru360 y se confirmó que es el inhibidor más potente y específico del uniportador, lo sintetizamos a partir de su precursor radioactivo para utilizarlo como ligando de afinidad. Se purificó una proteína de 18 kDa, que puede ser la misma que reconocen los anticuerpos específicos y que se enriquece durante la purificación.

SUMMARY

The transporter that catalyzes calcium uptake into mitochondria was partially purified from rat kidney. The transport was reconstituted in cytochrome oxidase vesicles. This vesicles are capable to establish a negative inside membrane potential in presence of an oxidizable substrate. When mitochondrial proteins were incorporated into the vesicles, calcium uptake was reconstituted with kinetic and regulation attributes that characterizes the mitochondrial calcium uniporter. The purest fraction was obtained by preparative isoelectrofocusing, with a specific activity of 14,888 nmol Ca^{2+} /mg/5 min. This fraction contained two main bands, one of 18-20 kDa and other protein of 70 kDa. Polyclonal antibodies were obtained from this semipurified fraction. The antibodies inhibited calcium uptake in mitoplasts and in the reconstituted system. The antibodies that recognized the low molecular weight protein inhibited calcium uptake by 70% in mitoplasts. The kinetic properties of the mitochondrial calcium uptake inhibitor Ru360, were evaluated. It was proved that its a potent and specific transport inhibitor. It was synthesized from a radioactive precursor in order to use it as an affinity ligand. By this approach we purify a 18 kDa protein, that may be the same that the specific antibodies recognizes and that is enriched during the purification scheme.

RESUMEN

En este trabajo se presenta la purificación del uniportador que cataliza la entrada de calcio a la mitocondria. Se reconstituyó el transporte en vesículas de citocromo oxidasa, que en presencia de un sustrato oxidable pueden generar un potencial de membrana negativo interno. Las proteínas mitocondriales incorporadas en este sistema reconstituido conservan algunos de los atributos cinéticos y de regulación que operan en mitocondrias intactas. En la fracción más pura obtenida por isoelectroenfoque preparativo y que tiene una actividad específica de 14,888 nmol Ca^{2+} /mg proteína/5 min, se observan principalmente dos proteínas de 18-20 y 70 kDa. A partir de las fracciones semipurificadas con actividad de transporte se produjeron anticuerpos policlonales capaces de inhibir el transporte en mitoplastos y en liposomas. Estos anticuerpos reconocen a las dos proteínas mencionadas, en una mezcla de proteínas de partículas submitocondriales. Los anticuerpos específicos que reconocen a la proteína de 18-20 kDa inhiben en un 70% la actividad de transporte en mitoplastos.

Se caracterizó cinéticamente al complejo Ru_{360} y se confirmó que es el inhibidor más potente y específico del uniportador; lo sintetizamos a partir de su precursor radioactivo para utilizarlo como ligando de afinidad. Se purificó una proteína de 18 kDa, que puede ser la misma que reconocen los anticuerpos específicos y que se enriquece durante la purificación.

ABREVIATURAS

ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
$[Ca^{2+}]_c$	Concentración de calcio en el citosol
$[Ca^{2+}]_m$	Concentración de calcio mitocondrial
$C_{12}E_8$	Mono-dodeciloctaelenglicol
CCCP	Carbonil metacloro cianuro fenil hidrazona
COV's	Vesículas de citocromo oxidasa
CHAPS	Colamido propil dimetil amonio-1-propano sulfonato
EDTA	Acido etilen diamino tetraacético
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas
HEPES	Hidroximetil piperazina etano sulfonato
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TEA	Trietanolamina
TMPD	Tetrametilfenilendiamina
TRIS	Tris-hidroximetil amino metano
TWEEN 20	Polioxietilen sorbitan monolaurato
$\Delta\phi$	Potencial transmembranal

CONTENIDO

I. INTRODUCCION	6
1. TRANSPORTE DE CALCIO EN MITOCONDRIAS	6
2. IMPORTANCIA DEL TRANSPORTE DE CALCIO MITOCONDRIAL.....	6
3. EL UNIORTADOR DE CALCIO MITOCONDRIAL.....	10
3.1. Dependencia del transporte de entrada de calcio por el potencial transmembranal.	11
3.2. Dependencia del uniortador por la concentración de calcio.....	12
3.3. Dependencia del uniortador a la temperatura.....	12
4. AVANCES EN LA PURIFICACION DEL UNIORTADOR DE CALCIO.....	13
II. ANTECEDENTES	15
III. OBJETIVOS	17
IV. METODOLOGIA	18
1. OBTENCIÓN DE MITOCONDRIAS	18
2. SOLUBILIZACION DE PROTEINAS MITOCONDRIALES	18
2.1. Obtención de extractos semipurificados	19
3. PREPARACION DE LIPOSOMAS	20
3.1. Incorporación de citocromo oxidasa (COVs)	21
3.2. Incorporación de extractos mitocondriales a COVs	21
3.3. Determinación del transporte de calcio en liposomas	22
4. OBTENCIÓN DE SUEROS HIPERINMUNES	23

4.1. Inhibición de la entrada de calcio por anticuerpos.....	23
4.1.1. Preparación de mitoplastos	23
4.1.2. Ensayos de inhibición en mitoplastos y en vesículas de citocromo oxidasa.....	23
4.2. Inhibición del transporte de calcio por anticuerpos específicos.	24
4.3 Purificación de las inmunoglobulinas AntiUni-Ca ²⁺ y unión a resina de sefarosa activada con hidrazina.....	25
4.3.1. Purificación de las fracciones precipitadas con sulfato de amonio por cromatografía de afinidad.....	25
5. PURIFICACION POR ISOELECTROENFOQUE PREPARATIVO	25
6. SINTESIS DEL COMPLEJO BINUCLEAR ¹⁰³ Ru ₃₆₀	26
6.1. Transporte de calcio en presencia del inhibidor Ru ₃₆₀	27
6.2. Unión del complejo binuclear ¹⁰³ Ru ₃₆₀ a mitocondrias intactas..	28
6.3. Cromatografía de intercambio iónico de las proteínas marcadas con ¹⁰³ Ru ₃₆₀	28
V. RESULTADOS	30
1. TRANSPORTE DE CALCIO EN VESICULAS DE CITOCROMO OXIDASA.....	30
2. INHIBICION DEL TRANSPORTE DE CALCIO POR ANTICUERPOS...40	
3. PURIFICACION POR ISOELECTROENFOQUE PREPARATIVO.....	52
4. EL INHIBIDOR ¹⁰³ Ru ₃₆₀ COMO LIGANDO DE AFINIDAD.....	56

VI. DISCUSION.....	69
VII. CONCLUSIONES	80
VIII. PERSPECTIVAS	81
IX. REFERENCIAS	83
X. APENDICE	98

I. INTRODUCCION

1. TRANSPORTE DE CALCIO EN MITOCONDRIAS.

En mitocondrias, el sistema de transporte de calcio está compuesto por un mecanismo de entrada y dos de salida: el de entrada, a través de un uniportador electroforético, facilita el movimiento del calcio a favor de su gradiente electroquímico y no requiere de otra molécula o ion que lo acompañe. La fuerza que impulsa la captación de este ion es el potencial transmembranal que se mantiene a través del bombeo de protones durante la hidrólisis del ATP, o es mediado por el sistema de transporte de electrones que está acoplado a la oxidación de sustratos de la cadena respiratoria. La salida de calcio se lleva a cabo mediante un mecanismo de intercambio con Na^+ o con H^+ (Gunter y Pfeiffer, 1990). Existe otro sistema de transporte que involucra una permeabilidad generalizada de la membrana a iones (que incluye al calcio) y otras moléculas pequeñas, al que se ha denominado "transición de la permeabilidad" (Figura 1).

2. IMPORTANCIA DEL TRANSPORTE DE CALCIO MITOCONDRIAL

Para que el calcio intramitocondrial actúe como un mediador en el metabolismo energético, la mitocondria debe responder a cambios en la concentración de calcio en el citoplasma ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) bajo condiciones fisiológicas. Aun existe controversia sobre este punto; la principal razón, es que casi la totalidad de los datos existentes sobre la cinética del uniportador, de su modulación por Mg^{2+} , por

el potencial transmembranal, la fuerza iónica y muchos otros parámetros, se hicieron bajo condiciones muy diferentes de aquellas que ocurren *in situ*. Otra razón que impide la predicción de la captación de calcio mitocondrial *in vivo*, es que no se conoce el estado de activación del uniportador *in vivo*.

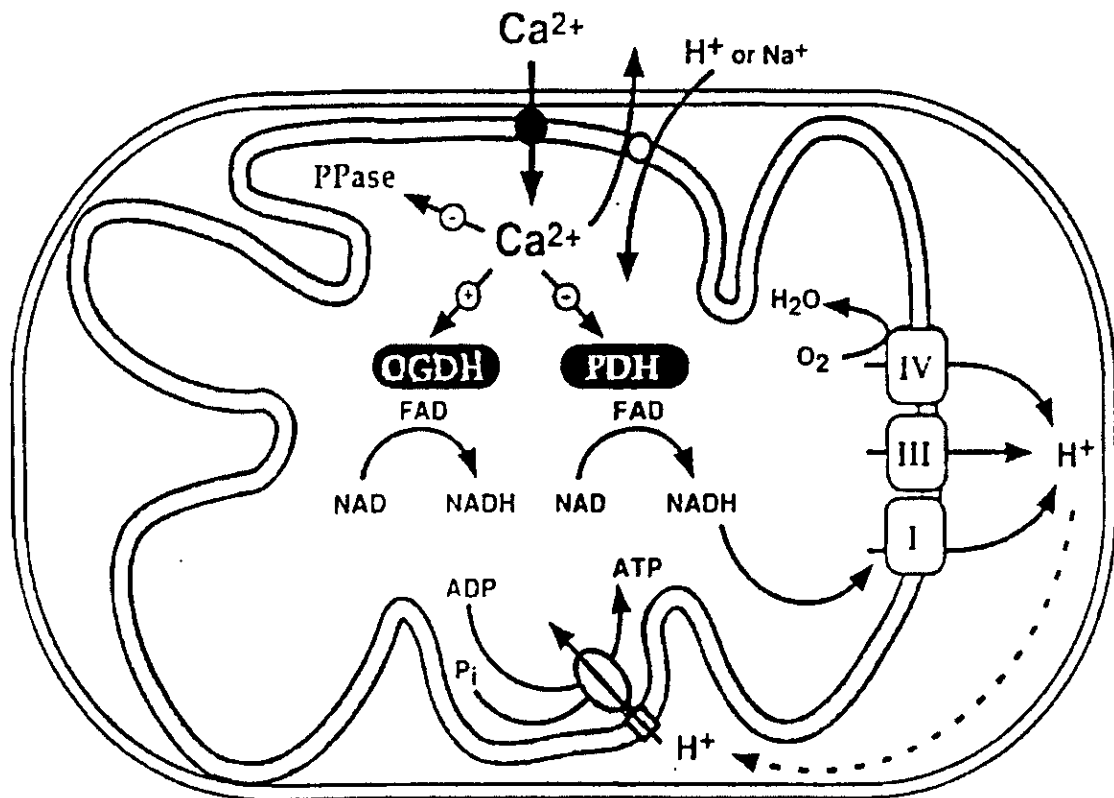


Figura 1. Transporte de calcio mitocondrial. El Ca^{2+} entra a la mitocondria electroforéticamente a través del uniportador de calcio mitocondrial (●) en respuesta al potencial de membrana generado por el bombeo de protones de la cadena respiratoria (I,III,IV) y sale en intercambio con Na^+ o H^+ a través de acarreadores específicos (○). Dentro de la matriz mitocondrial la $[\text{Ca}^{2+}]$ regula la actividad de la enzimas del ciclo de Krebs, i.e. OGDH (oxoglutarato deshidrogenasa) y PDH (piruvato deshidrogenasa) e inhibe a la PPasa (pirofosfatasa).

El uniportador es un mecanismo de segundo orden, activado por Ca^{2+} y otros iones (Vinogradov, A., y Scarpa, A., 1973). Cuando se activa a una $[\text{Ca}^{2+}]$ dada, la velocidad de entrada de calcio se incrementa en un orden de magnitud. Ya que la asociación y disociación del sitio de activación parece ser lenta (de segundos a minutos) (Kröner, H., 1986), es difícil estimar el grado de activación del uniportador durante una secuencia de pulsos bajo condiciones fisiológicas. La captación real de calcio podría ser hasta de un orden de magnitud menor si el uniportador no estuviera activado y aún menor si se considera la posible inhibición ejercida por concentraciones fisiológicas de magnesio.

Se ha estudiado la entrada de pulsos de calcio en mitocondrias aisladas y en células completas. Sparagna y cols., (1995) utilizando espectroscopía de fluorescencia, midieron la entrada de calcio en mitocondrias de hígado controlando los pulsos de calcio. Determinaron que durante cada pulso, las mitocondrias son capaces de secuestrar cantidades significativas del catión, aún a concentraciones de 200 nM. Por otro lado se ha intentado medir en células completas la captación de calcio mitocondrial con indicadores fluorescentes (fura-2 o indo-1), para determinar si la $[\text{Ca}^{2+}]_m$ puede actuar como un regulador metabólico. En 1991, Hansford y colaboradores midieron por primera vez, la $[\text{Ca}^{2+}]_m$ en miocitos cardiacos de rata, utilizando el indicador indo-1. Encontraron que en células no estimuladas la $[\text{Ca}^{2+}]_m$ es alrededor de 100 nM y en presencia de norepinefrina se eleva hasta 600 nM. El grupo de Rizzuto (1992a) utilizó una técnica muy novedosa para medir la concentración de calcio mitocondrial en

condiciones de reposo y después de una estimulación hormonal. Fusionó el DNA complementario de la fotoproteína aequorina sensible a calcio con la secuencia que codifica para la subunidad VII de la citocromo c oxidasa de humano. El cDNA híbrido fue transfectado a células endoteliales, que expresaron la fotoproteína asociada a las mitocondrias. Al estimular con histamina los canales sensibles a IP_3 , observaron que la $[Ca^{2+}]_c$ aumentó de 100 nM a aproximadamente 500 nM, elevación seguida de un aumento en los niveles de la $[Ca^{2+}]_m$ de 200 nM hasta 5 μ M. Los autores proponen la existencia de microambientes citosólicos con $[Ca^{2+}]$ de hasta 10 μ M, en donde las mitocondrias se encuentran íntimamente asociadas con los canales de liberación de calcio del retículo endoplásmico. Las mitocondrias captarían grandes cantidades de calcio, cada vez que éste ion se liberara del retículo en respuesta a una estimulación hormonal (Rizzuto, 1992b).

Existen muchos reportes de la activación por calcio de diferentes procesos metabólicos, que incluyen las deshidrogenasas asociadas con el ciclo de los ácidos tricarbónicos (Hansford, 1991; Rutter y Denton, 1988), el transporte de electrones (Halestrap, 1987), la F_1 ATPasa (Yamada, 1989) y el translocador de adenín nucleótidos (Moreno-Sánchez, 1985). La regulación metabólica del calcio se extiende más allá de las fronteras mitocondriales: a concentraciones citosólicas del rango de micro a milimolar, se altera la estructura de ácidos nucleicos y ciertas proteínas (Farber, 1990), a más bajas concentraciones, puede interferir en el control de cinasas que requieren $ATP-Mg^{2+}$ (Blackshear y cols., 1988) y puede activar proteasas o fosfolipasas dependientes de calcio. Actualmente se

considera que el papel principal del transporte de calcio mitocondrial es secuestrar el Ca^{2+} citosólico para activar los procesos metabólicos mitocondriales Ca^{2+} -dependientes y controlar la $[\text{Ca}^{2+}]_m$. Una función secundaria sería la de proteger el citosol contra la hipercalcemia en condiciones patológicas.

3. EL UNIORTADOR DE CALCIO MITOCONDRIAL

El uniportador de calcio es responsable de la captación de este ion hacia la matriz, así como de otros iones con diferente selectividad: Sr^{2+} (Carafoli, 1965); Mn^{2+} (Gunter y Pfeiffer, 1975); Ba^{2+} (Vainio, 1970); Cd^{2+} (Chávez y cols., 1985); Fe^{2+} (Romsli, 1973), Pb^{2+} (Vainio y cols., 1970) y lantánidos (Reed y Bygrave, 1974). El Mg^{2+} disminuye la entrada de calcio, mientras que la espermina puede activar o inhibir la entrada, dependiendo de la concentración (Lenzen, 1992). El uniportador es un mecanismo cooperativo, en el cual la unión de Ca^{2+} al sitio de activación, incrementa la velocidad de entrada de Ca^{2+} que se ha unido al sitio de transporte (Vinogradov, 1973). La mayoría de los iones que son transportados por el uniportador, actúan como inhibidores competitivos del transporte; el Mg^{2+} y las poliaminas no se transportan a través del uniportador, pero su unión a éste o a un sitio cercano activa o inhibe el transporte. Los policationes rojo de rutenio (Moore, 1971; Reed and Bygrave, 1974), cobalto de hexamina (Tashmukhamedov y cols., 1972) y el Ru_{360} (Ying y cols., 1991), se encuentran entre los inhibidores más potentes del transportador. Algunos agentes farmacológicos como los anestésicos locales, drogas cardioactivas y los β -bloqueadores también inhiben al

uniportador. Mela (1969) y Reed y Bygrave (1974) titularon la actividad del uniportador utilizando rojo de rutenio, para estimar la concentración máxima posible de uniportador, asumiendo que una molécula de rojo de rutenio se une a una molécula de uniportador. Mela concluyó que el uniportador está presente a una concentración no mayor de 0.01 nmol/mg proteína; mientras que Reed y Bygrave fijan como límite superior 0.001 nmol/mg de proteína.

3.1. Dependencia del transporte de entrada de calcio por el potencial transmembranal.

Wingrove y colaboradores (1984) demostraron que la velocidad del transporte de calcio es una función del potencial transmembranal. Ajustaron sus resultados con una distribución de tipo Nernst bajo condiciones de equilibrio. En estas condiciones este tipo de distribución es la que termodinámicamente se requiere para el transporte a través de un uniportador (Gunter y Gunter, 1994). El mejor ajuste de sus datos lo obtuvieron con la función $[e^{\Delta\phi/2} \Delta\phi/2] / [\sinh \Delta\phi/2]$, en donde $\Delta\phi = zF\Delta\Psi/RT$. Esta reacción se derivó a partir de premisas idénticas a las que se requieren para la derivación de la ecuación de flujo constante de Goldman (Gunter and Gunter, 1994); esto es, si el campo eléctrico a través de la membrana es constante, el flujo es independiente de la posición a través de la membrana y los iones se mueven a favor de su gradiente electroquímico a través de difusión electroquímica. De aquí que esos resultados indican que el uniportador transporta calcio a favor de su gradiente electroquímico.

3.2. Dependencia del uniportador por la concentración de calcio.

El uniportador es un mecanismo de transporte rápido, el coeficiente de Hill para el transporte de entrada es cercano a 2, de manera que la dependencia del transporte por la concentración se describe con una ecuación de Hill de segundo orden, lo que indica cooperatividad positiva. El grado de cooperatividad varía con las condiciones estudiadas, particularmente con la fuerza iónica, la temperatura y la $[Mg^{2+}]$ (Akerman, 1977; Crompton y cols., 1976). Vinogradov y Scarpa (1973) encontraron que pequeñas cantidades de Ca^{2+} o Pr^{3+} causan que se pierda la sigmoidicidad en la entrada de Mn^{2+} a través del uniportador. Estos datos se han interpretado en el sentido de que el uniportador posee un sitio de activación y un sitio de transporte. La unión del Ca^{2+} o del Pr^{3+} al sitio de activación disminuye la energía de activación que se necesita para el transporte, o disminuye la K_d para que se de la unión al sitio de transporte. Los valores más aceptados para la K_m son de 10-20 mM, mientras que el valor de V_{max} para mitocondrias de hígado, independiente del potencial transmembranal es de 600-900 nmol/min/mg (Gunter y Gunter, 1994).

3.3. Dependencia del uniportador a la temperatura.

El proceso de transporte de calcio comprende un paso de activación, además de los pasos de asociación, translocación y liberación característicos de los acarreadores. Si la translocación es el paso limitante en el proceso, entonces la

dependencia de la velocidad del transporte a la temperatura, será la medida de la energía de activación de dicha fase. Åkerman en 1977 calculó la energía de activación para el uniportador de calcio a diferentes temperaturas, a partir de una curva tipo Arrhenius (log de la velocidad vs $1/T$) en un medio con sacarosa y encontró que es de 40 kJ/mol. En un medio de KCl el valor para la energía de activación se incrementó a 70 kJ/mol. Para definir si el paso limitante en la velocidad del proceso es la translocación o el mantenimiento del $\Delta\phi$, Bragadin y cols., 1979 utilizaron potasio en presencia de valinomicina en lugar de sustratos, para formar el potencial transmembranal. De este modo, calcularon una energía de activación de 41 kJ/mol en un medio de sacarosa, que resultó prácticamente igual a la que se obtuvo utilizando succinato, lo que sugiere que este valor corresponde a la fase de translocación del transporte.

4. AVANCES EN LA PURIFICACION DEL UNIORTADOR DE CALCIO

La identidad molecular del uniportador de calcio no se ha definido, a pesar del gran esfuerzo que en este sentido han desarrollado muchos laboratorios. Los trabajos pioneros en el campo, buscaban extraer proteínas mitocondriales que unieran calcio con alta afinidad (Evtodienko, 1971; Lenhinger, 1971; Gómez-Puyou y cols., 1972); más tarde se intentó asociar al uniportador con componentes mitocondriales que contuvieran carbohidratos, asociación que resultó del descubrimiento del rojo de rutenio como inhibidor del transporte. Destacan los trabajos de Carafoli (1972); Sottocassa (1974) y más recientemente

de Mironova y cols. (1982). Este grupo aisló dos proteínas, de 40 kDa y 2 kDa, a partir de extractos de etanol de mitocondrias de corazón de res, que incrementaban la conductividad en membranas lipídicas de bicapa, sensible a rojo de rutenio. La proteína de 40 kDa resultó ser una glicoproteína del suero que contaminaba las preparaciones mitocondriales, mientras que el péptido de 2 kDa parece ser el responsable del aumento en la conductividad en ese sistema (1994). En nuestro laboratorio hemos conseguido reconstituir el transporte de calcio a partir de proteínas mitocondriales de riñón de rata en liposomas reconstituidos con citocromo oxidasa (Zazueta, 1991).

II. ANTECEDENTES

Existe una gran cantidad de conocimientos sobre los aspectos de regulación por calcio en el metabolismo celular; sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con otros transportadores, todo lo que se sabe del sistema de transporte de entrada de calcio mitocondrial ha derivado de estudios de bioquímica clásica.

La falta de información molecular de la entidad que permite que el calcio atraviese la membrana interna mitocondrial, nos ha llevado a intentar identificar estos componentes, que no han podido ser plenamente identificados a pesar de que el proceso de transporte se describió hace más de 30 años (DeLuca, 1961; Vasington, 1962).

Como ya se ha señalado, muchos grupos de investigación han abordado esta tarea, sin que a la fecha se haya conseguido la demostración concluyente de que alguna de las proteínas que se han señalado como el uniportador de calcio lo sea realmente. En nuestro laboratorio hemos conseguido reconstituir el sistema de entrada de calcio en un modelo *in vitro*. Para ello utilizamos liposomas a los que se incorporó el complejo IV de la cadena respiratoria (citocromo oxidasa), estas vesículas, a las que denominamos COVs son capaces de generar un potencial negativo interno (Rosier y Gunter, 1980). Bajo estas condiciones incorporamos extractos mitocondriales de riñón de rata y observamos que existe una acumulación de calcio dependiente de la formación de un potencial membranal, selectivo para cationes divalentes (transporta calcio y estroncio, pero no magnesio) y que se inhibe por rojo de rutenio (Zazueta y cols., 1991).

Estos antecedentes nos condujeron a intentar la purificación del uniportador de calcio. Como parte de la estrategia para aislarlo, utilizamos fracciones mitocondriales semipurificadas por precipitación con sales, para la obtención de anticuerpos policlonales, con los que se construyó una columna de inmunoafinidad (Zazueta y cols., 1994). A partir de esta columna pudimos obtener las proteínas que los anticuerpos reconocen y separarlas por técnicas de isoelectroenfoque preparativo. También utilizamos al inhibidor $^{103}\text{Ru}_{360}$, como sonda radioactiva con el fin de identificar a tan evasiva molécula (Zazueta y cols., 1998).

III. OBJETIVOS

- Aislar los componentes del sistema de transporte de entrada de calcio de mitocondrias.
- Reconstituir el transporte en un modelo membranar simple: COV's
- Obtener anticuerpos específicos contra estas fracciones que inhiban la captación de calcio *in situ*.
- Identificar a la proteína involucrada en el transporte utilizando el inhibidor $^{103}\text{Ru}_{360}$.

IV. METODOLOGIA:

1. OBTENCION DE MITOCONDRIAS Y DE PARTICULAS SUBMITOCONDRIALES .

Las mitocondrias se obtuvieron por centrifugación diferencial a partir de riñón de rata o de corazón de res, en un medio de separación que contenía: 250 mM de sacarosa, 10 mM de TRIS y 1 mM de EDTA, pH 7.3. La homogeneización fue manual para el tejido de riñón y con Politron para el de corazón. La primera centrifugación fue a 2,500 RPM durante 10 min, se recuperó el sobrenadante y se obtuvieron las mitocondrias tras centrifugar a 10,000 RPM durante 10 min. El precipitado se resuspendió en 250 mM sacarosa, 10 mM de TRIS y 0.1% de albúmina pH 7.3. Finalmente se centrifugaron a 10,000 RPM durante 10 min y se resuspendieron en el mismo amortiguador (sin albúmina), a una concentración de aproximadamente 30 mg/ml (Chávez y cols., 1985). Las mitocondrias de corazón de res no se incubaron con albúmina.

De ambas preparaciones obtuvimos partículas submitocondriales siguiendo el método de Lee y Ernster (1965).

2. SOLUBILIZACION DE PROTEINAS MITOCONDRIALES.

Para solubilizar las partículas submitocondriales se utilizó colato de sodio a una concentración de 1.2% en el buffer de extracción. Se incubaron en esta mezcla a 4°C durante 1 hora con agitación constante. El material no solubilizado, se

eliminó por ultracentrifugación a 40,000 RPM (45 min). A los sobrenadantes se les determinó proteína por el método de biuret (Gornall, 1949).

2.1 Obtención de extractos semipurificados

Las muestras solubilizadas se precipitaron con sulfato de amonio. La primera aproximación fue llevar a un 50% de saturación y recuperar las proteínas por centrifugación a 10,000 RPM durante 10 min; el sobrenadante se llevó a un 90% de saturación y se centrifugó a 12,000 RPM durante 20 min a 4°C. A estas fracciones se les denominó F₅₀ y F₉₀ respectivamente.

Intentamos reducir estos rangos y se fraccionó con sulfato de amonio a 25% de saturación, a 40% de saturación y a 60% de saturación. Las fracciones que se obtuvieron tras las precipitaciones, se dializaron contra KH₂PO₄ 50 mM, pH 7.0, se les determinó proteína y se reconstituyeron en liposomas para medir su capacidad de transportar calcio a través de una membrana lipídica.

Estos liposomas debían poseer un ambiente electronegativo en su interior, para funcionar como modelo en las determinaciones de transporte (Figura 2). Para ello incorporamos a los liposomas la enzima citocromo oxidasa, que en presencia de su sustrato y de un donador de electrones: citocromo c y el par ascorbato/TMPD, bombea protones hacia fuera de la vesícula, con lo que ésta queda con un exceso de cargas negativas en el interior y puede soportar la captación electroforética del calcio (Rosier y Gunter, 1980).

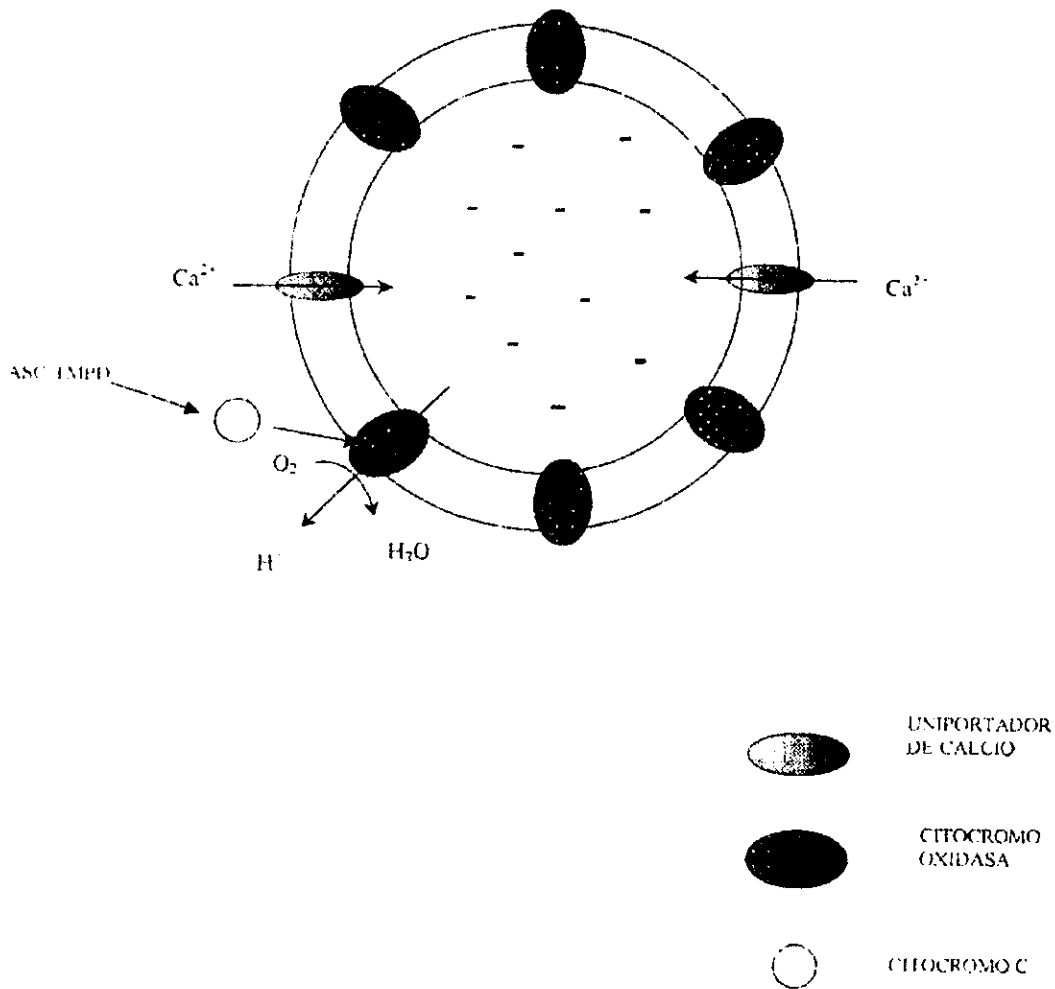


Figura 2. Vesículas de citocromo oxidasa. En presencia de un sustrato oxidable y citocromo c, la citocromo oxidasa genera un potencial negativo en COVs. El calcio se acumulará en respuesta a este potencial si se ha incorporado también un sistema de transporte en la membrana de las vesículas.

3. PREPARACION DE LIPOSOMAS

Utilizamos lecitina de soya, lavada con acetona (Kagawa y Racker, 1971) a una concentración final de 30-40 mg/ml. La lecitina lavada, se mantuvo disuelta

en éter con un ambiente de nitrógeno y α -tocoferol como antioxidante. Para cada incorporación se tomó la cantidad requerida y se evaporó el éter con una corriente de nitrógeno. Se agregó KH_2PO_4 50 mM, pH 7.0 para solubilizar los lípidos y se sonicaron a claridad a 4 °C, con pulsos alternados de reposo en un sonicador de vástago Soniprep 150.

3.1 Incorporación de citocromo oxidasa.

La incorporación de la enzima fue por simple dilución: a 1 ml de suspensión de fosfolípidos sonicados, se les agregó 250 μg de citocromo oxidasa en buffer de fosfatos + TWEEN 20 al 0.5%. La incorporación se obtuvo tras incubar la mezcla a 30°C durante 15 minutos (Ramírez y cols., 1987).

Los proteoliposomas se congelaron en nitrógeno líquido y se descongelaron lentamente para obtener liposomas más grandes, que denominamos COV (CYTOCHROME OXIDASE VESICLES).

3.2 Incorporación de extractos mitocondriales a COVs.

Las proteínas mitocondriales disueltas en 1% de colato de sodio en buffer de fosfatos 50 mM, pH 7.0, se agregaron a las vesículas de citocromo oxidasa (0.5 mg proteína:7.5 mg fosfolípido). Se sonicaron brevemente, de 3-5 segundos y se dializaron contra 250 volúmenes de KH_2PO_4 50 mM, pH 7.0 (2 o 3 cambios) durante toda la noche.

3.3 Determinación del transporte de calcio en liposomas.

Se corrieron dos series de determinaciones por ensayo: Para la serie control, los liposomas con proteína mitocondrial incorporada se llevaron a un medio de H_3PO_4 50 mM/TEA pH 7.0, que contenía 0.5 mM de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (act. esp. 1000 cpm/nmol) y para la serie experimental además de lo anterior, se agregaron los sustratos de la citocromo oxidasa: 6 mg de citocromo c, 0.75 mM de Ascorbato y 0.075 mM de TMPD. Las muestras se incubaron a 30°C durante los tiempos indicados, se precipitaron con sulfato de protamina (Rosier y cols., 1979), se filtró una alícuota a través de un filtro Millipore de 0.45 μm y se cuantificó la radioactividad en un contador de centelleo. Los valores netos de transporte, se obtuvieron tras restar los valores del control (sin energía) de los obtenidos en los liposomas que generan un potencial negativo interno (con energía = sustratos).

Las determinaciones de proteína se hicieron por el método de Lowry (1951) y los análisis de las fracciones por medio de electroforesis, según lo descrito por Laemmli (1979).

4. OBTENCIÓN DE SUEROS HIPERINMUNES

Se inmunizaron ratones hembra de la cepa Balb-c intraperitonealmente, con 40 μg de la fracción semipurificada (F90) emulsificada en coadyuvante completo de Freund, seguidas por refuerzos de 30 μg cada tres semanas en coadyuvante incompleto de Freund. El título de cada uno de los sueros se evaluó por separado con el ensayo de ELISA (enzyme-linked immunoabsorbent assay). Los sueros más activos se

conservaron en alícuotas a -20°C (Anti-UniCa²⁺). La especificidad del antisuero hacia los componentes de la F₉₀ se evaluó por Western blot.

4.1 Inhibición de la entrada de calcio por anticuerpos.

La inhibición de la entrada de calcio en mitocondrias se determinó en dos sistemas: en mitoplastos y en liposomas de citocromo oxidasa incorporados con proteínas mitocondriales.

4.1.1 Preparación de mitoplastos.

Los mitoplastos se prepararon agregando digitonina 1.2% (w/v) por cada 10 mg de proteína mitocondrial. La suspensión se incubó durante 10 minutos y se centrifugó a 15,000 g durante 10 minutos. Los mitoplastos se resuspendieron en sacarosa 250 mM/ TRIS 10 mM, pH 7.3. Se midió la actividad de la monoamino oxidasa (enzima marcadora de la membrana externa mitocondrial) por el método de Schnaitman y Greenwalt (1968).

4.1.2 Ensayos de inhibición en mitoplastos y en vesículas de citocromo oxidasa.

Los sueros hiperinmune (Anti-UniCa²⁺) y preinmune se incubaron con 1 mg de mitoplastos o con 50 μl de liposomas durante 10-30 minutos a 4°C . Finalizada la incubación, los mitoplastos se agregaron a un medio que contenía sacarosa 250 mM, succinato 10 mM, HEPES 10 mM, CaCl₂ 50 μM ; ADP 200 μM , rotenona 10 μg , Pi 1 mM y Arsenazo III 50 μM . La captación de calcio se midió con un espectrofotómetro

de doble haz a 685-675 nm. Alternativamente el transporte de calcio se determinó por el método de filtración utilizando $^{45}\text{CaCl}_2$ (act. esp. 1000 cpm/nmol). En el caso de las vesículas de citocromo oxidasa, la determinación del transporte se hizo como se menciona en el apartado 3.3.

4.2. Inhibición del transporte de calcio por anticuerpos específicos.

Se obtuvieron los anticuerpos específicos que reconocieron a las proteínas en un Western blot y cuya detección se llevó a cabo con diaminobenzidina: la fracción semipurificada F_{90} se corrió en un gel preparativo y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa que se incubó con una dilución 1:800 del suero hiperinmune. Se cortaron los dos extremos y se reservó la parte central de la membrana. Las tiras se incubaron con un segundo anticuerpo conjugado a peroxidasa y se revelaron con diaminobenzidina. Las zonas en donde los anticuerpos reconocieron proteínas se empalmaron con la parte central de la membrana y se hicieron cortes transversales. Estos nuevos cortes fueron sometidos a una técnica de elución ácida, incubando en 2 ml de glicina 0.1 M pH 3. Después de 30 segundos el pH se ajustó a 7.0 con KOH.

Los anticuerpos específicos así recuperados, se incubaron durante 10 minutos a 4°C con 1 mg de mitoplastos y ambos se agregaron al medio para transporte de calcio, en presencia de $^{45}\text{CaCl}_2$, como se describió anteriormente. Después de 1 minuto, se tomaron alícuotas y se midió la radioactividad en un contador de centelleo.

4.3. Purificación de las inmunoglobulinas AntiUni-Ca²⁺ y unión a una resina de sefarosa activada con hidrazina.

Las inmunoglobulinas se purificaron por cromatografía de afinidad con una columna de proteína A. Las IgG's se acoplaron a una resina de sefarosa, por medio de un enlace hidrazona entre el grupo funcional hidrazina de la resina y los carbohidratos de la fracción constante de las IgG's.

4.3.1. Purificación de las fracciones precipitadas con sulfato de amonio por cromatografía de afinidad.

La fracción F₉₀ se dializó para eliminar el exceso de sales y se pasó a través de la columna de inmunoafinidad previamente equilibrada con TRIS 10 mM, CHAPS 0.1%, pH 7.5. Para eluir las proteínas unidas a la columna se utilizó citrato de sodio 150 mM, CHAPS 0.3%, pH 5.5.

5. PURIFICACION POR ISOELECTROENFOQUE PREPARATIVO.

Al recuperar el equivalente a 3 mg de proteína de la columna de inmunoafinidad, se cargó la celda preparativa de isoelectroenfoque en presencia de CHAPS 0.3% y 0.5 ml de anfolitos (rango de pH 5-8), aforando a 55 ml con agua bidestilada. El proceso de isoelectroenfoque se mantuvo durante 5-7 horas (Volts/hora= 4500) a 12 W y a 4°C. Una vez establecido el equilibrio, se mantuvieron constantes los valores en todas las separaciones. Se recuperaron 20

fracciones por corrida y se les determinó el pH. Las fracciones se concentraron y dializaron. Se determinó proteína por el método de Lowry modificado (Nakamura y cols., 1983). Cada una de las fracciones se incorporó en liposomas y se midió el transporte de calcio, utilizando $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Se analizaron los perfiles electroforéticos de las fracciones tiñendo los geles de acrilamida con plata. También se evaluó la afinidad de los anticuerpos hacia las proteínas separadas por su punto isoeléctrico.

6. SINTESIS DEL COMPLEJO BINUCLEAR $^{103}\text{RU}_{360}$

La síntesis de este compuesto se basa en el método de preparación del rojo de rutenio descrito por Fletcher en 1961. El producto se purificó por cromatografía de intercambio iónico siguiendo la modificación reportada por Ying y colaboradores (1991). Se disolvieron 2.5 mg de $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ en 0.015 ml de HCl 6N + 2 μl de etanol absoluto, entonces se agregaron 0.30 ml de $^{103}\text{RuCl}_3$ (equivalentes a 1 mCi). Se mantuvo en baño maría a 90°C durante 1 hora. Transcurrido este tiempo se agregaron 2 μl de hidróxido de amonio concentrado. Se centrifugó y el precipitado se disolvió en 0.2 ml de hidróxido de amonio 12N, se mantuvo a 90°C durante 20 minutos más y después a 40°C toda la noche. Se centrifugó de nuevo y el sobrenadante se diluyó con formiato de amonio 0.2 M pH 5.5 y se introdujo en una columna de CM-celulosa de 1.5 cm de largo y 0.4 cm de ancho previamente equilibrada con formiato de amonio 0.2 M. La columna se eluyó con

un gradiente lineal de formiato de amonio de 0.2-0.6 M. A una concentración de 0.4M se recuperaron las fracciones de $^{103}\text{Ru}_{360}$ y a 0.6 M las fracciones de Rojo de $^{103}\text{Rutenio}$. Se midió la absorbencia a 360 nm a las fracciones que eluyeron alrededor de 0.4 M del gradiente y a 533 nm a las fracciones que eluyeron alrededor de 0.6 M de formiato de amonio. Las fracciones que presentaron la máxima absorbencia a cada una de las dos longitudes de onda se unieron y se les hizo un espectro de absorción para comprobar su pureza y determinar su concentración ($\epsilon_{360} = 2.6 \times 10^4 \text{ mol/l} \cdot \text{cm}$; $\epsilon_{533} = 2.1 \times 10^4 \text{ mol/l} \cdot \text{cm}$).

6.1. Transporte de calcio en presencia del inhibidor Ru_{360}

Se incubó 1 mg de mitocondrias en un medio de sacarosa 250 mM; TRIS 10 mM; succinato 10 mM, Pi 2 mM; ADP 200 μM , 3 μg de rotenona y 50 μM de $^{45}\text{CaCl}_2$ (actividad específica 1000 cpm/nmol) en presencia de diferentes concentraciones de Ru_{360} (también se sintetizó el inhibidor no marcado radioactivamente). Después de 10 segundos, se filtró una alícuota a través de un filtro Millipore de 0.45 μm y la radioactividad se midió en un contador de centelleo.

Los ensayos se llevaron a cabo a tres concentraciones diferentes de sustrato.

6.2. Unión del complejo binuclear $^{103}\text{Ru}_{360}$ a mitocondrias intactas.

Se incubaron 4 mg de mitocondrias en 6 ml de medio de sacarosa 250 mM; HEPES 10 mM; succinato 10 mM, pH 7.3 a diferentes concentraciones de $^{103}\text{Ru}_{360}$ durante 10 minutos. Pasado este tiempo las muestras se centrifugaron a 13,000 RPM (10 minutos). El precipitado se lavó con 10 ml de medio para eliminar al inhibidor libre. Para determinar la unión no específica del $^{103}\text{Ru}_{360}$ se agregó 1.5 μM del inhibidor sin marca a las muestras que habían sido incubadas con el compuesto radioactivo y tras 10 minutos, se centrifugaron y lavaron como se ha mencionado. La diferencia entre la unión total del inhibidor a las mitocondrias y la unión no específica, representa la unión específica del $^{103}\text{Ru}_{360}$.

6.3. Cromatografía de intercambio iónico de las proteínas marcadas con $^{103}\text{Ru}_{360}$.

Se solubilizaron partículas submitocondriales de riñón rata con 1% de CHAPS o con 1% de C_{12}E_8 . Se centrifugaron a 100,000 g durante 1 hora. El sobrenadante se incubó con 10 pmol/mg de $^{103}\text{Ru}_{360}$. El inhibidor no unido se eliminó dializando exhaustivamente en formiato de amonio 0.2 M, pH 5.5. Las proteínas marcadas se separaron por cromatografía de intercambio iónico en una columna de carboximetil celulosa, previamente equilibrada con formiato de amonio 0.2 M pH 5.5. Tras lavar con el mismo buffer, se aplicó un gradiente

lineal de formiato de amonio de 0.2 M a 1.0 M. Se midió la cantidad de radioactividad en cada una de las fracciones en un contador de emisiones gama.

V. RESULTADOS

1. TRANSPORTE DE CALCIO EN VESÍCULAS DE CITOCROMO OXIDASA.

Reportes previos han mostrado que las vesículas de citocromo oxidasa, en presencia de un sustrato oxidable y citocromo c, son capaces de acumular calcio en respuesta a un potencial de membrana negativo interno. Esta acumulación no es sensible al rojo de rutenio, por lo tanto el uniportador de calcio no está involucrado en dicha captación. Utilizamos este modelo para incorporar extractos mitocondriales sometidos a diferentes grados de purificación y seguir el transporte de entrada de calcio. En la figura 3, se muestra la acumulación de calcio en este tipo de vesículas. Las denominadas COV_M son liposomas a los que se incorporaron proteínas mitocondriales totales. La cinética de transporte es de tipo hiperbólica y alcanza un valor máximo de 260 nmol Ca²⁺ acumulado/mg después de 30 minutos de incubación. En presencia de 4 μM de rojo de rutenio este valor disminuye a 190 nmol/mg/30 min. El mismo tipo de vesículas sin proteínas mitocondriales incorporadas, acumulan una cantidad limitada de calcio, que no disminuye en presencia del inhibidor. Los valores representados como acumulación de calcio, representan la diferencia entre la captación registrada en vesículas que se incubaron con ASCORBATO/TMPD y citocromo c y las mismas vesículas sin sustratos para la citocromo oxidasa. Estas condiciones, como se mostrará más adelante, permiten distinguir entre la acumulación del catión dentro de la vesícula y la pegada inespecífica fuera de los liposomas.

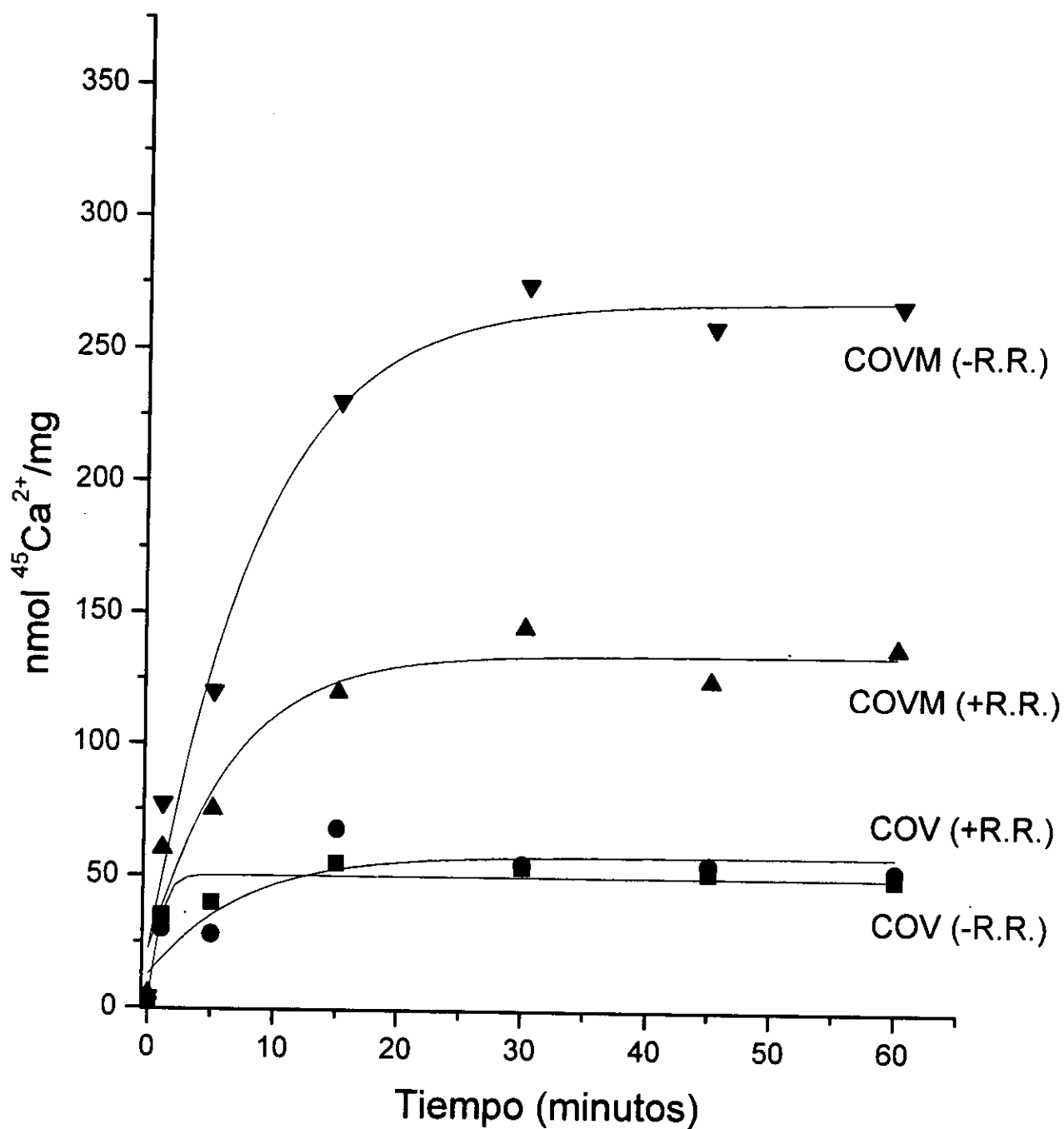


Figura 3. Captación de calcio en COV y COV_M en función del tiempo. La captación se inició agregando 1 mg de vesículas de citocromo oxidasa al medio de incubación que contenía KH₂PO₄ 50 mM; 7.5 mM de ascorbato; 0.75 mM de TMPD; 150 µg de citocromo c y 0.5 mM de CaCl₂ (act. esp. 1000 cpm/nmol). A los tiempos indicados se agregaron los liposomas con 0.8 mg de sulfato de protamina y se filtraron alícuotas a través de filtros de 0.45 µm. En las curvas en que se indica, se agregó 4 µM de rojo de rutenio al medio de incubación.

Para comprobar que el modelo utilizado cumple con las características del uniportador *in vivo*, evaluamos la sensibilidad a inhibidores, la dependencia al potencial transmembranal y la selectividad a otros cationes divalentes. En la figura 4 se muestra la inhibición del transporte de calcio en COV_M a diferentes concentraciones de rojo de rutenio. Obtuvimos una constante de disociación aparente para el inhibidor (K_i) de 3.5 μM a pH 7.0.

Aunque se sabe que el Mg²⁺ no se transporta a través del uniportador existen reportes de que reduce la velocidad de transporte de calcio, probablemente al unirse al sitio de activación. En la representación gráfica de Dixon (Figura 5) se muestra el efecto inhibitorio del Mg²⁺ sobre la acumulación de calcio en COV_M. La linearización por Dixon (recuadro) nos permitió calcular la K_i que fue de aproximadamente 30 mM. Esta concentración sugiere, tal como ocurre en mitocondrias, que la unión del magnesio a la membrana o al propio uniportador provoca un impedimento de tipo estérico para que el calcio pueda transportarse.

En la figura 6 se muestra la formación del potencial membranal en COV_M, tras la oxidación del ascorbato en presencia de citocromo c. El calcio a una concentración de 100 μM abate el potencial, lo mismo que 10 μM de CCCP. El rojo de rutenio a una concentración de 10 μM disminuye el efecto del calcio sobre el potencial membranal.

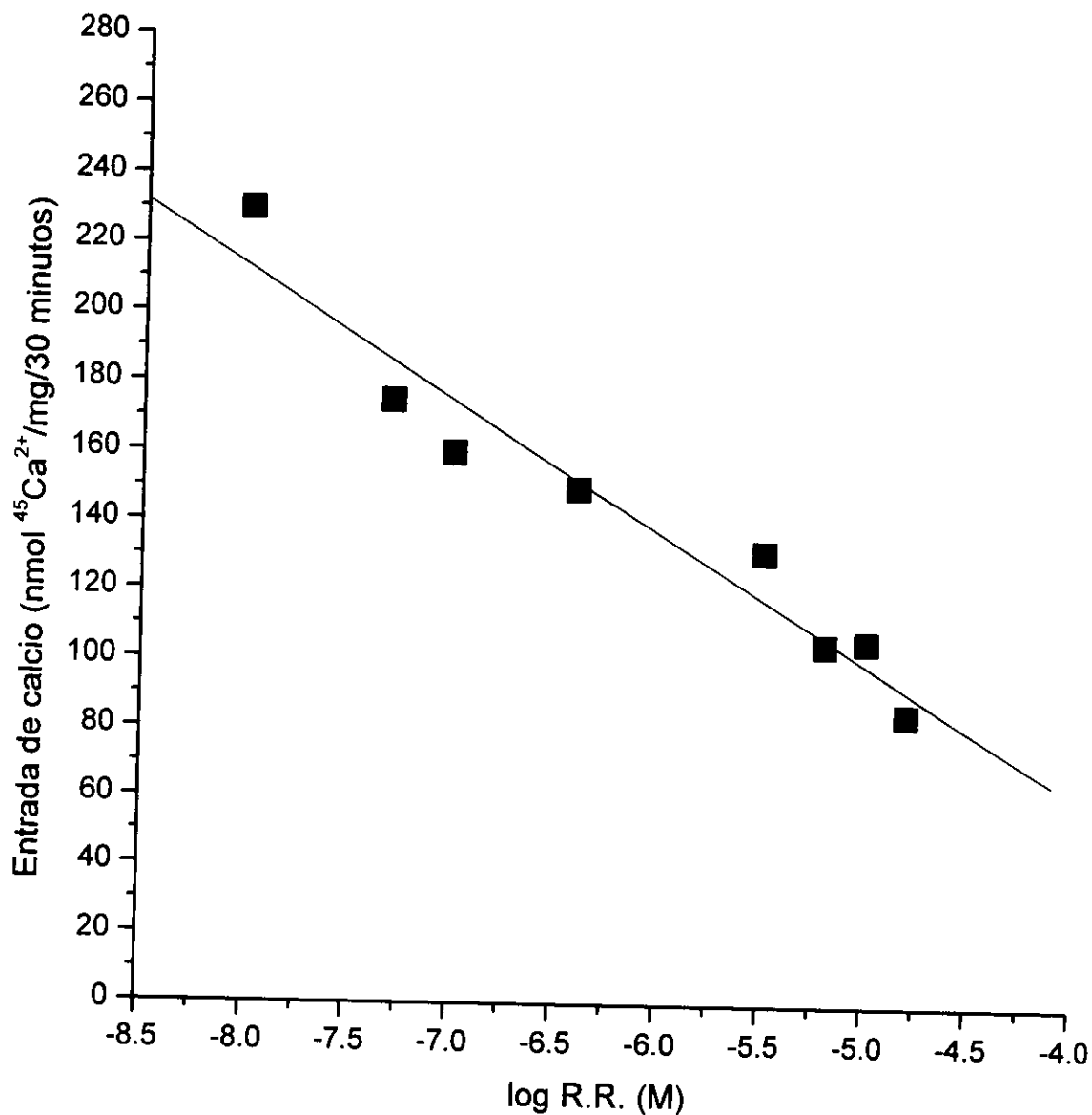


Figura 4. Inhibición del transporte de calcio por rojo de rutenio en vesículas de citocromo oxidasa incorporadas con proteínas mitocondriales.

Las muestras se incubaron como se indica en la Figura 3, el medio contenía las concentraciones de rojo de rutenio indicadas.

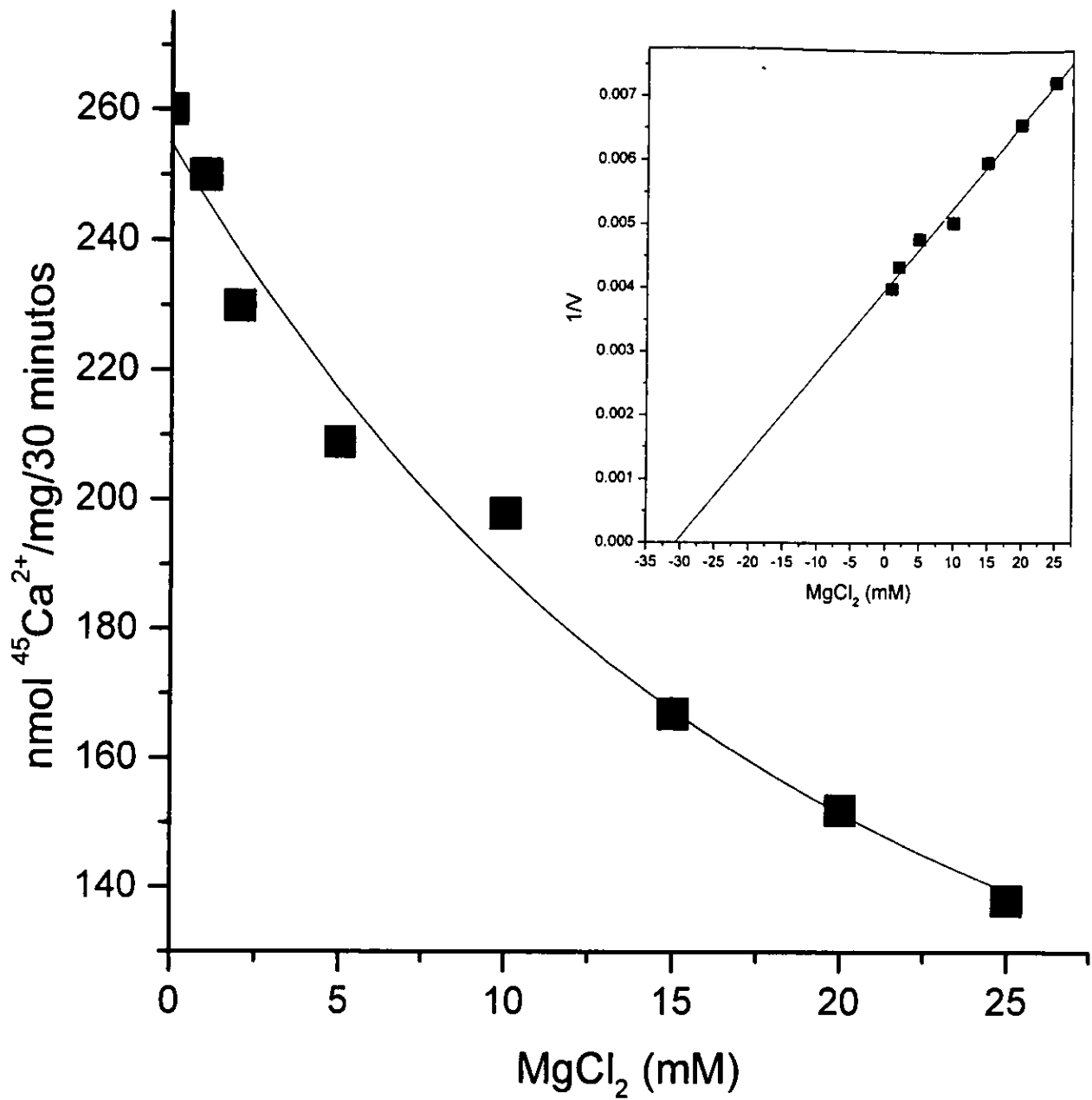


Figura 5. Efecto del magnesio sobre el transporte de calcio en COV_M. El transporte de calcio se determinó como se indica en la Figura 3. El medio contenía las concentraciones indicadas de magnesio.

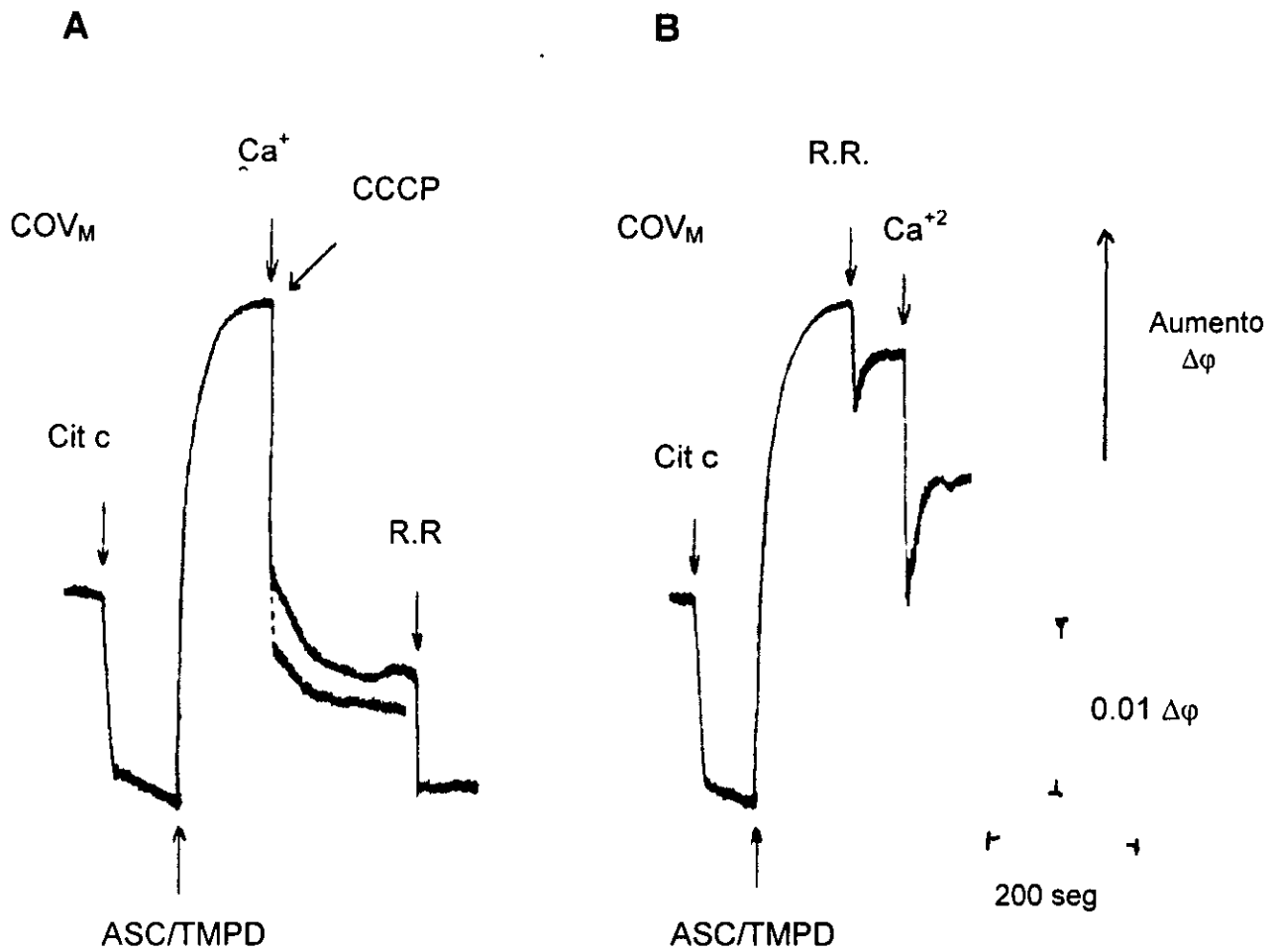


Figura 6. Efecto de la captación de calcio sobre el potencial transmembranal en COV_M . La medición del potencial transmembranal se llevó a cabo utilizando $10 \mu\text{M}$ del indicador safranina. La reacción se inició incubando 1 mg de vesículas de citocromo oxidasa incorporadas con proteínas mitocondriales, donde se señala se agregaron $150 \mu\text{g}$ de citocromo c, 7.5 mM de ascorbato, 0.75 mM de TMPD, $100 \mu\text{M}$ de CaCl_2 , $10 \mu\text{M}$ de CCCP y $10 \mu\text{M}$ de rojo de rutenio.

Se sabe que el uniportador de calcio transporta otros cationes divalentes, por lo que medimos la acumulación de estroncio y de magnesio en el sistema reconstituido. En la Tabla I, se muestra que el Ca^{2+} y el Sr^{2+} son transportados por las vesículas en respuesta a un potencial de membrana negativo interno, con aproximadamente la misma selectividad, i.e. $283.6 \text{ nmol } ^{45}\text{Ca}^{2+}/5\text{min}/\text{mg}$ y $240 \text{ nmol } ^{90}\text{Sr}^{2+}/5\text{min}/\text{mg}$. Esta acumulación es sensible en un 50% al rojo de rutenio, mientras que el Mg^{2+} a la misma concentración no se acumula en las COVs.

Transporte de cationes divalentes en COV_M 's	nmol/30min/mg proteína	
	-R.R.	+R.R.
Ca^{2+}	$283.6 \pm 50.4 (7)$	$132.1 \pm 66.0 (7)$
Sr^{2+}	$239.9 \pm 92.3 (3)$	$156.7 \pm 58.6 (3)$
Mg^{2+}	-	-

Tabla I. Transporte de cationes divalentes en COV_M . El transporte de calcio se determinó como se describe en la sección de Material y métodos. Las velocidades de entrada representan la diferencia entre la captación de las vesículas energizadas menos las no energizadas.

Una vez que se caracterizó el sistema de transporte de calcio en las vesículas de citocromo oxidasa, se incorporaron fracciones mitocondriales purificadas por diversas técnicas. Como se muestra en la TABLA II, las proteínas solubilizadas a partir de partículas submitocondriales tienen, una vez incorporadas en COVs, una

actividad específica de 127.3 nmol $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /5min/mg, muy semejante a la que se obtiene a partir de mitocondrias solubilizadas. A partir de esta fracción se obtuvieron dos extractos, tras la precipitación con sulfato de amonio. A un 50% de saturación precipitan más del 90% de las proteínas submitocondriales, sin que en el sistema reconstituido se recupere el transporte. Por el contrario, en el sobrenadante que contiene solamente un 7-10% del total de proteínas, encontramos una actividad específica de 443.0 nmol $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /5min/mg (TABLA II). Esta actividad es sensible al rojo de rutenio sólo en un 50% (no se muestra).

Extracto solubilizado reconstituido en COV's	Proteína total (mg)	Actividad específica (nmol/5min/mg)	Rendimiento (%)	Purificación
Mitocondrias	2900.00	151.88	100	1.00
Partículas submitocondriales	1315.00	127.33	40	0.83
Precipitado al 50% de saturación con sulfato de amonio	659.10	-	-	-
Sobrenadante al 50% de saturación con sulfato de amonio (F_{90})	44.2	443.0	2.7	2.91
Extracción orgánica (F_0)	2.7	1194.00	0.9	7.8

TABLA II. Actividad de transporte de extractos mitocondriales semipurificados incorporados en COVs. El transporte de calcio se midió como se señala en la Tabla I.

En la figura 7 se muestra el perfil electrofórico de las fracciones que se señalan en la TABLA II.

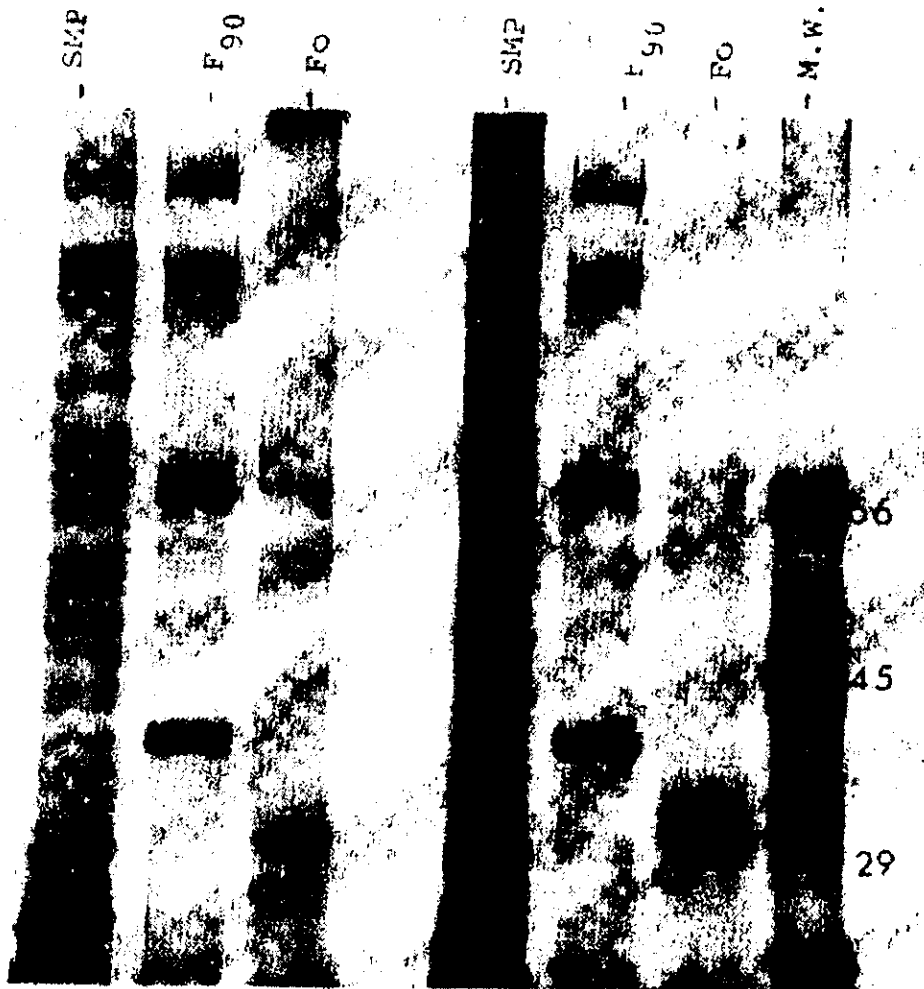


Figura 7. Electroforesis desnaturante (10%) de los extractos con actividad de transporte de calcio. De izquierda a derecha: SMP (partículas submitocondriales); F₉₀ (fracción obtenida al precipitar a un 90% de saturación con sulfato de amonio); FO (fracción obtenida después de la extracción orgánica). MW (pesos moleculares).

Ya que el uniportador de calcio debe ser por fuerza una proteína transmembranal, decidimos extraer la fracción con mayor actividad con una mezcla de cloroformo:n-butanol (60%:40%) y reconstituirla en el sistema de vesículas, la actividad específica fue de 1194 nmol $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /5min/mg, que representa casi un 8% de purificación. Esta fracción a la que denominamos Fo contenía aproximadamente 0.654 $\mu\text{mol Pi/mg}$ proteína, que se determinaron después de extraer los lípidos con una mezcla de CHCl_3 :MeOH (3:1). Se ha demostrado que los fosfolípidos pueden actuar como ionóforos para cationes divalentes (Sokolove y Brenza, 1983). Para descartar que las propiedades de afinidad al calcio que observamos en el sistema reconstituido, se debieran a los fosfolípidos asociados a las proteínas, se hicieron experimentos incorporando proteínas desnaturalizadas a las vesículas de citocromo oxidasa (Tabla III).

Tratamiento a las proteínas incorporadas	Acumulación de calcio (nmol $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /mg/5min)
Ninguno	112.2 \pm 10.8
Desnaturalizadas por calor	0

Tabla III. Las mitocondrias se desnaturalizaron calentando durante 10 minutos a ebullición, después se centrifugaron a 10,000 RPM (10 min) y se disolvieron con 1.2% de colato de sodio. Tras de una nueva centrifugación a la misma velocidad, se recuperó el sobrenadante y se incorporó en COVs con una breve sonicación en frío. La mezcla se dializó exhaustivamente durante 20 horas y los liposomas formados se pasaron por una columna de Sephadex G-50 equilibrada con H_3PO_4 50 mM/TEA pH 7.0. Las muestras controles (sin tratamiento) se incorporaron de la misma forma. A ambas se les determinó el transporte como se menciona en la metodología.

Como se puede observar las preparaciones hervidas y reconstituidas en liposomas no son capaces de acumular calcio en COVs lo que demuestra el papel esencial de un componente de naturaleza proteínica en la actividad de transporte de calcio.

Al analizar la tabla de purificación (TABLA II), podemos observar que tras la extracción con solventes, no se produce un aumento importante en la actividad de transporte de calcio y que el rendimiento se ha reducido de manera considerable; esto podría deberse a la pérdida o inactivación de algún componente durante la extracción. Considerando que el transportador que buscamos, está presente en el orden de pmol/mg de proteína total decidimos enriquecer la fracción anterior a la extracción, (F₉₀) y utilizarla en otro proceso de separación con el cual se conserve y aumente la actividad. Intentando enriquecer las proteínas presentes en F₉₀, inmunizamos ratones de la cepa Balb-c con esta fracción y obtuvimos anticuerpos policlonales.

2. INHIBICION DEL TRANSPORTE DE CALCIO POR ANTICUERPOS.

El título de los anticuerpos se determinó por el método indirecto de ELISA. Definimos el título del suero hiperinmune, como la dilución más alta a la cual la respuesta en el ELISA, es el doble que el valor obtenido con el suero control o preinmune. En todos los animales inmunizados se obtuvieron títulos, de alrededor de 1:3,200. Los sueros con éstas características se unieron y se titularon contra

un antígeno crudo (Partículas submitocondriales) y contra una muestra semipurificada (F₉₀)

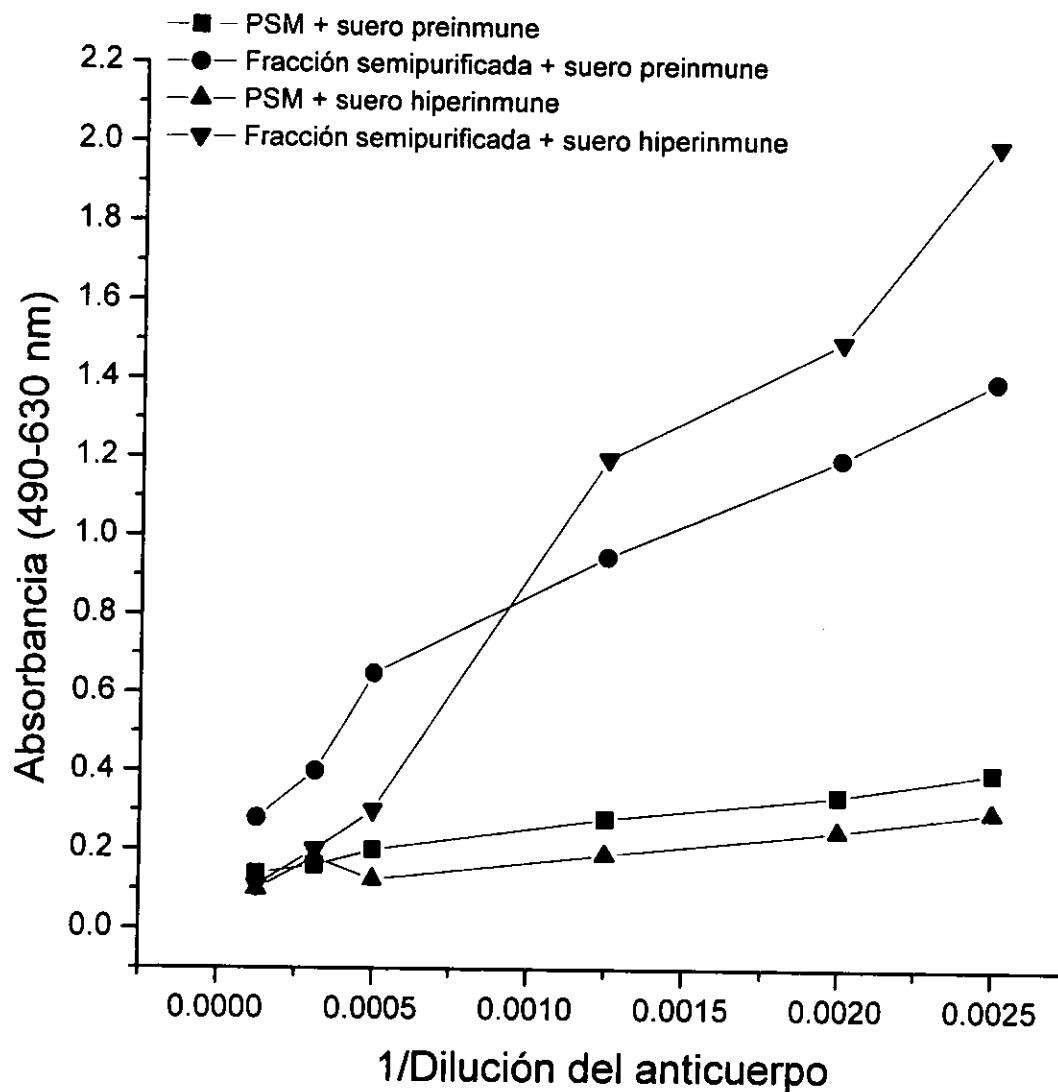


Figura 8. Determinación del título del suero hiperinmune por ELISA. En cada pozo se colocaron de 40-135 ng de muestra en buffer de carbonatos 0.05M, pH 9.6 y se dejó secar toda la noche. Se bloqueó con gelatina de cerdo 0.01% en TBS-Tween y se incubó con el suero preinmune e hiperinmune a las diluciones señaladas durante 1-2 horas. Se lavó con TBS-Tween y se incubó con Anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa (1:5,000) durante 1 hora a 35°C. Se lavó de nuevo con TBS-Tween y se reveló con o-fenildiamina.

En la figura 8 se muestra que el título máximo alcanzado fue de 1:8,000 cuando se utilizó como antígeno la muestra semipurificada, mientras que utilizando partículas submitocondriales el título máximo fue de 1:2,000.

Se probó la capacidad de estos antisueros para inhibir la entrada de calcio en COVs y en mitoplastos. En la figura 9 se observa la entrada neta de calcio en COVs en presencia de diferentes diluciones del suero preinmune y del suero hiperinmune, que en adelante denominaré AntiUni-Ca²⁺. El suero control no ejerce ningún efecto aún a concentraciones muy altas del inhibidor, mientras que AntiUni-Ca²⁺ desde una dilución de 1:200, disminuye el transporte en más del 50%. La diferencia entre los valores medios de ambos grupos fue estadísticamente significativa con una $P < 0.001$ (t de Student). Cada valor representa la diferencia entre las vesículas energizadas, i.e. liposomas con potencial interno negativo y las vesículas no-energizadas, que representan la acumulación pasiva de calcio y la unión inespecífica del catión a los liposomas.

El efecto de AntiUni-Ca²⁺ se determinó también en mitoplastos. Estas preparaciones se obtuvieron a partir de 10 mg de mitocondrias incubadas con digitonina 1.2% (w/v) durante 10 minutos a 4°C. La suspensión se centrifugó a 15,000g durante 10 minutos. El precipitado se resuspendió en sacarosa 250 mM, TRIS 10 mM pH 7.3. Se obtuvo también la fracción correspondiente a la membrana externa, centrifugando el sobrenadante a 144,000 g y se evaluó la actividad de la enzima monoamino oxidasa.

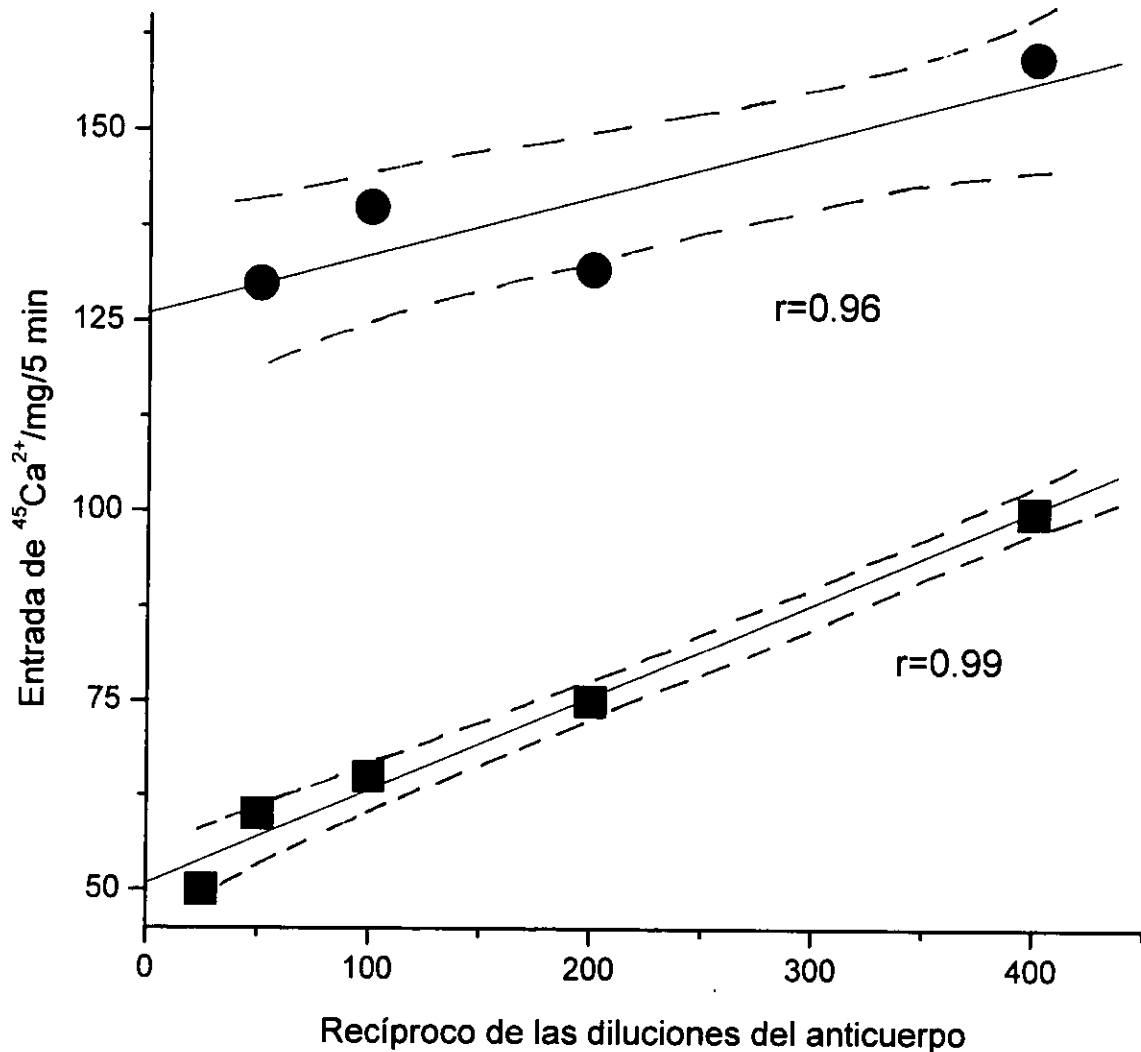


Figura 9. Entrada de calcio en COVs reconstituidas con extractos mitocondriales totales en presencia del suero preinmune (O) y de AntiUni- Ca^{2+} (●). Los proteoliposomas se incubaron durante 10 minutos a 4°C con los sueros y después se agregaron al medio de reacción descrito en la Figura 3. En este caso también se tomaron los controles de transporte \pm energía. Los valores representan la media de tres experimentos y las líneas punteadas los límites de confianza.

Como se observa en la Tabla IV, sólo el 1.5% de la actividad de esta enzima estuvo asociada a la preparación de mitoplastos. El 98% restante se encontró en la preparación de membrana externa (111.36 ± 69.13 nmol/min/mg proteína). La fracción de mitoplastos conservó su integridad morfológica, además de un alto consumo de oxígeno, equivalente al obtenido en las preparaciones mitocondriales.

Preparación	nmol benzaldehído/min/mg proteína
Mitocondrias	26 ± 11 (8)
Mitoplastos	1.4 ± 3 (5)
Membrana externa	111 ± 69 (5)

Tabla IV. Actividad específica de monoamino oxidasa (MAO) en mitocondrias, mitoplastos y membrana externa mitocondrial. La reacción se inició con 100-300 μ g de proteína que se adicionaron a 3 ml de un medio de KH_2PO_4 200 mM, 0.1% TX100 y 10 μ M de benzilamina, pH 7.2. La conversión de benzilamina a benzaldehído catalizada por MAO, se midió en un espectrofotómetro a 250 nm a 37-40°C. El coeficiente de extinción molar del benzaldehído = 1.32×10^4 M/cm.

En la Tabla V, se muestra el consumo de oxígeno (Estado 4) y el transporte de calcio en mitoplastos de riñón de rata incubados con los sueros preinmune e hiperinmune. Observamos que el estado 4 de la respiración no varía en presencia de los sueros, lo que sugiere que no existe efecto de los anticuerpos

sobre los componentes de la cadena respiratoria. Sin embargo, es evidente el efecto inhibitorio del suero hiperinmune sobre el transporte de calcio. Este se midió con $^{45}\text{Ca}^{2+}$ por el método de filtración. Se observa una disminución de casi el 70% en relación con el transporte de calcio en los mitoplastos control.

	Consumo de O ₂ (nAtO ₂ /min/mg proteína)	Transporte de calcio (nmol $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /min/mg proteína)
	Estado 4	
Control	15.9 ± 7.3 (3)	52.8 ± 15.2 (3)
Mitoplastos incubados con suero preinmune (1:250)	13.1 ± 4.8 (3)	44.9 ± 14.5 (3)
Mitoplastos incubados con AntiUni-Ca ²⁺ (1:250)	13.4 ± 7.2 (3)	15.9 ± 2.4 (3)

Tabla V. Consumo de oxígeno y transporte de calcio en mitoplastos incubados con sueros preinmune y AntiUni-Ca²⁺. Se incubó 1 mg de mitoplastos con la dilución indicada de los sueros durante 10 minutos en frío. Esta mezcla se agregó a 1 ml de medio que contenía sacarosa 250 mM, glutamato 10 mM, malato 10 mM, fosfato 10 mM y HEPES 10 mM, pH 7.0. El consumo de oxígeno se midió polarográficamente con un electrodo Tipo Clark a 30°C. El transporte de calcio se midió como se describe en la metodología.

Ya que se sabe que la entrada de calcio puede disminuir el potencial de membrana negativo interno (Gunter y Pfeiffer, 1990), exploramos el efecto del suero hiperinmune sobre el potencial de membrana de los mitoplastos, para

descartar que diferencias en el potencial de nuestras preparaciones, provocara la baja acumulación de calcio en presencia de AntiUni-Ca²⁺.

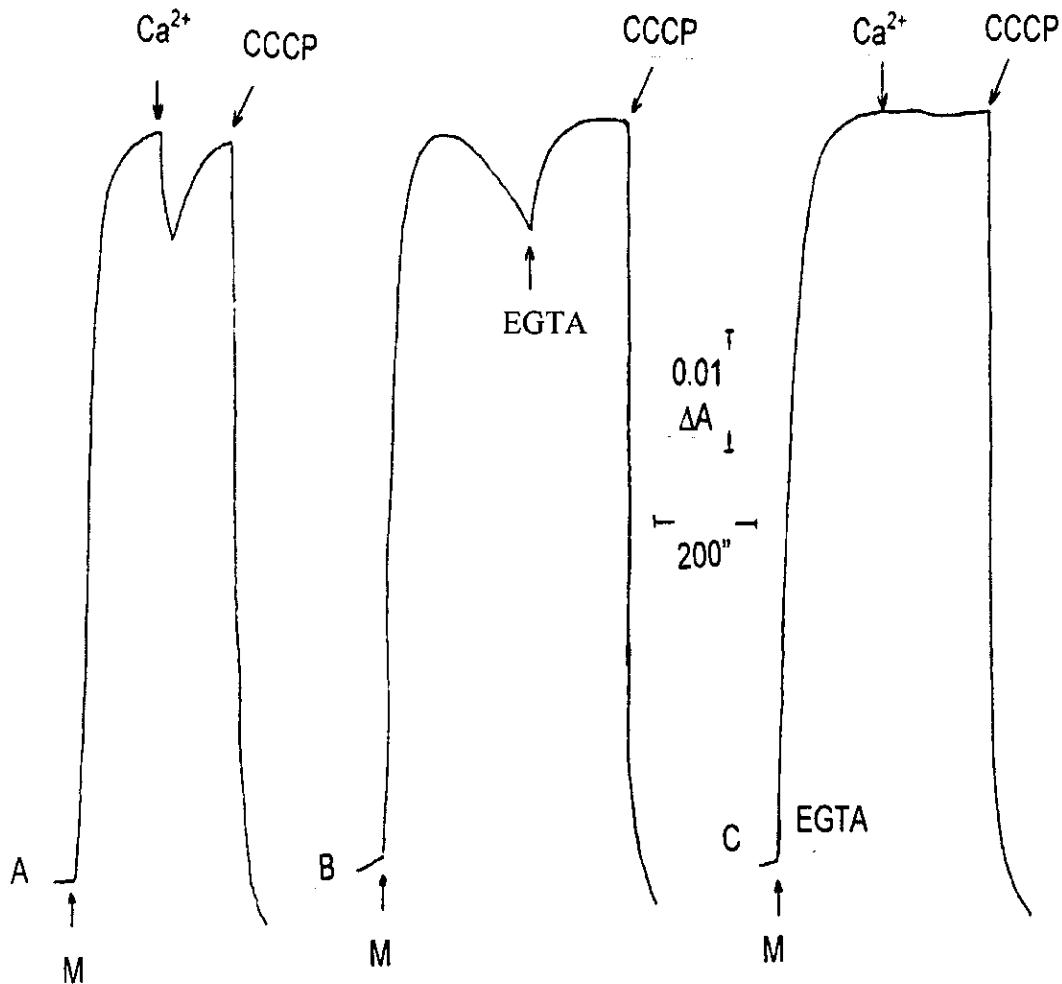


Figura 10. Potencial transmembranal de los mitoplastos incubados con suero preinmune y AntiUni-Ca²⁺. La incubación con los anticuerpos se realizó igual que en la Tabla V. El potencial se midió espectrofotométricamente a 533-511 nm, en un medio que contenía sacarosa 250 mM, succinato 10 mM, HEPES 10 mM, 200 μM de ADP, 10 μg de rotenona, 1 mM de fosfato y safranina 10 μM. A. Mitoplastos control. B. Mitoplastos incubados con suero preinmune (1:100). C. Mitoplastos incubados con AntiUni-Ca²⁺ (1:100).

En la Figura 10A, se muestra el potencial de membrana de los mitoplastos control. Al agregar 50 μM de calcio se observa una disminución transitoria, debida a la entrada de calcio a través del uniportador. Una vez que se reestablece el ciclo de entrada/salida de calcio, el potencial se restaura y es posible abatirlo completamente al adicionar 10 μM de CCCP. En la Figura 10B, los anticuerpos se incubaron con los mitoplastos durante 10 minutos y después se agregaron al medio de incubación para medir los cambios en absorbencia del indicador safranina. Se observa que los mitoplastos mantienen el potencial transmembranal, a pesar de la alta concentración de calcio presente en los sueros. Para eliminar el exceso de calcio se agregó 1 mM de EGTA (Figura 10C).

Una vez que probamos la capacidad inhibitoria de AntiUni-Ca²⁺ sobre la captación de calcio, se determinó la especificidad de los anticuerpos por Western blot. Las muestras se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida, bajo condiciones desnaturalizantes y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Encontramos que las muestras que se hervían antes de la electroforesis, no eran reconocidas por los anticuerpos, lo que nos sugiere que el epitope que AntiUni-Ca²⁺ reconoce es conformacional. En la Figura 11 se muestra el patrón de las proteínas reconocidas por los anticuerpos y que se revelaron con o-diaminobenzidina. Se observa que el suero preinmune reconoce inespecíficamente una banda de aproximadamente 25 kDa, tanto en muestras de partículas submitocondriales, como en F₉₀ (líneas b y d) ésta banda es mucho más evidente en la fracción semipurificada. Por otro lado el suero AntiUni-Ca²⁺,

reconoce una segunda banda, con un peso molecular aproximado de 18-20 kDa, además de una banda muy intensa de 70 kDa, que se observa en partículas submitocondriales y en F₉₀.

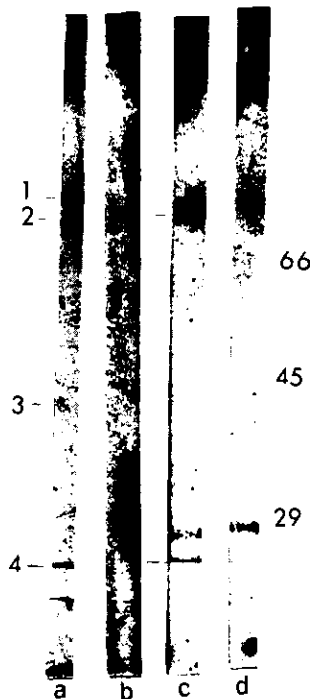


Figura 11. Western blot de extractos mitocondriales semipurificados incubados con los sueros preinmune e hiperinmune. Se sometieron a electroforesis desnaturizante 50 μ g de partículas submitocondriales (a) y (b) y 20 μ g de F₉₀ (c) y (d). Posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (100V – 1 hora) en un buffer sin SDS. La membrana se bloqueó con 0.01% de gelatina de cerdo en TBS-Tween. Se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con el suero preinmune (b) y (d) y con AntiUni-Ca²⁺ (a) y (c) a una dilución 1:800. Se utilizó como segundo anticuerpo anti-IgG dirigido contra ratón acoplado a peroxidasa. Las membranas se revelaron con o-diaminobenzidina.

Para determinar cual anticuerpo era el responsable de la inhibición sobre el transporte de calcio, se desprendieron los anticuerpos específicos unidos a las proteínas transferidas a nitrocelulosa por elución ácida, después de su detección con o-diaminobenzidina. Utilizamos un amortiguador de glicina 0.1 M, pH 3.0. Se agitaron las membranas durante 60 segundos e inmediatamente se neutralizó el eluado a pH 7.0. Los lavados se repitieron hasta que no se detectó proteína en los eluados. Obtuvimos tres anticuerpos específicos y un eluado control. Los anticuerpos específicos reconocieron respectivamente a las proteínas de 75, 70 y 18-20 kDa. El eluado control se obtuvo después de tratar con glicina pH 3.0 una zona de la matriz de celulosa que no dio señal con o-diaminobenzidina.

En la Tabla IV se muestra el efecto inhibitorio de los anticuerpos eluidos de las membranas, sobre la velocidad inicial del transporte de calcio en mitoplastos.

Se observa que los mitoplastos incubados con la solución de glicina 0.1M acumularon 86.62 nmol $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /mg/min. La misma preparación de mitoplastos, incubada con el anticuerpo que reconoce a la proteína de 75 kDa, capta el 60% de calcio. El anticuerpo que reconoce la proteína de 70 kDa, inhibe el transporte en un 25%, mientras que el anticuerpo asociado a la proteína de bajo peso molecular inhibe casi el 70% del transporte. Bajo condiciones control (sin incubación) los mitoplastos acumularon 85.53 ± 2.3 nmol $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /min/mg proteína.

Anticuerpos eluidos	nmol $^{45}\text{Ca}^{2+}$ acumulados/min/mg
Glicina 0.1 M pH 3.0	86.62 \pm 6.34
Anticuerpo vs 75 kDa	50.70 \pm 12.27
Anticuerpo vs 70 kDa	63.57 \pm 3.97
Eluado Control	84.35 \pm 1.30
Anticuerpo vs 18-20 kDa	28.28 \pm 0.78

Tabla IV. Inhibición del transporte de calcio por anticuerpos específicos. Se incubó 1 mg de mitoplastos y los anticuerpos eluidos de la membrana de nitrocelulosa durante 10 min a 4°C. La mezcla se agregó al medio para transporte de calcio en presencia de $^{45}\text{CaCl}_2$ (act. esp. 1000 cpm/nmol), después de 1 minuto se filtraron alícuotas a través de filtros de 0.45 μm y se midió la radioactividad.

La banda con peso molecular de entre 18 y 20 kDa reconocida por el anticuerpo, tiene un peso molecular muy semejante al del citocromo c. Para determinar si esta proteína se encontraba en nuestras preparaciones medimos el espectro visible de absorción de la F_{90} , de 400 a 700 nm y lo comparamos con el del citocromo c comercial en condiciones reducidas. En la figura 12 se observa que el espectro es idéntico en ambas muestras, destacan las características bandas de Soret del citocromo c: a 545 nm (α) y a 527 nm (β). Encontramos que de las proteínas que contiene la F_{90} , el 0.5% corresponde al citocromo c.

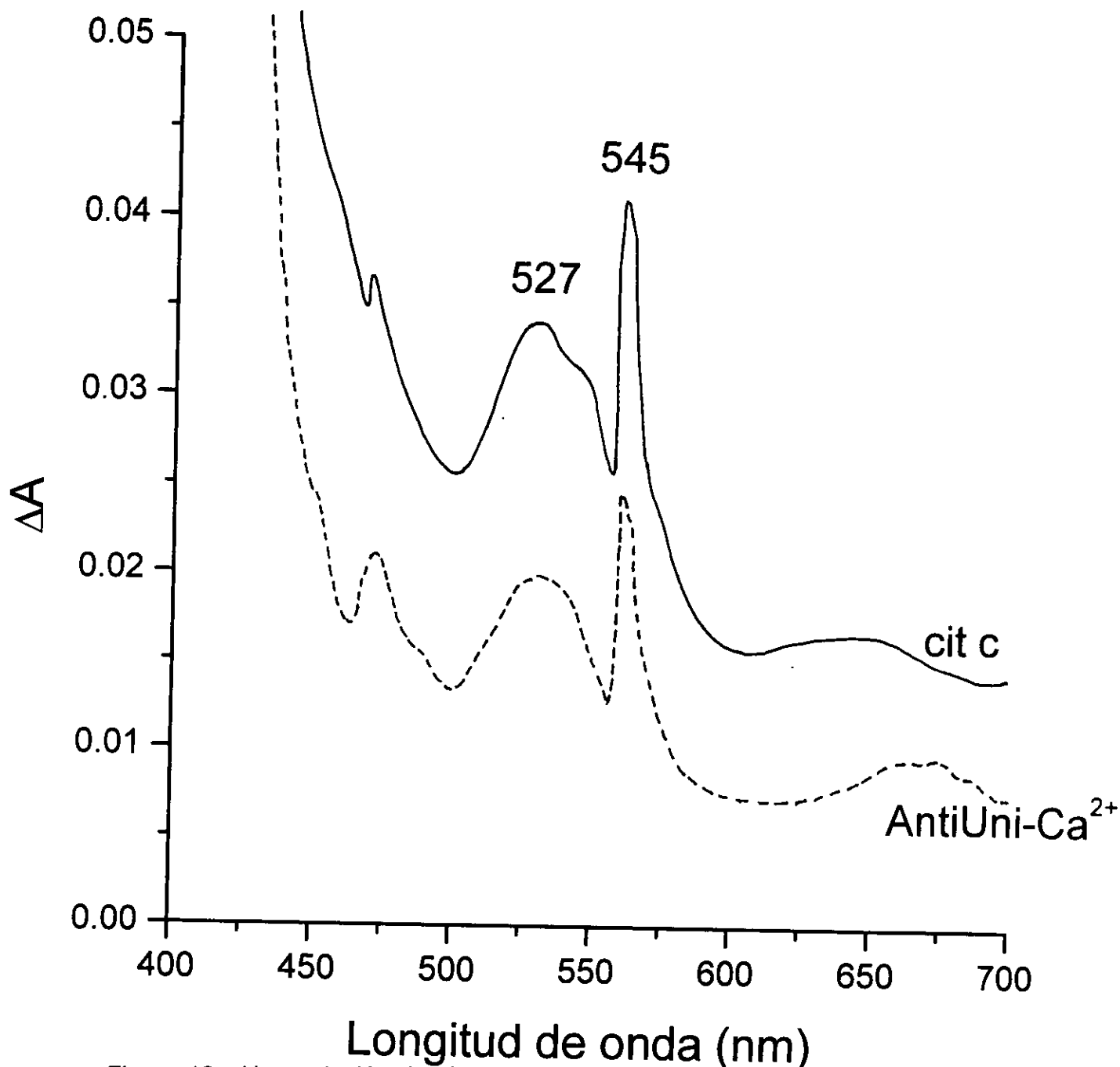


Figura 12. Una solución de citocromo c comercial y la F₉₀, se redujeron con 10 mM de ascorbato de sodio y se pasaron a través de una columna de Sephadex-G50 equilibrada con TRIS-HCl 0.2M, pH 7.5, para eliminar el exceso de ascorbato. Los espectros se corrieron en el intervalo señalado en presencia de Tween 80 0.3%. El coeficiente de extinción molar que se utilizó para calcular la concentración de citocromo c es $\epsilon = 29,500 \text{ mol/l.cm}$.

3. PURIFICACION POR ISOELECTROENFOQUE PREPARATIVO

El ensayo con anticuerpos dio una sola señal en la región de 18-20 kDa, sin embargo teníamos al menos citocromo c en nuestras preparaciones, por lo que se realizó una separación por isoelectroenfoque preparativo, para determinar cuantas especies del mismo peso molecular (o de un peso aproximado), podrían responder al anticuerpo. En la figura 13a se muestra el perfil de pH y la distribución de proteína, que se obtuvo tras el establecimiento del equilibrio en la celda de isoelectroenfoque. La mayor parte de la proteína se enfoca a pH's arriba de 8.0, en estas fracciones la proteína más abundante fue citocromo c, que evaluamos analizando su espectro de absorción en condiciones oxidadas y reducidas. Es interesante hacer notar, que esta proteína extramembranal, localizada en la cara externa de la membrana interna mitocondrial, no se elimina en las primeras fases de la purificación en condiciones de altas concentraciones de sales. Cada fracción se concentró y se incorporó en COVs de la manera antes descrita. Tras la incorporación se determinó la actividad de transporte en las vesículas. Las fracciones en las que se observó una mayor acumulación de calcio fueron aquellas con puntos isoeléctricos entre 5.0 y 6.0 (Figura 13b), la captación es parcialmente sensible a rojo de rutenio (no se muestra). El análisis electroforético de dichas fracciones muestra dos proteínas, una de aproximadamente 70 y otra de aproximadamente 18-20 kDa (Figura 13c). También aparece un pico de actividad recurrente en el extremo ácido del gradiente, que sin embargo no es sensible a rojo de rutenio.

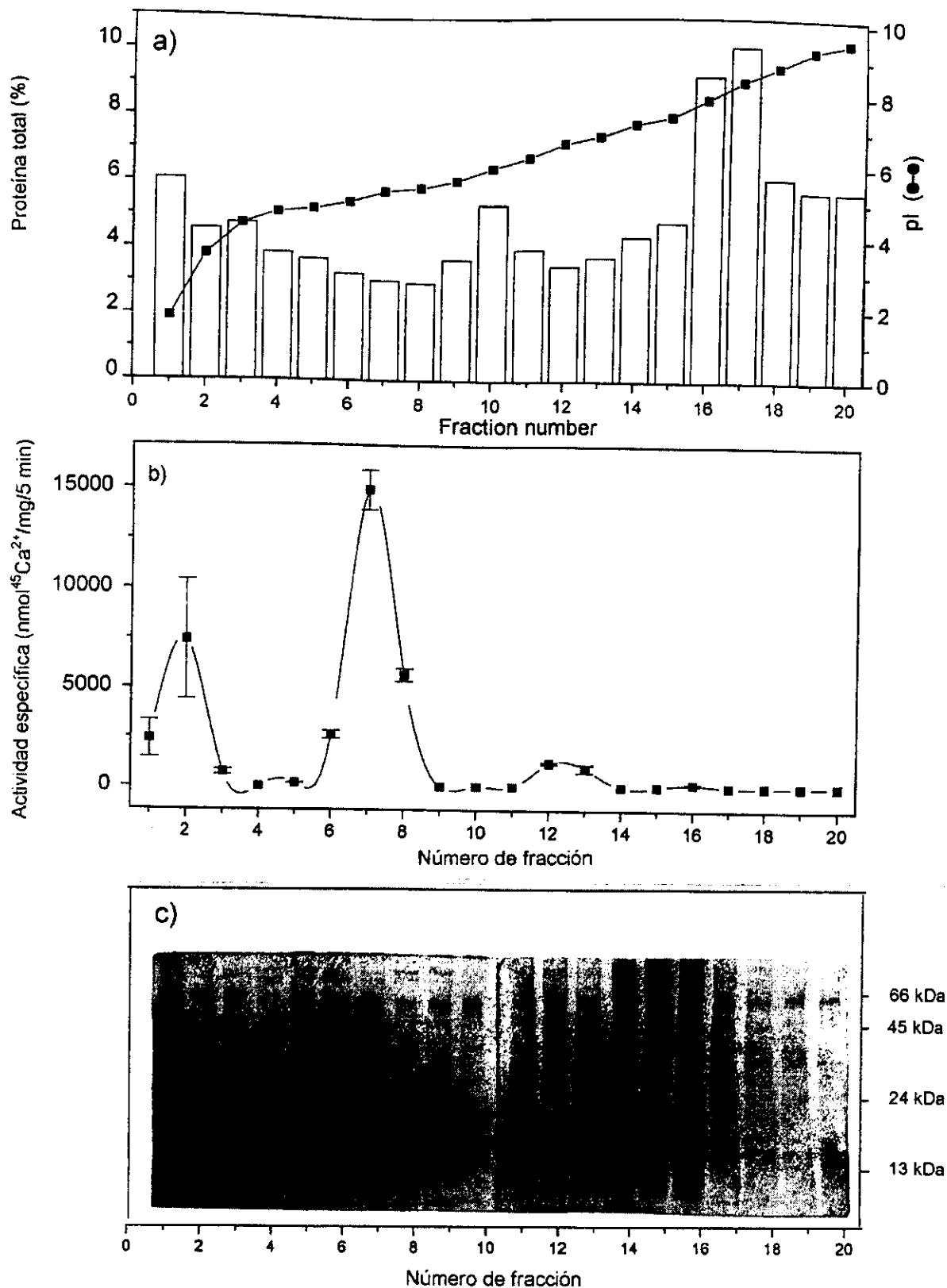


Figura 13. Análisis de las proteínas separadas por isoelectroenfoque preparativo. En a) se muestra el gradiente de pH de cada una de las fracciones y la concentración de proteína en cada una de ellas; en b) la actividad específica de las fracciones tras reconstituirlas en COVs y en c) la imagen teñida con plata de las proteínas que se separaron en cada fracción.

Para determinar si las proteínas observadas en presencia de SDS, son proteínas independientes o son subunidades que forman un multímero, se hizo una electroforesis en condiciones nativas. La Figura 14 muestra la imagen teñida con plata de las fracciones con pI's entre 2.0 y 7.0. En las fracciones 5-8, se observa una sola banda y no se detectan agregados en el inicio del gel.

NUMERO DE FRACCION

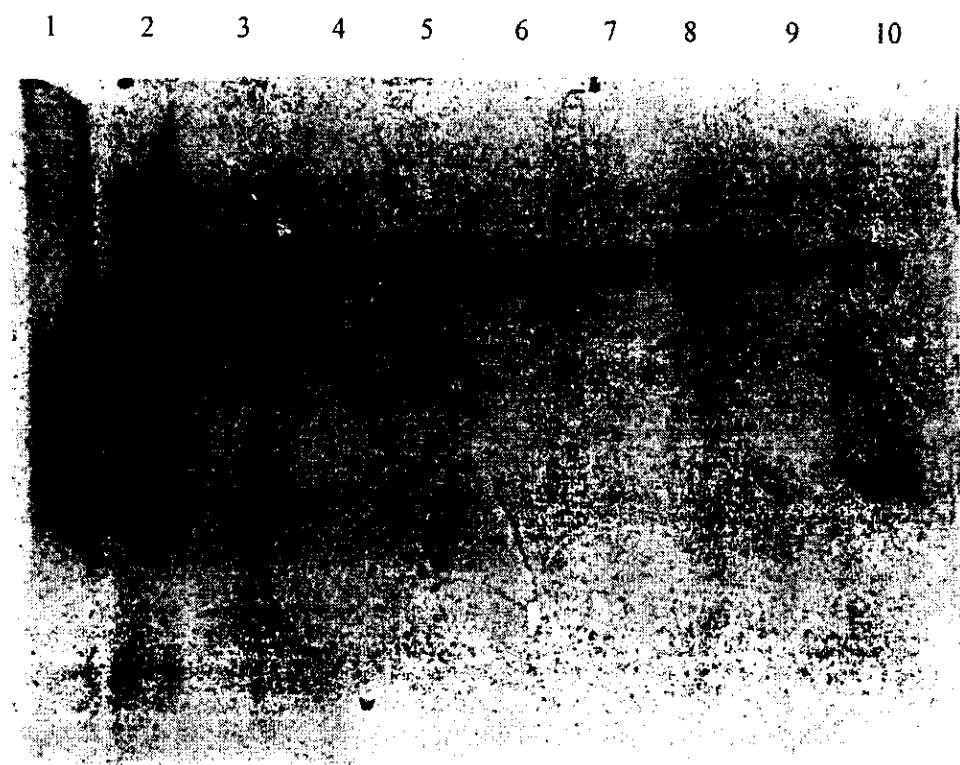


Figura 14. Electroforesis no desnaturizante de las fracciones con pI's ácidos entre las que se encuentran aquellas con actividad de transporte de calcio. Se incubaron 25 μ g de proteína con 0.6% de CHAPS y se separaron en un gel de poliacrilamida al 7.5%, que no contenía SDS. El gel se reveló con la técnica de tinción con plata.

En la siguiente tabla se resume el enriquecimiento de la actividad del uniportador de calcio en COVs, tras el fraccionamiento por isoelectroenfoque preparativo y la sensibilidad al inhibidor rojo de rutenio.

Extracto solubilizado reconstituido en COV's	Proteína Total (mg)	Actividad específica (nmol Ca ²⁺ /5min/mg)	+ RR 5 μ M (nmol Ca ²⁺ /5min/mg)	Rendimiento (%)
Mitocondrias	4000.00	151.80 \pm 10.0	71.2 \pm 10.0	100.0
Partículas Submitocondriales	1350.00	127.13 \pm 13.0	63.9 \pm 9.0	33.8
Sulfato de amonio (90%)	18.54	443.00 \pm 32.0	251.3 \pm 42.1	0.46
Cromatografía de inmunoadfinidad	4.90	1665.03 \pm 408.12	1203 (2)	0.12
Isoelectroenfoque en fase líquida	0.20	14888 (2)	5400 (2)	0.01

Tabla VII. Actividad específica de las fracciones reconstituidas en COVs. La actividad específica para cada extracción, corresponde a la diferencia entre la acumulación de calcio en COVs en presencia y ausencia de sustratos para la citocromo oxidasa.

Se observa que el factor de purificación es de 90, mientras que el rendimiento es sólo de 0.01%. Suponemos que el factor de purificación está subestimado, debido a la inactivación del uniportador durante el proceso de extracción. La sensibilidad parcial al rojo de rutenio, puede deberse a una incorrecta incorporación del transportador a las COVs, que impediría el acceso del inhibidor

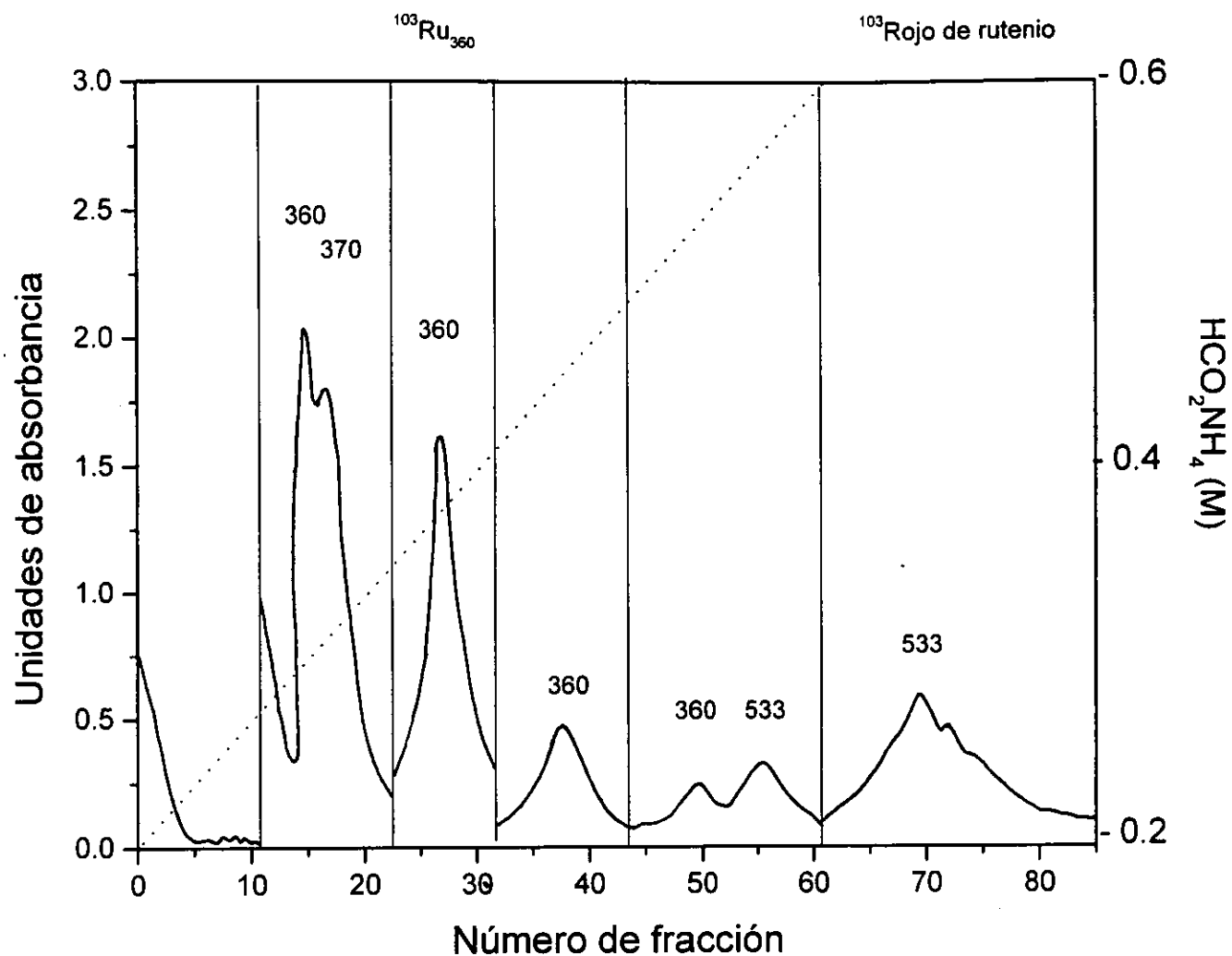
al sitio de unión en el uniportador. También proponemos que el rojo de rutenio, podría estar uniéndose de manera inespecífica a los fosfolípidos negativos de las vesículas de citocromo oxidasa.

4. EL INHIBIDOR $^{103}\text{Ru}_{360}$ COMO LIGANDO DE AFINIDAD.

Para verificar que la proteína de bajo peso molecular a la que reconocen los anticuerpos AntiUni- Ca^{2+} forma parte del uniportador de calcio, utilizamos el inhibidor Ru_{360} como ligando de afinidad y como sonda radioactiva.

Este compuesto es un derivado que se produce durante la síntesis del rojo de rutenio, en 1991 Ying y colaboradores demostraron que es el más potente de los inhibidores del uniportador de calcio mitocondrial. Nuestra estrategia fue sintetizar los compuestos que resultan de la reacción del RuCl_3 con amoníaco, utilizando material radioactivo. Entre estos compuestos se encuentran el Ru_{360} y el rojo de rutenio. La síntesis se llevó a cabo como se describe en la metodología. Separamos los complejos radioactivos por cromatografía de intercambio iónico, utilizando un gradiente lineal de concentración de formiato de amonio. En la figura 15 se muestran los espectros de absorbencia (300-450 nm) de las especies eluidas a lo largo del gradiente. El $^{103}\text{Ru}_{360}$ se despega de la resina aproximadamente a 0.4M del gradiente, mientras que a partir de 0.55 M de formiato de amonio empieza a aumentar el pico a 533 nm, que indica el máximo de absorbencia para el rojo de rutenio. La preparación purificada mostró un pico máximo y único a 360 nm en formiato de amonio, al igual que el compuesto

reportado por Ying y colaboradores (1991). También recuperamos el rojo de rutenio marcado radioactivamente (Figura 15).



$$\epsilon_{360}: 2.6 \times 10^4 \text{ mol/l.cm}$$

$$\epsilon_{533}: 2.1 \times 10^4 \text{ mol/l.cm}$$

Figura 15. Espectros de absorción de las especies generadas en la reacción del ¹⁰³RuCl₃ con amoniaco, separadas por cromatografía de intercambio iónico. Se señalan los coeficientes de extinción molar de los principales inhibidores del transporte de calcio mitocondrial.

El compuesto que obtuvimos se analizó cinéticamente con la finalidad de determinar su pureza y afinidad por el uniportador de calcio. En la figura 16 se muestra el análisis de Dixon del transporte variando las concentraciones de calcio y en presencia de diferentes concentraciones del inhibidor. Se obtuvieron las curvas que tipifican a un inhibidor no competitivo y la K_i fue igual a 7.68 nM.

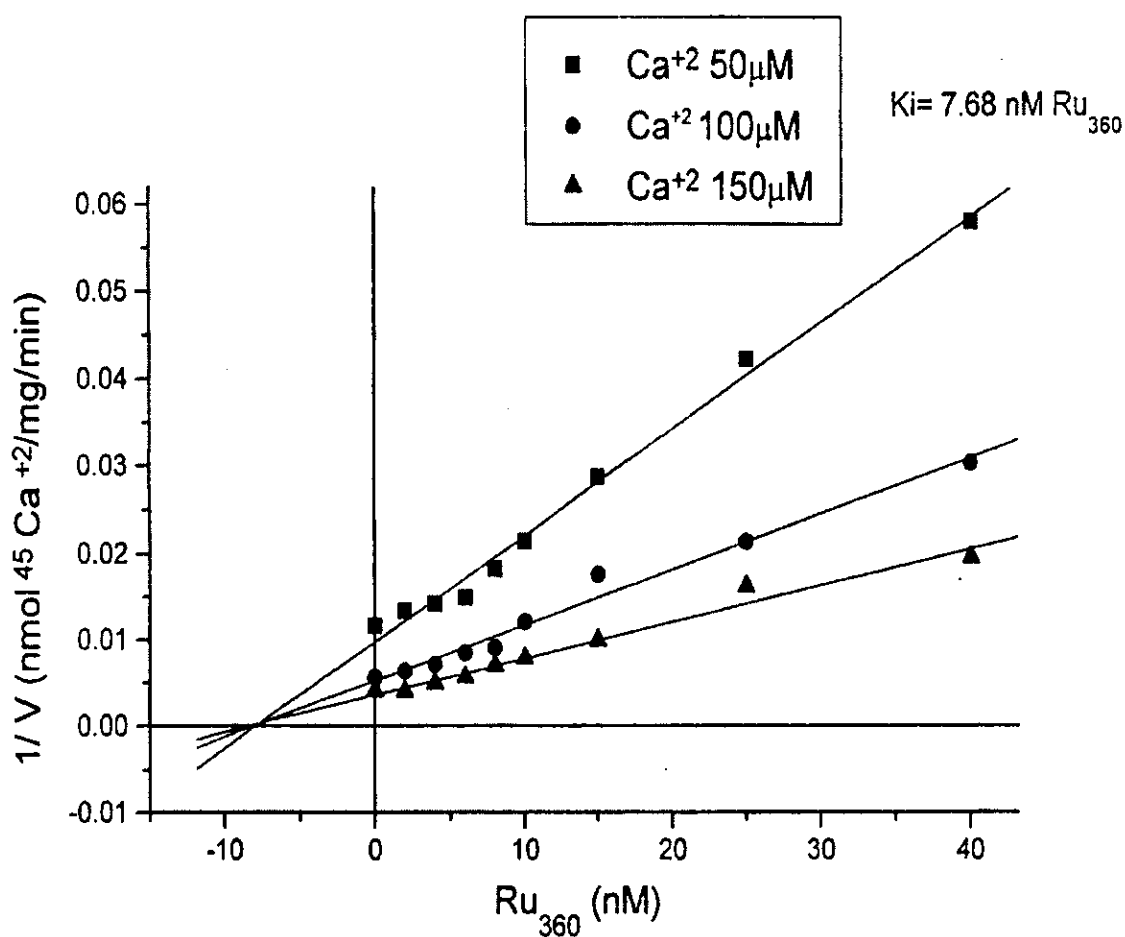


Figura 16. Gráficas de Dixon para los datos de cinética del transporte de calcio en presencia de Ru360. Se señalan las diferentes concentraciones de sustrato, el medio utilizado fue el mismo que en la Tabla III.

El análisis gráfico de Dixon para inhibidores fuertemente unidos, dio como resultado una K_i de 9.89 nM (Figura 17). A partir de éste análisis determinamos la concentración de inhibidor unido al uniportador, que fue de 4.8 pmol/mg de proteína.

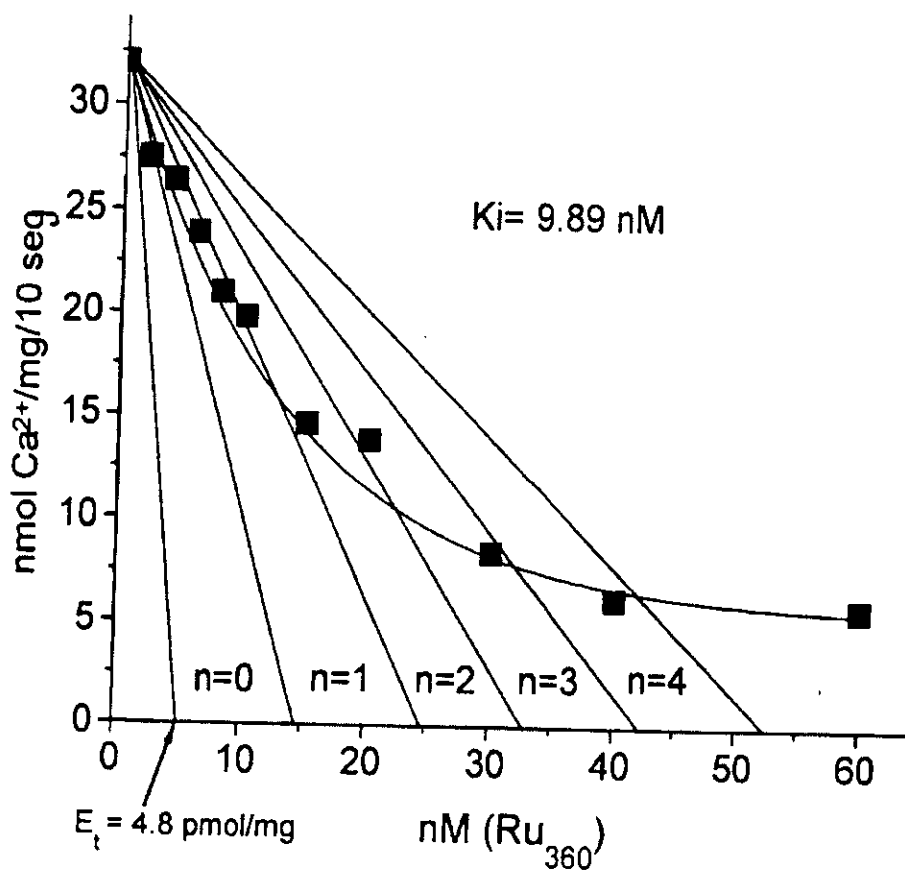


Figura 17. Análisis de Dixon para inhibidores fuertemente unidos. Se incubó 1 mg de mitocondrias con diferentes concentraciones de Ru_{360} en presencia de $^{45}CaCl_2$ (act. esp. 1000 cpm/nmol). A los 10 segundos se tomaron alícuotas y se filtraron a través de filtros de $0.45\mu m$. La radioactividad se midió en un contador de centelleo.

La unión específica del inhibidor se midió también directamente utilizando el compuesto radioactivo. En la figura 18 se muestra la unión de $^{103}\text{Ru}_{360}$ a mitocondrias intactas. La curva es hiperbólica y aparentemente se convierte en una función saturable por arriba de 20 nM. La linearización por el gráfico de Scatchard dio un valor para la K_D de 16.5 nM y para la B_{max} de 6.2 pmol/mg de proteína mitocondrial, muy cercano al obtenido por el análisis de Dixon. Existe una clara correlación entre la unión del complejo radioactivo y la inhibición del transporte de calcio en mitocondrias.

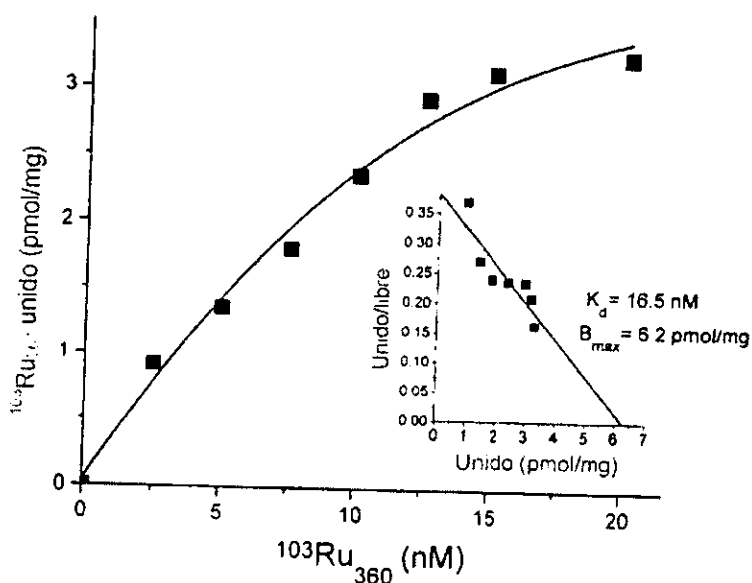


Figura 18. Unión del $^{103}\text{Ru}_{360}$ a mitocondrias intactas. Se incubó 1 mg de mitocondrias en el medio de transporte de calcio con diferentes concentraciones de $^{103}\text{Ru}_{360}$, a los 10 minutos se centrifugaron y lavaron con el mismo medio pero en presencia de $1.5 \mu\text{M}$ del inhibidor sin marca. La radioactividad se midió en un contador para emisiones γ .

Ya que la inhibición del transporte por el rojo de rutenio en las fracciones purificadas e incorporadas en COVs fue parcial (Ver Tabla III), evaluamos el efecto del Ru₃₆₀ en las muestras enriquecidas. Una vez que obtuvimos las fracciones por isoelectroenfoque preparativo, se incorporaron en COVs y se evaluó el transporte como ya se ha descrito. En la figura 19A, se muestra el gradiente de pH; en el panel B se observan dos picos de actividad de transporte de calcio, el primero con pI muy ácido (fracciones 1-2) y el segundo, que es el que hemos considerado que representa al uniportador de calcio, con un pI alrededor de 5.0. Hasta este punto habíamos concluido que las proteínas con actividad de transporte de calcio, tendrían pI's entre 5.0 y 6.0, ya que se enriquece una banda de 18-20 kDa. Recordemos que los anticuerpos específicos que reconocen una proteína de ese peso molecular, inhiben el transporte de calcio en mitoplastos (Ver Tabla VI). Por tanto, resulta interesante el comportamiento de estas actividades en presencia del inhibidor específico Ru₃₆₀. En la figura 19B se compara la actividad de transporte de las fracciones mencionadas, con la captación de calcio de las mismas muestras incubadas con 40 nM de Ru₃₆₀, antes de la incorporación en COVs (Figura 19C). Con este experimento podríamos descartar, que el inhibidor pierda efectividad por no encontrar un sitio al cual unirse en las moléculas de uniportador que estén orientadas incorrectamente en las vesículas. Como se observa, el Ru₃₆₀ inhibe completamente la actividad de transporte en las vesículas reconstituidas con proteínas con pI's entre 5.0 y 6.0. Sin embargo la actividad de las proteínas con pI muy ácido resulta insensible al inhibidor.

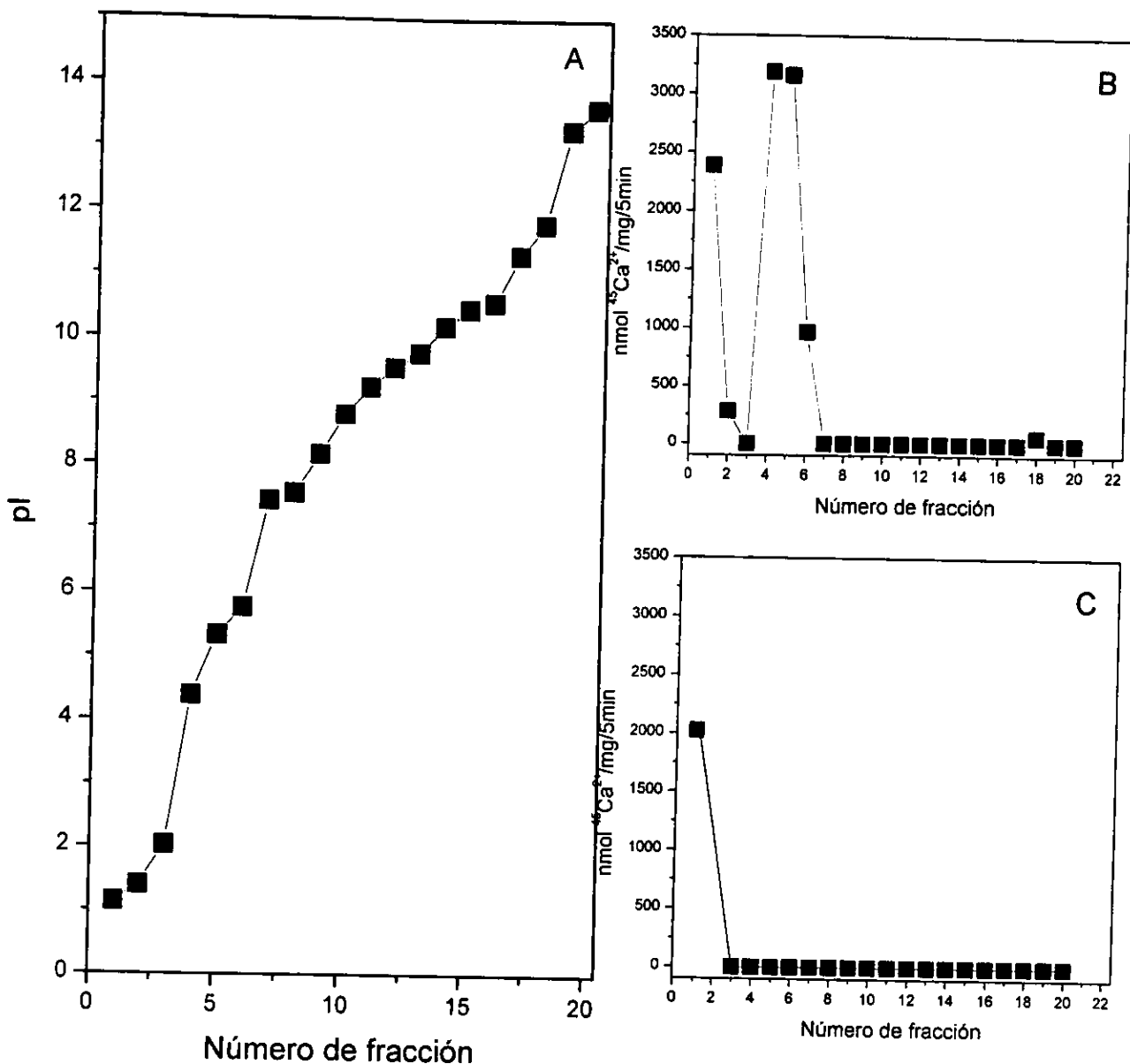


Figura 19. Isoelectroenfoque preparativo de F_{90} . Se separaron por isoelectroenfoque preparativo de 3-5 mg de proteína de la F_{90} . A cada una de las 20 fracciones resultantes se les midió el pH. El volumen final se dividió en dos partes, a una se le neutralizó con TRIS, se le concentró y dializó. Se tomaron alícuotas de 25 μg por fracción para incubarlas con 40 nM de Ru_{360} durante 1 hora. Posteriormente se incorporaron en COVs, como ya se ha descrito. A. Gradiente de pH. B. Transporte en COVs de las 20 fracciones sin incubarse con Ru_{360} . C. Transporte en COVs de las muestras incubadas con el inhibidor.

Para incrementar el rango de separación de las proteínas con pI's entre 4.0 y 6.0, las sometimos a refraccionamiento por isoelectroenfoque. En estas condiciones no hubo adición extra de anfólitos. El gradiente se formó con los anfólitos presentes en las muestras refraccionadas. En la figura 20A, se muestra el gradiente de pH, que forma un *plateau* en el rango de 4-6. La actividad se encuentra en dos zonas bien definidas. La actividad más alta (sensible a Ru₃₆₀) fue de 2332 nmol ⁴⁵Ca²⁺/mg/5min y se enfocó a un pH entre 5.02-5.26, como era de esperarse (Fig. 20B). De manera sorprendente, encontramos una segunda actividad de transporte, insensible al inhibidor a pH 2.57. El posible significado de estos resultados se discutirá más adelante.

Con la intención de utilizar el complejo ¹⁰³Ru₃₆₀ para aislar al uniportador de calcio mitocondrial, hicimos los siguientes experimentos para confirmar su especificidad. Para ello, marcamos partículas submitocondriales con 10 pmol ¹⁰³Ru₃₆₀/mg de proteína. Las partículas submitocondriales marcadas, fueron sometidas a electroforesis nativa y desnaturalizante. Los geles fueron analizados por autoradiografía, o alternativamente cortados en secciones de 2 mm a las que se midió la radioactividad en un contador de centelleo. Tanto en los geles nativos como en los desnaturalizantes se detectó una sólo banda. En la figura 21a, se muestra el perfil de radioactividad de un gel desnaturalizante en el que se separaron partículas submitocondriales marcadas con ¹⁰³Ru₃₆₀. En la figura 21b, se muestra la autoradiografía de un gel con proteínas tratadas en las mismas condiciones, la única banda detectable presenta un peso molecular de 18 kDa.

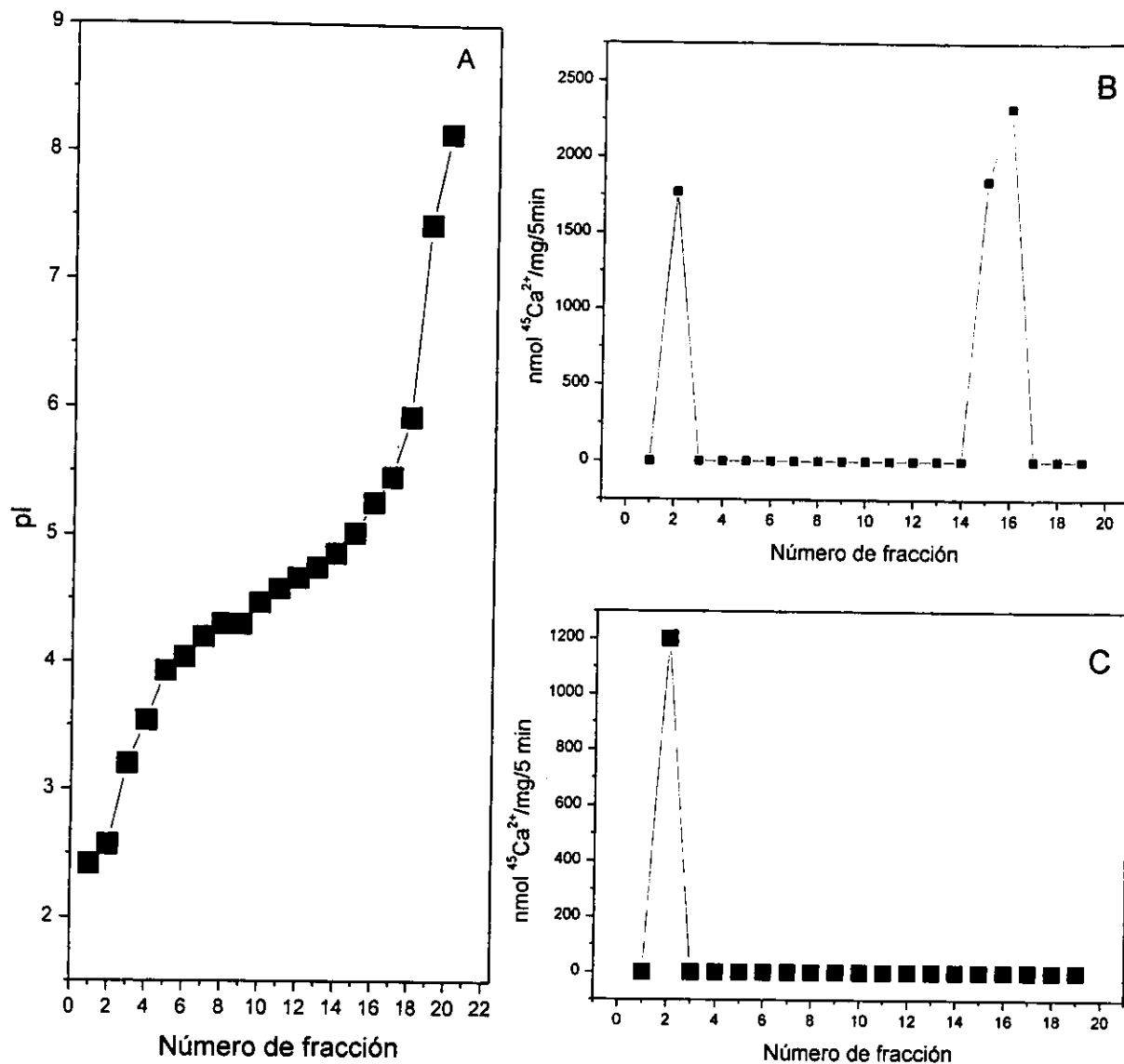
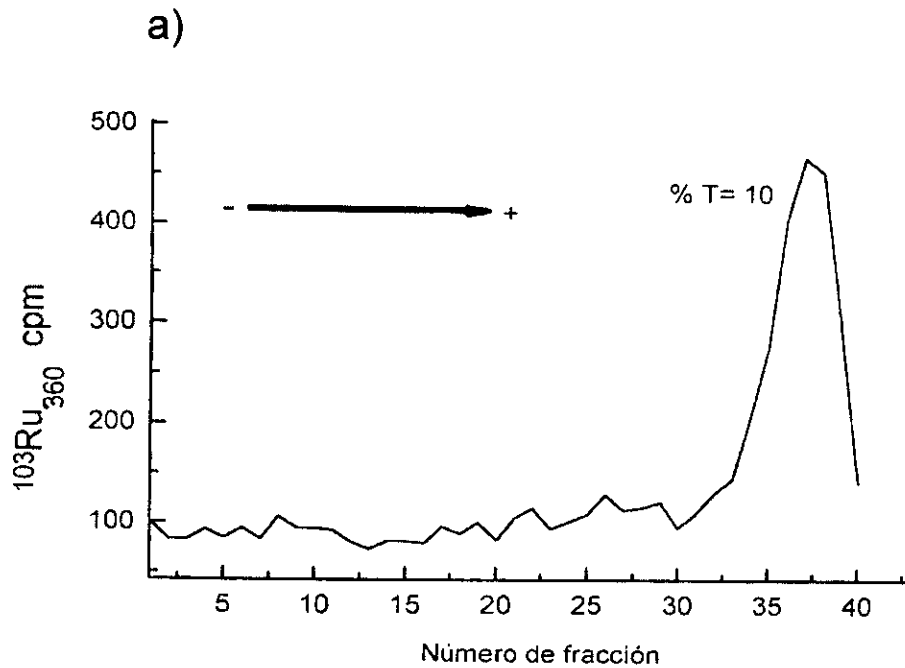


Figura 20. Isoelectroenfoco preparativo de muestras con pI's entre 4.0 y 6.0. Las fracciones con actividad de transporte de calcio (sensible a Ru_{360}), se colectaron y sin ningún tratamiento previo se diluyeron a 55 ml finales. Esta preparación se enfocó a 12W constante, durante 5 horas en frío. A las fracciones colectadas se les midió el pH, se neutralizaron, concentraron y dializaron. Una vez que se determinó proteína, se trataron como se describe en la figura anterior.



b)

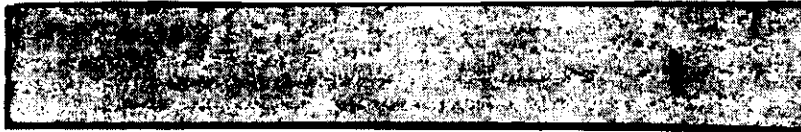


Figura 21. a) Perfil radioactivo de proteínas de partículas submitocondriales separadas por electroforesis en condiciones desnaturizantes. b) Autorradiografía de proteínas de partículas submitocondriales en geles de SDS.

Con la intención de obtener ésta proteína, hicimos extracciones por electroelución en fase líquida. Las PSM se marcaron como se ha descrito y se cargaron en un gel desnaturizante al 12% en una cámara de electroelución continua. Se aplicó una corriente de 12W constante, hasta que el colorante alcanzó el límite inferior del gel. En ese momento se colectaron fracciones de 2 ml que contenían las proteínas eluidas en orden ascendente de peso molecular.

Se midió la radioactividad a cada una de las fracciones y se determinó el peso molecular de las fracciones marcadas en un segundo gel desnaturalizante (Figura 22). Se observaron tres picos de radioactividad: el de la fracción 37, que tiene un peso molecular ligeramente menor a los 18 kDa y el de las fracciones 72-74, que muestran un enriquecimiento en la zona de 18 kDa.

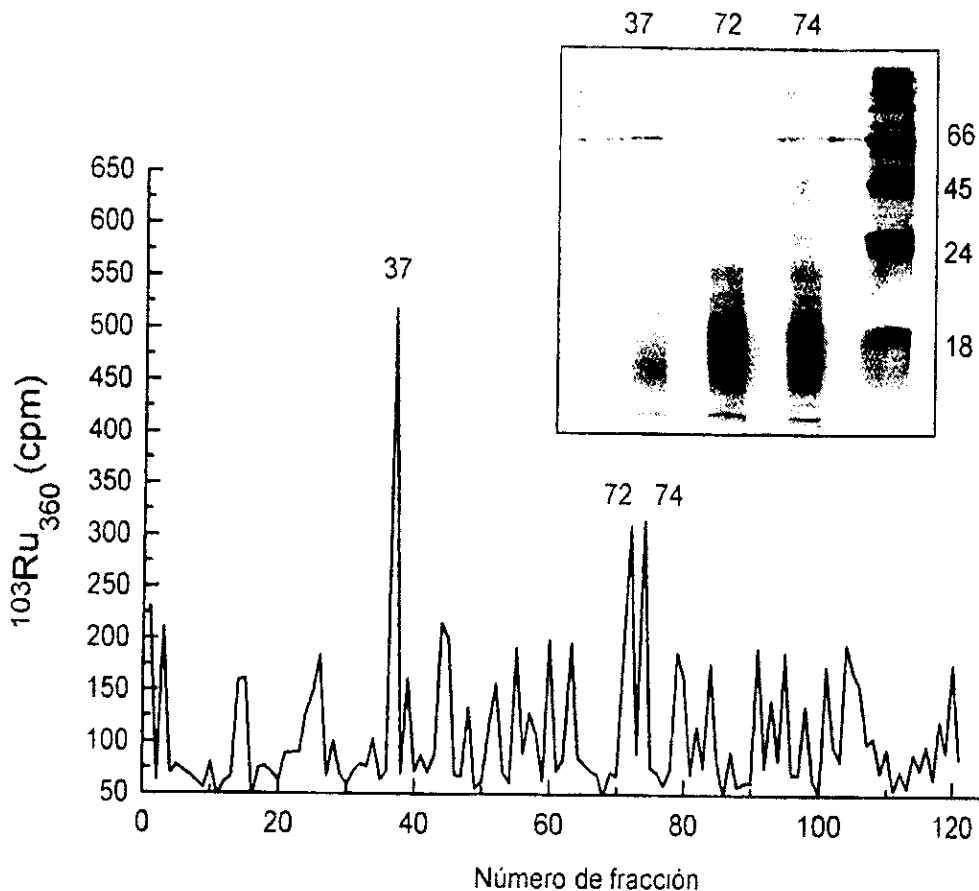


Figura 22. Electroelución en fase líquida de partículas submitocondriales marcadas con $^{103}\text{Ru}_{360}$. Se marcaron partículas submitocondriales como se indica en la figura 18 y se solubilizaron con 2% de SDS. Se sometieron a electroforesis hasta que el colorante rebasó el límite del gel preparativo. Las fracciones se recuperaron en orden ascendente de peso molecular, se concentraron y se analizaron al teñir con plata en un gel desnaturalizante (inserto).

Con la finalidad de obtener la proteína a la que se une el $^{103}\text{Ru}_{360}$, se diseñó una columna de afinidad aplicando el principio de separación de los complejos de rutenio. Se solubilizaron 20 mg de proteínas membranales con 1% de C_{12}E_8 y se incubaron con 10 pmol de $^{103}\text{Ru}_{360}$ /mg de proteína. El inhibidor no unido se eliminó dializando exhaustivamente contra formiato de amonio 0.2M pH 5.5. La proteína marcada se cargó en una columna de carboximetil-celulosa de 15 x 5.5.cm en presencia de la misma concentración de detergente. En la figura 23 se muestra el perfil radioactivo de las proteínas eluidas con un gradiente lineal de formiato de amonio de 0.2M a 1.0 M, pH 5.5. Se resuelven tres picos, el primero representa el $^{103}\text{Ru}_{360}$ libre, que eluyó a 0.4 M del gradiente de formiato de amonio y que no se encontró asociado a proteínas. Las dos fracciones restantes (pico 2 y 3) se analizaron por electroforesis, se tiñeron con la técnica de plata y se encontró que ambas presentaban una proteína de 18 kDa además de algunos contaminantes. Estas dos fracciones se unieron y se sometieron a una nueva electroforesis, la imagen teñida con azul de Coomassie muestra una sólo banda de 18 kDa (inserto figura 23).

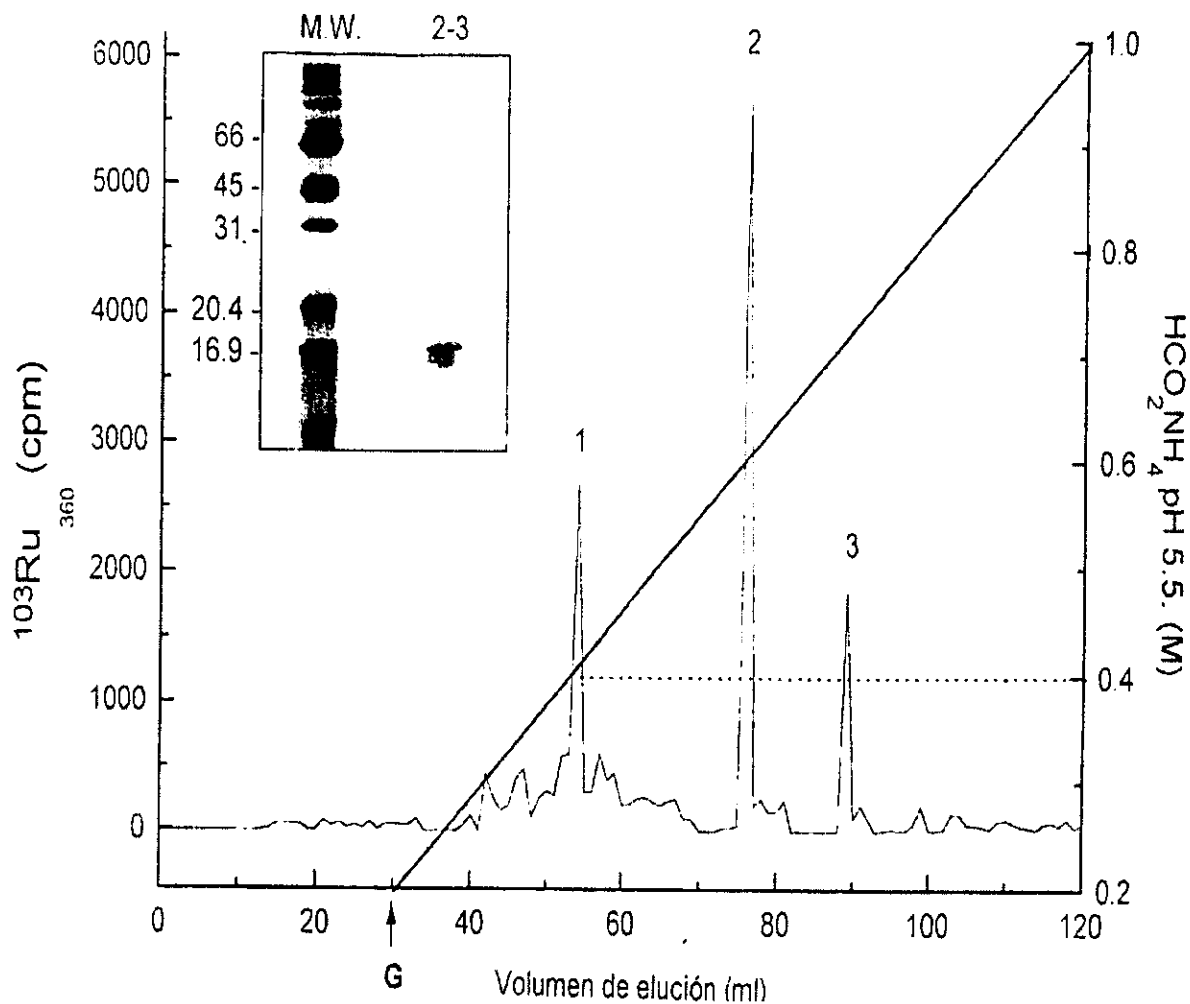


Figura 21. Cromatografía de intercambio iónico de partículas submitocondriales solubilizadas y marcadas con $^{103}\text{Ru}_{360}$. Las partículas submitocondriales se marcaron como se señala en la figura 18. Se centrifugaron y se solubilizaron en 1% de C_{12}E_8 . El solubilizado se cargó en una columna de carboximetilcelulosa, que se lavó con formiato de amonio 0.2 M. Para eluir las proteínas unidas a la resina se utilizó un gradiente lineal de formiato de amonio pH 5.5.

VI. DISCUSION

A partir de que se descubrió el transporte de calcio mitocondrial, se iniciaron los experimentos para identificar la naturaleza molecular de los transportadores involucrados en el proceso. A la fecha se ha reportado la purificación, reconstitución y caracterización inmunológica del intercambiador de salida $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ que es una proteína de 110 kDa (Li, W., 1992) y la purificación parcial de una proteína que aumenta la entrada de Ca^{2+} en proteoliposomas en intercambio con H^+ (Villa y cols., 1998). En el caso del transportador de entrada de calcio existen pocos y contradictorios reportes. Se ha propuesto que el uniportador es una glicoproteína localizada en el espacio intermembranal, a pesar de que el acarreador de calcio debe ser por fuerza una proteína con cruces membranales. Se le han asignado diferentes pesos moleculares: Jeng y Shamoó en 1980, aislaron un péptido de 2 kDa con gran afinidad y especificidad por calcio a la que denominaron calciforina, más tarde en 1983, Sokolove y Brenza, demostraron que todas las propiedades de afinidad por calcio de este péptido se debían a sus lípidos asociados; Saris y colaboradores en 1993, purificaron un péptido de 3 kDa asociado a una glicoproteína, estos autores propusieron que el primero funciona como canal de calcio sensible a rojo de rutenio, y que la glicoproteína podría ser un componente regulatorio. Más tarde se demostró que la glicoproteína era un contaminante de plasma presente en sus preparaciones (Mironova y cols., 1994). En 1997, este grupo reportó que el componente hidrofóbico de bajo peso molecular, puede formar un canal iónico al ser activado por calcio (Mironova y

cols., 1997). Recientemente han asociado la actividad del canal, a su capacidad para unir calcio bajo las condiciones en que opera el poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial (Mironova y cols., 2000). Otros autores sostienen que el uniportador es una glicoproteína de entre 30 y 42 kDa, ya que algunas de ellas incrementan la conductividad eléctrica en bicapas lipídicas en presencia de calcio (Panfili y cols., 1976; Sottocasa y cols., 1981).

Es evidente la variedad de propuestas que en torno a la identidad del uniportador se han reportado, por lo que al pretender señalar a alguna entidad molecular como la responsable del transporte de calcio mitocondrial, se deben tomar en cuenta todos los atributos cinéticos y regulatorios, que tipifican a este transporte en mitocondrias intactas.

En 1980 Rosier y Gunter, demostraron que liposomas reconstituidos con citocromo oxidasa son capaces de formar un potencial interno negativo y que pueden acumular Ca^{2+} . En ese sistema el rojo de rutenio no inhibe la captación, a diferencia de los agentes que colapsan el potencial, como el CCCP y la combinación de nigericina, valinomycin y K^+ . El que el rojo de rutenio no inhiba la acumulación de calcio indica que la citocromo oxidasa no está involucrada en el sistema de transporte de entrada mitocondrial. En nuestros experimentos demostramos que el modelo de vesículas de citocromo oxidasa (COVs), reconstituidas con extractos mitocondriales aumenta la acumulación de calcio, en las condiciones en que existe un potencial de membrana negativo interno, y que este transporte es sensible al rojo de rutenio. Aunque la K_i encontrada para el rojo de rutenio en el sistema de COVs es casi un orden de magnitud superior a la

reportada en mitocondrias, i.e. 30 nM (Vasington y cols., 1972), podemos tratar de explicarlo de la siguiente forma:

- 1) El inhibidor puede unirse inespecíficamente a diferentes estructuras. Al respecto, Voelker y Smetjck (1996) han demostrado que el rojo de rutenio se comporta en una bicapa difusa como un ión con una carga neta < 6 y que tiene una gran afinidad por membranas que contienen fosfatidilserina. Luft (1971) reportó que el rojo de rutenio se une con baja afinidad a otros fosfolípidos como la cardiolopina y la fosfatidilcolina.
- 2) Al incorporar al uniportador en COVs, el sitio de unión al inhibidor no es accesible.
- 3) El uniportador puede bajo ciertas condiciones, adoptar más de una conformación que se traduce en una diferente sensibilidad a los inhibidores y activadores del transporte (Sparagna y cols., 1998). Este grupo en 1995, describió un mecanismo adicional de entrada de calcio en mitocondrias, al que han denominado RAM (rapid mode of uptake), que permite la captación de grandes cantidades de calcio en pulsos cortos (Sparagna y cols., 1995). Ya que el efecto del rojo de rutenio sobre este transporte y el que tradicionalmente se atribuye al uniportador es el mismo, se sugiere que ambos mecanismos se llevan a cabo a través de un mecanismo de transporte único. Sin embargo, se requieren casi 10 veces más de rojo de rutenio para inhibir la entrada a través de RAM, que a través del uniportador. La propuesta es que la unión de calcio al lado citosólico del

complejo RAM, induce un cambio conformacional que activa el mecanismo más lento de transporte. Esto es consistente con el hecho de que el transporte RAM, puede ser reajustado disminuyendo la $[Ca^{2+}]$. Si el uniportador de calcio, puede adoptar dos estados conformacionales, que se expresan con una diferente sensibilidad al inhibidor, podría ser que en las condiciones del sistema que hemos empleado operará preferencialmente la conformación menos sensible al inhibidor. Una posible evidencia de que existe más de una conformación para el uniportador, son los estudios de inhibición con rojo de rutenio del transporte de calcio mitocondrial en diferentes tipos mitocondriales. Zimniak y Barnes (1980) reportaron la caracterización de un transportador de calcio en vesículas membranales de *Azotobacter vinelandii*, que se inhibe a concentraciones muy altas de rojo de rutenio, i.e. 4 μM a pH 6.5. El rojo de rutenio no inhibe el transporte de calcio en mitocondrias de plantas (Åkerman y Moore, 1983); en protistas como *Euglena gracilis*, es parcialmente insensible (Uribe y cols., 1994) y en levadura se estimula (Bazhenova y cols., 1998).

Por otro lado, el Mg^{2+} inhibe la acumulación de calcio en COVs a altas concentraciones, esto corresponde con lo reportado en mitocondrias, en donde se ha propuesto que el efecto se debe al apantallamiento por cargas (Jung et al., 1997), más que a la acumulación del magnesio a través del uniportador.

El sistema reconstituido en este trabajo muestra selectividad para cationes, el Ca^{2+} y el Sr^{2+} se transportan, mientras que el Mg^{2+} no se acumula. Estos

resultados concuerdan con la serie de selectividad del uniportador, que se sabe es $\text{Ca}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{La}^{3+} \gg \text{Mg}^{2+}$ (Gunter y Gunter, 1990).

La posibilidad de que los lípidos asociados a las proteínas reconstituidas en modelos de bicapas actúen como ionóforos, se ha reportado en la literatura (Sokolove y Brenza, 1983). Al respecto demostramos que los lípidos extraídos de las fracciones que transportan Ca^{2+} , no son capaces de transferir calcio de una fase hidrofílica a otra. Demostramos el papel esencial de un componente proteico en nuestro sistema, ya que se pierde la actividad de transporte al incorporar los extractos activos previamente desnaturalizados por calor en COV's.

En nuestro esquema de purificación, se utilizaron técnicas de precipitación con sales, cromatografía de inmunoafinidad y de isoelectroenfoque preparativo en presencia de un detergente zwitteriónico. La actividad específica del uniportador de calcio en la fracción más enriquecida fue de 14888 ± 2922 nmol Ca^{2+} /mg/5 min (50 nmol Ca^{2+} /mg/seg). Recientemente Villa y colaboradores (1998) reportaron la acumulación de 0.8 nmol $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /mg/seg en proteoliposomas de asolectina reconstituidos con proteínas de partículas submitocondriales, en un sistema donde se favorece la entrada electroforética de calcio con K^+ y valinomicina.

Otros reportes de proteínas que transportan Ca^{2+} se han expresado en términos de conductividad de la membrana (Mironova y cols., 1982). En nuestro sistema las proteínas de partículas submitocondriales reconstituidas en COVs acumulan 0.43 nmol $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /mg/seg.

En nuestras fracciones, la más activa (sensible a los inhibidores policatiónicos del transporte: rojo de rutenio y Ru₃₆₀) se obtuvo a un pI entre 5.5 y 6.0. Tras su separación por electroforesis en geles de poliacrilamida se observan principalmente dos proteínas (18-20 y 70 kDa). Sin embargo, en las determinaciones de actividad también encontramos actividad de transporte (insensible a rojo de rutenio) en las regiones más ácidas del gradiente en el isoelectroenfoque. En esta fracción se observa una proteína de 70 kDa, además de otros contaminantes.

¿Son ambas proteínas un mismo componente del uniportador?

La actividad insensible a rojo de rutenio podría ser atribuida a:

1) La unión inespecífica del catión a proteínas que por su pI (ácido), tuvieran carga neta negativa y al ser reconstituidas a un pH neutro, quedarán desprotonadas y unieran calcio (Figura 24).

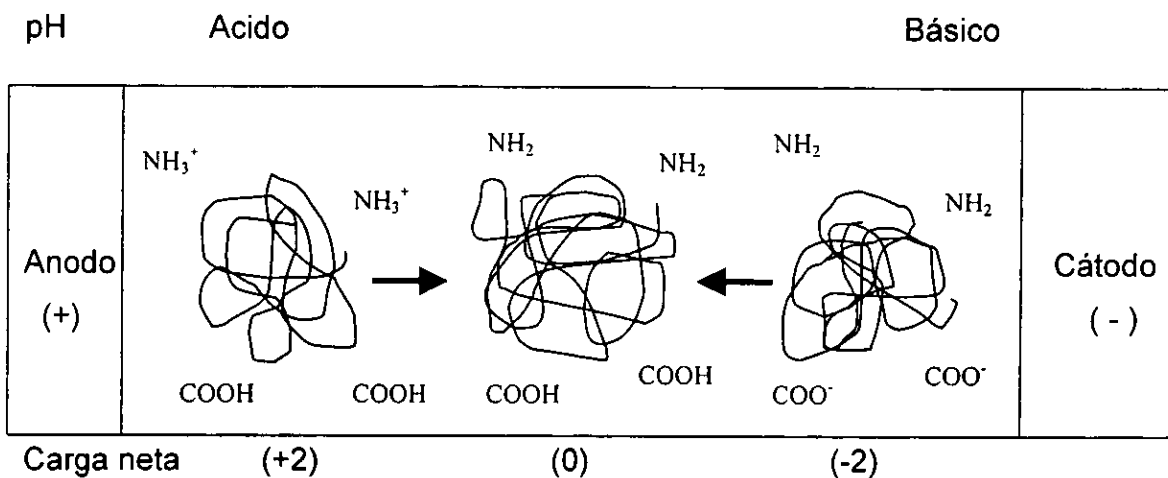


Figura 24. Electroenfoque de una proteína en un gradiente de pH. Una proteína con carga neta negativa, tenderá a migrar hacia el ánodo (←) mientras acepta protones. En algún punto la carga neta de la molécula será cero y dejará de migrar.

Si esto estuviese sucediendo, observaríamos un incremento en el transporte hacia la región ácida del gradiente. En nuestro sistema esto no ocurre, ya que la captación en las vesículas control que no forman potencial, es la misma a cualquier pH.

2) La existencia de un sistema de transporte de entrada de calcio mitocondrial diferente al uniportador, por lo menos en sensibilidad a los inhibidores clásicos (esta hipótesis ya se ha discutido).

3) La posibilidad de que el sistema de transporte esté formado por más de un componente y que lo observamos en los experimentos de las figuras 19 y 20, sea la disociación de la subunidad de transporte y de la subunidad a la que se une el inhibidor. Al respecto se sabe, que las subunidades de un oligómero pueden disociarse de manera reversible, bajo la influencia de variables como la temperatura, la unión de un ligando, o el pH. Por ejemplo, se ha reportado que la 4-aminobutirato transferasa es un dímero a pH 7.0, mientras que a pH 5.0 predomina la especie monomérica (Pineda y cols., 1995). Podemos pensar que durante el isoelectroenfoque preparativo, las proteínas que migran hacia su pI, pueden sufrir una disociación parcial cuando se encuentran a un pH ácido; al disociarse, cada una de las subunidades migraría hasta alcanzar su pI. De esta forma, al incorporar la fracción con el pI ácido, se reconstituiría el transporte, al igual que en la fracción de pI 5.5-6.0, en donde aún existe la especie unida a la subunidad menor.

El papel que cada una de estas subunidades podría jugar en el transporte se define con mayor claridad en los experimentos con anticuerpos específicos.

Por los datos de inhibición de los anticuerpos parece concluyente que la proteína de entre 18-20 kDa está relacionada con el transporte de calcio. Sin embargo el papel de la subunidad mayor (70 kDa) no es muy claro, ya que en presencia del anticuerpo específico que la reconoce, el transporte se inhibe en un 40%. Podemos especular acerca de la importancia de estas proteínas. Se ha propuesto que el uniportador de calcio es un mecanismo cooperativo en el cual la unión al sitio de activación, incrementa la velocidad de transporte (Prestipino y cols., 1974; Carafoli, 1975). Si este sitio está desocupado, la entrada a través del uniportador no se activará. Este sitio de reconocimiento podría estar localizado en la proteína de 18-20 kDa y debería estar situado cerca de la cara externa de la membrana interna mitocondrial. Ya que esta subunidad es muy pequeña, suponemos que tiene pocos cruces transmembranales, pero puede estar suficientemente expuesta como para que la molécula de anticuerpo apantalle el sitio de reconocimiento del calcio y el transporte no pueda activarse. Por el otro lado, la proteína de 70 kDa estaría atravesando la membrana y cambiaría su conformación al ocuparse el sitio de activación, lo que daría como resultado un aumento en el transporte.

El anticuerpo que reconoce esta proteína disminuye ligeramente el transporte, lo que podría significar que se une a un epítipo localizado lejos del sitio activo.

Un dato que apoya la idea de una subunidad regulatoria, es la observación de que la actividad del uniportador es regulada por cationes divalentes externos, que se unen a un componente localizado en el espacio intermembranal (Igbavboa y Pfeiffer, 1991). Estos autores proponen que dicha subunidad se asociaría o disociaría del uniportador, en respuesta a la ocupación por calcio del sitio de activación. Al respecto Garlid (1994), observó que el transporte de calcio en un sistema de bicapa lipídica presenta un comportamiento hiperbólico, en contraste con el que se observa en mitocondrias intactas, en donde se sabe que el calcio es un activador alostérico del transporte (Gunter y Pfeiffer, 1990). Proponen que en mitocondrias la activación por calcio del uniportador, depende de una proteína regulatoria accesoria.

Estos resultados son consistentes con los estudios de actividad reversa del uniportador, en donde se ha observado que el EGTA es casi tan efectivo como el rojo de rutenio para inhibir la liberación inducida por desacoplante (Igbavboa y Pfeiffer, 1988); Litsky y Pfeiffer, 1997). Proponen que el EGTA previene la unión de calcio al sitio de activación, manteniendo la $[Ca^{2+}]$ por debajo de la K_d y por tanto la salida a través del uniportador es muy lenta. La fracción que incorporamos en COVs y que dió lugar a los anticuerpos, se obtuvo después de precipitar con altas concentraciones de sales; sin embargo, en estas condiciones co-purifica el citocromo c, que sabemos es una proteína periférica asociada a la membrana interna mitocondrial, por lo que no podemos descartar el modelo de una subunidad soluble.

Una herramienta poderosa para la identificación y aislamiento de proteínas es la utilización de ligandos específicos. En este trabajo demostramos que el complejo binuclear de rutenio (Ru_{360}), puede utilizarse con este fin para la identificación y purificación del uniportador de calcio mitocondrial. Recientemente Matlib y cols. (1998), demostraron que este inhibidor no tiene efecto sobre otros movimientos de calcio, por ejemplo: el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial; el transporte de calcio de retículo sarcoplásmico; el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de sarcolema; la actividad de canal Tipo L de la membrana celular y la actividad de ATPasa de la actomicina de miofibrillas. Esto, aunado a la alta afinidad del Ru_{360} por el uniportador de calcio mitocondrial (5.5 pmol/mg proteína) lo convierte en el inhibidor ideal para identificar la naturaleza molecular de este transportador.

Nuestros resultados también indican que el Ru_{360} se une a una subunidad de bajo peso molecular y que bajo ciertas condiciones, es posible observar actividad de transporte de calcio insensible a este inhibidor. Estos datos dan lugar a una posible explicación en base a la estructura molecular del uniportador, que podría estar formado por una subunidad de transporte y otra a la que el inhibidor se une y que jugaría un papel regulatorio.

Aún quedan muchas preguntas por resolver en cuanto a la manera en que los sistemas de transporte regulan el calcio mitocondrial y de que manera interactúan con el metabolismo celular. Uno de los responsables de esta sutil regulación es el uniportador de calcio mitocondrial, al que se ha sumado un segundo sistema de transporte (RAM), que se activa de manera transitoria por altas concentraciones de calcio.

La visión del calcio mitocondrial y su papel en la biología de la célula, ha evolucionado dramáticamente a partir de los últimos 25 años. Durante mucho tiempo se pensó que la mitocondria era un reservorio de Ca^{2+} capaz de amortiguar los incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (Nicholls y cols., 1978). Ahora sabemos que la captación de calcio en la mitocondria participa en el sistema de señales de la célula, en microambientes asociados a otras membranas. Rutter y Rizzuto (2000), han documentado imágenes en células vivas, con tomografía de transmisión electrónica, en donde la concepción clásica que tenemos de la fisonomía mitocondrial cambia radicalmente. Esta nueva visión, nos ofrece (en muchos tipos celulares) mitocondrias que existen en estrecha relación con las membranas de retículo endoplásmico, por lo que estos autores han acuñado el término de "retículo mitocondrial", para designar a estas estructuras. Una de las metas importantes a conseguir, es la de investigar la importancia y relación de estos dos transportadores de calcio en los sitios de contacto con las membranas de retículo endoplásmico. A medida que se identifiquen las entidades que están involucradas en estos procesos se conocerán las propiedades intrínsecas de los sistemas de transporte de calcio mitocondrial.

Aparentemente, la única certeza con que podemos contar en cuanto al conocimiento de la mitocondria, es que seguirá cambiando a medida que las preguntas actuales se resuelvan y otras nuevas ocupen su lugar.

**ESTA TESIS NO DEBE
SER DE LA BIBLIOTECA**

VII. CONCLUSIONES

- La actividad de transporte presentada en este trabajo tiene los atributos cinéticos y regulatorios que definen al uniportador de calcio en mitocondrias.
- El transporte de calcio en este sistema es de origen protéico, los lípidos que copurifican con las proteínas reconstituidas no tienen actividad ionofórica.
- Los experimentos de reconstitución e identificación inmunológica revelan dos proteínas, una de 18-20 y una de 70 kDa, que podrían formar parte de un complejo.
- Los experimentos de marcaje indican que el sitio de unión del inhibidor específico del transporte es una proteína de 18-20 kDa. Esta subunidad podría tener un carácter regulatorio, mientras que la subunidad mayor podría representar a la proteína transportadora.

VIII. PERSPECTIVAS

Obtener ambas subunidades intentando reconstituir el transporte con cada una de ellas y demostrar que se cumple el siguiente esquema:

Subunidad	18-20 kDa	70 kDa	18-20 + 70 kDa
Transporte de Ca^{2+}	-	+	+
Inhibición por R.R./Ru ₃₆₀	-	-	+
Unión $^{103}\text{Ru}_{360}/^{103}\text{R.R.}$	+	-	+

De ser así, propondríamos una estructura oligomérica para el uniportador, con una subunidad regulatoria a la que se une el inhibidor. Para confirmar la suposición anterior, intentaríamos entrecruzar ambas subunidades, para demostrar que la actividad insensible a rojo de rutenio es la misma que la del pl 5.5-6.0 y que el pH está propiciando la disociación del oligómero.

El aislamiento y reconstitución del uniportador de calcio, abre la posibilidad no sólo de identificar a la proteína o al complejo responsable del mecanismo de entrada de calcio en mitocondrias, sino también a tener acceso a la poderosa batería de herramientas que proporciona la biología molecular. La secuenciación

de esta proteína permitiría la comparación entre secuencias de otros sistemas de transporte, posiblemente relacionados.

La secuencia o alternativamente la obtención de anticuerpos monoclonales contra estas proteínas, podrían utilizarse como sondas en un banco de cDNA comercial de corazón de res o de riñón de rata. Tras identificar las clonas positivas, se podrían llevar a un vector de expresión adecuado, posiblemente levadura.

La producción de cantidades suficientes de esta proteína, a través de las técnicas de biología molecular permitiría a futuro, llevar a cabo estudios de tipo estructural utilizando cristalografía de Rayos X o de resonancia magnética nuclear, lo que daría una detallada información de los mecanismos de acción de este tipo de moléculas.

IX. REFERENCIAS

Akerman, K.E., Winkström, M. y Saris, N. Effect of inhibitors on the sigmoidicity of the calcium ion transport kinetics in rat liver mitochondria. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 464, 287-294.

Akerman, K. Y Moore, A. Phosphate-dependent, ruthenium red insensitive Ca^{2+} uptake in mung bean mitochondria. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114, 1176-1181.

Bazhenova, E., Saris, N. Y Zvyagilskaya, R. Stimulation of the yeast mitochondrial calcium uniporter by hypotonicity and by ruthenium red. (1998) *Biochim. Biophys. Acta.* 1371, 96-100.

Blackshear, P., Nairn, A. y Kuo, J. Protein kinases: a current perspective (1988) *FASEB J.* 2, 2957-2969.

Bragadin, M., Pozzan, T. y Azzone, G. Kinetics of Ca^{2+} carrier in rat liver mitochondria (1979) *Biochemistry* 18, 5972-5978.

Carafoli, E. Active accumulation of Sr^{2+} by rat liver mitochondria. Competition between Ca^{2+} and Sr^{2+} . (1965) *Biochim. Biophys. Acta* 97, 99-106.

Carafoli, E., Gazzotti, P., Vasington, F., Sottocassa, G., Sandri, G., Panfili, E. y DeBernard, B. (1972) in *Biochemistry and Biophysics of Mitochondrial Membranes*. (Azzone, G., Carafoli, E., Lehninger, A., Quagliariello, E. and Silipandri, N., eds.) Acad. Press. New York, 623-640.

Carafoli, E. (1975) The interaction of calcium with mitochondria, with special reference to the structural role of Ca^{2+} in mitochondrial and other membranes. *Mol. and Cell. Biochem.* 8, 133-140.

Charuk, J., Pirraglia, C. y Reithmeier, F. Interaction of ruthenium red with calcium binding proteins. (1990) *Anal. Biochem.* 38, 123-131.

Chávez, E., Briones, R., Michel, B., Bravo, C. y Jay, D. Evidence for the involvement of dithiol groups in mitochondrial calcium transport: studies with cadmium. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.* 242: 493-497.

Crompton, M., Capano, M. y Carafoli, E. The sodium-induced efflux of calcium from heart mitochondria. A possible mechanism for the regulation of mitochondrial calcium. (1976) *Eur. J. Biochem.* 69, 453-462.

De Luca, H. F. y Engström, G. W. Calcium uptake by rat kidney mitochondria (1961). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 47, 1744-1754.

Evtodienko, Y., Azarashvili, T. y Kudin, A. Calcium binding to polypeptides of rat liver and Zajdela hepatoma mitochondrial inner membranes. (1998) *FEBS Lett.* 423, 45-48.

Farber, J. The role of calcium in lethal cell injury. (1990) *Chem. Res. Toxicol.* 3, 503-508.

Fletcher, J., Greenfield, B. Hardy, C., Scargill, D. y Woodhead, J. Ruthenium red. (1961) *J. Chem. Soc.* 2000-2007.

Garlid, K. Mitochondrial calcium transport: a progress report. (1994) *J. Bioenerg. Biomembr.* 26, 537-542.

Gateau-Roesch, A., Pavlov, E., Lazareva, A., Limarinko, A., Levrat, C., Saris, N. Louisot, P. y Mironova, G. Calcium-binding properties of the mitochondrial

channel forming hydrophobic component. (2000) *J. Bioenerg. Biomembr.* 32, 105-110.

Gómez-Puyou, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., Becker, G. y Lehninger, A. An insoluble calcium binding factor from rat liver mitochondria (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47, 814-819.

Gornell, A.C., Bardawill, C. y David, M. (1949) *J. Biol. Chem.* 177, 751-756.

Gunter, T. y Pfeiffer, D. (1990) Mechanisms by which mitochondria transports calcium. *Am. J. Physiol.* 258, C755-C786.

Gunter, T., Puskin, J. y Russell, P. Quantitative magnetic resonance studies of manganese uptake by mitochondria. (1975) *Biophys. J.* 15, 319-333.

Gunter, K. y Gunter, T. Transport of calcium by mitochondria (1994) *J. Bioenerg. Biomembr.* 26, 471-485.

Gunter, T., Buntinas, L., Sparagna, G. y Karlene, G. The Ca^{2+} transport mechanism of mitochondria and Ca^{2+} uptake from physiological-type Ca^{2+} transients. (1998) *Biochem. Biophys. Acta.* 1366, 5-15.

Halestrap, A. The regulation of the oxidation of fatty acids and other substrates in rat heart mitochondria by changes in the matrix volume induced by osmotic strength, valinomycin and Ca^{2+} . (1987) *Biochem. J.* 244, 159-165.

Hansford, R. G. Dehydrogenase activation by Ca^{2+} in cells and tissues. (1991) *J. Bioenerg. Biomembr.* 23, 823-854.

Igbavboa, V. y Pfeiffer, D. (1988) EGTA inhibits reverse uniport-dependent calcium release from uncoupled mitochondria. Possible regulation of the calcium uniporter by a calcium binding site on the cytoplasmic side of the inner membrane. *J. Biol. Chem.* 263, 1405-1412.

Igbavboa, V. y Pfeiffer, D. (1991) Regulation of the reverse uniport activity in mitochondria by extramitochondrial divalent cations. Dependence on a soluble intermembrane space component. *J. Biol. Chem.* 266, 4283- 4287.

Jeng, A. y Shamoo, A. Isolation of a Ca^{2+} carrier from calf heart inner mitochondrial membrane. (1980) J. Biol. Chem. 255, 6897-6903.

Jung, K., Panzeter, E., Baysal, K y Brierly, G. (1997) On the relationship between matrix free Mg^{2+} concentration and total Mg^{2+} in heart mitochondria. Biochim. Biophys. Acta. 1320, 310-320.

Kagawa, Y. y Racker, E. Partial resolution of enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. (1971) J. Biol. Chem. 246, 5477-5487.

Kapús. A., Szászi, K., Káldi, K., Ligeti, E. y Fonyó, A. Is the mitochondrial Ca^{2+} uniporter a voltage-modulated transport pathway? (1991) FEBS Lett. 282, 61-64.

Kröner, H. L. Calcium ions, an allosteric activator of calcium uptake in rat liver mitochondria. (1986) Arch. Biochem. Biophys. 251, 525-535.

Laemmli, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. (1970) Nature 227, 680-685.

Lee, C. y Ernster, J. (1965) In symposium on the regulation of metabolic process in mitochondria (Tager, J., Papa, S., Quagliariello, E. and Slater, E. eds). Vol. 7, Elsevier/North Holland, New York, p.p. 218-234.

Lenhinger, A. (1971) A soluble heat-labile, high affinity calcium binding factor extracted from rat liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42, 312-318.

Lenzen, S., Münster, W. y Rustenbeck, I. Dual effect of spermine on mitochondrial calcium transport. (1992) *Biochem. J.* 286, 597-602.

Li, W. Shariat-Madar. Z., Powers, M., Sun, X., Lane, R. y Garlid, K. (1992) Reconstitution, identification, purification and immunological characterization of the 110 kDa $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiporter from beef heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* 267, 17983-17989.

Litsky, M. y Pfeiffer, D. (1997) Regulation of the mitochondrial calcium uniporter by external adenine nucleotides: the uniporter behaves like a gated channel which is regulated by nucleotides and divalent cations. *Biochemistry*, 36, 7071-7080.

Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. y Randall, R. Protein measurement with the folin phenol reagent. (1951) J. Biol. Chem. 193, 262-275.

Luft, J. Ruthenium red and violet. I. Chemistry, purification, methods of use fro electron microscopy and mechanism of action. (1971) Anat. Rec. 171, 369-416.

Matlib, M., Zhou, Z., Knight, S., Ahmed, S., Choi, K., Krause, J., Phillips, R., Altschuld, R., Katsube, Y., Sperelakis, N. y Bers, D. Oxygen-bridged dinuclear ruthenium amine complex specifically inhibits Ca^{2+} uptake into mitochondria *in vitro* and *in situ* in single cardiac myocytes. (1998) J. Biol. Chem. 273, 10223-10231.

Mela, L. Inhibition and activation of calcium transport in mitochondria. Effect of lanthanides and local anesthetics drugs. (1969) Biochemistry 8, 2481-2486.

Mironova, G., Sirota, T. Pronevich, L., Trofimenko, N., Mironov, G., Grigorjev, P., y Kondrashova, M. Isolation and properties of Ca^{2+} -transporting glycoprotein and peptide from beef heart mitochondria. (1982) J. Bioenerg. Biomembr. 213-225.

Mironova, G., Lazareva, A., Gateau-Roesch, A., Tynnella, J., Zakirova, R., Pavlov, Y., Vanier, M. y Saris, N. Oscillating Ca^{2+} -induced channel activity obtained in BLM

with a mitochondrial membrane component. (1997) *J. Bioenerg. Biomembr.* 29, 561-569.

Mironova, G., Baumann, M., Kolomytkin, O., Krasichkova, A., Berdimuratov, A., Sirota, T., Virtanen, I., Saris, N. (1994) Purification of the channel component of the mitochondrial calcium uniporter and its reconstitution into planar lipid bilayers. *J. Bioenerg. Biomembr.* 26, 231-238.

Moore, C. Specific inhibition of mitochondrial calcium transport by ruthenium red. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42, 298-305.

Moreno-Sánchez, R. Regulation of oxidative phosphorylation in mitochondria by external free Ca^{2+} concentration. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 4028-4034.

Nakamura, J., Wang, T. y Tsai, L. Properties and characterization of a highly purified Ca^{2+} -ATPase from dog cardiac and rabbit skeletal muscle. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 5079-5083.

Nicholls, D. The regulation of extramitochondrial free calcium ion concentration by rat liver mitochondria. (1978) *Biochem. J.* 176, 463-479.

Panfili, E., Crompton, E. y Sottocasa, G. L. Immunochemical evidence of the independence of the $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ antiporter and electrophoretic Ca^{2+} uniporter in heart mitochondria. (1983) FEBS Lett. 123, 30-32.

Pineda, T., Osei, Y. y Churchich, J. (1995) Characterization of monomeric 4-aminobutirate aminotransferase at low pH. Eur. J. Biochem. 228, 683-688.

Prestipino, G., Ceccarelli, D., Conti, F. y Carafoli, E. interactions of a mitochondrial Ca^{2+} -binding glycoprotein with lipid bilayer membranes. (1974) FEBS Lett 45, 99-103.

Ramírez, J., Calahorra, M. y Peña, A. Variations on the "dilution" method for reconstituting cytochrome c oxidase into membrane vesicles. (1987) Anal. Biochem. 163, 100-106.

Reed, K. y Bygrave, F. The inhibition of mitochondrial calcium transport by lanthanides and ruthenium red. (1974) Biochem. J. 140, 143-155.

Rizzuto, R., Brini, M., Murgia, M. y Pozzan, T. Microdomains with high Ca^{2+} close to IP_3 -sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. (1992a) Science, 262, 744-747.

Rizzuto, R., Simpson, W., Brini, M. y Pozzan, T. Rapid changes of mitochondrial Ca^{2+} revealed by specifically targeted recombinant aequorin. (1992b) *Nature* 358, 325-327.

Rutter, G. y Rizzuto, R. Regulation of mitochondrial metabolism by ER Ca^{2+} release: an intimate connection. (2000) *TIBS* 25, 456-462.

Romslo, I. y Flatmark, T. Energy-dependent accumulation of iron by rat liver mitochondria. Relationship to the active transport of Ca^{2+} . (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 325, 38-46.

Rosier, R., Gunter, T., Tucker, D. y Gunter, K. A rapid method for separating small vesicles from suspension. (1979) *Anal. Biochem.* 96, 384-390.

Rosier, R. y Gunter, T. Calcium uptake by cytochrome oxidase vesicles. (1980) *FEBS Lett.* 109, 99-103.

Rutter, G. y Denton, R. Regulation of NAD^+ -linked isocitrate dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase by Ca^{2+} ions within toluene-permeabilized rat heart

mitochondria. Interactions with regulation by adenine nucleotides and NADH/NAD⁺ ratios. (1988) *Biochem. J.* 252, 181-189.

Saris, N., Sirota, T., Virtanen, I., Niva, K., Penttillä, T., Dolgachova, L. y Mironova, G. Inhibition of the mitochondrial calcium uniporter by antibodies against a 40 kDa glycoprotein. (1993) *J. Bioenerg. Biomembr.* 25, 307-312.

Schnaitman, C. y Greenwalt, W. Enzymatic properties of the inner and outer membranes of rat liver mitochondria. (1968) *J. Cell Biol.* 38, 158-175.

Sokolove, P. y Brenza, J. Isolation of a fraction with Ca²⁺ ionophore properties from rat liver mitochondria (1983) *Arch. Biochem. Biophys.* 221, 404-416.

Sparagna, G., Gunter, K., Sheu, S. y Gunter, T. Mitochondrial calcium uptake from physiological-type pulses of calcium. A description of the rapid uptake mode. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 27510-27515.

Tashmukhamedov, B., Galgelgans, A., Mamatkulov, K. y Makhmudova, E. Inhibition of Ca²⁺ transport in mitochondria by selective blockade of membrane mucopolysaccharides by hexamine cobaltichloride. (1972) *FEBS Lett.* 28, 239-242.

Uribe, A., Chávez, E., Jiménez, M., Zazueta, C. y Moreno-Sánchez, R. Characterization of calcium transport in *Euglena gracilis* mitochondria. (1994) Biochim. Biophys. Acta. 1186, 107-116.

Vainio, H., Mela, L. y Chance, B. Energy dependent bivalent cation translocation in rat liver mitochondria. (1970) Eur. J. Biochem. 12, 387-391.

Vasington, F., Gazzoti, P. Tiozzo, R. y Carafoli, E. The effect of ruthenium red on Ca^{2+} transport and respiration in rat liver mitochondria (1972) Biochem. Biophys. Acta. 256, 43-54.

Vasington, F.D. y Murphy, J.V. Ca^{2+} uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation. (1962) J. Biol. Chem. 237, 2670-2677.

Villa, A., García-Simón, I., Blanco, P., Sesé, B., Bogóñez, E. y Satrustegui, E. Affinity chromatography purification of mitochondrial inner membrane proteins with calcium transport activity. (1998) Biochem.- Biophys. Acta. 1373, 347-359.

Vinogradov, y Scarpa, A. The initial velocities of calcium uptake by rat liver mitochondria. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 5527-5531.

Voelker, D. y Smetjck, P. Absorption of ruthenium red to phospholipid membranes. (1996) *Biophys. J.* 70, 818-830.

Wingrove , D. Amatruda, J. y Gunter, T. Glucagon effects on the membrane potential and calcium uptake rate of rat liver mitochondria. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 9390-9394.

Yamada, E. y Huzel, J. Calcium-binding ATPase inhibitor protein of bovine heart mitochondria. Role in ATP synthesis and effect of calcium. (1989) *Biochemistry* 28, 9714-9718.

Ying, W., Emerson, J., Clarke, M. y Sanadi, R. Inhibition of mitochondrial calcium ion transport by an oxo-bridged dinuclear ruthenium ammine complex. (1991) *Biochem.* 30, 4949-4952.

Zazueta, C., Holguín, J.A y Ramírez, J. Calcium transport sensitive to ruthenium red in cytochrome oxidase vesicles reconstituted with mitochondrial proteins. (1991) *J. Bioenerg. Biomembr.* 23, 889-902.

Zazueta, C., Massó, F., Paéz, A., Bravo, C., Vega, A., Montañó, L., Vázquez, M. Ramírez, J. y Chávez, E. Identification of a 20-kDa protein with calcium uptake transport activity. Reconstitution in a membrane model. (1994) J. Bioener. Biomembr. 26, 555-562.

Zazueta, C., Zafra, G., Vera, G., Sánchez, C. y Chávez, E. Advances in the purification of the mitochondrial Ca^{2+} uniporter using the labeled inhibitor $^{103}\text{Ru}_{360}$. (1998) J. Bioenerg. Biomembr. 30, 489-498.

Zimniak, P. y Barnes, E. Characterization of a calcium/proton antiporter and an electrogenic calcium transporter in membranes vesicles from *Azotobacter vinelandii*. (1980) J. Biol. Chem. 255, 10140-10143.

A P E N D I C E

Calcium Transport Sensitive to Ruthenium Red in Cytochrome Oxidase Vesicles Reconstituted with Mitochondrial Proteins

Cecilia Zazueta,¹ José A. Holguín,¹ and Jorge Ramírez²

Received April 10, 1990; revised March 20, 1991

Abstract

We describe a calcium transport that is sensitive to ruthenium red in liposomes reconstituted with mitochondrial extracts. This system is able to build an internally negative membrane potential, which allows the electrogenic influx of Ca^{2+} and Sr^{2+} . Proteins with molecular weights higher than 35 kDa were incorporated to the vesicles, and enhanced the accumulation of the cation in an energy-dependent fashion.

Key Words: Ca^{2+} transport; liposomes; ruthenium red; mitochondria

Introduction

Calcium ion influx into the mitochondrial matrix appears to be mediated by a reversible uniport system, which seeks to equilibrate the electrochemical potential of Ca^{2+} across the inner mitochondrial membrane (Selwyn *et al.*, 1970; Rottenberg and Scarpa, 1974; Puskin *et al.*, 1976). This process is dependent on an internal negative $\Delta\psi$, and is inhibited by ruthenium red and lanthanides (Reed and Bygrave, 1974; Rossi *et al.*, 1973).

In the last years, several attempts have been made to purify a mitochondrial protein with clear Ca^{2+} transport activity (Sottocasa *et al.*, 1971; Gómez-Puyou *et al.*, 1972; Blondin, 1974; Fry and Green, 1979; Jeng and Shamoo, 1980; Rosier and Gunter, 1980). Sottocasa *et al.* (1971) isolated a soluble Ca^{2+} -binding glycoprotein from liver mitochondria by hypotonic shock. Antibodies prepared against this 42,000-Da protein (Panfili *et al.*,

¹Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, México, D.F., 041080, México.

²Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Microbiología, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado 70-600, México 04510, D.F., México.

1979) inhibit the rate at which high concentrations of Ca^{2+} are accumulated. However, the easy extraction would indicate that it is not an integral membrane protein. In addition, the large amounts in which it may be prepared (Sottocasa *et al.*, 1971) contrast with the low number of La^{3+} binding sites reported (Reed and Bygrave, 1974). Jeng and Shamoo (1980) have isolated a 3000-Da polypeptide from mitochondria, which is highly acidic and capable of transferring Ca^{2+} into an organic phase. Another possible Ca^{2+} translocator arose as a result of experiments with reconstituted purified cytochrome oxidase (Fry and Green, 1979; Rosier and Gunter, 1980; Rosier *et al.*, 1981). Fry and Green described an increased passive Ca^{2+} permeation in liposomes reconstituted with subunit I of cytochrome oxidase, whereas Rosier and Gunter (1980) observed a slow, respiration-dependent, uptake of Ca^{2+} in vesicles reconstituted with cytochrome oxidase.

The purpose of the present work was to study the transport of Ca^{2+} in liposomes reconstituted with mitochondrial extracts. The results obtained indicate that Ca^{2+} accumulation is energy dependent and is inhibited by ruthenium red.

Materials and Methods

Preparation of Mitochondria

Mitochondria from rat kidney cortex were prepared, as described elsewhere (Chávez *et al.*, 1985), in 250 mM sucrose, 10 mM TRIS-HCl,³ and 1 mM EDTA, pH 7.4, as isolation medium. The mitochondria were then washed in this medium without EDTA. Proteins were determined by the biuret method after solubilization of mitochondria with deoxycholate (Gornall *et al.*, 1949). Bovine serum albumin was used as standard.

Preparation of the Vesicles

Cytochrome oxidase was purified from beef heart as described (Ramirez *et al.*, 1987). COV and COV_M were obtained with the cholate dialysis method (Hinkle *et al.*, 1972), using acetone-extracted asolectin (Kagawa and Racker, 1971). The dried lipids were dispersed (vortex mixing) in aqueous buffer (H_3PO_4 -TEA 50 mM, pH 7.0) at a final phospholipid concentration of 30 mg/ml and sonicated to clarity. Cytochrome oxidase was then added to a

³Abbreviations used: CCCP, carbonylcyanide *m*-chlorophenylhydrazone; COV, cytochrome oxidase vesicles; COV_M, cytochrome oxidase vesicles plus mitochondrial extracts; EDTA, ethylenediamine-*N,N'*-tetraacetic acid; $\Delta\psi$, mitochondrial membrane potential; TRIS, Tris(hydroxymethyl)aminomethane; TEA, triethanolamine; TMPD, *N,N,N',N'*-tetramethylphenylenediamine; R.R., ruthenium red; P.L., phospholipids; cyt *c*, cytochrome *c*; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; cyt ox, cytochrome oxidase; SDS, sodium dodecylsulfate.

final concentration of 0.25 mg/ml and mitochondrial extracts solubilized with sodium cholate to a concentration of 3 mg/ml. The incorporation of the membrane proteins was achieved after a gentle sonication for 10 sec. The suspension was dialyzed overnight at 4°C against 250 volumes of 50 mM KH_2PO_4 , pH 7.0, and then passed through a G-50 Sephadex column pre-equilibrated with 50 mM KH_2PO_4 , 0.8% sodium cholate, 0.5% asolectin, pH 7.0. The vesicles were collected by centrifugation at 100,000 g for 1.5 h and then resuspended in the dialysis buffer.

Vesicles with encapsulated dye were prepared similarly by adding Anti-pyrilazo III to a final concentration of 3 mM in the vortex mixing step (Kester and Sokolove, 1989).

Mitochondrial Extracts

Membrane proteins were solubilized with 1.6% sodium cholate and centrifuged in a Beckman Spinco Microfuge for 4 min at maximum speed. The supernatant, about 3 mg/ml, was loaded on the top of a glycerol step gradient (v/v) constructed with 6 ml of 50%, 6 ml of 40%, 6 ml of 30%, 6 ml of 20%, and 4 ml of 10% in 50 mM KH_2PO_4 , 1 mM EDTA, 0.5 mg/ml asolectin, and 0.8% sodium cholate, pH 7.0. Mitochondrial extract (6 mg) was added and centrifuged at 90,000 g for 2.5 h in an SW25Ti rotor type centrifuge. Fractions of 5 ml were collected carefully using Pasteur pipettes. The fractions were incorporated to the vesicles for Ca^{2+} uptake assay. The upper fraction (10% glycerol) containing almost 20% of protein had no activity, neither did the bottom fraction (50% glycerol) which included a light pellet. The remaining volume was designated MG. Incorporated proteins were determined by the Nakamura method (Nakamura *et al.*, 1983).

Assay of Ca^{2+} Uptake

Samples were prepared in a final volume of 1 ml of 50 mM KH_2PO_4 (pH 7.0), containing 1 mg of vesicle phospholipids plus 7.5 mM ascorbate, pH 7.0, 0.75 mM TMPD, and 150 μg cytochrome *c*. To inhibit calcium uptake, purified ruthenium red was added (Luft, 1971) to a final concentration of 10 μM (unless otherwise indicated). The uptake reaction was initiated by adding 0.05 ml of 10 mM $^{45}\text{CaCl}_2$ (specific activity 1000 cpm/nmol). Using the protamine aggregation/filtration technique (Rosier *et al.*, 1979), 0.2 ml of a protamine solution (4 mg/ml) was added to precipitate the vesicles, and the sample was immediately filtered with a 0.45 μm pore size Millipore filter. This was washed immediately with 10 ml of cold 10 mM CaCl_2 and dried. Trapped $^{45}\text{Ca}^{2+}$ was determined using the standard liquid scintillation technique. $^{86}\text{Sr}^{2+}$ (specific activity 1000 cpm/nmol) was determined in the same way. Samples with or without ascorbate were run in parallel, and the increment or

net uptake was used to calculate the rate at the given incubation times. Ca^{2+} uptake was also determined with the encapsulated metallochromic indicator Antipyrylazo III. Measurements were performed in an SLM-Aminco DW-2000 dual-wavelength spectrophotometer at 790–720 nm (Johnson and Scarpa, 1973).

Assessment of Liposomes' Integrity

Integrity of the liposomes was determined by their ability to maintain a membrane potential; changes in $\Delta\psi$ were followed by dual-wavelength spectroscopy using safranin at 533 minus 511 nm, as reported (Akerman and Wikström, 1976).

Other Assays

Magnesium determinations were carried out in a Perkin-Elmer 560 atomic absorption spectrophotometer, by using the magnesium atomic absorption solution from Sigma as standard. Polyacrylamide gel electrophoresis of the mitochondrial extracts and of incorporated proteins in the vesicles was performed in the presence of 0.1% sodium dodecylsulfate, as described by Weber and Osborn (Weber and Osborn, 1968). Silver stain for SDS PAGE was performed as described by Oakley (1980).

Results

Early reports (Fry and Green, 1979; Rosier and Gunter, 1980; Rosier *et al.*, 1981) have shown that cytochrome oxidase vesicles, in the presence of an oxidizable substrate and cytochrome *c*, are able to accumulate Ca^{2+} in response to an internal negative membrane potential. However, this electrophoretic accumulation of Ca^{2+} is not sensitive to ruthenium red. Thus, it appears that the transport is not mediated by the uniporter. Figure 1 represents Ca^{2+} accumulation by phospholipid vesicles reconstituted with a complete mitochondrial extract and cytochrome oxidase. As observed, in COV_M vesicles, Ca^{2+} accumulation attained its maximum value, i.e., $260 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ after 30 min of incubation time. Ruthenium red, an inhibitor of mitochondrial Ca^{2+} transport (Vasington *et al.*, 1972; Reed and Bygrave, 1974; Luthna and Olson, 1977), also inhibits calcium uptake in this reconstituted system. When ruthenium red was added, the uptake value decreased to $190 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$. This result seems to indicate that calcium transport in COV_M was carried out through the Ca^{2+} uniport system. This statement is reinforced by the fact that energized vesicles without mitochondrial proteins failed to accumulate high amounts of the cation. The increment in Ca^{2+}

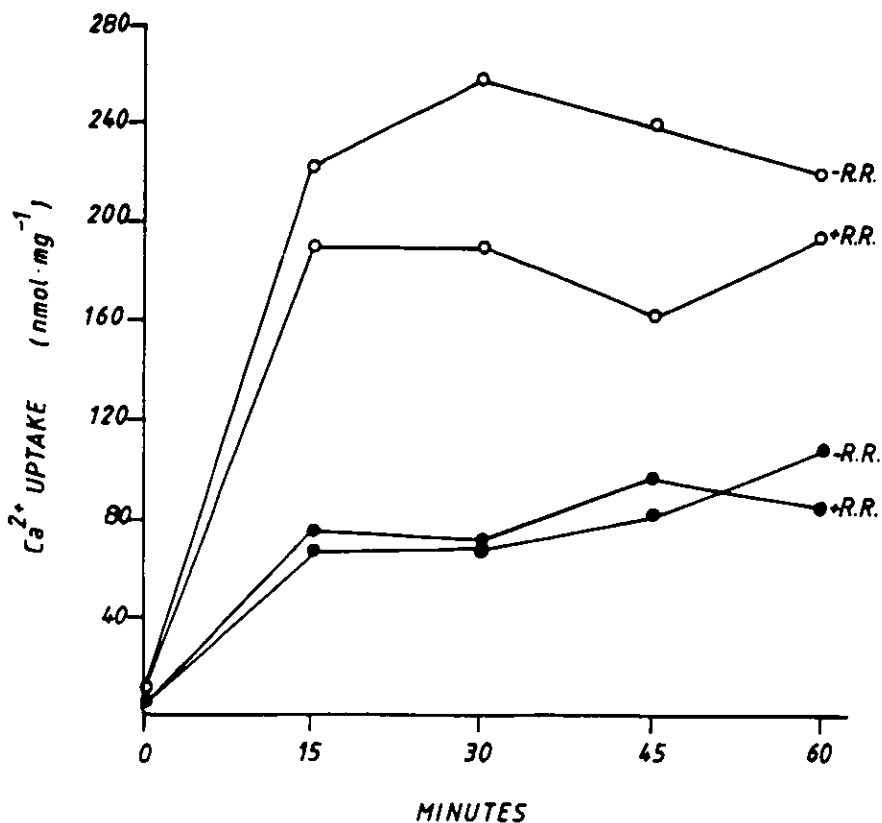


Fig. 1. Ca^{2+} uptake in COV and COV_M as a function of time. A 1-mg portion of cytochrome oxidase vesicles was added to an incubation medium containing 50 mM KH_2PO_4 , 7.5 mM ascorbate, 0.75 mM TMPD, and 150 μg cytochrome *c* (pH 7.0). Where indicated, 4 μM ruthenium red was added. Samples were incubated during the indicated time and then filtered through 0.45 μm Millipore filters using the protamine aggregation/filtration technique. Filled circles (●) represent cytochrome oxidase vesicles and open circles (○) represent cytochrome oxidase vesicles with incorporated mitochondrial proteins from a complete membranous extract (5 mg/ml) solubilized in 1.6% sodium cholate, before dialysis. Final volume 1 ml; temperature 25°C.

transport in COV_M was twice that observed in COV . The effect of ruthenium red in COV was negligible, which agrees with the findings of Rosier and Gunter (1980). Figure 2 summarizes the inhibition of calcium uptake in COV_M by R.R. This plot is linear with an apparent dissociation constant for the inhibitor (K_i) of 3.5 μM at pH 7.0. Additionally, Ca^{2+} uptake at short times was explored; accumulation was 120 nmol Ca^{2+} /mg during the first minute of incubation. Qualitative measurements of membrane potential in COV and COV_M were made using the membrane potential dye, safranin, according to methods previously reported (Akerman and Wikström, 1976). Figure 3a shows that the membrane potential was achieved only when the vesicles were energized by oxidation of ascorbate. Interestingly, Ca^{2+} addition abolished the internal negative membrane potential developed in

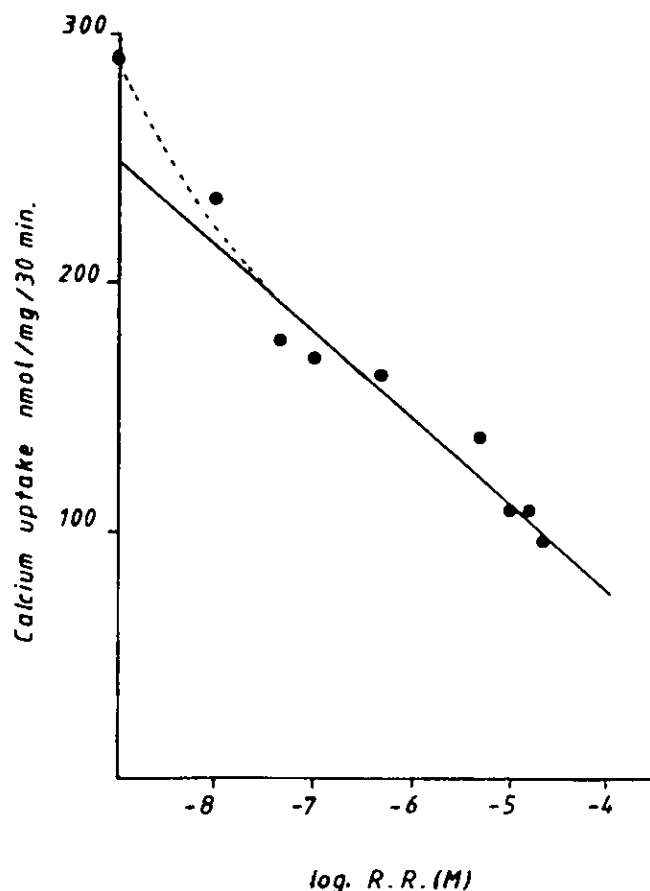


Fig. 2. Inhibition of calcium transport by ruthenium red in cytochrome oxidase vesicles with incorporated mitochondrial proteins. Samples were assayed as in Fig. 1. Final volume 1 ml; temperature 25°C.

COV. Therefore, Ca^{2+} transport seems to occur through an electrogenic mechanism.

The fact that ruthenium red diminished the effect of Ca^{2+} on $\Delta\psi$ (Fig. 3b) reinforces the statement that the Ca^{2+} translocator was incorporated in COV_M . The deflection, following ruthenium red addition, corresponds to absorbance of the dye at 533–511 nm. Quantitative Ca^{2+} uptake in reconstituted systems is shown in Table I. The net uptake of Ca^{2+} in vesicles with incorporated mitochondrial extracts was around 270 nmol Ca^{2+} /mg of protein/30 min, supported by internally negative $\Delta\psi$ in vesicles of cytochrome oxidase. These values were reduced 50% when ruthenium red was present in the assay. It should be noted that in each experiment all net uptake rates and ruthenium red-insensitive uptake were calculated as the difference between the energized and nonenergized uptake rates. The uptake rates in COV were also subtracted in each situation. The average uptake rate in energized COV was 2.42 ± 0.9 nmol Ca^{2+} /mg of cyt ox/min. This value is

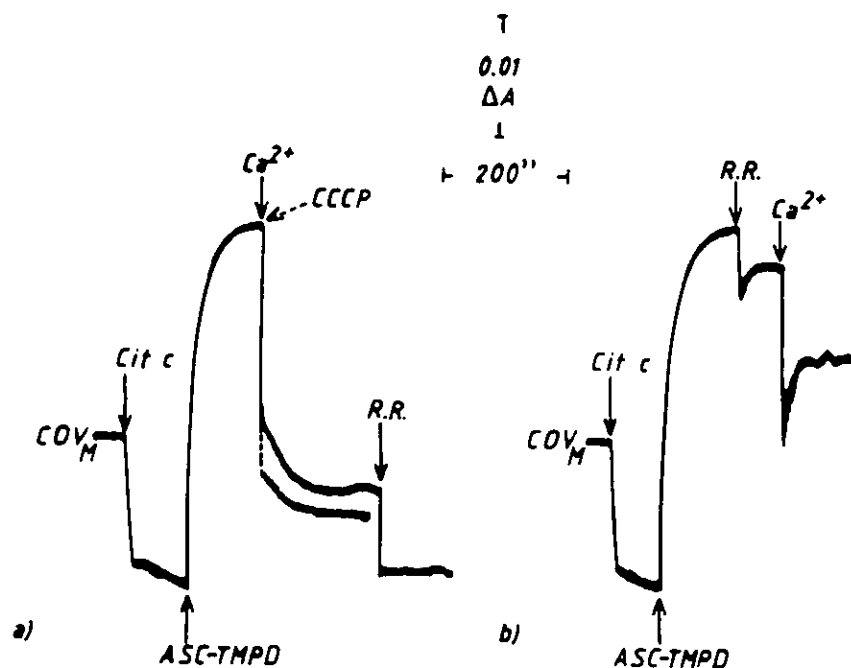


Fig. 3. Collapse of Δw as induced by Ca^{2+} or CCCP in cytochrome oxidase vesicles. COV_M represents cytochrome oxidase vesicles with incorporated mitochondrial proteins from a complete membranous extract, solubilized in 1.6% sodium cholate, as described in Materials and Methods, before dialysis. A 1-mg portion of COV_M was suspended in 50 mM KH_2PO_4 , and 10 μM safranin was used as indicator. Where indicated, 150 μg cytochrome *c*, 7.5 mM ascorbate, 0.75 mM TMPD, 100 μM CaCl_2 , 10 μM CCCP, or 10 μM ruthenium red (R.R.) were added. Final volume 1 ml; temperature 25°C.

Table I. Inhibition by Ruthenium Red of the Reconstituted Ca^{2+} Uptake^a

Incorporated fraction into COV	nmol $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /mg protein/30 min		
	Net uptake (- R.R.)	R.R. insensitive (+ R.R.)	R.R. sensitive
COV_M	283.6 \pm 50.4 (7)	132.2 \pm 66.0 (7)	151.4 (53.3%)
COV_{MI}	285.0 \pm 153.0 (3)	139.8 \pm 96.0 (3)	144.9 (50.9%)
COV_{MG}	201.0 \pm 15.0 (3)	93.9 \pm 27.0 (3)	108.3 (53.6%)

^aCytochrome oxidase vesicles were prepared, as previously described, with the indicated proteins in the suspension at the time of dialysis. The ruthenium red-sensitive uptake rate is the difference between the net uptake and the ruthenium red-sensitive uptake. COV_M represents cytochrome oxidase vesicles with incorporated proteins from a complete extract of membrane proteins in 1.6% sodium cholate; COV_{MI} is the fraction of mitochondrial proteins solubilized in 1.2% detergent reconstituted in cytochrome oxidase vesicles, and COV_{MG} indicates vesicles with an extract obtained after glycerol gradient fractionation. Values in the first two rows represent the mean of the experiments indicated by the number in parenthesis \pm S.D. The third row represents the calcium transport, sensitive to ruthenium red, as the difference between net uptake and calcium transport insensitive to ruthenium red.

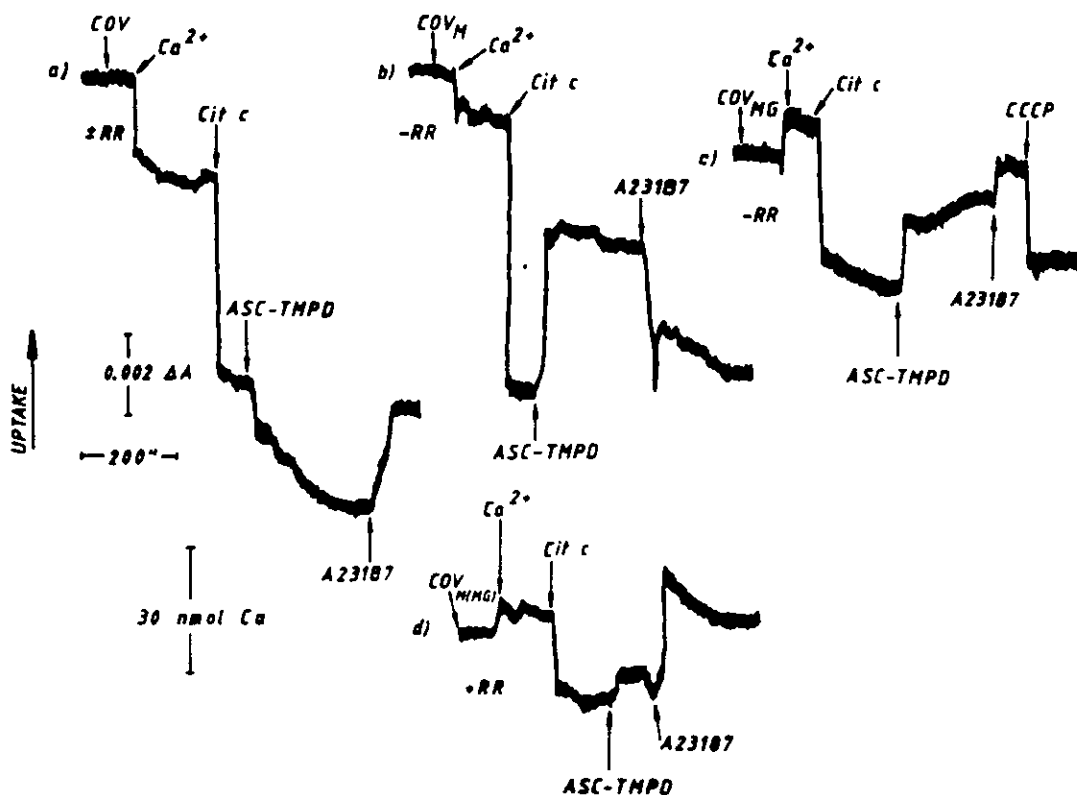


Fig. 4. Reconstitution of Ca^{2+} uptake in cytochrome oxidase vesicles with extracts of mitochondrial proteins, loaded with Antipyrylazo III. A 1-mg portion of cytochrome oxidase vesicles with incorporated proteins was suspended in 50 mM KH_2PO_4 . Where indicated, 750 μM CaCl_2 , 150 μg cytochrome *c*, 7.5 mM ascorbate, 0.75 mM TMPD, and 10 μM CCCP were added. Traces a, c, and e represent incubation in the presence of 10 μM ruthenium red.

similar to that obtained by Rosier *et al.* (1981), i.e., 2.9 nmol Ca^{2+} /mg of cyt ox/min in internally negative $\Delta\psi$ COV.

To determine whether the data in Table I corresponded to Ca^{2+} transport or represented Ca^{2+} binding, calcium uptake was followed by using encapsulated Antipyrylazo III in the incorporated systems (Fig. 4). Antipyrylazo III was chosen, instead of the more classic metallochromic indicator Arsenazo III (Kester and Sokolove, 1989), because it allows measurement of Ca^{2+} transport even in systems with colored reagents (cit *c*). As observed (Fig. 3a), in energized vesicles without mitochondrial extracts no increments in absorbance of the entrapped indicator, Antipyrylazo III, occurred. The latter indicates that calcium was not accumulated in these vesicles. The neutral ionophore, A23187, promotes Ca^{2+} uptake despite incubation with ruthenium red. Addition of ascorbate-TMPD to the vesicles, with incorporated mitochondrial extracts (COV_M and COV_{MG}), induced an important increment in Ca^{2+} uptake. This was more striking in COV_M (Fig. 4, trace b), since these vesicles incorporated approximately 40 μg of protein/mg of P.L. from the complete mitochondrial extract (M). Conversely, COV_{MG} only

Table II. Divalent Cation Transport in COV_M^a

Divalent cation transport in COV _M	nmol/mg protein/30 min	
	- R.R.	+ R.R.
Ca ²⁺	283.6 ± 50.4 (7)	132.1 ± 66.0 (7)
Sr ²⁺	239.9 ± 92.3 (3)	156.7 ± 58.6 (3)
Mg ²⁺	—	—

^aCation transport was determined as described in Materials and Methods. The uptake rates are the difference between the uptake in energized and nonenergized vesicles. Final volume 1 ml; temperature 25°C.

(MG), a significant amount of low-molecular-weight proteins was eliminated. Finally, Fig. 7 shows the polyacrylamide gel electrophoresis of the cytochrome oxidase vesicles, reconstituted with mitochondrial extracts, compared with molecular weight standards (well a). Well b shows total mitochondrial proteins. Well c illustrates the proteins reconstituted from the complete extract, and well e shows those incorporated in the vesicles from the glycerol extract. Well d shows a glycerol gradient extract that has no activity. Proteins with molecular weights higher than 35 kDa were preferentially stained in samples c and e. Simultaneously, vesicles with incorporated cytochrome oxidase were electrophoresed. The amount of protein incorporated could not be observed using Coomassie Blue staining (not shown).

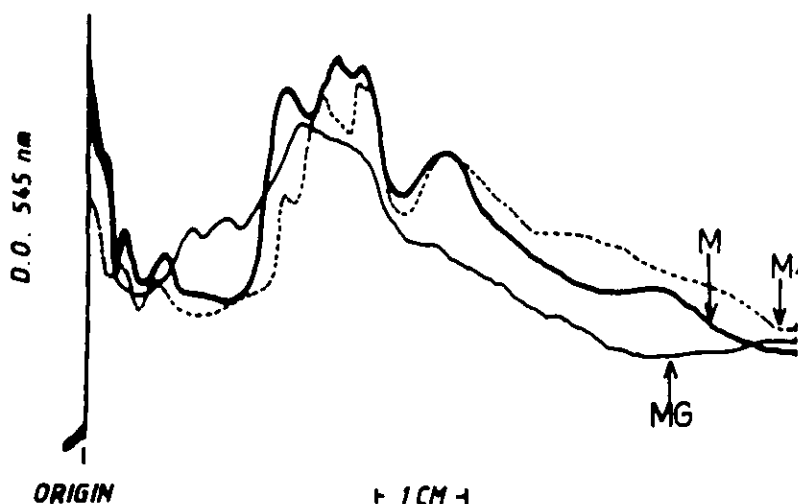


Fig. 6. Scanning of mitochondrial extracts before incorporation into COV. Rat kidney mitochondria were solubilized with sodium cholate: M represents a complete extract of membranous protein in 1.6% detergent; M1 is the fraction soluble in 1.2% sodium cholate, and MG is an extract obtained after glycerol gradient separation; 150 µg of each sample were electrophoresed, as described in Materials and Methods, and stained with 0.1% Coomassie Blue.

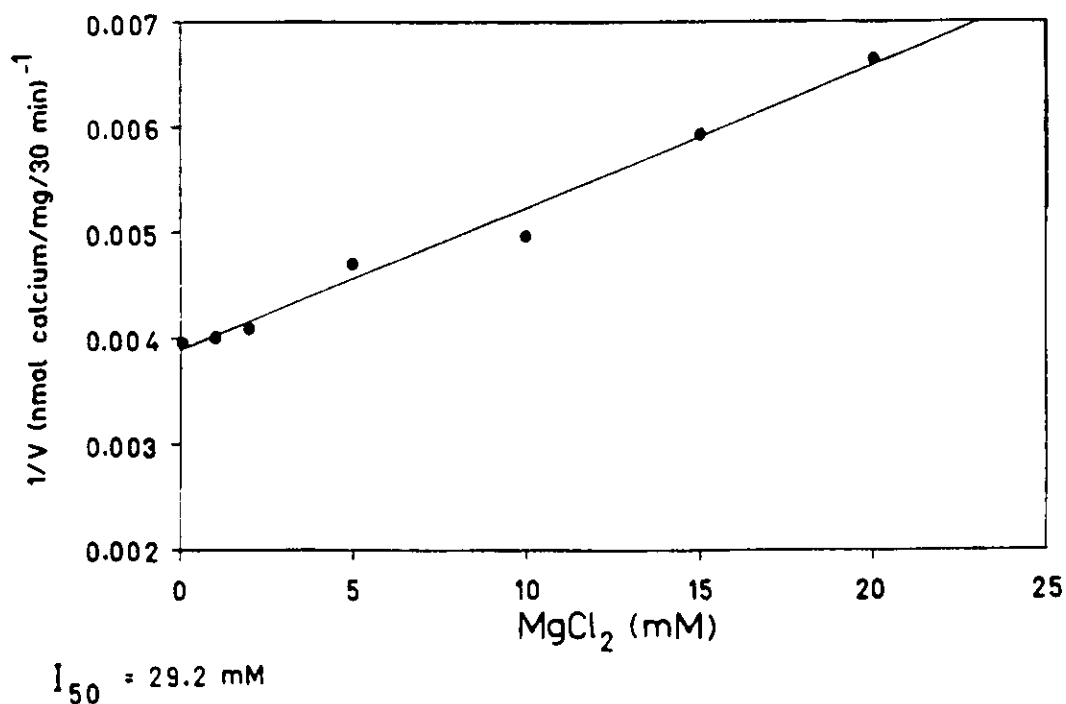


Fig. 5. Inhibitory effect of magnesium on calcium uptake in cytochrome oxidase vesicles with incorporated mitochondrial extracts. Calcium transport was assayed as described in Materials and Methods. Final volume 1 ml; temperature 25°C.

incorporated around 20 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of P.L. (Fig. 4, trace c). When ruthenium red was present in the medium, a clear inhibition in Ca^{2+} uptake occurred in both samples (Fig. 4d).

It is known from the work of Scarpa and Azzone (1968) that, in liver mitochondria, the surface binding of calcium is reduced by the addition of Mg^{2+} , by lowering pH, or by increasing the osmolarity of the medium. Figure 5 shows the effect of Mg^{2+} in calcium uptake. A 50% inhibition (I_{50}) at 29.2 mM was calculated from a Dixon plot. The inhibition at this concentration suggests that magnesium binds at the level of the membrane surface, producing screening effects as occurs in rat liver mitochondria (Vaino *et al.*, 1970). Table II compares the transport of divalent cations by the reconstituted system. Calcium and strontium were transported in an energy-dependent fashion and their accumulation was ruthenium red sensitive, i.e., $^{90}\text{Sr}^{2+}$ uptake was inhibited by ruthenium red in 34.7%. Again, the uptake rates were calculated as the difference between the energized and nonenergized uptake rates. Magnesium influx into vesicles was determined by atomic absorption, but no differences in the energized and nonenergized samples were found. Figure 6 shows the scanning of the mitochondrial extracts used in the incorporation, as resolved in SDS gel electrophoresis. In the fraction from the extract obtained by fractionation with glycerol gradient

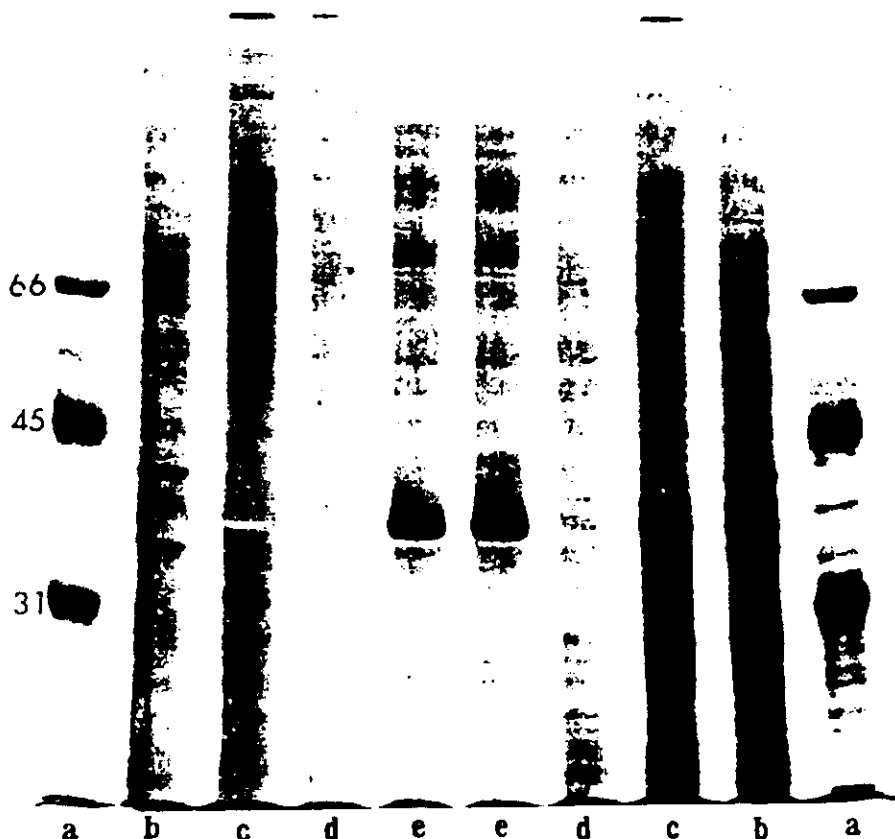


Fig. 7. SDS PAGE (10% gel) of cytochrome oxidase vesicles reconstituted with mitochondrial extracts. Samples of 15 μ g protein were incubated with 0.1% SDS and 0.1% β -mercaptoethanol in a 100°C water bath for 2 min. Then the solution was mixed with 10 μ l Bromophenol Blue (2.5%) and placed into the wells. Molecular weight standards (well a) and a complete mitochondrial extract (well b) were also electrophoresed as controls.

Discussion

Several authors have demonstrated Ca^{2+} uptake into cytochrome oxidase vesicles reconstituted by using phospholipids and extracted mitochondrial proteins (Gunter *et al.*, 1978; Fry and Green, 1979; Rosier and Gunter, 1980; Rosier *et al.*, 1981; Saltzgeber-Müller *et al.*, 1980). Rosier and Gunter (1980) observed an energy-dependent uptake of Ca^{2+} in cytochrome oxidase vesicles. Ruthenium red does not appreciably affect calcium uptake in such vesicles. However, agents that break down the proton gradient developed in COV, such as CCCP or the combination of nigericin, valinomycin, and K^+ (Fry and Green, 1979), were found to be potent inhibitors of Ca^{2+} accumulation. The lack of effect of ruthenium red on the Ca^{2+} uptake in COV may indicate, as proposed by Rosier and Gunter (1980), that either modification of the calcium mediator has occurred or that Ca^{2+} transport in COV is mediated by an entirely different, perhaps less specific, transport system. In

1981. Rosier *et al.* demonstrated uptake of calcium against its electrochemical gradient into internally positive asolectin vesicles containing cytochrome oxidase and fraction V, which includes the high-affinity uncoupler site as well as the base protein (F_0) of the mitochondrial H^+ -transporting ATPase (F_1). Calciphorin, a putative calcium ionophore protein of 3000 Da molecular weight (Jeng and Shamoo, 1980), was tentatively identified as the electrophoretic uniporter involved in Ca^{2+} uptake in mitochondria, but Sokolove and Brenza (1983) found that all of the Ca^{2+} binding properties of the crude hepatic calciphorin fraction can be attributed to the associated lipids. Cardiolipin is a major component in mitochondrial membranes. Tyson *et al.* (1976) demonstrated that cardiolipin, when present in an organic phase at millimolar concentrations, can mediate the transport of calcium in a Pressman cell. In our assays, the lipid constituents probably cannot account for the transport rates that we observed, since we reconstituted both lipid and protein components in each sample. As indicated, we report the energy-dependent calcium transport, not the binding of calcium to the whole system. A chymotrypsin-sensitive polypeptide of 8800 Da, an impurity in cytochrome oxidase preparations (Saltzgeber-Müller *et al.*, 1980), was also incorporated in COV; however, ruthenium red, at concentrations of $100 \mu M$, did not inhibit Ca^{2+} uptake. The present work shows that high-molecular-weight proteins (35–60 kDa) from rat kidney mitochondrial extracts are preferentially reconstituted in COV. These proteins enhance Ca^{2+} accumulation as well as Sr^{2+} uptake in cytochrome oxidase vesicles in an energy-dependent fashion. Calcium accumulation seems to be related with the so-called uniporter since it is sensitive to ruthenium red; although the dye levels could seem too high, most of them could be acting on unspecific binding to phospholipids. In agreement with our results, Zimniak and Barnes (1980) have reported the characterization of an electrogenic calcium transporter in membrane vesicles from *Azotobacter vinelandii*, which is inhibited by $4 \mu M$ of ruthenium red at pH 6.5.

The inhibition of calcium transport by high concentrations of Mg^{2+} could indicate binding or charge screening effects. On the basis of inhibitor studies (Crompton *et al.*, 1976), influx of magnesium into heart mitochondria is believed to occur via a mechanism distinct from the Ca^{2+} uptake mechanism (Diwan, 1987), whereas calcium transport inhibitors inhibit Mg^{2+} as well as Ca^{2+} influx in brain and in liver mitochondria (Rugola and Zoccarato, 1984; Kun, 1976). Thus, although the calcium accumulation system has a very low activity for Mg^{2+} (Vaino, *et al.*, 1970), complete exclusion of this cation from transport on the uniporter may be tissue specific.

The reconstituted system presented in this work shows cation selectivity, since Ca^{2+} and Sr^{2+} were transported, whereas Mg^{2+} was not (Table II). These results are in agreement with the selectivity series of the uniporter.

known as $\text{Ca}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{La}^{3+} \gg \text{Mg}^{2+}$. This series is not followed by the system proposed by Jeng and Shamoo (1980), since Mn^{2+} and Zn^{2+} interact strongly with calciphorin, whereas Sr^{2+} and Mg^{2+} show a slight effect on calcium extraction by calciphorin (Sokolove and Brenza, 1983).

We cannot discount the fact that some of the possible Ca^{2+} translocators, already cited, were reconstituted in this system. What is true is that the characteristics of those systems alone cannot account for the current data. The question remains if a single band (35 kDa) stained from the incorporated proteins of the pooled extracts could correspond to the glycoprotein isolated by Sottocasa *et al.* (1971). The molecular nature of the calcium transporter is unknown. By analogy with other systems, it is most likely a protein, but at present we cannot exclude other possibilities, e.g., a low-molecular-weight ionophore or lipid molecules (Tyson *et al.*, 1976).

Considerable effort has been made to elucidate the nature of the uniporter (Blondin, 1974; Fry and Green, 1979; Jeng and Shamoo, 1980; Rosier *et al.*, 1981; Reed and Bygrave, 1974; Sottocasa *et al.*, 1971; Sandri *et al.*, 1976; Panfili and Crompton, 1983; Saltzgaber-Müller *et al.*, 1980), but there is still no clear evidence for the isolation and reconstitution of the Ca^{2+} mitochondrial uniporter.

References

- Akerman, K. E., and Wikström, M. F. K. (1976). *FEBS Lett.* **68**, 191-197.
- Blondin, G. A. (1974). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **56**, 97-105.
- Chávez, E., Briones, R., Michel, B., Bravo, C., and Jay, D. (1985). *Arch. Biochem. Biophys.* **242**, 493-497.
- Crompton, M., Capano, M., and Carafoli, E. (1976). *Eur. J. Biochem.* **69**, 453-462.
- Diwan, J. J. (1987). *Biochim. Biophys. Acta* **895**, 155-165.
- Fry, M., and Green, D. E. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 2664-2668.
- Gómez-Puyou, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., Becker, G., and Lenhninger, A. L. (1972). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **47**, 814-819.
- Gornall, A. G., Bardawill, C. J., and David, M. M. (1949). *J. Biol. Chem.* **177**, 751-766.
- Gunter, T. E., Gunter, K. K., Puskin, J. S., and Rusell, P. R. (1978). *Biochemistry* **17**, 339-345.
- Hinkle, P. C., Kim, J. J., and Racker, E. (1972). *J. Biol. Chem.* **247**, 1338-1339.
- Jeng, A. Y., and Shamoo, A. E. (1980). *J. Biol. Chem.* **255**, 6897-6903.
- Johnson, R. G., and Scarpa, A. (1973). *J. Gen. Physiol.* **68**, 601.
- Kagawa, Y., and Racker, E. (1971). *J. Biol. Chem.* **248**, 4841-4847.
- Kester, M. B., and Sokolove, P. M. (1989). *Biochim. Biophys. Acta* **980**, 127-133.
- Kun, E. (1976). *Biochemistry* **15**, 2328-2336.
- Luft, J. H. (1971). *Anat. Rec.* **171**, 347-368.
- Luthna, R., and Olson, M. S. (1977). *FEBS Lett.* **81**, 142-146.
- Nakamura, J., Wang, T., and Tsai, L. I. (1983). *J. Biol. Chem.* **258**, 5079-5083.
- Oakley, R. B. (1980). *Anal. Biochem.* **105**, 361-363.
- Panfili, E., and Crompton, M. (1983). *FEBS Lett.* **123**(1), 30-32.
- Panfili, E., Sandri, G., and Sottocasa, G. L. (1979). *Nature (London)* **264**, 185-186.
- Puskin, J., Gunter, T. E., Gunter, K. K., and Rusell, P. R. (1976). *Biochemistry* **15**, 3834-3842.
- Ramirez, J., Calahorra, M., and Peña, A. (1987). *Anal. Biochem.* **163**, 100-106.

- Reed, K. C., and Bygrave, F. L. (1974). *Biochem. J.* **140**, 143-155.
- Rosier, R. N., and Gunter T. E. (1980). *FEBS Lett.* **109**, 99-103.
- Rosier, R. N., Gunter, T. E., Tucker, D. A., and Gunter, K. K. (1979). *Anal. Biochem.* **96**, 384-390.
- Rosier, R. N., Tucker, D. A., Meerdink, S., Jain, I., and Gunter, T. E. (1981). *Arch. Biochem. Biophys.* **210**, 549-564.
- Rossi, C. S., Vasington, F. D., and Carafoli, E. (1973). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **50**, 846-852.
- Rottenberg, G., and Scarpa, A. (1974). *Biochemistry* **13**, 4811-4817.
- Rugolo, M., and Zoccarato, F. (1984). *J. Neurochem.* **12**, 1127-1130.
- Saltzgeber-Müller, J., Douglas, M., and Racker, E. (1980). *FEBS Lett.* **120**, 49-52.
- Sandri, G., Panfili, E., and Sottocasa, G. L. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **68**, 1272-1279.
- Scarpa, A., and Azzone, G. F. (1968). *J. Biol. Chem.* **243**, 5132.
- Selwyn, M. J., Dawson, A. P., and Dunett, S. J. (1970). *FEBS Lett.* **10**, 1-5.
- Sokolove, P. M., and Brenza, J. M. (1983). *Arch. Biochem. Biophys.* **221**, 404-416.
- Sottocasa, G. L., Sandri, G., Panfili, E., and De Bernard, B. (1971). *FEBS Lett.* **17**, 100-105.
- Tyson, C. A., Zande, H. V., and Green, D. E. (1976). *J. Biol. Chem.* **251**, 1326-1332.
- Vaino, H., Mela, L., and Chance, B. (1970). *Eur. J. Biochem.* **12**, 387-291.
- Vasington, F. D., Gazzotti, P., Tiozzo, R., and Carafoli, E. (1972). *Biochim. Biophys. Acta* **467**, 12-18.
- Weber, K., and Osborn, M. J. (1968). *J. Biol. Chem.* **243**, 4406-4413.
- Zimniak, P., and Barnes, E. M. (1980). *J. Biol. Chem.* **255**, 10140-10143.

Identification of a 20-kDa Protein with Calcium Uptake Transport Activity. Reconstitution in a Membrane Model

Cecilia Zazueta,¹ Felipe Massò,² Araceli Paez,² Concepción Bravo,¹ Alicia Vega,¹
Luis Montaña,² Miriam Vázquez,³ Jorge Ramírez,³ and Edmundo Chávez¹

Received January 26, 1994; accepted June 29, 1994

This paper presents results of experiments designed to further purify the membrane system involved in mitochondrial calcium transport. A partially purified extract, which transported calcium with a specific activity of 1194 nmol ⁴⁵Ca²⁺ mg protein 5 min, was used to obtain mouse hyperimmune serum. This serum inhibited calcium uptake both in mitoplasts and in vesicles reconstituted with mitochondrial proteins containing cytochrome oxidase. Western blot analysis of the semipurified fraction showed that the serum recognized specifically two antigens of 75 and 20 kDa. Both antibodies were purified by elution from the nitrocellulose sheets and their inhibition capacity was analyzed. The antibody that recognized the 20-kDa protein produced a higher degree of inhibition than the other one.

KEY WORDS: Calcium uptake; uniporter; mitochondria.

INTRODUCTION

It has been well established that Ca²⁺ regulates several intramitochondrial functions (Gunter and Pfeiffer, 1990; Denton and McCormack, 1985; Hansford, 1985); therefore, it is important to elucidate the mechanisms through which Ca²⁺ is taken up by mitochondria. It is commonly assumed that the energy-linked transport of Ca²⁺ is accomplished through a specific membrane transport system. Since the pioneering reports of Lehninger (1971) and subsequent workers (Sottocasa *et al.*, 1971; Gómez Puyou *et al.*, 1972; Blondin, 1974; Carafoli and Sottocasa, 1974; Jeng and Shamoo, 1980; Mironova *et al.*, 1982; Ying *et al.*, 1991), considerable effort has been devoted to the search and characterization of the calcium uniporter. Sottocasa *et al.* (1971) isolated a glycoprotein from

the intermembrane space which bound Ca²⁺ with high affinity. A regulatory role upon mitochondrial Ca²⁺ homeostasis has recently been attributed to that glycoprotein by Panfili *et al.* (1980). Carafoli's group has described a glycoprotein located in the inner membrane which transports Ca²⁺ and increases electric conductance in lipid bilayers (Carafoli and Sottocasa, 1974). Recent work by Mironova *et al.* (1982) describes a glycoprotein and peptide isolated from heart mitochondria capable of transporting Ca²⁺. Their reported molecular weights are 40 and 2 kDa, respectively. This Ca²⁺ transporting activity is inhibited by ruthenium red at concentrations varying from 1 to 10 μM.

An attempt to characterize the mitochondrial Ca²⁺ transport system was carried out recently in our laboratory. We reported (Zazueta *et al.*, 1991) that mitochondrial extracts, reconstituted in cytochrome oxidase vesicles (COV), transported Ca²⁺ in an energy-dependent fashion and that this Ca²⁺ accumulation was sensitive to ruthenium red. The crude extract exhibited the following selectivity for divalent cations: Ca²⁺ > Sr²⁺ ≫ Mg²⁺. The present work describes the results of further purification and

¹ Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez, México, 14080, D.F., México.

² Sección de Biología Celular, Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez, México, 14080, D.F., México.

³ Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apartado 70-600, 04510 México.

immunochemical identification of proteins involved in mitochondrial Ca^{2+} transport. It was found that polyclonal antibodies induced against a semipurified extract recognized three specific membrane proteins, corresponding to molecular weights of 75, 70, and 20 kDa. An important feature of this work is the fact that the antibody associated with the 20-kDa protein inhibited calcium transport by 70%.

MATERIALS AND METHODS

Mitochondria from rat kidney cortex were prepared as described (Chávez *et al.*, 1985) in 0.25 M sucrose, 10 mM Tris,* and 1 mM EDTA, pH 7.0, as isolation medium. Submitochondrial particles were obtained by the method of Lee and Ernster (1965). Semipurified extracts were obtained after solubilization of SMP with 1.2% sodium cholate in a sucrose medium. This sample was 50% saturated with ammonium sulfate and centrifuged at 12,000 *g* for 10 min at 4°C. The supernatant was then 90% saturated with ammonium sulfate and centrifuged at 20,000 *g* for 15 min at 4°C.

The resultant pellet was homogenized with 50 mM KH_2PO_4 , pH 7.0, and dialyzed against the same buffer in a 1:250 proportion (F90). This fraction was extracted with 60% chloroform: 40% *n*-butanol and separated by centrifugation at 1,500 *g* for 10 min. The organic phase was evaporated to dryness under a nitrogen current. The resultant dry extract was dissolved in 50 mM KH_2PO_4 , 0.8% sodium cholate, pH 7.0 (F₀). Protein was determined by a modified Lowry method (Nakamura *et al.*, 1983). The extracts were reconstituted into COV to test their calcium transporting activity, as follows: Dried lipids were sonicated to clarity in 50 mM H_3PO_4 -TEA, pH 7.0. Cytochrome oxidase was added to a final concentration of 0.25 mg/ml and incorporated by simply mixing it with the liposomes as described by Ramirez *et al.* (1987). Mitochondrial extracts solubilized with 0.8% sodium cholate were incorporated to COV after a gentle sonication for 10 sec and dialyzed overnight at 4°C against 250 volumes of 50 mM KH_2PO_4 ,

pH 7.0. The next day they were passed through a G-50 Sephadex column pre-equilibrated with the same buffer. The vesicles were collected by centrifugation at 100,000 *g* for 1.5 h and assayed for calcium uptake.

Hyperimmune sera was obtained from female Balb-c mice, 6–8 weeks old, immunized every three weeks by subcutaneous or intraperitoneal injection of 40 μg of the semipurified fraction (F90) emulsified in incomplete Freund's adjuvant. Sera from immunized mice were stored at -20°C until required. The specificity of the antisera against the F90 protein components was determined by Western blot, whereas the optimal titration was determined by enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA). (Engvall and Perlmann, 1971). The serum from each mouse was tested separately, and only active antisera were pooled (AntiUni- Ca^{2+}).

Inhibition of calcium transport by antisera was assayed in two different systems: in liposomes with incorporated mitochondrial proteins and in mitoplasts. Mitoplasts were freshly prepared each day as follows: Digitonin, 1.2% (w/v) was added dropwise to 10 mg of mitochondrial protein. The resulting suspension was incubated for 10 min at 5°C and centrifuged at 15,000 *g* for 10 min. The mitoplast pellet was resuspended and an outer membrane preparation was obtained by ultracentrifugation of the supernatant at 144,000 *g* for 10 min at 5°C. Most of the activity of monoamine oxidase, assayed by the method of Schnaitman and Greenawalt (1968), was found associated with the outer membrane preparation, (88 ± 12 nmol/min/mg protein). The inner membrane-matrix fraction retained its morphological integrity and exhibited a high respiratory rate when assayed in a sucrose/HEPES medium containing EDTA. Calcium transport in mitoplasts was followed by dual-wavelength spectroscopy at 675–685 nm, with the methallochromic dye Arsenazo III (Kendrick, 1976). Quantification of calcium uptake was obtained by a filtration technique using $^{45}\text{CaCl}_2$ (specific activity 1000 cpm/nmol) in reconstituted liposomes and in mitoplasts. Changes in the transmembrane potential were followed by dual-wavelength spectroscopy, at 511–533 nm, using safranin as reported (Rottenberg, 1979).

Polyacrylamide gel electrophoresis was performed in the presence of 2% sodium dodecyl sulfate, as described by Laemmli (1979). The proteins were electroblotted onto nitrocellulose (Towbin *et al.*, 1979), and then visualized for specific antibody

* Abbreviations: HEPES, *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N*-2-ethanesulfonic acid; Tris, tris(hydroxymethyl)aminomethane; SDS PAGE, sodium dodecyl polyacrylamide gel electrophoresis; EDTA, ethylenediaminetetraacetic; CCCP, carbonylcyanide *m*-chlorophenylhydrazone; TEA, triethanolamine; COV, cytochrome oxidase vesicles.

Table I. Calcium Uptake Activity of Semipurified Mitochondrial Extracts^a

Solublized extract co-reconstituted with cytochrome oxidase	Total protein (mg)	Specific activity (nmol·mg/5 min)	Yield purification (%)	
Mitochondria	2900.00	151.88	100	1.00
Inner membrane proteins	1315.00	127.33	40	0.83
50% ammonium sulfate precipitation	659.10	—	—	—
90% ammonium sulfate precipitation	44.20	443.00	2.7	2.91
Organic-extraction (CHCl ₃ /n-butanol)	2.70	1194.00	0.9	7.80

^a COV (1.5 mg phospholipids) with incorporated protein from semipurified extracts were added to an incubation medium containing 50 mM KH₂PO₄, 7.5 mM ascorbate, 0.75 mM TMPD, 150 μg cytochrome *c* (pH 7.0), and 0.5 μM ⁴⁵CaCl₂ (specific activity 1000 cpm/nmol). The samples were incubated during 5 min, and an aliquot filtered through a 0.45 μM Millipore filter using the protamine aggregation/filtration technique. Specific activity values represent the difference between the energized and nonenergized uptake rates. Under all conditions the calcium transport activity was inhibited by ruthenium red. Final volume 1 ml; temperature 25°C.

binding by the immunoperoxidase method, using diaminobenzidine tetrahydrochloride.

RESULTS

Calcium Uptake Activity of Semipurified Extracts

As described in the preceding section, partially purified extracts were obtained and reconstituted into vesicles to test their ability to accumulate calcium in similar conditions as those reported for whole mitochondria extracts (Zazueta *et al.*, 1991). The results are presented in Table I. As indicated, after elimination of external membrane and matrix space constituents, inner membrane proteins still transported calcium with a specific activity of 127.3 nmol ⁴⁵Ca²⁺/mg protein/5 min. The ammonium sulfate fractionation step provided two extracts; the one obtained after precipitation at 50% saturation completely lost the ability to accumulate the cation regardless of its considerable amount of protein content.

The second extract (F90), once reconstituted, restored calcium uptake with a specific activity of 443 nmol ⁴⁵Ca²⁺/mg protein/5 min. Finally, this fraction was extracted with chloroform:n-butanol and reconstituted into the vesicle system (F₀); again calcium transport with a specific activity of 1194 nmol ⁴⁵Ca²⁺/mg/5 min was observed. Figure 1 shows the electrophoretic pattern of the extracts with calcium transport activity, from left to right, duplicates of 10 and 20 μg protein: submitochondrial particles (SMP), fraction precipitated with 90% ammonium sulfate (F90), and fraction extracted with organic solvents (F₀). We also explored the ability of the F90 fraction to promote calcium movements through an organic

phase. As seen in Fig. 2, calcium was translocated from a hydrophilic medium, through the hydrophobic phase, to an aqueous solution containing a calcium chelating buffer. This movement was 50% inhibited by 5 μM ruthenium red. The fraction assayed contained an excess of lipids, which was quantified as 0.654 μmol Pi/mg protein. In the organic phase experiment, the possible calcium transporting activity of phospholipids was also

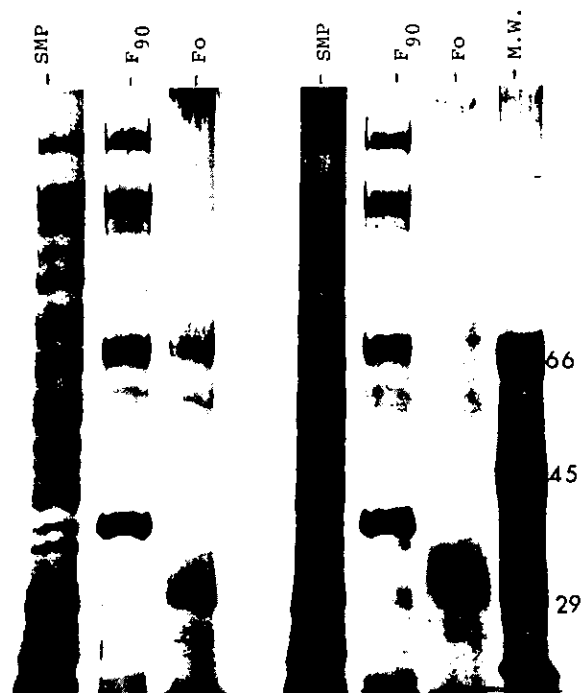


Fig. 1. SDS-PAGE (10% gel) of mitochondrial extracts reconstituted into COV with calcium transport activity. From left to right: submitochondrial particles; F90 (fraction precipitation with 90% ammonium sulfate) and F₀ (fraction obtained after organic solvent extraction).

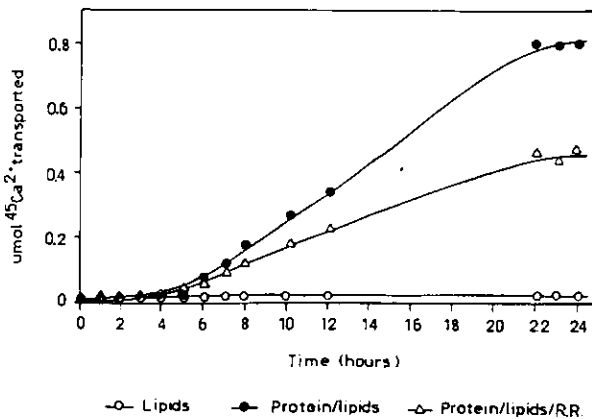


Fig. 2. Purified mitochondrial extracts induced calcium mobilization through a hydrophobic phase. An 8-ml mixture of 60% chloroform: 40% *n*-butanol containing 0.7 mg of mitochondrial protein from the F90 fraction was transferred into a U-tube (270 mm long \times 7 mm diameter). In the left side, 1.0 ml of 7.5 μ M ⁴⁵CaCl₂ in 10 mM TRIS, pH 7.3, was layered and in the right side, 1 ml of a 5 mM EGTA solution in 10 mM TRIS, pH 7.3, was deposited (●). The same experiment was carried out in the absence of the protein (○) and in the presence of 2.5 μ mol ruthenium red (△). At the indicated times, aliquots of 0.05 ml were withdrawn for radioactivity measurements.

tested, observing that phospholipids themselves had no ionophoretic properties. The experiments with denaturalized protein added further evidence about the essential role of a protein component in the calcium transport activity. Boiled preparations reconstituted into liposomes completely lost their calcium transport activity (not shown).

Characterization of the Antibodies

Titers of Sera

Titers were determined by an indirect ELISA method. The titer is defined as the highest dilution at which the ELISA response was twice the blank value of the test. High titers were obtained in all the animals. The capacity of the antibodies to inhibit calcium uptake was tested in reconstituted liposomes and mitoplasts.

Inhibitory Action of Antiserum on Calcium Transport Activity in Reconstituted Liposomes and Mitoplasts

Control antiserum and AntiUni-Ca²⁺ were incubated with COV reconstituted with whole mitochondria proteins, for 10 min, and assayed for ⁴⁵calcium uptake by the filtration method and scintillation counting.

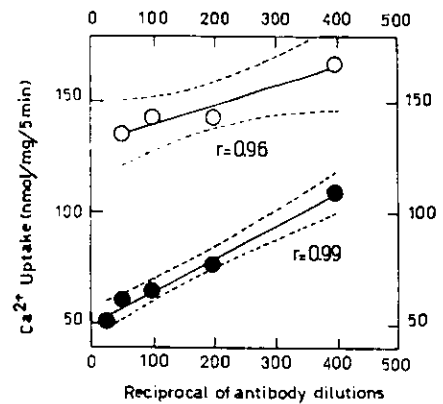


Fig. 3. Net calcium uptake in COV reconstituted with whole mitochondria proteins in the presence of preimmune serum (○) and AntiUni-Ca²⁺ (●). Proteoliposomes were incubated for 10 min at 4°C with antisera and then added to the reaction medium described in Table I. After 5 min, an aliquot was filtered and the radioactivity measured in a scintillation counter. The results are expressed as the mean of three experiments represented as a linear regression with confidence limits of 95% (dotted lines).

Figure 3 shows the net uptake of calcium in COV in the presence of different dilutions of control serum and AntiUni-Ca²⁺. Both sera inhibit calcium uptake; this can be explained by a nonspecific recognition of the antibodies or of another serum component, of a similar epitope. Nevertheless, the remaining activity of calcium transport in the vesicles incubated with control serum was almost twice the observed when AntiUni-Ca²⁺ was present under the same conditions. The difference between the mean values of the two groups was statistically significant at $P < 0.001$ (Student's *t* test). Each value represents the difference between "energized" vesicles uptake, i.e., liposomes with a negative inner membrane potential and "nonenergized" uptake, or passive calcium accumulation and unespecific binding of the cation to the liposomes.

Calcium uptake by mitoplasts is illustrated in Fig. 4. Trace A shows energy-dependent calcium accumulation in mitoplasts. It can be observed that when the proton gradient was dissipated by CCCP, the cation was released by mitoplasts. Trace B shows the same experiment in the presence of control serum. In this case the antibodies had no effect on calcium movements. Trace C clearly shows the inhibitory action of AntiUni-Ca²⁺. These results raised the question of a possible inhibitory effect upon the mechanism that induces the protonmotive force. Mitoplasts respiration was followed in an oxymeter with a Clark type electrode, revealing a high rate

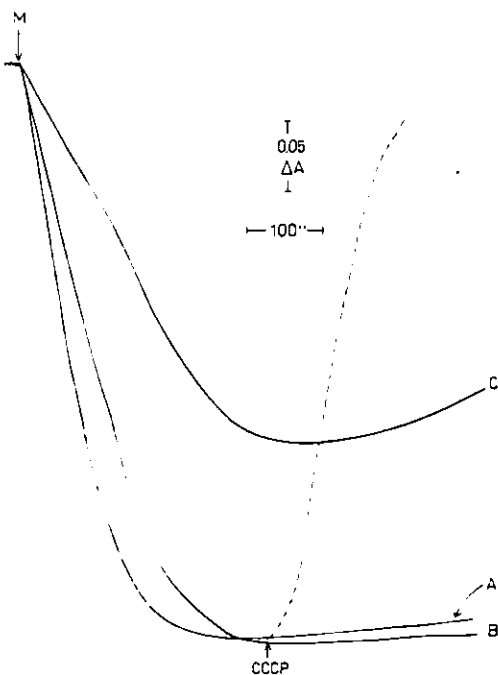


Fig. 4. Inhibition of calcium uptake by Anti-UniCa²⁺ in mitoplasts. Protein (1 mg) was added to an incubation medium containing 250 mM sucrose, 10 mM succinate, 10 mM HEPES, 50 μM CaCl₂, 200 μM ADP, 10 μg rotenone, 1 mM phosphate, and 50 μM Arsenazo III. Double wavelength spectrophotometric tracings were obtained at 685-675 nm. Final volume 3 ml, temperature 25 C, pH 7.3.

of respiration in the presence of the antisera (not shown).

It is known that a rapid, electrophoretic calcium uptake can decrease the internal negative membrane potential (Scarpa and Azzone, 1970; Gunter and Pfeiffer, 1990). The effect of the antisera on the mitoplasts' membrane energization was explored. Figure 5A shows the membrane potential of control mitoplasts: a partial de-energization of the membrane is induced by 50 μM calcium as a result of the cation cycling across the membrane (Lehninger *et al.*, 1967; Broekemeier and Pfeiffer, 1989; Chávez *et al.*, 1991). Once the equilibrium of positive charges is established, the transmembrane potential is restored to a value of 200 mV.

The Δψ decrease after addition of the uncoupler carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone. In Figs. 5B and 5C, the antibodies were incubated with mitoplasts for 10 min and then added to the assay medium to measure changes in optical absorbance in the presence of safranine. As shown, mitoplasts were capable of maintaining their membrane integrity in spite of the high calcium concentration present in the serum. Only when a critical concentration of calcium has been reached inside the mitoplast did the Δψ begin to drop. EGTA was added to chelate the excess of external calcium.

Specificity of the Antibodies

The specificity of the antibodies was monitored using the Western blot technique. After electrophoresis

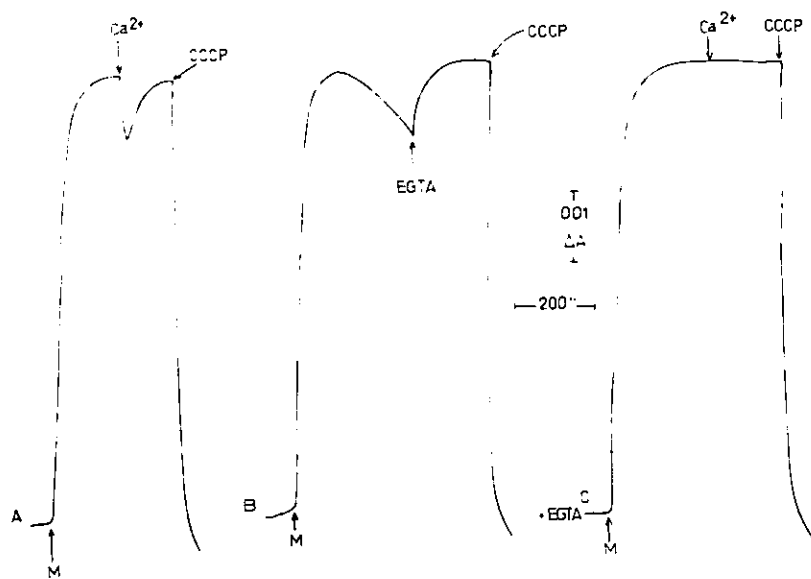


Fig. 5. Transmembrane potential of mitoplasts incubated with preimmune serum and Anti-UniCa²⁺. The assay medium was essentially the same as described in Fig. 4, but safranine was used instead of Arsenazo III and the changes in absorbance were followed at 533-511 nm. Calcium was added where indicated.

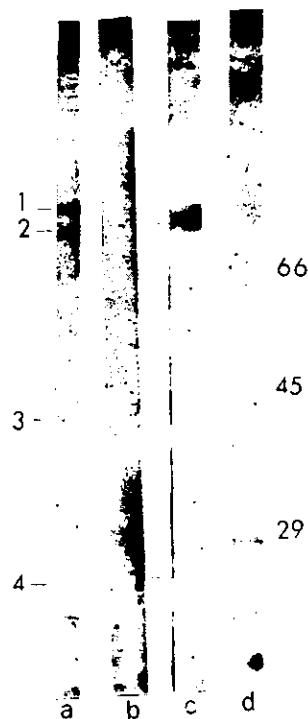


Fig. 6. Western Blot of semipurified mitochondrial extracts. From left to right: submitochondrial particles, incubated with AntiUni-Ca²⁺ (a) and with preimmune serum (b); F90 incubated with AntiUni-Ca²⁺ (c) and preimmune serum (d), developed with *o*-diaminobenzidine.

on polyacrylamide gels under denaturing conditions, the proteins were transferred to nitrocellulose paper and tested against antibodies. The fact that antibodies lost their recognition capacity for boiled, electrophoresed proteins, blotted onto nitrocellulose, suggests that the recognized epitope is conformational or situated very near to an active locus.

Figure 6 shows the patterns of transferred proteins revealed by immunochemical detection using AntiUni-Ca²⁺ and a second antibody labeled with peroxidase. Among the numerous bands detected by protein staining (not shown) only a few reacted with the antiserum and were revealed after incubation with *o*-diaminobenzidine. Nonspecific recognition of a 25-kDa protein was observed by the control antisera incubated with SMP and F90 (lines b and d), probably by cross reaction; on the other hand AntiUni-Ca²⁺ specifically detected two bands, a 75-kDa protein and a second band of approximately 20 kDa, both present in SMP and F90 (lines a and c). In line a, AntiUni-Ca²⁺ detected another band in SMP (70 kDa), probably a degradation product of the same protein present in F90, as a single, but rather broad band.

Calcium Uptake Inhibition by Specific Antibodies

Removal of specific antibodies bound to proteins transferred onto nitrocellulose was made after careful detection. An acid elution technique was used in the presence of 0.1 M glycine solution, pH 3. After 60 sec of continuous shaking, the eluates were neutralized to pH 7.0. This was done until no proteins were detected in the eluates. Three specific antibodies and a control eluate were obtained. The specific antibodies correspond to 75-, 70- and 20-kDa proteins. A control eluate in each experiment was obtained after acid treatment of a different zone of the nitrocellulose matrix, which showed no affinity for the specific antibodies.

Table II shows the inhibitory effect of eluted antibodies on the initial rate of calcium uptake. Mitoplasts incubated with the control eluate accumulated 86.62 ± 6.34 nmol ⁴⁵Ca²⁺/mg/min. The same preparation incubated with the antibody against the 75-kDa protein of F90 reduced the uptake to 50.7 ± 12.27 nmol ⁴⁵Ca²⁺/mg/min, which represents 59% of the total calcium transport activity. Similar values were found for the antibody that recognized the 70-kDa protein, i.e., 63.57 ± 3.97 nmol ⁴⁵Ca²⁺/mg/min. In some experiments AntiUni-Ca²⁺ recognized a band of approximately 66 kDa; this antibody was eluted and its inhibitory action on calcium accumulation was tested. It did not affect the cation uptake: an activity

Table II. Eluted Antibodies Inhibited Calcium Uptake in Mitoplasts^a

Eluted antibodies	nmol ⁴⁵ Ca ²⁺ transported/mg·min
Control	86.82 ± 6.34
1	50.70 ± 12.27
2	63.57 ± 3.97
3	84.35 ± 1.30
4	28.28 ± 0.78

^a A 50-μg preparative SDS-PAGE was blotted onto a nitrocellulose membrane and then incubated for 3 h at room temperature with a 1:25 dilution of the hyperimmune sera. At the end of the incubation period, strips were cut of the regions where the 75-, 70- and 20-kDa antigens were located. One strip obtained from the blotted membrane, developed with a peroxidase-labeled rabbit antimouse IgG and diaminobenzidine, was used as control. Each strip was immediately incubated for 2 min with 1 ml of 0.1 M glycine in distilled water and the pH adjusted to 7.0 with KOH. Mitoplasts were incubated for 10 min at 4°C with the specific antibodies and then added to the assay medium, described in Fig. 4, which contained 50 μM ⁴⁵CaCl₂. Radioactivity measurements were carried out after 1 min of incubation.

of $84.35 \pm 1.30 \text{ nmol } ^{45}\text{Ca}^{2+} / \text{mg} / \text{min}$ was found. The antibody associated to the 20-kDa protein inhibited almost 67% of the calcium transport in mitoplasts, i.e., $28.28 \pm 0.78 \text{ nmol } ^{45}\text{Ca}^{2+} / \text{mg} / \text{min}$. It should be noted that mitoplasts accumulated $85.53 \pm 2.3 \text{ nmol } ^{45}\text{Ca}^{2+} / \text{mg} / \text{min}$ under normal conditions.

DISCUSSION

In previous study we showed that a crude extract of proteins isolated from the inner mitochondrial membrane had the ability to transport Ca^{2+} , provided a membrane potential was built up (Zazueta *et al.*, 1991). The present work reports data on further purification of a calcium carrier uniporter. As shown, extraction of the F90 fraction with chloroform-butanol conduces to the isolation of four protein bands, identified in SDS-PAGE, and with molecular weights ranging between 20–70 kDa (F_0).

Interestingly, this extract was able to transfer Ca^{2+} from a hydrophilic phase to another, separated by a hydrophobic phase. It should be noted that this membrane extract, due to the form of extraction, contained phospholipids. In this regard, Sokolove and Brenza (1983) showed that phospholipids may act as ionophores for Ca^{2+} . However, this possibility was discarded, since, as shown in Fig. 2, when using phospholipids as controls, no calcium transport was observed. Further evidence on the essential role of the protein component was provided by the experiment showing that after boiling the extract, its Ca^{2+} -transporting activity was completely lost.

An important finding of this work was that the polyclonal antibodies prepared with an inner membrane extract (F90) identified three proteins with apparent molecular weights of 75, 70, and 20 kDa. It is relevant to note that the antibody reacting against the 20-kDa protein almost completely inhibited Ca^{2+} accumulation in mitoplasts (Table II). These data strongly suggest that this 20-kDa protein is a necessary component of the Ca^{2+} uniporter. Saris *et al.* (1993) reported that antibodies induced against a Ca^{2+} -binding mitochondrial glycoprotein inhibited the uniporter-mediated transport of calcium in mitoplasts prepared from rat liver mitochondria. The protein was reported to consist of a glycoprotein part and a small putative channel peptide that might be dissociated from it. Due to its elusive character, identification of the calcium

transport system is a difficult challenge that remains open to all possibilities. It can be inferred that the 20-kDa protein could be the calcium uniporter *per se*, or at least a fundamental constituent of the transporting proteins. Although we used polyclonal antibodies, the antibody directed against the 20-kDa protein was indeed selectively purified, since it was eluted after specific recognition of this protein. This specificity was observed even in a very complex mixture of proteins, i.e., submitochondrial particles. Finally, the dissociation of respiratory activity from inhibition upon initial calcium influx, in mitoplasts, supports the notion that the AntiUni- Ca^{2+} acts on calcium translocation at the uniporter level. It has been proposed that the possible role of the high-affinity Ca^{2+} -binding proteins could consist in being a "recognition site" for superficial binding of calcium, not involved in membrane translocation of the cation, but essential for the transport process (Carafoli, 1975; Prestipino *et al.*, 1974). Remarkably, the calcium transport activity observed with the extract used to induce antibodies was not a binding activity, but an energy-dependent Ca^{2+} uptake, depending on a selective and differential energization. This energization method has been widely described in the literature (Horstman and Racker, 1970; Skulachev, 1974; Racker, 1974; Carrol and Racker, 1977; Kessler *et al.*, 1977).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by grant 047N from CONACyT.

REFERENCES

- Blondin, G. (1974). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **56**, 97–105.
- Broekemeier, K. M., and Pfeiffer, D. R. (1989). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **163**, 551–556.
- Carafoli, E. (1975). *Mol. Cell. Biochem.* **8**, 133–139.
- Carafoli, E., and Sottocasa, G. (1974). In *Dynamics of Energy-Transducing Membranes*, (Ernster, L., Stabrook, R. W., and Slatter, E. C., eds.), Elsevier, Amsterdam, pp. 455–469.
- Chávez, E., Briones, R., Michel, B., Bravo, C., and Jay, D. (1985). *Arch. Biochem. Biophys.* **242**, 493–497.
- Chávez, E., Moreno-Sánchez, R., Zazueta, C., Reyes-Vivas, H., and Arteaga, D. (1991). *Biochem. Biophys. Acta* **1070**, 461–466.
- Denton, R. M., and McCormack, G. (1985). *Am. J. Physiol.* **249**, E543–E554.
- Engvall, E., and Perlmann, P. (1971). *Immunochemistry* **8**, 871–876.

- Gómez-Puyou, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., Becker, G., and Lehninger, A. (1972). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **47**, 814-819.
- Gunter, T. E., and Pfeiffer, D. R. (1990). *Am. J. Physiol.* **258**, C-755-C-786.
- Hansford, R. G. (1985). *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **102**, 1-72.
- Horstman, L., and Racker, E. (1970). *J. Biol. Chem.* **245**, 1336-1344.
- Jeng, A., and Shamo, E. (1980). *J. Biol. Chem.* **255**, 6897-6903.
- Kendrick, N. C. (1976). *Anal. Biochem.* **76**, 487-501.
- Kessler, R., Blondin, G., VandeZande, H., Haworth, R., and Green, D. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 2662-2666.
- Laemmli, U. K. (1979). *Nature (London)* **277**, 680-685.
- Lee, C. P., and Ernster, J. (1965). In *Symposium on the Regulation of Metabolic Process in Mitochondria* (Tager, J., Papa, S., Quagliariello, E., and Slater, E. eds.), Vol. 7, Elsevier/North Holland, New York, pp. 218-234.
- Lehninger, A. (1971). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **42**, 312-318.
- Lehninger, A., Carafoli, E., and Rossi, C. (1967). *Adv. Enzymol.* **29**, 259-320.
- Mironova, G., Grigorjev, P., and Kondrashova, M. (1982). *J. Bioenerg. Biomembr.* **14**, 213-225.
- Nakamura, J., Wang, T., and Tsai, L. I. (1983). *J. Biol. Chem.* **258**, 5079-5083.
- Panfilii, E., Sottocassa, G. L., Sandri, G., Liut, G. (1980). *Eur. J. Biochem.* **105**, 205-210.
- Prestipino, G., Ceccarelli, D., Conti, F., and Carafoli, E. (1974). *FEBS Lett.* **45**, 99-103.
- Racker, E. (1974). In *Dynamics of Energy-Transducing Membranes* (Ernster, L., Slater, E., and Estabrook, R. W. eds.), Elsevier, Amsterdam, New York, pp. 243-256.
- Ramirez, J., Calahorra, M., and Peña, A. (1987). *Anal. Biochem.* **163**, 100-107.
- Rottenberg, H. (1979). In *Methods Enzymol.* **55**, 547-569.
- Saris, N., Sirota, T., Virtanen, I., Niva, K., Penttilä, T., Dolgachova, L., and Mironova, G. (1993). *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**, 307-312.
- Scarpa, A., and Azzone, G. (1970). *Eur. J. Biochem.* **12**, 328-335.
- Schnaitman, C., and Greenawald, W. (1968). *J. Cell. Biol.* **38**, 158-175.
- Skulachev, V. P. (1974). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **227**, 188-202.
- Sokolove, P., and Brenza, J. (1983). *Arch. Biochem. Biophys.* **221**, 404-416.
- Sottocassa, G. L., Sandri, G., Panfilii, E., and DeBernard, B. (1971). *FEBS Lett.* **17**, 100-105.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
- Ying, W., Emerson, J., Clarke, M., Sanadi, R. (1991). *Biochemistry* **30**, 4949-4952.
- Zazueta, A. C., Holguin, J. A., and Ramirez, J. (1991). *J. Bioenerg. Biomembr.* **23**, 889-902.

Advances in the Purification of the Mitochondrial Ca^{2+} Uniporter Using the Labeled Inhibitor $^{103}\text{Ru}_{360}$ ¹

Cecilia Zazueta,^{2,3} Gabriela Zafra,² Gabriela Vera,² César Sánchez,² and Edmundo Chávez²

Received June 19, 1998

For many years the calcium uniporter has eluded attempts of purification, partly because of the difficulties inherent in the purification of low-abundance hydrophobic proteins (Reed and Bygrave, 1974). Liquid-phase preparative isoelectric focusing improved the fractionation of mitochondrial membrane proteins. A single 6-h run resulted in a 90-fold increase in specific activity of pooled active fractions over a semipurified fraction, allowing for enrichment of the calcium transport function in cytochrome oxidase vesicles. An additional powerful tool in the isolation of the uniporter was the use of the labeled inhibitor $^{103}\text{Ru}_{360}$ as an affinity ligand; by following this procedure a protein of 18 kDa was purified in nondenatured, but rather inactive, form. The labeled protein corresponds to the protein that showed Ca^{2+} transport activity.

KEY WORDS: Mitochondria; Ca^{2+} uniporter; calcium transport inhibitors.

INTRODUCTION

The currently proposed roles for intramitochondrial calcium transport (Hansford, 1988; McCormack and Denton 1989) emphasize the importance of Ca^{2+} accumulation and, thereby, a renewed interest in the investigation of the uptake mechanism. The uptake carrier is an uniporter that reduces extramitochondrial calcium concentration within the concentration of 10^{-7} to 10^{-5} M; the rate of uptake is a function of calcium concentration showing sigmoidal kinetics, a $K_{0.5}$ which depends on the membrane potential and a Hill coefficient near 2.0 (Gunter and Pfeiffer, 1990). This system is inhibited by low concentrations of lanthanides and ruthenium red (Reed and Bygrave, 1974). Recently, Ying *et al.* (1991), reported the synthesis of an oxo-

bridged ruthenium complex that possesses higher inhibitory activity than ruthenium red itself.

In contrast with the remarkable progress in the field of metabolic regulation by calcium, attempts to identify the components of the calcium transport system with the ultimate goal of isolating them and reconstituting the process, still remains to be done. The low uniporter concentration, estimated between 0.001–0.01 nmol/mg protein, constitutes a serious problem for its isolation, as well as the selection of the adequate detergent to remove the uniporter from the lipidic environment without denaturing the protein. Even with these difficulties, however, there has been some success in isolating, identifying, and reconstituting this porter (Gunter and Pfeiffer, 1990). Saris *et al.* (1993) found that antibodies raised against a glycoprotein-peptide complex inhibited the calcium uniporter in rat liver mitoplasts. Mironova *et al.* (1994) reported the purification of the channel-forming component of that complex and described its channel properties when reconstituted into a planar lipid bilayer. Our laboratory reported the identification of a low molecular-weight protein, i.e., 20 kDa, by using specific antibodies that inhibit calcium transport by 60% in rat liver mitoplasts (Zazueta *et al.*, 1994). In this paper we present results

¹ Abbreviations used: TEA, Triethanolamine; CHAPS, (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate); TMPD, tetramethyl-1-phenylendiamine; COV, cytochrome oxidase vesicles; SMP, submitochondrial particles; C_{12}E_8 , mono-*N*-dodecyltaetilenlycol; CCCP, carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone.

² Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez, México D.F. 01480, México.

³ Author to whom correspondence should be sent.

of purifying the mitochondrial calcium uniporter using a specific ligand: the high-affinity inhibitor $^{103}\text{Ru}_{360}$ synthesized from a radioactive precursor, as well as experiments of reconstitution in cytochrome oxidase vesicles.

MATERIAL AND METHODS

Rat kidney mitochondria from adult female Wistar rats were obtained as described (Chávez *et al.*, 1985). Submitochondrial particles were obtained by the method of Lee and Ernster (1965).

Solubilization of Rat Kidney Submitochondrial Particles

SMP (3 mg/ml) were solubilized in 1.2% sodium cholate (w/v) in a sucrose medium. Solubilization was carried out with constant stirring for 30 min at 4°C. The material was centrifuged for 1 h at $100,000 \times g$. The supernatant was collected for further fractionation and reconstitution.

Fractionation of Submitochondrial Particles

Solubilized SMP (3 mg/ml) were saturated with 50% ammonium sulfate and centrifuged at $12,000 \times g$ for 10 min at 4°C. The supernatant was then 90% saturated with ammonium sulfate and centrifuged at $20,000 \times g$ for 15 min at 4°C. The resultant pellet was homogenized with 50 mM KH_2PO_4 , pH 7.0, and dialyzed against the same buffer in a 1:250 proportion (F_{90} fraction).

Polyclonal antibodies were obtained against this fraction (Zazueta *et al.*, 1994) and the purified IgGs were immobilized in an Affi-Gel hydrazide column. This affinity column was used to enrich the F_{90} fraction by successive passages of solubilized submitochondrial particles in 1.0% CHAPS and eluting the recognized proteins with 150 mM sodium citrate, pH 5.0 (Fig. 1).

Liquid-Phase Isoelectric Focusing

The enriched preparation (8 mg, 30 ml) was desalted using the ion retardation ECONOPAC 10DG desalting column and diluted to a final volume of 55 ml containing 0.5% CHAPS (w/v), 20% glycerol, and

2 ml of BioLyte ampholites, pH range 5–8. This solution was loaded into a liquid-phase isoelectrofocusing Rotofor Cell without further treatment. Focusing was carried out at 12-W constant power for 6 to 7 h at 4°C. At equilibrium, the values were 740 V and 16 mA. Twenty fractions were harvested and their pH values measured. Protein concentration was determined by a modified Lowry procedure (Nakamura *et al.*, 1983).

Reconstitution of Liquid-Phase Isoelectrofocused Proteins

After measurement of pH and protein concentration, samples were incubated with 1 M NaCl (final concentration) and dialyzed against 250 volumes of 50 mM KH_2PO_4 , pH 7.0, to eliminate ampholites. Each fraction (60–90 μg) was incubated with 0.5 ml of COV, as described below, and sonicated in a water sonicator for 3 to 5 s in the presence of 0.5% sodium cholate. The detergent was removed by dialysis or by dilution with 40 volumes of 50 mM KH_2PO_4 , pH 7.0, followed by ultracentrifugation at 45,000 rpm for 1 h. The liposomes were resuspended in the same buffer and the activity of reconstituted calcium uptake was analyzed.

Calcium Uptake Activity in Cytochrome Oxidase Vesicles

Dried lipids (40 mg asolectin) were sonicated to clarity in 50 mM H_3PO_4 -TEA, pH 7.0. Cytochrome oxidase was added to a final concentration of 0.25 mg/ml and incorporated by simple mixing with the liposomes, as described by Ramírez *et al.* (1987). COV (40 mg/ml), with incorporated proteins from mitochondrial extracts, were added to an incubation medium containing 50 mM KH_2PO_4 , 7.5 mM ascorbate, 0.75 mM TMPD, 150 μg cytochrome *c* (pH 7.0), and 0.5 mM $^{45}\text{CaCl}_2$ (specific activity 1000 cpm/nmol). The samples were incubated during 5 min and an aliquot filtered through a 0.45- μm Millipore filter using the protamine filtration technique (Rosier *et al.*, 1979). Specific activity values represent the difference between energized (plus cytochrome oxidase substrates) and nonenergized uptake rates.

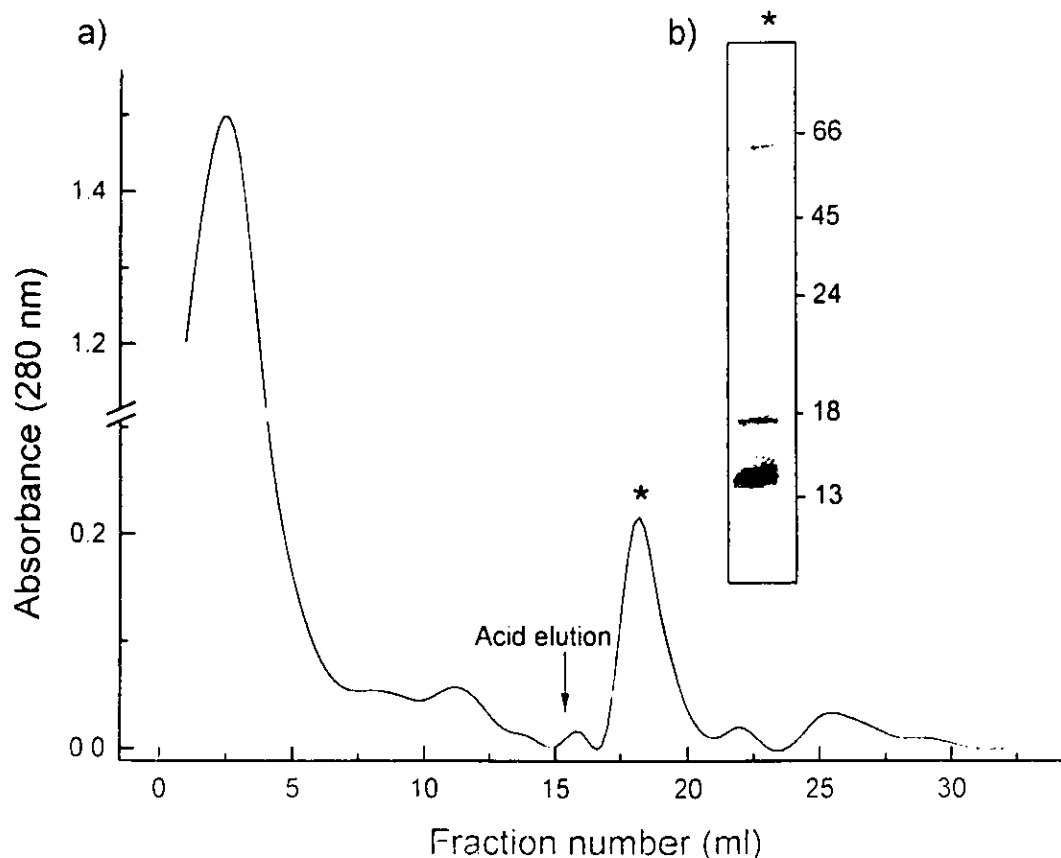


Fig. 1. Enrichment of the F_0 fraction by immunoaffinity chromatography. (a) Elution profile of SMP after passing them through the immunoaffinity column. Polyclonal antibodies were raised against the fraction precipitated with ammonium sulfate to 90% saturation. These antibodies were coupled to a Affi-Gel hydrazide column and equilibrated with 10 mM Tris, 0.1% CHAPS, pH 7.5. Semicrude extracts (1 or 2 mg) solubilized in the same buffer were used. The proteins that freely passed through the column were eliminated and the recognized ones were eluted with 150 mM sodium citrate, 0.3% CHAPS, pH 5.0. (b) Silver staining of the eluted fraction. Of this fraction, 10 μ g were electrophoresed in a 15% polyacrylamide gel in denaturing conditions and stained as described in the methods section.

Synthesis of the Radiolabeled Ru_{360}

The synthesis of the inhibitory complex was based on the method for the preparation of ruthenium red, as modified by Ying *et al.* (1991). The radiolabeled Ru_{360} was synthesized from 2.5 mg $RuCl_3 \cdot 3 H_2O$ combined with 1 mCi of $^{103}RuCl_3$. The final separation was achieved using a 0.5×3.0 cm column packed with carboxymethyl cellulose. The yield was 130 nmol of Ru_{360} as calculated from the molar coefficient extinction of the complex at 360 nm, i.e., $2.6 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$.

Inhibition of Mitochondrial Calcium Uptake

Calcium uptake was followed by incubating mitochondria with $^{45}CaCl_2$ (specific activity 1000 cpm/

nmol) in the presence of increasing concentrations of Ru_{360} . After 1 min, an aliquot of the sample was filtered and its radioactivity measured in a scintillation counter. The assay was carried out under three substrate concentrations. Calculations of the lines in the Dixon plots and line fittings were carried out with the Microcal Origin computer program (Microsoft Corp.). The linear-regression coefficient of calculated lines varied between 0.95 and 0.99.

Binding of $^{103}Ru_{360}$ Complex to Intact Mitochondria

Mitochondria were incubated in 6 ml of 250 mM sucrose/10 mM HEPES/10 mM succinate, pH 7.3, at different concentrations of $^{103}Ru_{360}$. After 10 min, the

samples were centrifuged for 10 min at 13,000 rpm and the pellets were washed with 10 ml of medium to eliminate free inhibitor. To remove nonspecific binding, 1.5 μ M unlabeled inhibitor was added to mitochondria; after 10 min, the samples were centrifuged and washed as above, for radioactivity measurement.

Affinity Chromatography of the Membrane Proteins

Submitochondrial particles were labeled with 10 pmol/mg $^{103}\text{Ru}_{360}$ in the presence of 1.0% C_{12}E_8 or 1% CHAPS for 30 min at 0°C. The labeled proteins were separated by CM-cellulose chromatography, using a linear gradient of ammonium formate, pH 5.5.

SDS-PAGE Analysis of Protein Fractions

Polyacrylamide gel electrophoresis was performed in the presence of 2% sodium dodecyl sulfate, as described by Laemmli (1979). Other techniques include the separation in polyacrylamide in nondenaturing conditions, using the anodic discontinuous buffer system described by Davis (1964).

RESULTS

Liquid-Phase Preparative Isoelectrofocusing Separation

Rat kidney mitochondria was solubilized and treated as described in the section on material and methods, before isoelectrofocusing was performed.

Two assays methods were used for localizing the transporter following purification in the isoelectrofocusing chamber. One of them was the traditional method of solubilization and functional reconstitution into liposomes. The other one was by the Western blot technique using antibodies raised against the fraction with maximal Ca^{2+} transporting activity. The antibodies were also used to inhibit cation uptake in mitoplasts.

Figure 2a shows the pH profile and protein distribution after reaching the equilibrium in the fractionating cell. The bulk of protein was focused at pHs above 8.0; in these fractions the main protein was cytochrome *c*, as was demonstrated by analyzing its absorption spectrum and by its stained image (mol. wt. 13,000 Da) in SDS-PAGE (not shown). Interestingly, this

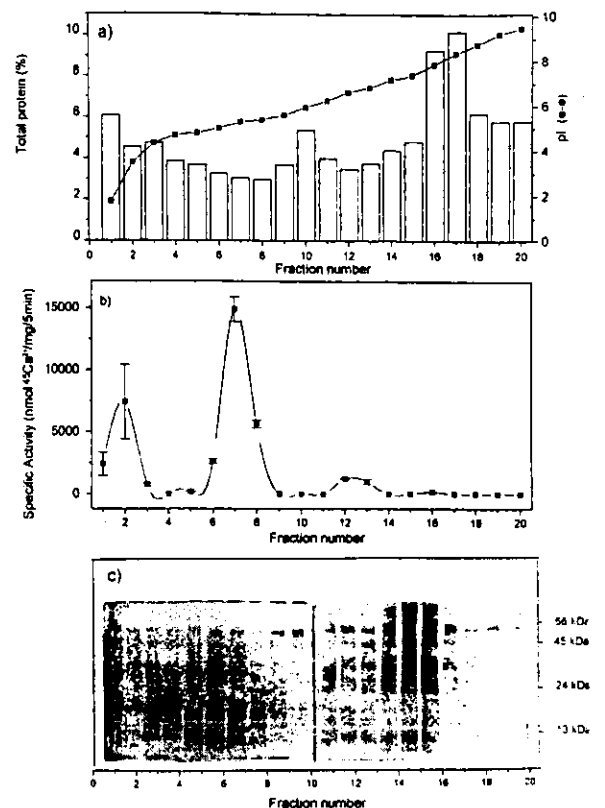


Fig. 2. (a) Analysis of isoelectrofocusing fractions by pH and protein assay. Enriched fraction (6 mg) was focused in the presence of 0.6% glycerol and 0.1% CHAPS. pH was measured immediately after collecting fractions and protein assayed by a modified Lowry technique. The ratio volts/hour ($V/H = 4500$) was maintained in all the focusing experiments. (b) Specific activity determination and (c) silver staining imaging of the isoelectrofocusing fractions. Each of the 20 fractions obtained were assayed for calcium uptake activity as described in the methods section. Data represent mean values of three experiments \pm S.D. After concentration and dialysis, 5 μ g of each fraction were electrophoresed in a 15% polyacrylamide gel (2% SDS) and stained with the silver technique already mentioned.

peripheral protein was not solubilized in the primary steps of purification, which was carried out by high-salt concentration precipitation.

Each fraction was concentrated and incorporated into COVs as described earlier. After reconstitution, transport activity was measured as the ability of COVs to support uptake of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ in presence of cytochrome *c* and the electron donor pair ascorbate-TMPD (in each case, COVs without these substrates were used as negative controls to account for passive $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake and nonspecific binding). The reaction was stopped by addition of protamine sulfate, which promotes aggregation of the liposomes. An aliquot is fil-

tered and its radioactivity measured. The fractions that promoted maximal accumulation were those with isoelectric points between 5.0–6.0 (Fig. 2b). The electrophoretic analysis of the fractions with Ca^{2+} transporting activity showed an approximately 20 and a 70 kDa protein (Fig. 2c). It appears that the activity of these proteins is critically maintained above pH 5.0–6.0. The drop to the acidic end of the gradient inactivates these proteins (as observed in the activity analysis), in spite of the mild conditions used during the reconstitution and calcium accumulation assays.

A nondenaturing electrophoresis was done to determine if the proteins observed in the presence of sodium dodecyl sulfate were independent proteins or were subunits that belong to a multimer. Figure 3 shows the silver staining imaging of the ten acidic fractions. As observed from fraction 5–8, only a broad band is detected and no aggregates were formed in the front of the gel.

Inhibition by Antibodies of Calcium Uptake in Mitoplasts

To strengthen the evidence of the participation of these proteins in the calcium uptake mechanism, purification of substantial amounts of these fractions were carried out until it was possible to inject enough antigen in rabbits to raise high serum titers. As the yield of protein was poor each time (200–220 μg),

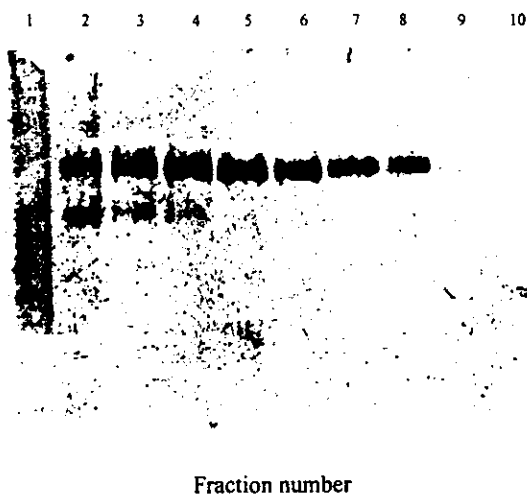


Fig. 3. Acidic fractions (10 μg) were run, at constant 200 V, in a acidic discontinuous buffer system in a 7.5% gel without SDS. To ensure the entrance of hydrophobic proteins, 0.6% CHAPS was added. Silver staining was used to detect proteins.

the induction of antibody response was stimulated by injecting the antigen in the popliteal ganglion of female New Zealand rabbits.

The lymphocytes were confronted with the antigen in the lymph node, as the site of greatest concentration, so the primary response was greater than the one obtained when the lymphocytes left the recirculating pool and migrated to the site of antigen concentration.

Titers were determined by an indirect ELISA method (not shown). The titers were defined as the highest dilution at which the ELISA response was twice the blank value of the test. A maximal titer of 1:3200 was obtained, confronting the absorbance values (490–630 nm) obtained by the incubation of preimmune and hyperimmune serum with semicrude antigens.

The ability of antibodies to inhibit Ca^{2+} uptake in mitoplasts is illustrated in Fig. 4. Trace A shows Ca^{2+} accumulation in control mitoplasts. Depending on the membrane potential; it is shown that the uncoupler CCCP, by dissipating the proton gradient, releases the cation to the medium. The preimmune serum does not affect the ability of mitochondria to transport cal-

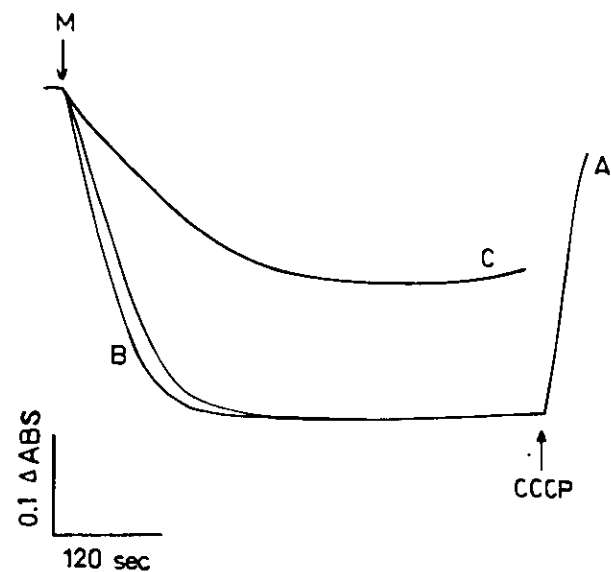


Fig. 4. Inhibition of calcium uptake by hyperimmune serum in mitoplasts. Protein (1 mg) was added to an incubation medium containing 250 mM sucrose, 10 mM succinate, 10 mM HEPES, 50 μM CaCl_2 , 200 μM ADP, 10 μg rotenone, 2 mM phosphate, 50 μM arsenazo III, and incubated in presence of hyperimmune or control serum. Double-wavelength spectrophotometric tracings were obtained at 685–875 nm. Trace A represents calcium accumulation without serum addition; trace B was in the presence of preimmune serum and trace C was in presence of hyperimmune serum. Final volume 3 ml; temperature 25°C; pH 7.3.

cium (Fig. 4, trace B); however, in remarkable contrast, the hyperimmune serum inhibits such a reaction at the same concentration (Fig. 4, trace C). It should be mentioned that there was no inhibition of the respiratory rate of mitoplasts preparations in either condition (not shown). Control mitoplasts transported 52.80 ± 15.29 nmol Ca^{2+} /mg protein/5 min. A slight inhibition was observed when preimmune serum was incubated with mitoplasts for 1 min. The hyperimmune serum reduced calcium accumulation by 70%, i.e., to 15.93 ± 2.48 nmol Ca^{2+} /mg protein/5 min.

As expected, the analysis by immunoblotting using submitochondrial particles from rat kidney, showed two proteins of approximately 20 and 70 kDa; there is no evidence of the presence of these proteins in the membranes incubated with the preimmune serum. The hyperimmune serum recognized the same proteins when the antigen electrophoresed and blotted, as obtained from beef kidney submitochondrial particles (not shown).

The enrichment of the calcium uniporter activity in COVs is documented in Table I. Preextraction with ammonium sulfate precipitation in presence of sodium cholate, followed by isoelectrofocusing in liquid phase with a zwitterionic detergent (CHAPS), led to a substantial purification of this protein. The purification factor was 90 and the yield was 0.01%. Considering that the number of uniporters in the membrane has been estimated by inhibitor titration to be approximately 0.001 nmol/mg protein, the purification efficiency reported here is adequate. Very likely, the purification factors may be even higher, due to partial inactivation of the transport function during the procedure. On the other hand, inhibitor-binding components could be inaccessible to ruthenium red in the reconstituted system. This latter effect can be assumed by

the fact that in this model the classical suppressor of calcium uptake in mitochondria inhibited calcium accumulation at concentrations one order of magnitude higher than those required to inhibit the process in the organelle (Table I). Elsewhere we reported an apparent dissociation constant for the inhibitor (K_i) of $3.5 \mu\text{M}$ at pH 7.0 in COVs reconstituted with mitochondrial proteins (Zazueta *et al.*, 1991). The six positive charges of this trinuclear complex $[(\text{NH}_3)_5\text{Ru}-\text{O}-\text{Ru}(\text{NH}_3)_4-\text{O}-\text{Ru}(\text{NH}_3)_5]^{6+}\text{Cl}_6$ could account for nonspecific binding to negative charges of the phospholipids from COVs.

Selective Labeling of Membrane Proteins with the Inhibitor $^{103}\text{Ru}_{360}$

Ying and co-workers (1991) reported the isolation of a derivative of ruthenium red (Ru_{360}) with higher inhibitory activity than ruthenium red itself. Our approach was to synthesize the labeled ruthenium amine complex and use it as an affinity ligand for the calcium uniporter. A spectrophotometric analysis was performed to evaluate the purity of the complex. As described, the binuclear complex elutes at 0.4 M of the formate linear gradient as a single peak that absorbs strongly at 355–360 nm. The recovery of the labeled compound was 140 nmol, with a specific activity of 587,000 cpm/nmol. The kinetics mode of action of the binuclear amine complex on mitochondrial calcium transport was measured by varying calcium concentration in the presence of different amounts of inhibitor. Figure 5 shows a Dixon plot of kinetics data of calcium transport obtained with rat kidney mitochondria. Typical noncompetitive inhibition curves were obtained. The K_i of Ru_{360} was 7.5 nM, which is in agreement with the inhibition rates obtained by Ying *et al.* (1991)

Table I. Enrichment of Calcium Uniporter Activity in COVs^a

Solubilized extract reconstituted in COVs	Total protein (mg)	Specific activity (nmol Ca^{2+} /mg/5 min)	+ RR 5 μM (nmol Ca^{2+} /mg/5 min)	Yield (%)
Mitochondria	4000.00	151.80 \pm 10.0	71.2 \pm 10.0	100.0
Submitochondrial particles	1350.00	127.13 \pm 13.0	63.2 \pm 9.0	33.75
Ammonium sulfate (90%)	18.54	443.00 \pm 32.0	251.3 \pm 42.1	0.46
Immunoaffinity chromatography	4.90	1655.03 \pm 408.12	1203 (2)	0.12
Liquid-phase isoelectrofocusing	0.20	14888.00 \pm 2922.0	(n.e.)	0.01

^a Mitochondrial fractions were incorporated in COVs (1.5–3.25 μg /mg phospholipids) and incubated in a medium containing 50 mM KH_2PO_4 , 7.5 mM ascorbate, 0.75 mM TMPD, 150 μg cytochrome *c*, and 0.5 mM $^{45}\text{CaCl}_2$ (specific activity 1000 cpm/nmol). After 5 min, an aliquot was filtered through a 0.45 μm -Millipore filter and washed with 10 mM of CaCl_2 . Specific activity values represent the difference between the energized and nonenergized uptake rates. In the indicated cases, ruthenium red (RR) 5 μM was used to inhibit the energized uptake. Final volume 1 ml; temperature 30°C; pH 7.0. n.e., not evaluated.

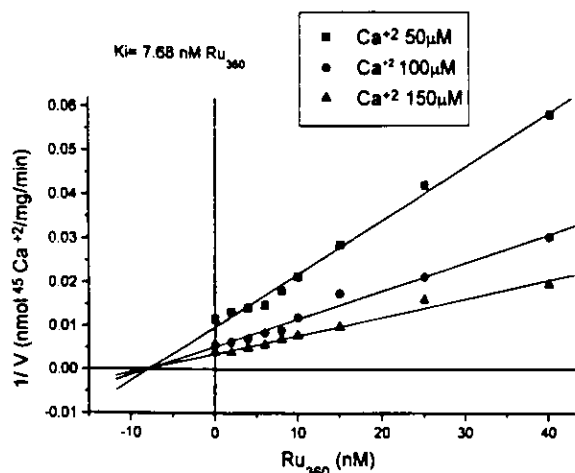


Fig. 5. Dixon plots of the kinetics data of mitochondrial Ca^{2+} transport in the presence of increasing concentrations of Ru_{360} . (■) At $50 \mu\text{M}$ Ca^{2+} ; (●) $100 \mu\text{M}$ Ca^{2+} ; and (▲) $150 \mu\text{M}$ Ca^{2+} . The medium was the same as in Fig. 4, except that $^{45}\text{CaCl}_2$ was used. Temperature, 25°C ; pH 7.3.

by using this compound to inhibit Ca^{2+} -stimulated respiration of rat liver mitochondria.

The affinity of the binuclear complex was evaluated by equilibrium binding to intact mitochondria. As observed in Fig. 6, the binding at high concentrations of the inhibitor was not saturable. Indeed, the high-affinity sites obtained by a Scatchard plot, i.e., 11 pmol/mg protein, correlates with maximum levels of inhibition.

The affinity of the binuclear complex to mitochondrial proteins was also analyzed in submitochon-

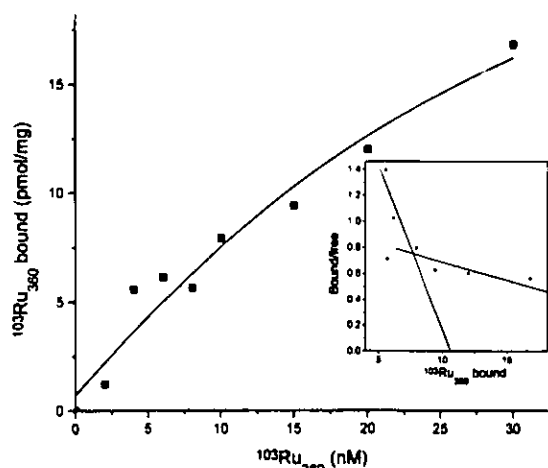


Fig. 6. Equilibrium binding of $^{103}\text{Ru}_{360}$ to intact mitochondria. The medium was the same as in Fig. 4, except that arsenazo III was not added. The insert shows the Scatchard plot analysis. Temperature, 25°C ; pH 7.3.

drial particles labeled with $10 \text{ pmol } ^{103}\text{Ru}_{360}/\text{mg}$ protein by native and SDS-electrophoresis. In Fig. 7, the distribution of radioactivity in each 2-mm slice of a 12% SDS-polyacrylamide gel is shown, as well as the autoradiography of a gel run under the same conditions and exposed for several weeks. The assay clearly reveals a main labeled protein of low molecular weight. An approach to obtain this labeled protein was made by using preparative electroelution in liquid phase (Fig. 8). The protein that binds the labeled oxo-bridged ammonium complex elutes with other proteins of nearly the same molecular weight, i.e., 18 kDa , but the assay conditions limited the extraction of a single band.

Because of the cationic nature of Ru_{360} , $(\mu\text{-O})[(\text{HCO}_2)(\text{NH}_3)\text{Ru}_2]\text{Cl}_3$, it may simply interact with negatively charged groups on proteins. Thus, the specificity of the dye toward the calcium transporter was assayed by means of an isoelectric focusing separation of labeled proteins. The main radioactivity was detected on the range of acidic proteins, which is in good correspondence with the fraction that exerts maximal Ca^{2+} transport activity (not shown).

With the idea of obtaining the protein that binds $^{103}\text{Ru}_{360}$ with high selectivity, an "affinity" column was

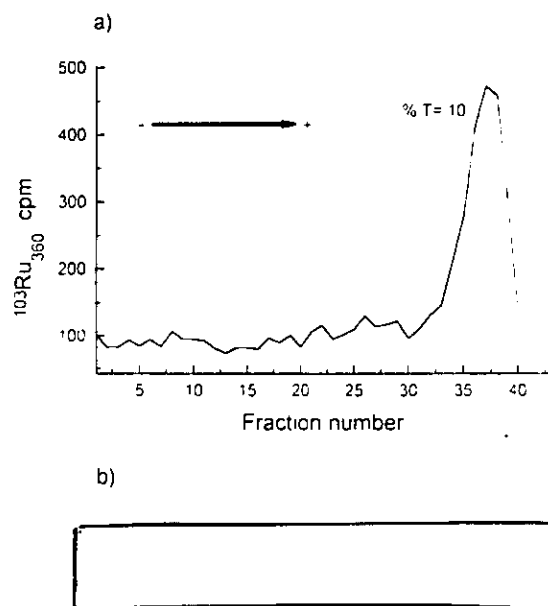


Fig. 7. (a) Radioactivity profile of SMP labeled with $^{103}\text{Ru}_{360}$, electrophoresed in a 12% SDS-polyacrylamide gel. Mitochondria ($150 \mu\text{g}$) or submitochondrial particles were labeled with $10 \text{ pmol/mg } ^{103}\text{Ru}_{360}$, centrifuged, and resuspended in 2% of SDS under nonreducing conditions. The radioactivity in each 2-mm slice of the gel was counted in a γ -counter. (b) Proteins, separated under the same conditions, were dried and exposed to a X-ray film for nearly 12 weeks.

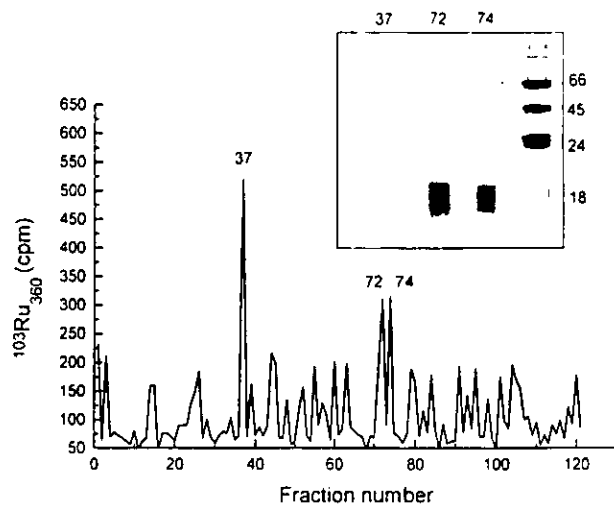


Fig. 8. Liquid-phase electroelution of submitochondrial particles labeled with 10 pmol/mg $^{103}\text{Ru}_{360}$. Submitochondrial particles were labeled as described in Fig. 5. Protein (2 mg) was resuspended in 2% SDS buffer and electrophoresed at constant power (12 W) until the dye front reached the end of the preparative 12% gel. The eluted fractions were recovered by increasing molecular weight order in 10 mM Tris, pH 7.0. The samples were concentrated and analyzed by silver stain in an analytical 12% SDS denaturing gel.

prepared by applying the assay for the separation of the ammonia complexes formed in the synthesis of ruthenium red and Ru_{360} . Solubilized membrane protein (20 mg) with 1% C_{12}E_8 or 1% CHAPS was incubated with 10 pmol/mg protein of $^{103}\text{Ru}_{360}$. The unbound inhibitor was eliminated by exhaustive dialysis against 0.2 M ammonium formate, pH 5.5. The labeled protein was loaded into a 15×5.5 cm CM-cellulose packed column in the presence of the same detergent concentration. After extensive washing with the same buffer, a linear gradient from 0.2 M to 1.0 M ammonium formate, pH 5.5, was applied. Figure 9 shows the radioactivity profile of the eluted proteins. Three peaks were resolved; one of them represents unbound $^{103}\text{Ru}_{360}$, which elutes at 0.4 M of the gradient. It has not associated proteins as evaluated in a silver-stained SDS-polyacrylamide gel. The remaining two fractions were also analyzed by electrophoresis. Both presented a 18-kDa protein associated with small contaminants, detected by silver stain. These fractions were pooled and reanalyzed by electrophoresis; the Coumassie-stained image is shown in Fig. 9 (insert).

DISCUSSION

Early attempts to purify the calcium uniporter included the isolation of factors that bind Ca^{2+} with

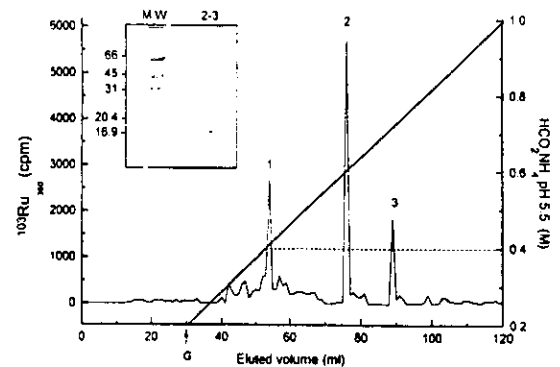


Fig. 9. Radioactivity profile of eluted submitochondrial proteins labeled with $^{103}\text{Ru}_{360}$ and separated by a linear ammonium formate gradient from a CM-cellulose matrix. Submitochondrial particles were labeled as described in Fig. 5. The pellet was solubilized in 1% C_{12}E_8 or 1% CHAPS and centrifuged at $100,000 \times g$ for 1 h. The supernatant was loaded onto a CM-cellulose column equilibrated with 0.2 M ammonium formate pH 5.5 and washed exhaustively with the same buffer. Where indicated, a linear gradient from 0.2 to 1.0 M was applied. In the insert a Coumassie-stained image of the proteins that retains the label is shown.

high affinity (Lenhinger, 1971; Gómez-Puyou *et al.*, 1972). The discovery by Moore (1971) that ruthenium red is a potent inhibitor of calcium uptake drove the search toward carbohydrate-containing components in mitochondria that possessed the ability to bind Ca^{2+} . A considerable effort has been expended toward the extraction of a mitochondrial glycoprotein with Ca^{2+} -binding or transport activity. The most extensively studied are a set of glycoproteins (33,000–42,000 kDa), which appear to be located in the intermembrane space and to be removed by hypotonic rupture of the outer membrane (Sottocasa *et al.*, 1971, 1972; Sandri *et al.*, 1976; Prestipino *et al.*, 1974). They bind calcium with both high and low affinity and this binding is inhibited by ruthenium red and lanthanides. The rate of calcium uptake is lowered in preparations from which the glycoprotein has been removed and is partially restored upon addition to the suspension. Antibodies to the glycoprotein significantly inhibit Ca^{2+} uptake. The lack of sensitivity of this protein to agents that dissipate the membrane potential generated by respiration and the fact that it was easily extracted by osmotic shock indicated that this protein was located in the intermembrane space or loosely bound to the membrane, so its role on the uptake mechanism was suggested as a superficial site of recognition for calcium.

Recently, Mironova and co-workers (1994) reported the purification of a low-molecular-weight peptide from rat liver mitochondria that formed selec-

tive channels. These channels were strongly inhibited by 1–4 μM ruthenium red. This observation led to that group to suggest that the channel is a constituent of the mitochondrial calcium uniporter.

In this paper, we describe a fractionation procedure for enriching calcium uniporter proteins from rat kidney submitochondrial particles. Important steps in our purification scheme were the enrichment of the fraction, obtained by salt precipitation, followed by liquid-phase isoelectrofocusing in the presence of a zwitterionic detergent and protective agents, such as glycerol. The data presented show that the calcium transporting fraction incorporated into liposomes exhibits properties that are distinctive features of the Ca^{2+} uniporter in mitochondria, such as the absolute requirement of a negative inner membrane potential that drives the accumulation of the cation and the inhibitor sensitivity.

Isolation of the mitochondrial proteins responsible for transport of cations across the inner membrane is an arduous task. With the exception of the uncoupling protein (Strieleman *et al.*, 1985; Casteilla *et al.*, 1990; Jezek, *et al.*, 1990), the mitochondrial cation transporting proteins have not been purified and their cDNAs have not been cloned. Other cation mitochondrial transporters, e.g., the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiporter, the K^+/H^+ exchanger, and the Na^+ -selective Na^+/H^+ antiporter, have been only partially purified and reconstituted (Li *et al.*, 1990, 1992; Garlid *et al.*, 1991).

The use of specific ligands, providing the means for the identification of a particular protein, is of special interest, since the isolation and reconstitution process would otherwise be a lengthy and tedious technical procedure. The inhibitor Ru_{360} has the characteristics of a satisfactory affinity ligand for purification of the uniporter. It has a very high affinity for the calcium uniporter, as the binding sites associated with the maximum inhibition rates correspond to 11 pmol/mg protein in whole mitochondria. The reported maximum specific binding for this compound is 7.5 pmol/mg protein (Ying *et al.*, 1991). The type of inhibition is noncompetitive with Ca^{2+} . Our results indicate that the protein that binds the oxo-bridged binuclear compound is related to the 18 kDa protein extracted from rat kidney mitochondria and reconstituted in cytochrome oxidase vesicles.

There are no reports concerning the affinity of this compound toward Ca^{2+} -binding glycoproteins, so we cannot discard the glycoside nature of the isolated protein. However, the fact that it is located in the inner mitochondrial membrane suggested that this protein

is different from the set of glycoproteins already mentioned.

It should be noted that under nondenaturing electrophoresis analysis, we found only one band from the isoelectrofocused fractions with Ca^{2+} transport activity; however, this preparation showed two subunits of 18 and 70 kDa in SDS-polyacrylamide electrophoresis. The subunit of 70 kDa is only detectable by silver stain; it may be a feature of the technique or a minor contaminant. We suggest that both could be part of a multicomponent system, in addition to a soluble recognition site located in the intermembrane space represented by the multicited glycoprotein. From our data, the arrangement of such a complex could only be speculated—it could resemble the structure of the Na^+ channel that consists of a single polypeptide chain with repeating units (Noda *et al.*, 1986). If the transporting protein is represented by the 70-kDa subunit, the role of the minor subunit would be only that of an inhibitor binding site.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by grant 0531PN from CONACyT.

REFERENCES

- Casteilla, L., Blondel, O., Klaus, S., Raimbault, S., Dioloz, P., Moreau, F., Boullaud, F., and Riquier, D. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 5124–5128.
- Chávez, E., Briones, R., Michel, B., Bravo, C., and Jay, D. (1985). *Arch. Biochem. Biophys.* **242**, 493–497.
- Davis, B. J. (1964). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**, 404–408.
- Garlid, K. D., Shariat-Madar, Z., Nath, S., and Jezek, P. (1991). *J. Biol. Chem.* **266**, 6518–6523.
- Gómez-Puyou, A., Tuena de Gómez Puyou, M., Becker, G., and Lenhinger, A. (1972). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **47**, 814–819.
- Gunter, T., and Pfeiffer, D. (1990). *Am. J. Physiol.* **27**, C755–C786.
- Hansford, R. (1988). *Adv. Exp. Med. Biol.* **232**, 230–243.
- Jezek, P., Mahdi, F., and Garlid, K. (1990). *J. Biol. Chem.* **265**, 10522–10526.
- Laemmli, U. (1979). *Nature* **277**, 680–685.
- Lee, C. P., and Ernster, J. (1965). In *Symposium on the Regulation of Metabolic Process in Mitochondria* (Tager, J., Papa, S., Quagliariello, E., and Slater, E., eds.), Vol. 7. Elsevier/North Holland, New York, pp. 218–234.
- Lenhinger, A. (1971). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **42**, 312–318.
- Li, X., Hegazy, M., Mahdi, F., Jezek, P., Lane, R., and Garlid, K. (1990). *J. Biol. Chem.* **265**, 15316–15332.
- Li, W., Shariat-Madar, A., Powers, M., Sun, X., Lane, R., and Garlid, K. (1992). *J. Biol. Chem.* **267**, 17983–17989.
- McCormack, J., and Denton, R. (1989). *Mol. Cell. Biochem.* **89**, 121–125.

- Mironova, G., Baumann, M., Kolomythin, O., Krasichkova, Z., Berdimuratov, A., Sirota, T., Virtanen, I., and Saris, N. (1994). *J. Bioenerg. Biomembr.* **26**, 231-238.
- Moore, C. (1971). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **43**, 293-305.
- Nakamura, J., Wang, T., and Tsai, L. (1983). *J. Biol. Chem.* **258**, 5079-5083.
- Noda, M., Ikeda, T., Kayono, T., Suzuki, H., Takeshima, H., Kurasaki, M., Takahashi, H., and Numa, S. (1986). *Nature* **320**, 188-191.
- Prestipino, G., Ceccarelli, D., Conti, F., and Carafoli, E. (1974). *FEBS Lett.* **45**, 99-103.
- Ramírez, J., Calahorra, M., and Peña, A. (1987). *Anal. Biochem.* **163**, 100-107.
- Reed, K., and Bygrave, F. (1974). *Biochem. J.* **140**, 143-155.
- Rosier, R., Gunter, T., Tucker, D., and Gunter, K. (1979). *Anal. Biochem.* **96**, 384-390.
- Sandri, G., Panfili, E., and Sottocasa, G. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **68**, 1272-1279.
- Saris, N., Sirota, T., Virtanen, I., Niva, K., Penttilä, T., Dolgahova, L., and Mironova, G. (1993). *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**, 305-312.
- Sottocasa, G., Sandri, G., Panfili, E., and de Bernard, B. (1971). *FEBS Lett.* **17**, 100-105.
- Sottocasa, G., Sandri, G., Panfili, E., de Bernard, B., Gazzoti, P., Vasington, F., and Carafoli, E. (1972). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **47**, 808-813.
- Strieleman, P., Schalisnke, K., and Shrago, E. (1985). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **127**, 509-516.
- Ying, W., Emerson, J., Clarke, M., and Sanadi, R. (1991). *Biochemistry* **30**, 4949-4952.
- Zazueta, C., Holguín, J., and Ramírez, J. (1991). *J. Bioenerg. Biomembr.* **23**, 1889-1902.
- Zazueta, C., Massó, F., Páez, A., Bravo, C., Vega, A., Montaño, L., Vázquez, M., Ramírez, J., and Chávez, E. (1994). *J. Bioenerg. Biomembr.* **26**, 555-562.

Inhibitory Properties of Ruthenium Amine Complexes on Mitochondrial Calcium Uptake¹

Cecilia Zazueta,^{2,4} Martha E. Sosa-Torres,³ Francisco Correa,² and Ariadna Garza-Ortiz³

Received April 24, 1999; accepted August 16, 1999

The recent finding that the inhibition of Ca^{2+} -stimulated respiration by ruthenium red is mainly due to a binuclear ruthenium complex (Ru_{360}) present in the commercial samples of the classical inhibitor ruthenium red (Ying *et al.*, 1991), showed that this complex is the more potent and specific inhibitor of the mitochondrial calcium uniporter. This work was aimed to provide insights into the mechanism by which Ru_{360} and other ruthenium-related compounds inhibit calcium uptake. Ruthenium red and a synthesized analog (Rrphen) were compared with Ru_{360} . The inhibition by this binuclear complex was noncompetitive, with a K_i of 9.89 nM. The number of specific binding sites for Ru_{360} was 6.2 pmol/mg protein. Ruthenium red and Ru_{360} were mutually exclusive inhibitors. Bound La^{3+} was not displaced by Ru_{360} . Rrphen was the least effective for inhibiting calcium uptake. The results support the notion of a specific binding site in the uniporter for the polycationic complexes and a negative charged region from the phospholipids in the membrane, closely associated with the uniporter inhibitor-binding site.

KEY WORDS: Calcium uniporter inhibitors; mitochondria.

INTRODUCTION

Cyclic accumulation and release of calcium occur through the action of the Ca^{2+} uniporter and the opposing transporters; thus, the $[\text{Ca}^{2+}]_m$ is strictly regulated. The matrix calcium concentration is thought to participate in the control of NADH production by the TCA cycle and, hence, in the regulation of the ATP synthesis by mitochondria (McCormack *et al.*, 1990; Hansford, 1994). It is claimed that matrix calcium concentration also exerts control in the rate of ATP synthesis by acting on the electron transport (McCormack *et al.*, 1990; Panov and Scaduto, 1995), on the adenine nucleotide translocase (Moreno-Sánchez, 1985; Halestrap,

1987), and over the ATPase per se (Yamada and Huzel, 1988; Panov and Scaduto, 1995).

In recent studies, there has been growing evidence that the mitochondrial calcium cycle participates in regulation of cellular Ca^{2+} levels by signaling mechanisms, under physiological conditions. It has been shown that engineered cell lines that express aequorin in mitochondria accumulate calcium in these organelles from an intracellular domain of high calcium concentration (Rizzuto *et al.*, 1993). Other reports indicate that in neurons, mitochondrial Ca^{2+} transport is quantitatively important in regulating the cytoplasmic as well as the matrix Ca^{2+} concentration (White and Reynolds, 1995). Recognition that the mitochondrial calcium cycle plays an important role in physiological processes has renewed interest in the study of the physical properties of the transporters involved.

Much of the information cited above is based on the specificity of inhibitors of mitochondrial calcium uptake, e.g., ruthenium red. Ying *et al.* (1991) purified a compound present in commercial samples of ruthenium red, which was identified as an oxo-bridged binuclear amino complex, which inhibited Ca^{2+} -stimulated respira-

¹ Key to abbreviations: Rrphen, ruthenium red with phenanthroline substituents; Ru_{360} , binuclear ruthenium complex; rr, ruthenium red.

² Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, I. C., Mexico, 014080, D.F.

³ Departamento de Química Inorgánica y Nuclear, DEPg, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria 04510, México, D.F.

⁴ Author to whom correspondence should be sent.

tion with higher potency than ruthenium red itself. Besides the recent report of Matlib *et al.* (1998), the effect of Ru₃₆₀ on calcium uptake in mitochondria has not been yet determined. The present work was conducted to determine a possible mechanism of action of the polycationic inhibitors of mitochondrial calcium uptake by comparing the effectiveness and sites of action of Ru₃₆₀ with ruthenium red. An analog with bulky phenanthroline substituents (Rrphen) was synthesized and its potency assayed to define the requirements of a basic structure for the calcium uniporter inhibitors.

EXPERIMENTAL.

The synthesis of Ru₃₆₀ was as described by Ying *et al.* (1991), by the reaction of RuCl₃ with ammonium hydroxide; the separation of the formed complexes was achieved by cation-exchange chromatography. The purified preparation was slightly yellowish and exhibited a single λ_{\max} at 360 nm in ammonium formate. The radioactive complex ¹⁰³Ru₃₆₀ was obtained from ¹⁰³RuCl₃ by the same method. Commercial ruthenium red was purified by the technique described by Luft (1971). This preparation was not contaminated with Ru₃₆₀. A single absorption peak at 533 nm was observed with distilled water.

The related compound with phenanthroline substituents was synthesized by using ruthenium red, 1,10-phenanthroline monohydrate and ammonium hexafluorophosphate.

Rrphen

Ruthenium red (0.6032g) was dissolved in distilled water (15 ml) and the solution filtered; the solid material was discarded. To this a solution, 4.5 g of 1,10-phenanthroline monohydrate in methanol (30 ml) was added. This solution was stirred for 24 h under nitrogen; the solution was kept at 45°C for another 6 h. When the solution cooled down, the solvent was evaporated into a high vacuum line until the remaining volume was about 15 ml. To this, an aqueous solution of 0.75 g of hexafluorophosphate ammonium salt was added in order to precipitate the complex. The solid formed was filtered under nitrogen and washed with abundant ethanol until the washings were colorless. The solid was further washed with ethanol (500 ml) in order to ensure the removal of any remaining free phenanthroline.

The product was allowed to dry under vacuum and nitrogen atmosphere. Elemental analysis found: C, 48.41; N, 13.64; and H 3.61%; C₉₆Cl₄F₁₂H₈₂N₂₂O₂-P₂Ru₃ requires C, 49.9; N, 13.34, and H, 3.58%.

Infrared spectra were recorded from KBr pellets of the complex with a Perkin Elmer 599 B spectrophotometer in the range 4000–450 cm⁻¹. Electronic spectra were measured with a Hewlett Packard 8452 Diode Array spectrophotometer. [¹H], [¹³C], [³¹P], and [¹⁹F] NMR spectrometry were obtained in dimethyl-*d*₆ sulfoxide solutions using a Varian NMR Unity plus 500 spectrometer.

Mitochondria from rat kidney were prepared by differential centrifugation as described by Chávez *et al.* (1985). The last wash was carried out in a medium containing 0.1% bovine serum albumin in 250 mM sucrose and 10 mM Tris, pH 7.3. The final pellet was suspended in the same medium without albumin. Protein concentration was determined by the Biuret method using bovine serum albumin as a standard. The samples were solubilized with deoxycholate, which was present at a final concentration of 1% by weight.

Calcium uptake was measured using ⁴⁵CaCl₂ (specific activity, 1000 cpm/nmol) following the filtration technique through Millipore filters of 0.45- μ m pore diameter, at the indicated time. The assay medium contained 125 mM KCl, 10 mM HEPES, 10 mM succinate, 200 μ M ADP, 10 μ g rotenone, 2 mM Pi, and 50 μ M ⁴⁵CaCl₂, pH 7.3. Ru₃₆₀ or the related compounds at the desired concentration, were added before Ca²⁺ uptake was initiated by the addition of 1 mg of mitochondrial protein. Binding experiments were carried out with isolated mitochondria (1 mg) incubated at 25°C in 6 ml of medium containing 125 mM KCl, 10 mM succinate, and 10 mM HEPES, pH 7.3, and 2–30 nM ¹⁰³Ru₃₆₀. After 10 min of incubation, the samples were centrifuged at 20,000 \times *g* for 10 min and the supernatant discarded. The pellet was resuspended in the same buffer and centrifuged again at 20,000 \times *g* for 10 min. The pellet was resuspended in the wash medium with 10 μ M of unlabeled Ru₃₆₀, and incubated for 1 min to eliminate nonspecific binding of the inhibitor. After a final centrifugation, the pellet was resuspended in a small volume of medium, transferred into a test tube, and its radioactivity content measured in a gamma counter.

RESULTS AND DISCUSSION

The structures of ruthenium red, Ru₃₆₀, and the synthesized analog are shown in Fig. 1. A 16 μ M

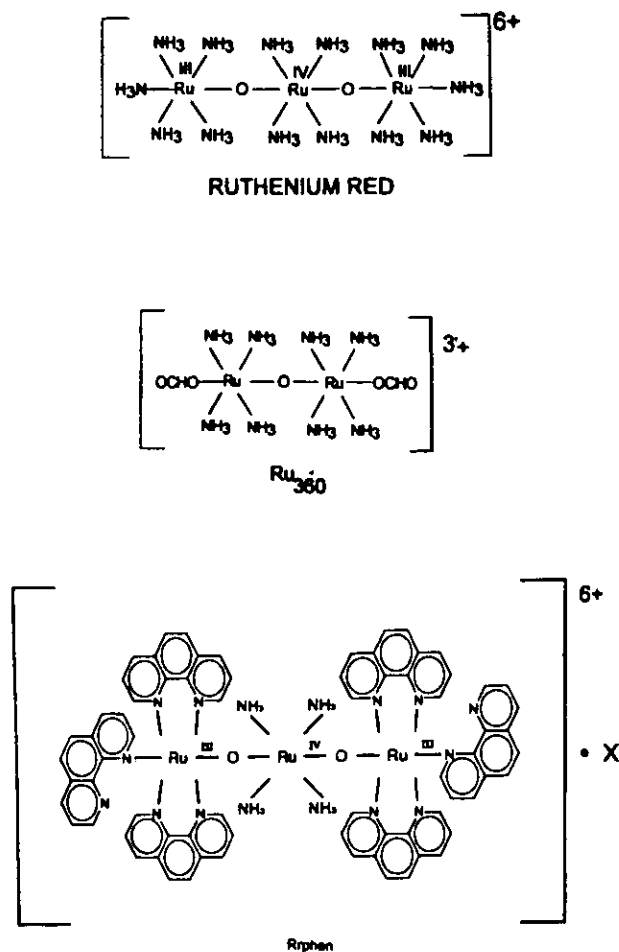


Fig. 1. The structures of ruthenium red and Ru_{360} (from Carrondo *et al.*, 1980 and Ying *et al.*, 1990, respectively). A possible arrangement of the phenanthrolines in the compound Rrphen is also shown.

solution of Ru_{360} exhibits an absorbance maximum at 360 nm, with no detectable absorbance at 533 nm, indicating that there is no contamination with ruthenium red. The spectrum of purified ruthenium red is also free of absorbance at 360 nm. Both compounds were free of cross contamination and were used to inhibit energized calcium uptake. The purified ruthenium red complex inhibited with a K_i similar to that reported by Reed and Bygrave (1974) (30 nM; data not shown).

The [^1H] NMR spectra at 297 K of Rrphen shows the same pattern found for the free phenanthroline. However, in our complex, the peaks are shifted downfield, indicating that the phenanthroline ligands are coordinated. Since we liked to confirm that the hexafluorophosphate counterion had not suffered any redox reaction, a ^{31}P and a ^{19}F resonance spectra were

recorded. The results confirm that the PF_6 counterion remains unchanged. The visible spectrum for Rrphen shows a main peak at 534 nm, assigned to the charge transfer electronic transitions. In the UV region, strong signals appear, which correspond to phenanthroline. The infrared spectrum of KBr pellet of the Rrphen complex in the range 4000–450 cm^{-1} shows bands at 3300–3100, 1620, and 1296, which correspond to the N–H group. The bands of the phenanthroline appears slightly shifted, confirming their coordination (not shown).

The potency of the binuclear complex Ru_{360} was assayed in energized mitochondria, under the conditions described. The uniporter had a very high affinity for the inhibitor; the K_i obtained was 7.68 nM as we previously reported (Zazueta *et al.*, 1990) and the inhibitor was considered tightly bound. Therefore, the analysis was made by the Dixon graphical method (Segel, 1993) for this type of inhibitors (Fig. 2). The K_i obtained was 9.89 nM and the concentration of the inhibitor that is bound to the uniporter was calculated

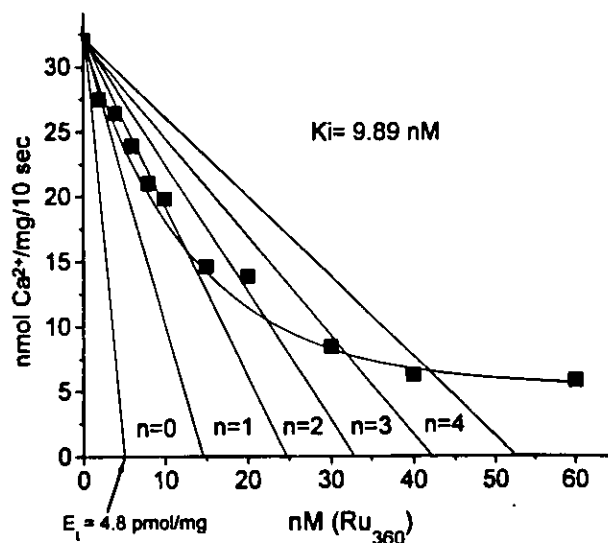


Fig. 2. Dixon graphical plot for tightly bound inhibitors. Calcium uptake was inhibited in the presence of different concentrations of Ru_{360} under the conditions described in the experimental section (■). A set of lines were drawn on the experimental data from v_0 to the $[I]$ axis, in such a way that each line intersects the experimental curve at $v_0/2$, $v_0/3$, $v_0/4$, and so on. This represent a 1/2, 1/3, and 1/4 of the activity. The distance between the intercepts on the $[I]$ axis gives K_i directly. The line drawn from v_0 to the $[I]$ axis two K_i s distance from the left of 1/2 v_0 , represents the $[I]_0$ of the total concentration inhibitor. Finally the distance between this line and the y axis is the $[E]_i$, where a significant proportion of the inhibitor is bound. $[I]_0$ = Total free inhibitor concentration. $[E]_i$ = Total enzyme concentration.

as 4.8 pmol/mg protein. These results are slightly different from those reported recently by Matlib *et al.* (1998) for a compound identified as Ru₃₆₀. They reported an IC_{50%} of 0.184 nM and a maximum binding of 80 fmol/mg of protein with a dissociation constant of 0.34 nM in isolated rat heart mitochondria, measuring calcium movements spectrophotometrically with arsenazo III. Indeed, the compound analyzed in this work exhibited more potency than pure ruthenium red.

The binding of ¹⁰³Ru₃₆₀ was also determined by adding the inhibitor directly to mitochondria in 125 mM KCl, 10 mM TRIS, pH 7.3, as described in the experimental section. The binding curve was hyperbolic and appeared to be a saturable function above 20 nM (Fig. 3a). Specific binding determined by a Scatchard plot gave a value for B_{max} of 6.2 pmol/mg mitochondrial protein; the K_d was 16.5 nM (Fig. 3 insert). The relation between binding of the binuclear ruthenium ammonium complex and inhibition of calcium uptake showed a clear correspondence.

The large variety of ruthenium amino compounds, obtained by ammoniacal reaction mixture from which ruthenium red is synthesized, raised the question as to whether all complexes are inhibitors of the calcium uniporter. Although they are structurally related, the inhibitory potency between the hexacationic ruthenium red and the lesser cationic charged Ru₃₆₀ is almost 25-fold. The potencies of the remaining complexes have been already analyzed (Reed and Bygrave, 1974). The experiment shown in Fig. 4, was conducted to define the competitive behavior between ruthenium red and

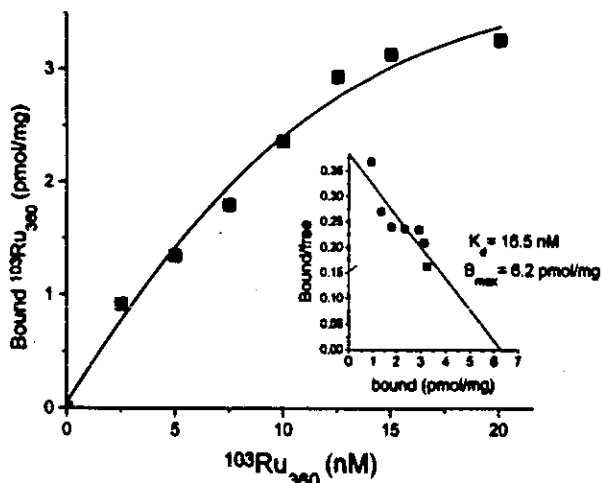


Fig. 3. Equilibrium binding of ¹⁰³Ru₃₆₀ in rat kidney mitochondria. The insert shows the Scatchard plot of the specific binding of ¹⁰³Ru₃₆₀. The conditions were as described in the experimental section.

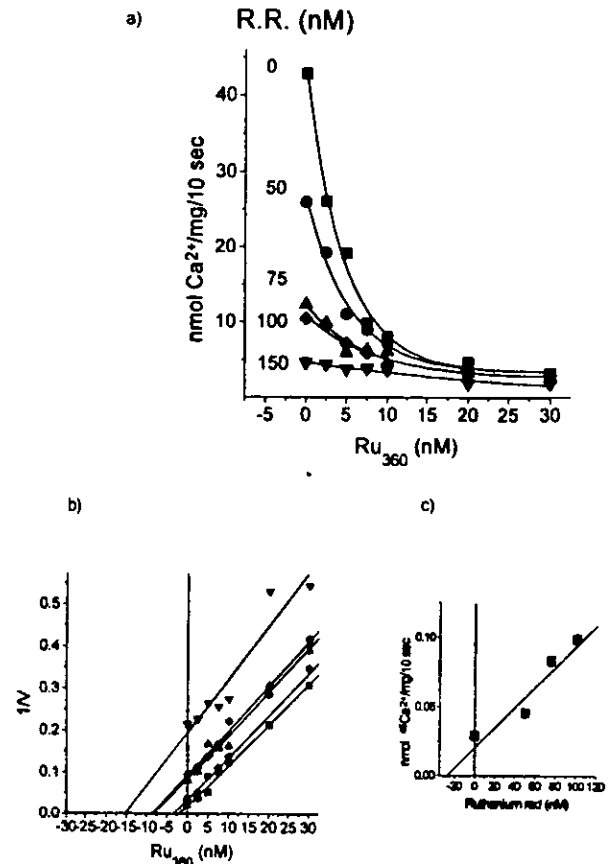


Fig. 4. Inhibition of mitochondrial calcium uptake by Ru₃₆₀ in the presence of ruthenium red. (a) Inhibition of Ru₃₆₀ in the presence of increasing concentrations of ruthenium red at a fixed Ca²⁺ concentration. (b) Dixon plot for the inhibition values (■, 0 ruthenium red; ●, 50 μM ruthenium red; ▲, 75 μM ruthenium red; ◆, 100 μM ruthenium red; and ▼, 150 μM ruthenium red). (c) Dixon graphic replot of the data without Ru₃₆₀ renders the K_i for ruthenium red. Calcium uptake determinations were made by using ⁴⁵CaCl₂, as described.

Ru₃₆₀ for the uniporter binding sites. The inhibition by Ru₃₆₀ in presence of different fixed concentrations of ruthenium red is shown in Fig. 4a. The mutual exclusivity of Ru₃₆₀ and ruthenium red is evident from the Dixon plots of 1/V versus the concentration of the binuclear complex at a fixed 50 μM calcium concentration and different fixed concentrations of ruthenium red (Fig. 4b). The slopes of the plots are independent of the concentration of the fixed (ruthenium red) inhibitor. The family of curves are parallel and the intercepts on the 1/V axis represent the inhibition of ruthenium red at different concentrations. The replot of these values against the fixed ruthenium red concentrations, represents the usual Dixon plot for this inhibitor. The K_i obtained was 25 nM (Fig. 4c). The pure noncompetitive

character of both inhibitors is demonstrated in this figure: Dixon plots from partial and most mixed non-competitive inhibitors are curved. When the complex enzyme-substrate-inhibitor is not catalytically active, the plot is linear. The addition of Ru_{360} to the system did not promote a synergistic effect on the inhibition. The same occurred when the fixed inhibitor was Ru_{360} versus different concentrations of ruthenium red (not shown).

It has been reported that ruthenium red binds to the so-called "low-affinity" calcium-binding sites that lanthanum (a competitive inhibitor of the calcium uniporter) can also occupy. These sites are presumably phospholipids. Voelker and Smetjck (1996) demonstrated that ruthenium red behaves in a diffuse double layer as an ion with an effective valence < 6 and has a very high affinity for phosphatidylserine-containing membranes. Does Ru_{360} compete with lanthanum for this low-affinity calcium-binding site?

A competition assay was performed to determine if Ru_{360} behaves as ruthenium red, in the presence of lanthanum. The addition of lanthanum to a fixed concentration of Ru_{360} promoted a larger inhibition than of the polynuclear complex by itself (Fig. 5a). The Dixon plot (Fig. 5b) shows that the high-affinity binding sites for La^{3+} , with a K_i of 100 nM were not modified when the oxo-bridged binuclear complex was present in the incubation medium; as expected only the low-affinity binding sites were modified in presence of Ru_{360} . The conclusion that could be drawn is that Ru_{360} displaces La^{3+} from the nonspecific phospholipid sites, but not from the calcium carrier binding sites.

The amine complexes of trivalent cobalt are similar in many respects to ruthenium complexes. Tash-

mukhamedov *et al.* (1972) have reported that hexamine cobalt chloride $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ inhibits mitochondrial calcium transport. This complex cation was reported to react with the negatively charged sites of sulfate-containing glycosaminoglycan and is used for determining the total amount of their anionic groups. The half-maximum inhibition observed was 3×10^{-5} M and this represents one order of magnitude higher than the inhibition exerted by ruthenium red.

In an aqueous environment, ruthenium red is present as an hexavalent cation (Carrondo *et al.* 1980), which due to its highly positive charge, is expected to be very responsive to negative charges on proteins, lipid membranes, and cation carriers. The possibility of electrostatically mediated action of ruthenium red in biomembranes in relation to its adsorption to negatively charged lipids has already been discussed in the literature. Missiaen *et al.* (1990) proposed that the inhibition of the Ca^{2+} pump in the plasma membrane by ruthenium red is due to an electrostatic origin mediated by the neutralization of negatively charged phospholipids by adsorbed ruthenium red cations.

To define the requirement of a basic structure for the calcium uniporter inhibitors and to discard a pure electrostatic mechanism, the potency of an analog of the polynuclear complexes was assayed. The compound possesses the essentially linear backbone N-Ru-O-Ru-O-Ru-N formed from three coordinated ruthenium, however, some of the amino groups are substituted by phenanthrolines groups. The net charge of the compound is +6. It inhibits calcium uptake with a K_i of approximately 0.3 μM (not shown). This represents about tenfold the K_i reported for ruthenium red and thirty-fivefold the K_i obtained for Ru_{360} . This complex forms a very voluminous compound that presumably cannot fit adequately in the conformed space that is occupied by the almost cylindrical ruthenium red molecule (Carrondo *et al.*, 1980). Ru_{360} has the same linear backbone N-Ru-O-Ru-N and each ruthenium atom is positively charged with the remaining charge delocalized between the Ru-O-Ru bridge (Matlib *et al.*, 1998). A possible model in Fig. 6, is proposed to explain the inhibitory properties of ruthenium amino complexes. The uniporter molecule has been considered to be a fast "gated" pore (Sparagna *et al.*, 1995; Litsky and Pfeiffer, 1997) with a recognition binding site for calcium, located near the cytoplasmic side of the membrane (Fig. 6a). The inhibitors described did not compete with calcium for the high-affinity sites related to the transporter, but they did so to the low-affinity sites for calcium, represented by acidic phospholipids.

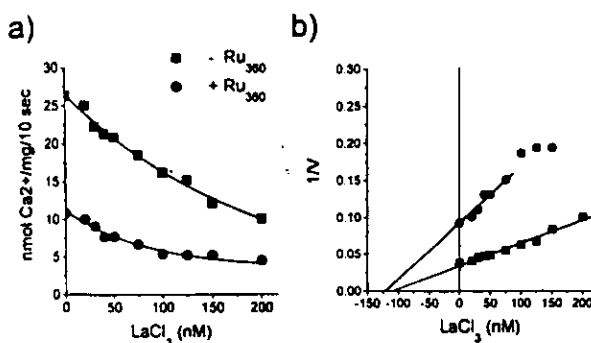


Fig. 5. Inhibition of calcium uptake by Ru_{360} in the presence of lanthanum. Calcium movement was determined as described in the experimental section. The medium contained 125 mM KCl, 10 mM HEPES, 10 mM succinate, 200 μM ADP, 10 μg rotenone, 40 nM Ru_{360} , and 50 μM $^{45}\text{CaCl}_2$. Phosphate was not added to the medium. ■, Without Ru_{360} ; ●, plus 40 nM Ru_{360} .

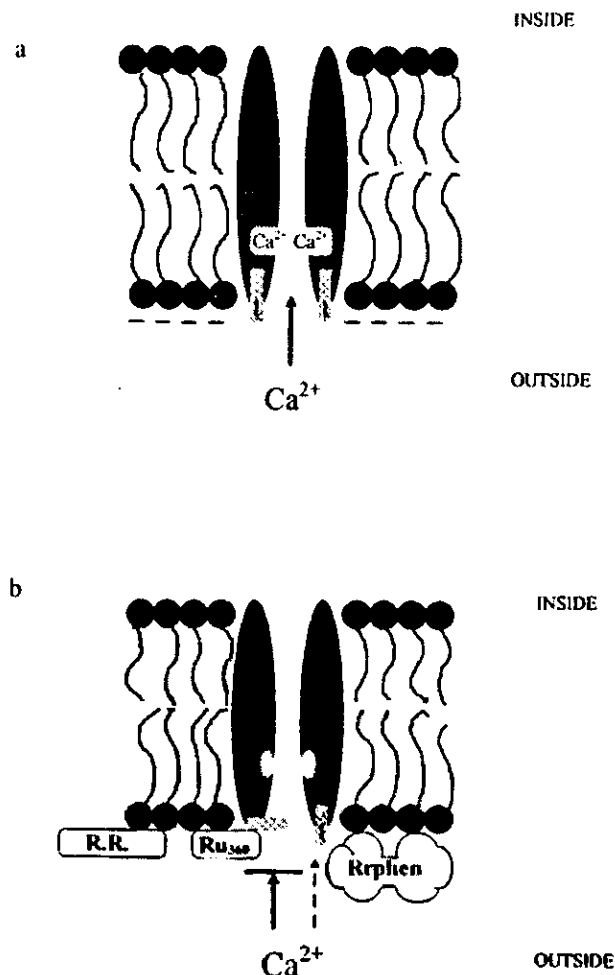


Fig. 6. Proposed model to explain the inhibitory properties of the polycationic ruthenium complexes described. (a) The uniporter molecule embedded in the membrane with two sites for calcium binding and a negatively charged density region, facing the outside of the inner membrane. (b) The polycationic complexes present different ability to fit this negatively charged density region. The 0.8 nm molecule of Ru₃₆₀ binds to this site and exerts a conformational change that modifies the recognition site for calcium; this compound also binds to the phospholipids, so it could be anchored to the membrane as well as to the uniporter-binding site. The 1.2 nm length ruthenium red possesses a higher affinity for acidic phospholipids, because of its hexacationic charge, but it could, indeed, fit in the uniporter-binding site. Finally, the bulky phenanthroline analog exerts low inhibition on calcium uptake, perhaps for its inability to promote a direct conformational change on the uniporter, but instead modifies the low-affinity binding sites for calcium at the phospholipid level.

The uniporter is a cooperative mechanism in which calcium binding to an activation site increases the rate of transport. The high specificity for ruthenium red and Ru₃₆₀ suggests that the uniporter cytoplasmic side possesses a highly negatively charged density region,

where the cylindrical complexes bind and promote a conformational change that modifies the calcium activation site in such a way that the uptake would not be activated. The fact that both compounds are mutually exclusive and that Ru₃₆₀, as well as ruthenium red, displace lanthanum from the low Ca^{2+} -binding sites, supports the notion of the presence of a specific binding site in the uniporter and negative charges from phospholipids in the membrane. Ruthenium red can be regarded as a charged cylinder 1.2 nm long (Carrondo *et al.*, 1980) or as a linear array of three charges separated by 0.6 nm. The bridging Ru-O bond lengths and the Ru-N distances estimated on the basis of the X-ray structure of Ru₃₆₀ Ying (*et al.*, 1991) reveal a cationic complex of approximately 0.8 nm of a cylindrical shape. In Fig. 6b, it is proposed that both complexes could be anchored to negative phospholipids closely associated with the uniporter inhibitor-binding site, in such a way that an adequate fitting to the carrier modifies the structure of the calcium channel. The lower affinity for ruthenium red could be explained in terms of its more positive charge that makes the complex very responsive to unspecific negative charges on proteins and lipid membranes. As the concentration of ruthenium red increased, unspecific screening to negative charges of the membrane diminished. The behavior of the ruthenium analog is explained on the basis of its bulky and more hydrophobic structure. Adsorption of ions to lipid membranes has been reviewed recently by Tatulian (1994). The low inhibitory potency of this complex could be related to their adsorption to the lipidic environment, as well to their steric inability to modify the Ca^{2+} -activation binding site.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by Grant 28666N from CONACyT.

REFERENCES

- Carrondo, M., Griffith, W., Hall, J., and Skalski, A. (1980). *Biochim. Biophys. Acta* **627**, 332–334.
- Chávez, E., Briones, R., Michel, B., Bravo, C., and Jay, D. (1985). *Arch. Biochem. Biophys.* **242**, 493–497.
- Gibson, J., Poole, R., Hughes, M., and Rees, J. (1982). *J. Gen. Microbiol.* **128**, 2211–2214.
- Halestrap, A. P. (1987). *Biochem. J.* **244**, 159–164.
- Hansford, R. (1994). *J. Bioenerg. Biomembr.* **26**, 495–508.
- Litsky, M., and Pfeiffer, D. (1997). *Biochemistry* **38**, 7071–7080.

- Luft, J. H. (1971). *Anat. Rec.* **171**, 347–368.
- Matlib, M., Zhou, Z., Knight, S., Ahmed, S., Choi, K., Krause-Bauer, J., Phillips, R., Altschuld, R., Katsube, Y., Sperelakis, N., and Bers, D. (1998). *J. Biol. Chem.* **273**, 10223–10231.
- McCormack, J., Halestrap, A., and Denton, R. (1990). *Physiol. Rev.* **70**, 391–425.
- Missiaen, L., DeSmedt, H., Droogmans, F., Wuytack, F., Racymackers, L., and Casteels, R. (1990). *Biochim. Biophys. Acta* **1023**, 449–454.
- Moreno-Sánchez, R. (1985). *J. Biol. Chem.* **260**, 4028–4034.
- Panov, A., and Scaduto, R. C., Jr. (1995). *Arch. Biochem. Biophys.* **316**, 815–820.
- Reed, K., and Bygrave, F. (1974). *Biochem. J.* **140**, 143–155.
- Rizzuto, R., Brini, M., Murgía, M., and Pozzan, T. (1993). *Science* **262**, 744–747.
- Segel, I. *Enzyme Kinetics*, Wiley (Interscience), New York, 1993, p. 947.
- Sparagna, G., Gunter, K., Shen, S., and Gunter, T. (1995). *J. Biol. Chem.* **270**, 27510–27515.
- Tashmukhamedov, G., Gagelgans, A., Mamatkulov, Kh., and Makhmudova, E. (1972). *FEBS Lett.* **28**, 239–242.
- Tatulian, S. (1994). *J. Phys. Chem.* **98**, 4963–4965.
- Voelker, D., and Smejtek, P. (1996). *Biophys. J.* **70**, 818–830.
- White, R., and Reynolds, I. (1995). *J. Neurosci.* **15**, 1318–1328.
- Yamada, E., and Huzel, N. (1988). *J. Biol. Chem.* **263**, 11498–11503.
- Ying, W., Emerson, J., Clarke, M., and Sanadi, R. (1991). *Biochemistry* **30**, 4949–4952.
- Zazueta, C., Zafra, G., Vera, G., Sánchez, C., and Chávez, E. (1998). *J. Bioenerg. Biomembr.* **30**, 489–498.