

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Organización y función de las subunidades de ATPasa
Translocadora de protones (F1 - ATPasa) de micrococcus
lysodeikticus : estudio inmunológico y bioquímico**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Faustino Mollinedo García

DIRECTOR:

Vicente Emilio Larraga Rodríguez de Vera

Madrid, 2015

7P
1984
220

Faustino Mollinedo García



* 5 3 0 9 8 6 7 3 4 8 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

x-53-112954-2

ORGANIZACION Y FUNCION DE LAS SUBUNIDADES
DE LA ATPasa TRANSLOCADORA DE PROTONES (F₁- ATPasa)
DE MICROCOCCUS LYSODEIKTICUS
ESTUDIO INMUNOLOGICO Y BIOQUIMICO

Departamento de Bioquímica
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Complutense de Madrid

1984



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº 220/84

© Faustino Mollinedo García
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1984
Xerox 9200 XB 430
Depósito Legal: M-31.423-1984

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE QUIMICA

ORGANIZACION Y FUNCION DE LAS SUBUNIDADES DE LA ATPasa TRANSLOCADORA DE PROTONES (F_1 -ATPasa) DE MICROCOCCUS LYSODEIKTICUS. ESTUDIO INMUNOLOGICO Y BIOQUIMICO.

MEMORIA

que para optar al grado de
Doctor en Ciencias Químicas

presenta

FAUSTINO MOLLINEDO GARCIA

MADRID, 1981

El presente trabajo ha sido realizado en la Unidad de Biomembranas del Instituto de Inmunología y Biología Microbiana (C.S.I. C.) bajo la supervisión del Dr. Emilio Muñoz y del Dr. Vicente Larraga, a quienes expreso mi agradecimiento por su valiosa ayuda y por las facilidades recibidas durante la realización de este trabajo.

Un especial agradecimiento dirijo al Dr. Emilio Muñoz tanto por su provechosa discusión de los resultados como por el ejemplo que con su entusiasmo y dedicación constante a la investigación nos ofrece a todos.

Asimismo expreso mi agradecimiento al Dr. Esteban Santiago y a la Dra. Natalia López-Moratalla, del departamento de Bioqímica de la Universidad de Navarra, por su colaboración en los análisis de metales así como por permitirme realizar algunos experimentos en su laboratorio.

También agradezco al Sr. Rafael Bragado, del departamento de Inmunología de la Fundación Jimenez Díaz, la colaboración prestada en la realización de los análisis de aminoácidos.

Igualmente agradezco al Prof. Dr. Angel Martin Municio tanto el haber aceptado la ponencia de esta tesis como su importante papel en mi formación bioquímica.

Asimismo agradezco a la Srta. Josefa Toribio por haberme ayudado en la transcripción de este trabajo a máquina.

Este trabajo se ha realizado mediante una beca predoctoral del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

ABREVIATURAS

ADP	adenosín difosfato.
AMP-PNP	adenilil β - γ imidodifosfato.
ATP	adenosín trifosfato.
ϵ -ATP	1-N ⁶ -etenoadenosín-5'-trifosfato.
BF ₁	factor de acoplamiento 1 de fosforilación o F ₁ -ATPasa de bacterias.
bisacrilamida	N,N'-metilen-bisacrilamida.
butil-PBD	2-(4' butilfenil)-5-(4'' bifenil)-1,3,4-oxadiazol.
CF ₁	factor de acoplamiento 1 de fosforilación o F ₁ -ATPasa de cloroplastos.
CTP	citidín trifosfato.
D	dalton.
DCCD	N,N'-díciclohexilcarbodiimida.
DTT	ditiotreitól.
ECF ₁	factor de acoplamiento 1 de fosforilación o F ₁ -ATPasa de <u>Escherichia coli</u> .
EEDQ	1-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2 dihidroquinoleína.
EDTA	ácido etilen diamino tetraacético.
F ₀	parte hidrofóbica insertada en la membrana del complejo de ATPasa, siendo el responsable de la inhibición por oligomicina del complejo de ATPasa mitocondrial.
F ₁	factor de acoplamiento 1 de fosforilación o F ₁ -ATPasa en sentido genérico. factor de acoplamiento 1 de fosforilación o F ₁ -ATPasa mitocondrial.

F_1 -ATPasa	parte hidrosoluble del complejo de ATPasa o factor de acoplamiento 1 de fosforilación.
$(F_0.F_1)$ ATPasa	complejo de ATPasa.
GTP	guanosín trifosfato.
H^+ -ATPasa	complejo de ATPasa.
ITP	inosín trifosfato.
NBD-Cl	7-cloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3 diazol.
NDP	nucleosido difosfato.
NTP	nucleosido trifosfato.
p/v	relación peso volumen.
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida.
PAS	ácido peryódico - reactivo de Schiff.
pCMB	p-cloro-mercuribenzoato.
P_i	fosfato inorgánico.
p.m.	peso molecular.
PMSF	inhibidor de proteasas de serina (fenil-metil-sulfonil fluoruro).
SDS	dodecil sulfato sódico.
TEMED	N,N,N',N' tetrametilendiamina.
TF_1	factor de acoplamiento 1 de fosforilación o F_1 -ATPasa de bacteria termófila PS_3 .
Tris	trishidroximetil-aminometano.
UTP	uridín trifosfato.
v/v	relación volumen volumen.

INDICE

	<u>Página</u>
1. INTRODUCCION.....	1
1.1. <u>Características y organización de las proteínas de membrana</u>	2
1.2. <u>Las membranas biológicas como transductoras de energía</u>	10
1.3. <u>Aspectos evolutivos en el acoplamiento bioenergético</u>	15
1.4. <u>Diferentes denominaciones para un mismo sistema enzimático</u>	19
1.5. <u>El complejo de ATPasa como un complejo multifuncional</u>	23
1.6. <u>Posibles modelos para la multifuncionalidad de los complejos de ATPasa</u>	26
1.7. <u>Factores F_1 de acoplamiento</u>	28
1.7.1. Aislamiento y purificación.....	28
1.7.2. Peso molecular, forma y microheterogeneidad de la enzima purificada.....	33
1.7.3. Subestructura molecular. Subunidades, estequiometría y papel de las mismas.....	37
1.7.4. Composición química.....	42
1.7.5. Latencia.....	44
1.7.6. Propiedades catalíticas del factor F_1	45
1.7.6.1. Sustrato, requerimientos iónicos y parámetros cinéticos.....	45
1.7.6.2. Actividad en ausencia de iones metálicos.....	47
1.7.6.3. Especificidad para nucleosidos trifostato.....	48
1.7.6.4. Grupos funcionales del sitio activo.....	48
1.7.7. Inhibidores y activadores de la actividad hidrolítica	

de los factores F_1	50
1.7.7.1. Nucleótidos de adenina y análogos.....	50
1.7.7.2. Inhibidores de la fosforilación oxidativa.....	51
1.7.7.3. Aniones.....	51
1.7.8. Fijación de ligandos.....	52
1.7.8.1. Nucleótidos de adenina.....	52
1.7.8.2. Fosfato.....	53
1.7.8.3. Aurovertina.....	54
1.7.8.4. Aniones.....	54
1.7.9. Sitios catalíticos.....	55
1.7.10. Cambios conformacionales.....	56
1.7.11. Diferencias entre los factores F_1 soluble y unido a membrana.....	57
1.7.12. Organización de la enzima en la membrana.....	58
1.8. <u>Aspectos de los factores F_0 de acoplamiento. Pro-</u> <u>teínas responsables de la acción de DCCD.</u>	62
1.9. <u>Estudios genéticos.</u>	65
1.10. <u>F_1-ATPasa de <i>Micrococcus lysodeikticus</i>.</u>	66
1.11. <u>Esta tesis</u>	71
2. MATERIALES Y METODOS.....	72
2.1. <u>Reactivos</u>	73
2.2. <u>Microorganismo y condiciones de crecimiento.</u>	74
2.3. <u>Preparación de membranas.</u>	75
2.4. <u>Solubilización de la enzima.</u>	75
2.5. <u>Purificación de la enzima.</u>	77
2.6. <u>Aislamiento de subunidades.</u>	78
2.7. <u>Electroforesis en gel de poliacrilamida.</u>	79
2.7.1. PAGE preparativa.....	79
2.7.2. PAGE analítica.....	79

2.7.3.	Tinciones.....	81
2.8.	<u>Ensayos de actividad enzimática.....</u>	82
2.9.	<u>Inhibición de la actividad enzimática por antisuero.....</u>	83
2.10.	<u>Tratamiento con agentes quelantes.....</u>	84
2.11.	<u>Otras determinaciones analíticas.....</u>	84
2.12.	<u>Reinserción de F_1-ATPasa y sus subunidades a membranas desprovistas de enzima.....</u>	85
2.13.	<u>Tratamiento con tripsina.....</u>	86
2.14.	<u>Preparación de antisueros.....</u>	87
2.15.	<u>Titulación de antisueros.....</u>	88
2.16.	<u>Inmunodifusión doble bidimensional.....</u>	89
2.17.	<u>Inmunoelectroforesis.....</u>	89
2.18.	<u>Marcaje de proteínas con ^{125}I.....</u>	89
2.19.	<u>Localización de radiactividad en geles.....</u>	91
2.20.	<u>Radioinmunoensayo de la enzima F_1-ATPasa y de sus subunidades.....</u>	91
2.21.	<u>Fijación de fosfato a F_1-ATPasa.....</u>	92
2.22.	<u>Análisis de metales.....</u>	92
2.23.	<u>Reconstitución de Zn^{2+}-(F_1-ATPasa).....</u>	93
2.24.	<u>Medidas de radiactividad.....</u>	93
2.25.	<u>Medidas de absorción.....</u>	93
2.26.	<u>Medidas de fluorescencia.....</u>	94
3.	RESULTADOS.....	95
3.1.	<u>Subestructura del factor BF_1.....</u>	96
3.1.1.	<u>Aislamiento y análisis de la enzima soluble.....</u>	97
3.1.2.	<u>Identificación de un nuevo componente en la subestructura de F_1-ATPasa de <i>M. lysodeikticus</i>.....</u>	101
3.1.3.	<u>Relación estequiométrica de subunidades.....</u>	105
3.2.	<u>Antigenicidad de la enzima F_1-ATPasa y sus sub</u>	

	<u>unidades</u>	107
3.2.1.	Caracterización de antisueros.....	108
3.2.2.	Titulo de los sueros.....	111
3.3.	<u>Radioinmunoensayo de F_1-ATPasa y sus subunidades. Influencia de las subunidades α, β y γ sobre las propiedades inmuoquímicas de la enzima</u>	114
3.3.1.	Marcaje y estado molecular de la molécula de F_1 -ATPasa y de sus subunidades α , β y γ	115
3.3.2.	Radioinmunoensayo de F_1 -ATPasa.....	124
3.3.3.	Radioinmunoensayo de las subunidades α , β y γ ..	126
3.3.4.	Reconstitución de las propiedades antigénicas de la molécula de F_1 -ATPasa a partir de sus componentes polipeptídicos.....	126
3.4.	<u>Papel de las subunidades de F_1-ATPasa en la actividad enzimática</u>	134
3.4.1.	Dos aproximaciones experimentales para afrontar un mismo problema.....	135
3.4.2.	Efecto de distintos antisueros sobre la actividad ATPásica de la enzima purificada.....	135
3.4.3.	Sensibilidad a tripsina de la enzima purificada. Su efecto sobre la actividad enzimática.....	138
3.4.4.	Aislamiento de distintas formas de F_1 -ATPasa obtenidas por digestión con tripsina.....	142
3.5.	<u>Inmuoquímica del factor BF_1 unido a membrana</u> ...	151
3.5.1.	Efecto de los sueros anti-(F_1 -ATPasa) sobre la actividad enzimática del factor BF_1 unido a membrana y purificado.....	152
3.5.2.	Efecto de los sueros anti-subunidades sobre la actividad enzimática del factor BF_1 unido a membrana y purificado.....	154

3.6.	<u>Papel de la subunidad δ y los iones Mg^{2+} en la fijación de la molécula F_1-ATPasa a membranas..</u>	160
3.6.1.	Efecto de la presencia de iones divalentes sobre la reinsertión de enzima a membranas.....	161
3.6.2.	Reversión de la fijación de F_1 -ATPasa a membranas.....	161
3.6.3.	Estudio comparativo de la solubilización de enzima y de la reversión del complejo BF_1 -membrana formado en presencia de Mg^{2+}	173
3.6.4.	Digestión proteolítica controlada de la enzima purificada. Su efecto sobre la reinsertión a membranas.....	173
3.6.5.	Reinsertión a membrana de una enzima con subunidad α modificada.....	178
3.6.6.	Reinsertión a membrana de moléculas de F_1 -ATPasa con contenido variable en subunidad δ ..	181
3.6.7.	Reinsertión a membrana de una enzima defectiva en subunidad δ obtenida por tratamiento con tripsina.....	181
3.6.8.	Reinsertión de las subunidades aisladas del factor BF_1 a membranas.....	183
3.6.9.	Efecto de distintos antisueros sobre la reinsertión de la enzima a la membrana.....	191
3.7.	<u>Papel de los iones metálicos en la F_1-ATPasa....</u>	193
3.7.1.	Contenido de zinc de la enzima purificada.....	194
3.7.2.	Efecto de varios agentes quelantes sobre la actividad enzimática.....	194
3.7.3.	Reconstitución de $(Zn^{2+})F_1$ -ATPasa y de su actividad.....	200
3.7.4.	Acción de cationes divalentes en la prevención y	

	reversión del efecto de los agentes quelantes.....	200
3.7.5.	Distinta funcionalidad de los iones metálicos divalentes.....	205
3.7.6.	Efecto de cationes divalentes sobre la actividad enzimática.....	207
3.7.7.	Influencia de diversos cationes sobre las propiedades ópticas de la molécula de F_1 -ATPasa estudiadas por espectroscopía de fluorescencia.....	209
3.8.	<u>Efecto del agente quelante EDTA sobre la subestructura del factor BF_1</u>	213
3.8.1.	Disociación de componentes polipeptídicos por tratamiento de F_1 -ATPasa con EDTA.....	214
3.8.2.	Efecto del EDTA sobre la tinción PAS de la enzima.....	220
3.8.3.	Reinserción a membrana de una enzima defectiva en las subunidades minoritarias.....	220
3.9.	<u>Fijación de fosfato a F_1-ATPasa</u>	225
3.9.1.	Medida de fijación de P_i	226
3.9.2.	Fijación en función de la concentración de fosfato..	226
3.9.3.	Efecto de la fuerza iónica, pH y temperatura.....	230
3.9.4.	Influencia de nucleótidos de adenina, cationes divalentes y EDTA.....	234
4.	DISCUSION.....	237
4.1.	<u>Propiedades estructurales del factor BF_1 de <i>M. lysoideikticus</i></u>	238
4.1.1.	Componentes intrínsecos.....	239
4.1.2.	Latencia.....	241
4.1.3.	Microheterogeneidad y labilidad.....	242
4.1.4.	Estequiometría en subunidades.....	244

4.1.5.	Consideraciones sobre la presencia de hidratos de carbono.....	244
4.2.	<u>Propiedades inmunoquímicas de la enzima.....</u>	248
4.2.1.	Antisueros y actividad enzimática.....	249
4.2.2.	Radioinmunoensayo y estructura molecular.....	251
4.3.	<u>Subunidades y actividad ATPásica.....</u>	254
4.3.1.	Papel de las subunidades mayoritarias, α y β ...	255
4.3.2.	Interacciones entre subunidades y comportamiento catalítico.....	259
4.4.	<u>Unión de F_1-ATPasa a membranas.....</u>	262
4.4.1.	Requerimientos iónicos.....	263
4.4.2.	Datos cuantitativos.....	265
4.4.3.	Papel de la subunidad δ	266
4.4.4.	Reinserción de las subunidades aisladas.....	271
4.5.	<u>Papel de los iones metálicos en las F_1-ATPasas.</u>	273
4.5.1.	Las F_1 -ATPasas como metaloproteínas.....	274
4.5.2.	Funciones estructurales y catalíticas de los iones metálicos divalentes.....	276
4.6.	<u>Fijación de PI.....</u>	280
4.6.1.	Características de la fijación.....	281
4.6.2.	Efecto de nucleotidos, cationes divalentes y agentes quelantes.....	282
4.7.	<u>Resumen del estudio de la enzima F_1-ATPasa de <i>M. lysodeikticus</i>.....</u>	284
4.8.	<u>Comparación entre distintas ATPasas.....</u>	294
4.9.	<u>Perspectivas.....</u>	303
5.	CONCLUSIONES.....	306
6.	BIBLIOGRAFIA.....	310

FE DE ERRATAS

-Pag. 176. Tabla XXIII.

Donde se lee " Mg^{2+} 0,66 mM y Mg^{2+} 1,88 mM" debe leerse " Mg^{2+} 1,40 y Mg^{2+} 4,00".

-Pag. 208. Tabla XXV.

Donde se lee concentraciones de: Mn^{2+} (0,1;1,0;3,2;10,0), Mg^{2+} (0,1;1,0;2,4;10,0), Co^{2+} (0,1;1,0;2,2;10,0), Fe^{2+} (0,1;1,0;10,0), Ca^{2+} (0,1;1,0) y Cu^{2+} (0,1;1,5), debe leerse: Mn^{2+} (0,15;1,5;4,8;15,0), Mg^{2+} (0,21;2,1;5,0;21,0), Co^{2+} (0,18;1,8;4,0;18,0), Fe^{2+} (0,18;1,8;18,0), Ca^{2+} (0,12;1,2) y Cu^{2+} (0,15;1,5).

-Pag. 236. Tabla XXXIX.

Donde se lee concentraciones de: Ca^{2+} ($1,81 \times 10^{-1}$; $1,21 \times 10^{-3}$) y Mg^{2+} ($1,13 \times 10^{-3}$; $6,77 \times 10^{-3}$), debe leerse: Ca^{2+} ($2,40 \times 10^{-1}$; $1,60 \times 10^{-3}$) y Mg^{2+} ($2,40 \times 10^{-1}$; $1,44 \times 10^{-3}$).

1. INTRODUCCION

1.1. Características y organización de las proteínas de membrana.

Las membranas biológicas tienen una importancia básica en casi todos los fenómenos celulares, habiéndose avanzado notablemente durante los últimos quince años en el conocimiento de la organización estructural de estos sistemas, sin los cuales no se podría concebir una célula como un organismo diferenciado. A pesar de que los sistemas membranosos difieren ampliamente en su morfología, funcionalidad y composición; algunas generalizaciones pueden aplicarse a todos los tipos de membranas celulares. Actualmente, el modelo con mayor apoyo experimental lo constituye el denominado modelo de "mosaico fluido", propuesto por Singer y Nicolson en 1972 (1). Dicho modelo considera a la membrana como una solución "orientada" de proteínas globulares en la matriz viscosa y discontinua de una bicapa lipídica (véase Fig. 1).

Todas las membranas están constituidas principalmente por lípidos y proteínas, y en menor medida por hidratos de carbono. La proporción en que cada uno de estos componentes se halla presente en la membrana varía según el tipo de la misma (véase Tabla I). En general las membranas más ricas en proteínas corresponderían a membranas muy activas, es decir, que participarían en un gran número de funciones (2).

El componente lipídico constituye la matriz estructural de la membrana y se organiza en forma de una bicapa con los grupos polares en las superficies intra y extra-celular, mientras que las cadenas hidrofóbicas de hidrocarburo se disponen paralelamente hacia la parte interna formando un ángulo recto con el plano de la membrana (6). Esta estructura única, conteniendo una parte externa hidrofílica y otra interna hidrofóbica, proporciona una barrera estable y relativamente impermeable entre los fluidos intra- y extra-celulares. Por otra parte, la fluidez de una bicapa lipídica, dependiente de su composición a una temperatura determinada, y las transiciones de fase desde un estado fluido (líquido) a un

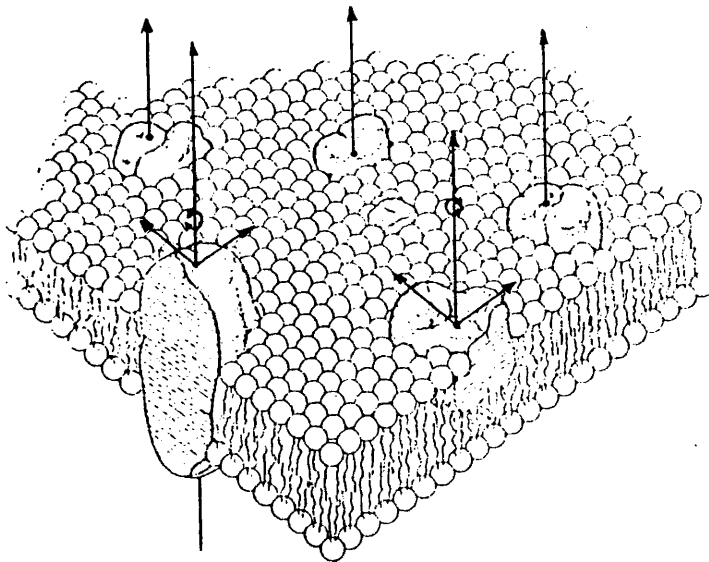


FIGURA 1.- Modelo del "mosaico fluido" propuesto por Singer y Nicolson (1). Representación esquemática en sección y tres dimensiones modificada de la figura original (1). En este modelo se representa como las moléculas de proteína pueden atravesar total o parcialmente la bicapa lipídica, así como las posibilidades de movimiento translacional y rotacional alrededor de un eje perpendicular al plano de la membrana de las proteínas.

TABLA I
 COMPOSICION QUIMICA DE MEMBRANAS

Tipo de membrana	Proteina/Lípido (peso/peso)	Coolesterol/lípidos polares (mol/mol)	Hidrato de car- bono (%)	Lípidos predominantes
Mielina	0,25	0,7-1,2	3	FC, FE, Est, CI
Plasmáticas				
Plaquetas	0,7		7,5	
Célula hepática	0,86-1,4	0,3-0,5	2-4	FC, FE, CI, FS, Est
Eritrocito humano	1,1-4,0	0,9-1,0	7,2-10,3	CI, FC, Est, FE, FS
Ameba	1,3		4	
Nuclear	1,6		2,9	FC, FE, FI
Bastoncillos retinianos	1,0-1,5	0,13	4	FC, FE, FS
Retículo sarcoplásmico	1,0-2,0	0,03-0,08	-	FC, FE, Est
Mitocondrial				
externa	1,1-1,5	0,03-0,09	2,4	FC, FE, FI
interna	3,2-3,5	0,02-0,04	1,2	FC, FE, DFG
Bacterias gram-positivas	2,0-4,0	0	(0-20)	DFG, FG, FE, FGae
Micoplasma	0,65-1,5		0,2-3,2	FG, CI, GL

CI: coolesterol; DFG: difosfatidil glicerol; Est: estingomielina; FC: fosfatidil colina; FE: fosfatidil etanolamina;
 FG: fosfatidil glicerol; FGae: aminoácil esteres de fosfatidil glicerol; FI: fosfatidil inositol; FS: fosfatidil serina;
 GL: glucolípidos; SL: sulfolípidos; TG: triglicérido.

Los datos indicados han sido tomados de las referencias (2-5).

estado cristalino rígido (gel), representan propiedades de primer orden en el comportamiento de las biomembranas al repercutir profundamente sobre la distribución y funcionabilidad de las proteínas en la membrana (7).

Como se ilustra en la Tabla I, las proteínas constituyen el componente mayoritario en peso de la mayoría de las membranas biológicas. Las moléculas de proteína se localizan en la matriz lipídica de un modo totalmente asimétrico, ocupando una posición exterior con respecto a la bicapa y manteniéndose asociadas a la superficie externa y citoplásmica de la membrana por interacciones predominantemente electrostáticas (proteínas periféricas o extrínsecas) o penetrando en una mayor o menor extensión en el interior de la bicapa, interaccionando hidrofólicamente con las moléculas lipídicas (proteínas integrales o intrínsecas). Dentro de este último grupo se encontrarían las proteínas transmembranales que atraviesan la membrana. La división de las proteínas de membrana en extrínsecas e intrínsecas surge de una clasificación básicamente operacional, realizada por Singer y Nicolson al proponer su modelo del "mosaico fluido" (1). Según ellos, las proteínas extrínsecas (p.ej. citocromo c, F_1 -ATPasa) se caracterizan por los siguientes criterios: (a) requieren tratamientos suaves, como un cambio en la fuerza iónica del medio o la adición de agentes quelantes para separarse en una forma molecularmente intacta de la membrana; (b) en su estado soluble se encuentran libres de lípidos; y (c) una vez aisladas de la membrana son relativamente solubles en tampones acuosos neutros. Por el contrario, las proteínas intrínsecas (p. ej. citocromo b_5 , Na^+K^+ -ATPasa, glucoforina) que representan más del 70% de las proteínas de membrana, poseen características diferentes: (a) requieren tratamientos mucho más drásticos que rompan interacciones lípido-proteína o lípido-lípido (fundamentalmente de naturaleza hidrofóbica) como detergentes, solventes orgánicos, agentes caotrópicos, para disociarse de la membrana; (b) en muchos casos, permanecen asociadas con lípidos al solubilizarse; (c) si se encuentran libres de lípidos son generalmente insolubles o forman agregados en tampones acuosos neutros. Esta

distinción entre ambos tipos de proteínas no presupone una descripción molecular en la ordenación de las mismas en las membranas, desconocida en la mayoría de los casos y debe considerarse como una situación extrema, presentándose matices intermedios principalmente en lo que concierne a las proteínas intrínsecas según estén más o menos embebidas en la bicapa lipídica. La figura 2 hace alusión a los distintos tipos posibles de organización de las proteínas en la membrana y a los posibles efectos de su extracción en medios acuosos, ya que la disposición y estructura de una proteína de membrana puede modificarse ostensiblemente durante el proceso de solubilización de la misma.

La composición porcentual de aminoácidos con carácter hidrofóbico (9) de una proteína de membrana puede reflejar su grado de interacción con la bicapa lipídica(10), sin embargo la secuencia debe contener regiones responsables de dicha interacción, es decir, cabe esperar una distribución asimétrica de grupos polares y no polares (11). Además, no todas las regiones hidrofóbicas se encontrarán en el interior de la bicapa, sino que muchas de ellas parecen estar relacionadas con la conformación de la proteína (véase Discusión).

Se ha supuesto que las proteínas intrínsecas que se encuentran embebidas en la membrana juegan un papel crítico en la integridad estructural de las membranas (1). Estas proteínas intrínsecas presentan una forma predominantemente globular con un porcentaje elevado de conformación α -helicoidal (12-15).

Quizás uno de los descubrimientos recientes más importantes en el estudio de las membranas, radica en que muchas de sus proteínas son móviles, pudiendo difundir lateralmente en el plano de la membrana y rotar alrededor de un eje perpendicular al plano de la membrana, como ocurre con las moléculas de rodopsina en las membranas -----

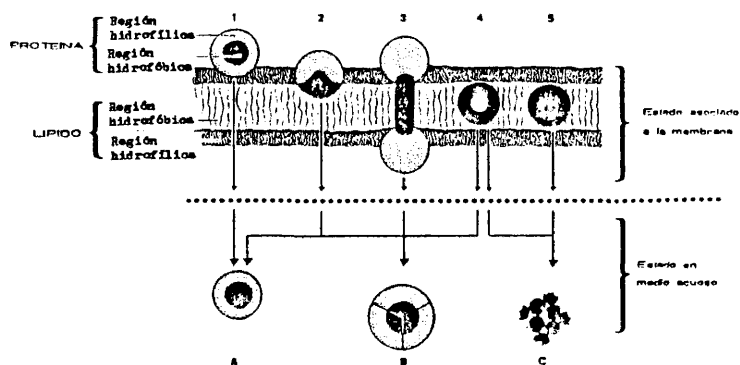


FIGURA 2.- Posible disposición relativa de proteínas en una bicapa lipídica y los posibles efectos de su extracción a medios acuosos.

1. Proteínas y lípidos interactúan exclusivamente a través de sus regiones hidrofílicas. La proteína puede ser transferida a un medio acuoso con la mínima perturbación (estado A).

2. Proteínas y lípidos interactúan a través de sus regiones hidrofílicas e hidrofóbicas. En este caso al aislar las proteínas, estas expondrían al agua algunas regiones hidrofóbicas por lo que se produciría un reagrupamiento, bien quedando encerradas dichas regiones en el interior de la molécula (estado A) o bien constituyendo un complejo multimolecular (estado B).

3. Aquí la proteína atraviesa totalmente la bicapa lipídica, pero las consecuencias de su extracción a un medio acuoso son análogas a las dadas en el caso anterior.

4. La interacción entre la proteína y los lípidos es puramente hidrofóbica ya que la parte hidrofílica de la proteína se encuentra en el interior de la molécula (una posible pero improbable disposición). En un medio acuoso, la proteína podría revertir a los estados A o B o a una mezcla de ellos, o podría formar un agregado insoluble como el representado por la letra C.

5. La proteína se compone exclusivamente de aminoácidos hidrofóbicos y formaría un agregado insoluble en medios acuosos (estado C). Una proteína de este tipo sería soluble en medios no acuosos.

En este esquema se ha supuesto que las proteínas están unidas a las membranas por interacción directa con lípidos. Algunas proteínas pueden no interactuar con lípidos directamente sino que se encuentran asociadas a la membrana por interacciones con otras proteínas, las cuales sí interactúan directamente con los lípidos de la membrana. Esta posibilidad adicional exige de pero no altera los conceptos ilustrados en el diagrama. (Esquema tomado de (8)).

de los bastoncitos retinianos (16). La primera demostración de que las proteínas de las membranas plasmáticas poseían una movilidad considerable, fué realizada por Frye y Edidin en 1970 para los antígenos de membrana de heterocariontes de células de ratón y humanas (17). Posteriormente, se observó que la unión de anticuerpos a antígenos de su superficie induce la aparición de varios tipos de redistribución selectiva - de los complejos anticuerpo-antígeno en la membrana como son (18): (a) formación de agregados ("patches"), consistente en una agrupación pasiva de macromoléculas en un proceso análogo a una precipitación o aglutinación, teniendo lugar en las dos dimensiones de la membrana (19); (b) segregación polar de ciertas moléculas ("capping") por un proceso activo, dependiente, probablemente de los microfilamentos citoplásmicos (20) ; (c) pinocitosis de los complejos, lo que en algunos casos puede conducir a una pérdida de proteínas de membrana (20) ; mecanismo para el que se ha postulado un posible papel de modulación antigénica (21).

Por otra parte, existen muchos casos en que las funciones exigen que las proteínas tengan una escasa y/o controlada movilidad y que se dispongan en una distribución no uniforme y polarizada como ocurre, por ejemplo, en las uniones discontinuas ("gap junctions"), donde las células se acoplan iónica y metabólicamente. Aunque no se conoce cómo se efectúa este control sobre la distribución y el movimiento de las proteínas de membrana se podría pensar en varios mecanismos. Estos incluirían la formación de grandes agregados de proteínas que difundirían muy lentamente y/o la acción de las estructuras fibrilares intracelulares: microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios (18).

Otra característica notable de las proteínas de membrana es su ya mencionada localización asimétrica. Hasta el presente no se ha identificado ninguna proteína que se encuentre simétricamente distribuida o no expuesta a algún lado de la membrana, por lo que la -

asimetría en la orientación de las proteínas en la membrana parece ser absoluta. Cada cadena polipeptídica tiene la misma orientación en la --- membrana, manteniéndose esta asimetría por la ausencia de difusión -- transmembranal . La mayor parte de las proteínas parece que atravie-- san asimétricamente la membrana o se hayan expuestas únicamente ha-- cia la superficie citoplásmica. Así, en la membrana de eritrocito huma-- no (18), que es la mejor estudiada entre las membranas de mamíferos, de las quince proteínas mayoritarias (p.m. 15.000-250.000) detectables por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, la ma-- yoría de ellas se encuentran ubicadas en el lado citoplásmico de la mem-- brana, siendo la más abundante una proteína fibrosa, la espectrina(22), que comprende aproximadamente el 25% de la proteína de membrana. Dos proteínas que se proyectan hacia la superficie externa son glucoproteínas que cruzan la membrana (18), una de ellas es una proteína globular de unos 100.000 dalton de peso molecular (23) y la otra, la glicoforina - (24).

Por su parte, los hidratos de carbono son componentes mino-- ritarios de las membranas biológicas (véase Tabla I) presentándose --- principalmente como cadenas laterales de oligosacarido unidas covalente-- mente a proteínas y, en una menor extensión, a esfingolípidos. Aunque-- más de un centenar de monosacáridos diferentes pueden hallarse en la naturaleza, tan sólo una decena de ellos se localizan en las glucoproteí-- nas y glucolípidos de membrana, siendo los principales: galactosa, ma-- nosa, fucosa, galactosamina, glucosamina, glucosa y ácido siálico (18). A pesar de haberse realizado un progreso sustancial en la elucidación de las secuencias de muchos oligosacáridos unidos a lípido o proteína, la funcionalidad biológica del hidrato de carbono permanece por diluci-- dar, habiéndose sugerido posibles implicaciones en la biogénesis de la membrana, comunicación celular y reconocimiento celular (18,25).

1.2. Las membranas biológicas como transductoras de energía.

Cualquier organismo requiere un aporte de energía para su existencia. Esta energía, una vez transformada por las células en una forma aprovechable biológicamente se emplea para un amplio número de funciones celulares: biosíntesis, transportes activos, trabajos mecánicos, cambios conformacionales, expresión de antígenos, recambio, etc. Esta gran variedad de procesos celulares que necesita un aporte eficaz de energía, utilizan en su mayoría un único compuesto como fuente de energía, el trifosfato de adenosina (ATP). Este nucleótido, considerado como la "moneda universal de energía", contiene una elevada concentración de cargas negativas en torno al grupo trifosfato, lo que constituye un factor importante en la naturaleza del ATP como compuesto de alto contenido energético (25). Consecuentemente hay diversas enzimas que catalizan la hidrólisis del grupo fosfato terminal de la molécula de ATP, dando lugar a difosfato de adenosina (ADP) y fosfato inorgánico (Pi) y liberando una apreciable cantidad de energía (de 7.000 a 8.000 cal/mol), la cual, convenientemente acoplada, puede utilizarse en procesos trascendentales para el mantenimiento del organismo vivo.

Tres son los procesos fundamentales por los que las células contribuyen a la recuperación del "pool" de ATP a partir de ADP y Pi: la glucólisis, la fosforilación oxidativa y la fotofosforilación. Estos tres procesos requieren sistemas enzimáticos eficazmente coordinados, pero la fosforilación oxidativa y la fotofosforilación precisan, además, que dichos sistemas se encuentren asociados con membranas biológicas. Así, en células procarióticas estos sistemas se hallan asociados a su membrana plasmática, mientras que en las células eucarióticas se encuentran ubicados en orgánulos especializados: la membrana interna de las mitocondrias (fosforilación oxidativa) y la membrana tilacoidal de los cloroplastos (fotofosforilación). Estos tres tipos de membrana son comúnmente denominadas "membranas transductoras de energía", ya que en ellas se -----

acopla la energía derivada del transporte de electrones a la síntesis de ATP. Los sistemas enzimáticos implicados en el transporte electrónico y la fosforilación acoplada son notablemente complejos y difíciles de abordar de forma experimental ya que se encuentran embebidos o asociados con los sistemas membranosos. Este hecho ha constituido un obstáculo para la elucidación del mecanismo molecular por el cual se conserva la energía del flujo electrónico en forma de energía del enlace - fosfato del ATP, si bien parece fuera de toda duda que la membrana constituye un elemento fundamental en este proceso de acoplamiento de energía.

En la actualidad se sabe que los sistemas transportadores de electrones asociados con las membranas mitocondriales, de cloroplastos y bacterianas se encuentran funcionalmente acoplados a un sistema que sintetiza ATP (complejo de ATPasa) por un mecanismo que es fundamentalmente similar en todas las células vivas; sin embargo, el modo en que acontece dicho acoplamiento sigue estando sujeto a controversia (26). Algunas de las principales hipótesis se ilustran en la figura 3.

Según la hipótesis química (Fig. 3A) inicialmente propuesta por Slater en 1953 (27), la cadena transportadora de electrones generaría un intermediario químico de "alta energía" durante el flujo electrónico que acoplado químicamente al complejo de ATPasa energizaría el Pi, el ADP o ambas moléculas. Esta hipótesis postulaba por lo tanto una analogía entre los procesos de fosforilación oxidativa y la fosforilación con la fosforilación a nivel de sustrato. Sin embargo, existe un gran número de hechos experimentales que son muy difíciles de acomodar con esta hipótesis química (28), que no obstante, no ha sido totalmente desechada (29).

Posteriormente en 1961, Mitchell propuso su hipótesis quimiosmótica (28) en la que tanto los sistemas responsables del trans

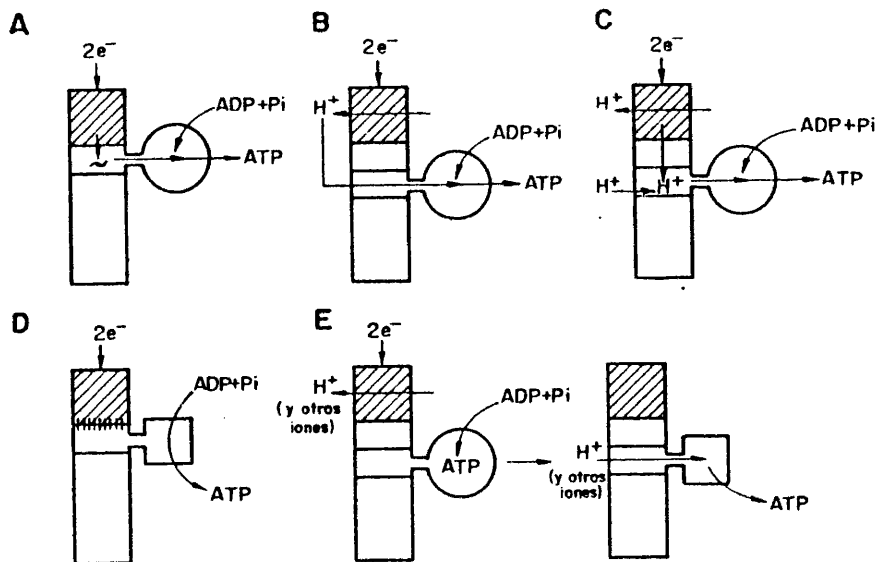


FIGURA 3.- Principales hipótesis de la transducción de energía. (A)

La hipótesis química de Slater postula la existencia de compuestos intermedios "ricos en energía". (E) La hipótesis quimiosmótica de Mitchell asume que el flujo de protones generado durante el transporte de electrones participa de una forma directa en la síntesis de ATP. (C) La hipótesis de Williams difiere de la anterior en que considera que no todos los protones son dirigidos hacia el espacio externo. Algunos, pueden liberarse en el interior de la membrana. (D) La hipótesis conformacional propuesta por Boyer suponía originariamente que la energía derivada de la respiración y la fotosíntesis se acumulaba en cambios conformacionales, que se transmitían por interacciones proteína-proteína dentro del espacio membranar. (E) La hipótesis electroconformacional de Boyer se puede considerar como una variante de la anterior. Supone que los cambios conformacionales responsables de la liberación de ATP preformado (véase texto) se originan a partir de un gradiente electroquímico de protones (o de protones+ otros iones).

porte de electrones como de la síntesis de ATP eran capaces de generar un gradiente de protones a través de la membrana, constituyendo - este gradiente la vía de transferencia de energía entre los dos sistemas (30-32) (Fig. 3B). Esta hipótesis quimiosmótica da una explicación del requerimiento de la membrana en este proceso de transducción de energía, en contraposición, con la hipótesis química en la que la presencia de la estructura de membrana podría no ser un requisito necesario (28). El papel de la membrana según esta hipótesis quimiosmótica sería el de constituir una barrera impermeable a iones, en la que la distribución - asimétrica de los componentes de la cadena de óxido-reducción diera - origen a potenciales eléctricos transmembranales y/o gradientes de pH a través de los cuales se transmitiría y se utilizaría la energía para la síntesis de ATP.

La hipótesis propuesta por Williams (33,34), representada - en la figura 3C, difiere únicamente del modelo de Mitchell en el sentido de que la transferencia de energía entre los sistemas de transporte de electrones y los complejos de ATPasa puede tener lugar a través - de flujos de protones en el interior de la membrana. No obstante, ambas hipótesis apuntan hacia una intervención directa del gradiente de -- protones originado durante el transporte electrónico en la deshidratación de ADP y Pi para la subsiguiente síntesis de ATP (35-37).

Una cuarta hipótesis, propuesta originariamente por Boyer - en 1965, consideraba que la transducción de energía tenía lugar a tra-- vés de cambios conformacionales de los sistemas implicados, que se - transmitían por interacciones proteína-proteína dentro del espacio mem-- branal (Fig. 3D). En una modificación de esta hipótesis (38-40), es-- quematizada en la figura 3E, se sugiere que un gradiente electroquímico de protones (o protones más otros iones) conduce a un cambio con-- formacional en el complejo de ATPasa que favorecería la unión de Pi y ADP a la enzima y la liberación de ATP de la misma. Este modelo su-- pone que la síntesis de ATP a partir de la deshidratación de ADP y Pi

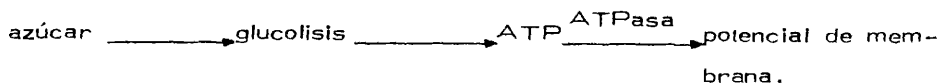
se produciría sin aporte energético, favorecida seguramente por un entorno fuertemente hidrofóbico en el sitio activo.

En la actualidad, se ha establecido que los sistemas implicados en el transporte de electrones y en la síntesis de ATP pueden generar reversiblemente un gradiente de protones y/o un potencial de membrana a través de la membrana en la que se hayan localizados y, aún más, que la transferencia de energía entre distintos sistemas transductores de energía ubicados en la misma membrana puede efectuarse mediante un gradiente de protones y/o un potencial de membrana, en concordancia con la hipótesis quimiosmótica. Sin embargo, los mecanismos moleculares por los que se genera un gradiente de protones y/o un potencial de membrana o por los que se sintetiza una molécula de ATP a partir de ADP y P_i no son conocidos. De este modo, pudiera suceder que las hipótesis esquematizadas en la figura 3 no representen alternativas mutuamente exclusivas, sino que reflejen aspectos diferentes de un mismo mecanismo básico enfocado desde un punto de vista transmembranal, intramembranal y molecular (41).

1.3. Aspectos evolutivos en el acoplamiento bioenergético.

La fermentación constituye el proceso metabólico más antiguo que hizo posible las formas más tempranas de vida. Posteriormente un mejor aprovechamiento y almacenaje de la energía, marcarían las directrices de los procesos evolutivos hasta alcanzar el de la fosforilación oxidativa.

La figura 4 reproduce el árbol filogenético relativo al acoplamiento energético, propuesto por Dickerson y col. (42,43), y comentado recientemente por Vignais (44). Como puede apreciarse, al final de la cadena se encuentran las bacterias que bajo una atmósfera reductora existente en la tierra primitiva, obtenían su energía (ATP) a través del proceso glucolítico. En estos fermentadores anaerobios, la presencia de una enzima ATPasa unida a la membrana plasmática podría "energizar" la membrana haciendo posible transportes activos de sustancias:



Un fuerte apoyo a esta hipótesis radica en la identificación y aislamiento de una enzima ATPasa unida a membrana y capaz de crear un gradiente de pH y un potencial de membrana en una bacteria anaerobia estricta, Clostridium pasteurianum, situada en un estadio filogenético muy primitivo (45,46).

Posteriormente con la aparición de las bacterias fotosintéticas conteniendo ya un sistema de transporte de electrones asociado a las membranas, se habría adquirido un mecanismo por el que se aprovecharía la energía solar para originar un potencial de membrana y poder almacenar energía en forma de ATP de una manera más eficaz, presumiblemente, por medio de la misma ATPasa operando en forma inversa:

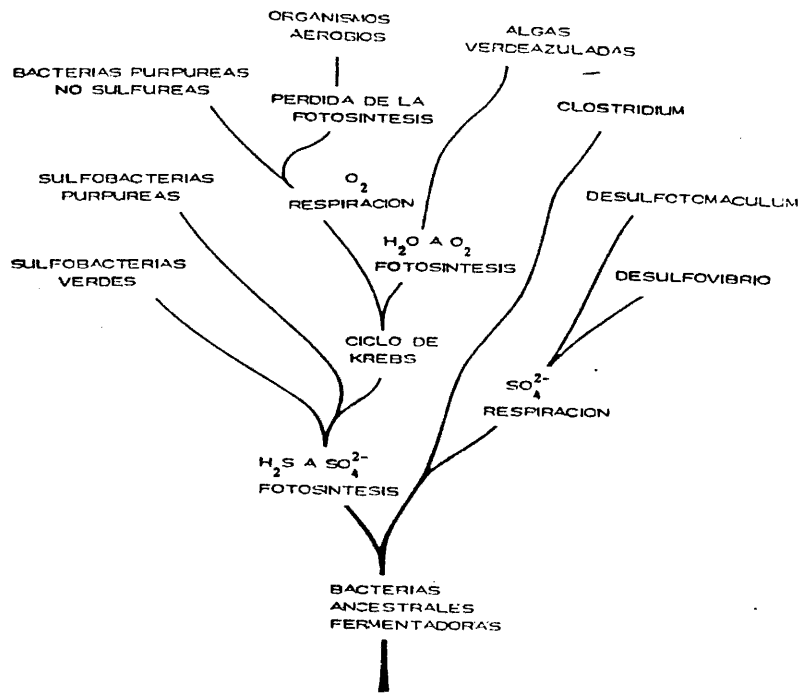


FIGURA 4.- Arbol filogenético relativo a la evolución de la fotosíntesis bacteriana y de la respiración. En este modelo, la respiración con sulfato surgió tempranamente en la tierra primitiva como respuesta a la fotosíntesis productora de sulfato, de la misma manera que la respiración con oxígeno apareció más tarde una vez que la fotosíntesis productora de oxígeno hubo creado un ambiente aeróbico. (Esquema tomado de (42)).

Luz $\xrightarrow{\text{cadena transportadora de electrones}}$ potencial de membrana $\xrightarrow{\text{ATPasa}}$ ATP

Estas bacterias fotosintéticas primitivas utilizarían SH_2 como fuente de equivalentes reductores (42), lo que condujo a una oxidación de SH_2 a azufre y en último término a sulfato. Esta producción de concentraciones locales de sulfato, incluso en condiciones de atmósfera reductora, pudo inducir a que ciertos microorganismos evolucionaran para extraer un mayor contenido energético a partir de sus metabolitos, oxidándolos con sulfato en vez de degradarlos por simple fermentación (47).

En este estadio ya algunas sulfobacterias verdes y purpúreas presentarían un ciclo de Krebs parcial o completo, pero aparentemente lo emplearían como un medio de síntesis de glutamato u otras moléculas, o como un medio de fijación de CO_2 (48). Sin embargo en los antepasados de las bacterias purpúreas no sulfúreas ya se presentaría un ciclo de Krebs completo con el que se proveerían de una fuente alternativa de NADH, eliminando la necesidad de una fuente externa de reductores.

Otra alternativa diferente evolucionaría de las primitivas algas verdeazuladas o cianofíceas, utilizando un abundante pero pobre reductor, el H_2O . Con el desarrollo de los sistemas fotosintéticos de las plantas verdes, liberando O_2 a partir de moléculas de H_2O , comenzaría una lenta alteración en la atmósfera, que en el transcurso del tiempo conduciría a la presente atmósfera oxidante. Consecuentemente, ciertos microorganismos utilizarían este O_2 como un aceptor de electrones haciendo posible el funcionamiento de la cadena transportadora de electrones en la oscuridad (respiración). Una vez que los procesos fotosintéticos de las algas verdeazuladas hubieren incrementado el contenido de oxígeno en la atmósfera por encima de un cierto umbral, la respiración sería lo suficientemente eficiente para que la pérdida de la fotosíntesis se produjese sin perjuicio alguno. Así las nuevas bacterias aerobias obtendrían su energía según el siguiente proceso:

Sustrato \longrightarrow cadena transportadora de electrones \longrightarrow potencial
de membrana $\xrightarrow{\text{ATPasa}}$ ATP.

En este contexto se ha propuesto que los procesos respiratorios de las células procarióticas y eucarióticas se habrían originado a partir de la pérdida de la capacidad fotosintética de las bacterias no sulfúreas, que presentaban un comportamiento dual: fotosintético y respiratorio (42). Avanzando más en la escala evolutiva y de acuerdo con la teoría endosimbiótica, los orgánulos responsables de la transducción de energía en las células eucarióticas se habrían originado a partir de organismos procarióticos: los cloroplastos de las algas simbióticas y las mitocondrias de las bacterias aerobias. En este sentido se ha sugerido que una bacteria del tipo Paracoccus podría ser el probable antecesor de las mitocondrias (49). Sin embargo una gran interrogante permanece todavía por afrontar, ¿cuales son los posibles mecanismos reguladores que introducidos en el curso de la evolución transformarían un organismo vivo e independiente en un orgánulo especializado en la transducción de energía ?.

Un hecho común a lo largo de todo este hipotético proceso evolutivo radicaría en la existencia de un mismo sistema de ATPasa con una función similar en todos los organismos, a saber, la translocación de protones. Como se verá más adelante estos sistemas enzimáticos asociados a las membranas bacterianas, mitocondriales y de cloroplastos participan de notables similitudes estructurales y funcionales.

1.4. Diferentes denominaciones para un mismo sistema enzimático.

Todas las membranas transductoras de energía poseen un complejo de proteínas, denominado complejo de ATPasa y diseñado para utilizar la energía procedente de la luz o de la oxidación de compuestos orgánicos en la síntesis energéticamente desfavorable de ATP, como ya se mencionó en el apartado 1.2.. Según la hipótesis quimiosmótica, inicialmente propuesta por Peter Mitchell en 1961 (28), y actualmente aceptada en sus postulados básicos, el ATP se sintetizaría en dicho complejo de ATPasa al utilizar un gradiente electroquímico de protones transmembranal (gradiente de pH y de potencial eléctrico), formado por el movimiento unidireccional de protones a través de la membrana de cloroplastos, mitocondrias y células bacterianas, durante el flujo de electrones a través de las moléculas transferidoras de las cadenas respiratoria y fotosintética. Así, la fosforilación de ADP para dar lugar a ATP se llevaría a cabo en dicho complejo de ATPasa por un flujo de protones en sentido inverso, a favor de gradiente. Por otra parte, este complejo puede trabajar reversiblemente formando un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana, acoplado con la hidrólisis de ATP. Un fuerte apoyo experimental a esta hipótesis estriba en el hecho de que el complejo de ATPasa reconstituido en liposomas interviene en la acumulación de H^+ a expensas de la hidrólisis de ATP (50).

El hecho de que este complejo se comporte realmente como una bomba de protones (51,52) y de que esta propiedad sea común a mitocondrias (53-55), cloroplastos (56), bacterias (54,57) e incluso a bacterias anaerobias estrictas como Clostridium pasteurianum (45), hace que sea más apropiado denominar a este complejo de ATPasa como ATPasa translocadora de protones o H^+ -ATPasa, como ocurre con Na^+ , K^+ -ATPasa y Ca^{2+} -ATPasa (52). Sin embargo, se han asignado diferentes denominaciones a esta H^+ -ATPasa desde que fuera primeramente aislada de la membrana mitocondrial (58) e identificada entonces como

"ATPasa sensible a oligomicina". Esta denominación que no puede ser universalmente aceptada ya que solamente la H^+ -ATPasa mitocondrial se muestra sensible a oligomicina (52) ha sido empleada por otros laboratorios (59). Otras denominaciones para el mismo sistema H^+ -ATPasa son: $(F_0 \cdot F_1)$ ATPasa (57,60), ATPasa sensible a DCCD (61), -- complejo de ATPasa (62-64), complejo V (65), ATPasa transdutora de energía y ATPasa · ATP sintetasa (66).

Estas ATPasas translocadoras de protones (H^+ -ATPasas) o complejos de ATPasa que constituyen las denominaciones más extendidas presentan dos características notables: a) la similitud en composición y propiedades generales de todas las H^+ -ATPasa estudiadas (52, 55, 62-64, 67-69) ; b) su ubicación universal, encontrándose en todas las células eucarióticas y procarióticas examinadas, a excepción de los eritrocitos (52), incluso en organismos tan simples como Streptococcus faecalis (70) o C. pasteurianum (45) que no poseen una cadena respiratoria o fotosintética. Esta amplia distribución se justifica por el hecho de que la translocación de protones a través de la membrana es esencial, no sólo para la fosforilación oxidativa o fotosintética (26,55,71), sino para multitud de funciones celulares como son la translocación de iones y sustratos (72), el movimiento de flagelos (54), transferencia de información (54), etc.

Al mismo tiempo, esta presencia universal del complejo de -- ATPasa en todos los organismos vivos, permite estudiar su estructura y función en diferentes formas, utilizando preparaciones de organismos con distintas características. Así, por ejemplo, en el caso de E. coli se puede aprovechar el gran conocimiento genético adquirido en esta bacteria, pudiéndose extrapolar los resultados obtenidos sobre éste u otro microorganismo a cloroplastos y mitocondrias. No obstante debe de acogerse con cautela cualquier tipo de generalización (73).

Estas H^+ -ATPasas, ubicadas según se muestra en la figura

5 en la membrana interna de las mitocondrias, en la membrana tilacoidal de los cloroplastos y en la membrana plasmática de las bacterias, constan de dos grupos de polipéptidos bastante diferenciados. Uno de ellos, conocido como factor de acoplamiento I" ó F_1 (74) que se proyecta hacia la matriz (mitocondria), estroma (cloroplasto) o citoplasma (bacterias), puede ser aislado por tratamientos suaves y constituye el sitio responsable de la síntesis e hidrólisis de ATP. La extracción de estos componentes F_1 de la membrana provoca un desacoplamiento del proceso de la fosforilación oxidativa y un aumento en la permeabilidad a protones, que puede ser revertido por adición de DCCD u oligomicina (en mitocondrias) (75). Esta disociación es frecuentemente reversible, restaurándose de nuevo las características funcionales de las membranas de partida (76). De ahí que se haya utilizado el término de "factor de acoplamiento" para describir este tipo de proteínas. El segundo grupo de polipeptidos constituyentes del complejo de ATPasa, denominado factor de acoplamiento o" ó F_o (77), constituye una parte integral de la membrana difícil de definir con precisión y que parece formar una especie de canal en la translocación de protones. Ambas partes F_1 y F_o serán tratadas más adelante.

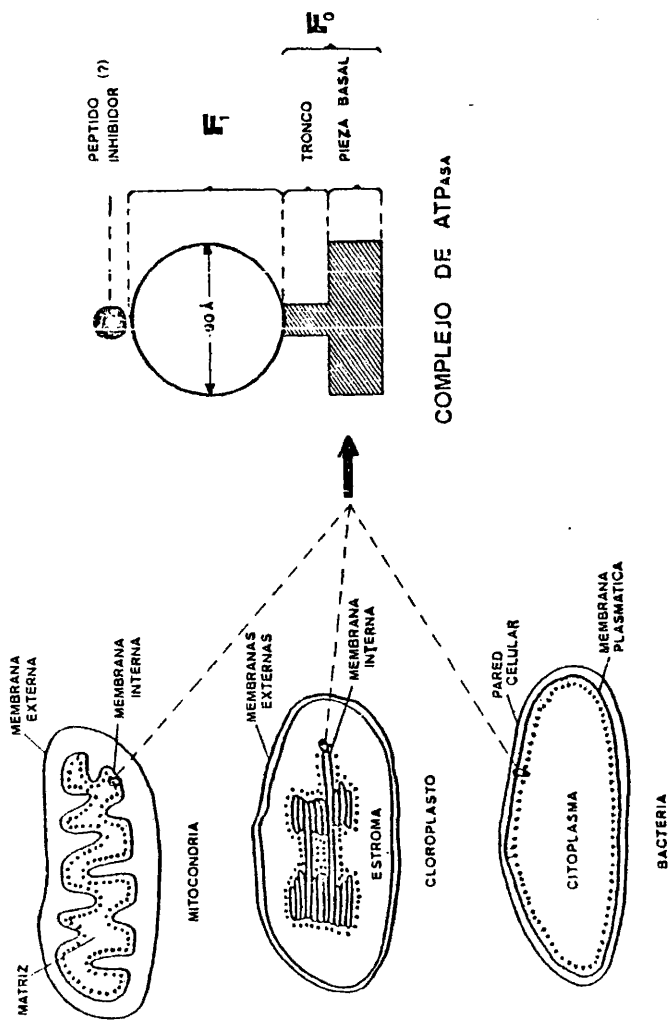


FIGURA 5.- Localización y estructura de los complejos de ATPasa. Si el inhibidor de la actividad ATPásica forma una parte integral del factor F₁ o si posee entidad propia separada de F₁ es una cuestión por dilucidar.

1.5. El complejo de ATPasa como un complejo multifuncional.

Los complejos de ATPasa pueden participar no solamente en la síntesis de ATP sino también en funciones dependientes de ATP (Tabla II). De este modo, en mitocondrias, por ejemplo, el complejo de ATPasa interviene en al menos cuatro funciones conocidas: síntesis de ATP; reducción dependiente de ATP, de NADP^+ por NADH (transhidrogenasa); transporte de Ca^{2+} dependiente de ATP y reversión del flujo de electrones dependiente de ATP (66). Recientemente el grupo de Pedersen ha demostrado que el componente F_1 del complejo de ATPasa mitocondrial de hígado de rata constituye el sitio donde tienen lugar la síntesis de ATP y las reacciones dependientes de ATP (78,79). La extracción del factor F_1 , de vesículas de membrana interna, por tratamiento con urea sin alterar la cadena transportadora de electrones de las vesículas es concomitante con la pérdida de actividad ATPásica, de síntesis de ATP y de actividades dependientes de ATP. Sin embargo, la adición de una preparación de F_1 purificado, de mitocondrias de hígado de rata, restaura dichas funciones. Esta restauración se ve favorecida por la presencia de ATP o AMP-PNP. Según Pedersen (66), este hecho junto con la potente acción inhibitoria de AMP-PNP de la actividad ATPásica (véase apartado 1.7.7.1.) y la posible identificación de ATP como un efector negativo de esta actividad, sugeriría que la forma de F_1 más activa para la síntesis de ATP sería aquella forma de "baja actividad ATPásica"; lo que podría estar relacionado con la presencia del péptido inhibitor en esta enzima (véase figura 5 y apartado 1.7.5.).

Por otra parte, y como se muestra en la Tabla III, estas funciones catalizadas por el factor F_1 de los complejos de ATPasa muestran ciertas características con relación a la especificidad del nucleosido trifosfato y K_m (ATP).

TABLA II
FUNCIONES DEL COMPLEJO DE ATPasa
MITOCONDRIAL

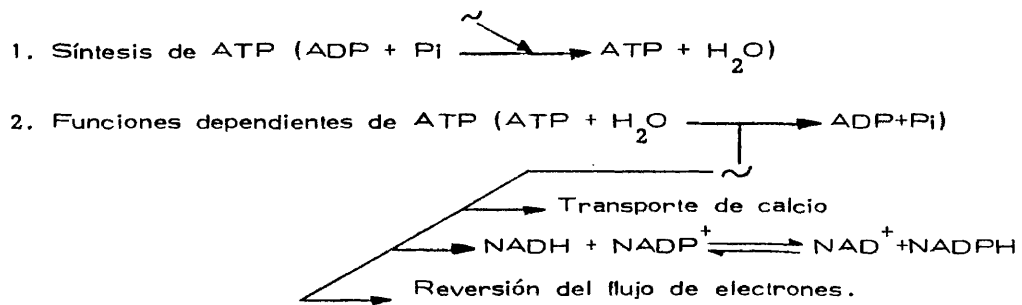


TABLA III

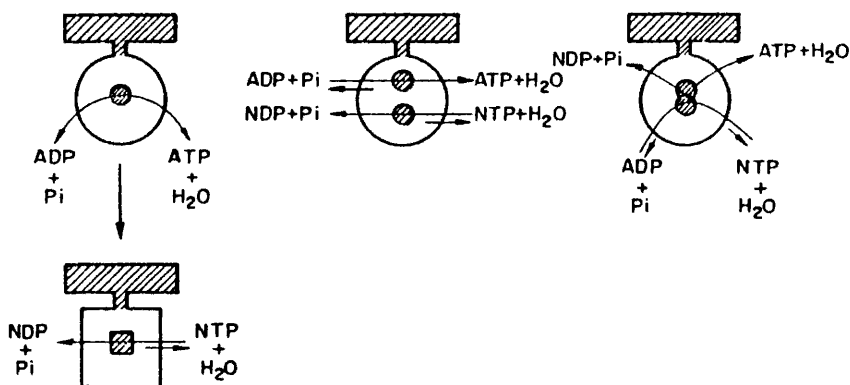
VALORES DE K_m (ATP) Y ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO (NUCLEOSIDO TRIFOSFATO) PARA ALGUNAS REACCIONES DEPENDIENTES DE ATP EN MEMBRANA INTERNA MITOCONDRIAL DE HIGADO DE RATA.

Reacción	K_m (ATP)		Especificidad (NTP)
	Tampón Tris-HCl	Tampón Tris-HCO ₃ ⁻	
Intercambio ATP-PI	1,0 mM	1,4 mM	ATP
Hidrólisis de ATP	0,058 mM, 0,21 mM	0,076 mM	ATP > ITP ≈ GTP
Transhidrogenasa dependiente de ATP	0,034 mM	0,054 mM	ATP ≈ ITP > GTP

Datos tomados de las referencias (101, 174).

1.6. Posibles modelos para la multifuncionalidad de los complejos de ATPasa.

Basicamente son tres los modelos que pueden explicar esta bidireccionalidad en la funcionalidad de los complejos de ATPasa (62, 66).



Uno de ellos ilustra como la H⁺-ATPasa puede tener un único sitio catalítico que al actuar de una forma reversible puede participar en ambas actividades: síntesis de ATP y funciones dependientes de ATP. No obstante, es importante observar que dicho modelo necesitaría de la existencia de ciertos tipos de regulación (quizás efectos alostéricos) que dieran cuenta de las diferencias en especificidad, Km (ATP) y efecto de inhibidores y activadores sobre la síntesis de ATP y las funciones dependientes de ATP (véase Tabla III y apartado 1.7.7.). Así se sugiere un cambio reversible en el estado conformacional de la enzima que alteraría la especificidad del sitio catalítico. Un segundo modelo muestra la presencia de dos sitios separados responsables de la síntesis de ATP y de las funciones dependientes de ATP respectiva -

mente. Tales sitios podrían ser independientes, si bien, una cierta interacción entre ellos sería más plausible. Un tercer modelo ilustraría la presencia de "sitios compartidos" donde los dos sitios mencionados anteriormente no serían ni completamente idénticos ni estarían completamente separados, de forma análoga al modelo propuesto por Kozlov y Skulachev (55).

1.7. Factores F_1 de acoplamiento.

1.7.1. Aislamiento y purificación.

El compuesto F_1 del complejo H^+ -ATPasa, también denominado factor de acoplamiento 1 ó F_1 -ATPasa, ha sido purificado a homogeneidad a partir de distintas biomembranas translocadoras de protones procedentes de diferentes orgánulos (mitocondrias de corazón de buey y de hígado de rata, cloroplastos de varias especies vegetales, cromatóforos de microorganismos fotosintéticos) y de membrana plasmática de diferentes procariotas (Tablas IV y V). A las F_1 -ATPasas procedentes de mitocondrias se las designa genéricamente como factores F_1 , mientras que para los cloroplastos y bacterias se utilizan las abreviaturas CF_1 y BF_1 , respectivamente.

Se han empleado distintos métodos de solubilización de la proteína dependiendo principalmente del tipo de membrana original. Así, en mitocondrias, los tratamientos de disrupción mecánica (agitación, sonicación) han permitido obtener buenos rendimientos (68), mientras que en cloroplastos se ha mostrado más eficaz el tratamiento de las membranas con tampones de baja fuerza iónica en presencia de agentes quelantes (63). En bacterias, por el contrario, existe un amplio abanico de procedimientos, no pudiéndose aplicar un proceso general para todos los microorganismos (69). No obstante, desde que Ishikawa y Lehninger, en 1962, lograran solubilizar la actividad ATPásica de las membranas de Micrococcus lysodeikticus mediante un "choque osmótico" con agua fría (132), un proceso similar tratando las membranas bacterianas con tampones de baja fuerza iónica en presencia o no de agentes quelantes, ha sido ampliamente utilizado para aislar la enzima F_1 -ATPasa de la membrana de numerosas especies bacterianas (véase Tabla V). Sin embargo este tipo de tratamiento no logra solubilizar la actividad ATPásica en ciertos microorganismos, como Rhodospirillum rubrum (105) o Mycoplasma laidlawii (133). También han sido descritos otros métodos -

TABLA IV

ESQUEMA DE LOS PROCESOS DE SOLUBILIZACIÓN DE F_1 -ATPasas
DE CELULAS EUCARIOTICAS

<u>Biomembrana</u>	<u>Fuente</u>	<u>Método de solubilización</u>	<u>Nº de cadenas polipeptídicas</u>	<u>Referencia</u>
Mitocondria	Corazón de buey	Sonicación	6	(77,81)
Mitocondria	Corazón de buey	Sonicación	5	(81-83)
Mitocondria	Corazón de buey	Sonicación	-	(84-86)
Mitocondria	Corazón de buey	Sonicación (pH 5,2)	3	(87)
Mitocondria	Corazón de buey	Incubación en presencia de losolípidos	-	(88)
Mitocondria	Corazón de buey	Tratamiento con cloroformo	3	(89)
Mitocondria	Corazón de cerdo	Tratamiento con cloroformo	5	(450)
Mitocondria	Hígado de rata	Sonicación	4	(90)
Mitocondria	Hígado de rata	Sonicación	3	(91)
Granulos cromafínicos	Medula adrenal bovina	Tratamiento con diclorometano en presencia de EDTA	3	(92,93)
Cloroplastos	Lechuga	Tratamiento con cloroformo	-	(94)
Cloroplastos	Espinacas	Tratamiento con EDTA	5	(95-97)
Cloroplastos	Espinacas	Tratamiento hipertónico con sacarosa 0,3 M	-	(98)
Mitocondria	Levadura (Saccharomyces cerevisiae)	Sonicación	5	(99-101,179)
Mitocondria	Levadura (Saccharomyces cerevisiae)	Tratamiento con cloroformo	5	(102)
Mitocondria	Levadura (Saccharomyces cerevisiae)	Tratamiento con cloroformo	6	(179)
Mitocondria	Levadura (Schizosaccharomyces pombe)	Sonicación	5	(103)

TABLA V
 ESQUEMA DE LOS PROCESOS DE SOLUBILIZACIÓN DE F₁-ATPasas DE CELULAS PROCARIOTICAS

Método de solubilización Origen	Sonicación en presencia de EDTA	Sonicación y suspensión en solución de baja fuerza iónica	Triton X-100	Cloroformo	EDTA	Suspensión de la bacteria en EDTA	Lavado de la bacteria iónica	Lavado con 0.03 M ⁺ + choque osmótico
Rhodospirillum rubrum	(104-106)							
Rhodospseudomonas sphaeroides	(108, 109)		(107)		(107)			
Mastigocladus laminosus				(110)				
Escherichia coli		(111)			(383)	(112)	(113)	
Forma L de Proteus			(114)		(114)		(114)	
Salmonella typhimurium						(115)		
Paracoccus denitrificans							(116)	
Bacillus megaterium								(117, 118)
Bacillus subtilis								(119)
Azobacter vinelandii						(120)		
Alcaligenes faecalis							(121, 122)	
Micrococcus lysodeikticus								(123, 124)
Micrococcus luteus								(125)
Mycobacterium phlei							(126)	
Streptococcus faecalis							(127, 128)	
Chromatium vinosum							(129)	
Bacillus stearothermophilus						(130)		
PS ₃					(131)			

de extracción empleando solventes orgánicos, como n-butanol (134) o cloroformo (89,94), y agentes caotrópicos (135), si bien en estos casos la composición en subunidades de los factores F_1 se suele presentar menos compleja y la capacidad de reasociación a la membrana disminuida. Pero a pesar de los distintos procesos de solubilización existentes, que pudieran sugerir una interacción F_1 -membrana de naturaleza fundamentalmente hidrofóbica y/o mediada por cationes divalentes (136), las principales diferencias en los diversos esquemas de extracción suelen residir en los tratamientos previos de las membranas.

Recientemente, Cox y col. (137) han descrito que la presencia del inhibidor de proteasas, p-aminobenzamidina (138), impide la solubilización de la F_1 -ATPasa de membranas de Escherichia coli al tratarlas con tampones de baja fuerza iónica en presencia de EDTA. De este modo, Cox y col. (137) sugieren que este tipo de tratamiento, empleado principalmente en cloroplastos y bacterias, expone el factor F_1 a la acción de una proteasa o activa una proteasa responsable en cualquier caso de la solubilización de la enzima F_1 -ATPasa. En este sentido se ha descrito la existencia de proteasas unidas a membrana en Bacillus subtilis (139) y Escherichia coli (140,192). A la luz de estos resultados, cabe pensar que la presencia de actividad proteásica en membranas puede afectar significativamente la solubilización de enzimas unidas a membrana, y presumiblemente alterar su estructura en subunidades (137). De esta manera debe tenerse gran cuidado en la interpretación de los resultados obtenidos en los estudios de relación estructura-función, especialmente cuando no se utilicen inhibidores de proteasas. Por otra parte, la presencia de p-aminobenzamidina no impide la extracción del componente F_1 por cloroformo (102, 137), obteniéndose en este caso una composición en subunidades más reducida (102, 137).

Los esquemas de purificación subsiguientes de la mayoría de las preparaciones de F_1 -ATPasa incluyen precipitación con sulfato amónico (141) o polietilenglicol (142), cromatografía de intercambio iónico —

(115), filtración en gel (112), electroforesis en gel de poliacrilamida (143) o cromatografía de afinidad (126).

Estas F_1 -ATPasas aisladas de organismos tan diversos - son solubles en tampones acuosos, poseen un complejo patrón de subunidades (véase apartado 1.7.3.) y se observan al microscopio electrónico como partículas esféricas de aproximadamente 90-100 Å de diámetro (123,128), que representan las mismas esféricas (144-146) originalmente observadas sobre la superficie de la membrana interna mitocondrial (147) y subsiguientemente sobre la membrana de cloroplasto (148) y la membrana bacteriana (57,71).

La mayoría de estos componentes F_1 se muestran lábiles al frío (mitocondrias, cloroplastos, levaduras, ciertas bacterias), - disociándose en subunidades a 0-4°C (113,149,150), si bien otros factores F_1 no participan de esta propiedad (R. rubrum, M. phlei, PS₃, M. lysodeikticus, B. stearothermophilus) (126,130,131,151,152). Como se podrá observar en los apartados siguientes, los factores F_1 poseen propiedades moleculares y funcionales muy similares y se -- presentan como un sistema mucho más asequible de abordar que el complejo H^+ -ATPasa (véase apartado 1.7.13.), en virtud de su re lativamente fácil solubilización por tratamientos suaves, sin necesidad de la acción de detergentes y sin producir desnaturalización de la - proteína. No obstante, las posibilidades para estudiar el mecanismo de la fosforilación oxidativa sobre este factor F_1 se hayan llimitadas por el hecho de que en su estado soluble pierde su capacidad de - sintetizar ATP y tan sólo manifiesta su actividad ATPásica hidrolí- zando el ATP en ADP y Pi. Sin embargo, esta enzima F_1 -ATPa- sa además de catalizar la hidrólisis de ATP, también cataliza su -- síntesis cuando se acopla correctamente a la cadena transportadora de electrones.

1.7.2. Peso molecular, forma y microheterogeneidad de la enzima purificada.

Todas las F_1 -ATPasas estudiadas exhiben pesos moleculares que oscilan en el rango de 320.000-400.000 dalton. En la Tabla VI se muestran los pesos moleculares de algunos factores F_1 purificados y las técnicas empleadas en su determinación. Como puede apreciarse se han descrito diferentes pesos moleculares para un mismo componente F_1 , así en el caso de CF_1 se han descrito valores desde 325.000 dalton (95) hasta 380.000 dalton (153), por lo que las diferencias entre pesos moleculares de enzimas procedentes de diferentes organismos se deben tomar con reservas. Varias pueden ser las causas de estas discrepancias, además de la obvia de reflejar propiedades intrínsecas de cada factor F_1 : a) uso de diferentes técnicas para la determinación de la talla molecular; b) disociación de algunos factores F_1 , producida incluso a 25°C (149,153,167), lo que daría lugar a una infraestimación del peso molecular; c) diferentes procesos de purificación utilizados que podrían causar la disociación de alguno de los componentes polipeptídicos débilmente unidos a la enzima.

Otra posible explicación de las diferencias encontradas en la determinación de pesos moleculares de estas enzimas, podría residir en los estudios llevados a cabo por Muller y col. (154), quienes indicaron la presencia de aproximadamente un 8% de material no proteico en F_1 mitocondrial de corazón de buey. Sin embargo, la naturaleza de este material no proteico no ha sido todavía establecida, desconociéndose si dicho material es una parte intrínseca de la enzima o un contaminante (154). En este contexto, estudios realizados por el grupo de Penefsky (74,83) pusieron de manifiesto que en la preparación F_1 mitocondrial de corazón de buey no se detectaba la presencia de glucosamina, galactosamina o ácidos grasos. Posteriores análisis de azúcares sobre este mismo factor F_1 y sus subunidades aisladas no revelaron la presencia de

TABLA VI

PESOS MOLECULARES DE F₁-ATPasas Y SUS SUBUNIDADES
(Células eucarióticas)

En esta tabla se representan los pesos moleculares de distintos F₁ y CF₁, así como de sus subunidades (x10⁻³ dalton). Las letras escritas entre paréntesis a continuación de cada valor de peso molecular indica la técnica utilizada para su determinación: (a), electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS; (b), equilibrio de sedimentación; (c), filtración en gel; (d), filtración en gel en presencia de cloruro de guanidina; (e), peso molecular mínimo calculado a partir del análisis de aminoácidos.

Origen	Referencia	F ₁ -ATPasa	α	β	γ	δ	ε	polipéptido
Mitocondria (Corazón de buy)	(81,165)		53(a)	50(a)	25(a)	12,5(a)	7,5(a)	10,5(a)
	(166)		54,6(b)	50,3(b)		17,5(b)		
	(166)		53,2(d)	50,8(d)	33(d)	17,3(d)	5,57(d)	
	(166)		59,4(a)	54(a)	33(a)	13,6(a)		
	(166)		53,3(a)	49(a)	33,16(a)	16,1(a)	5,85(e)	
	(167)		51(d)	51(d)	29(d)	20(d)	10(d)	
Mitocondria (Hígado de rat)	(90)		53(a)	53(a)	28(a)	12,5(a)	8,5(a)	
	(91,166)		62,5(a)	57(a)	36(a)	12,5(a)	7,5(a)	
	(169)							12,3(a)
Granulos cromafínicos	(93)		51(a)	50(a)	28(a)			
Ctioplasmas	(95)							
	(97)		62(a)	57(a)	38(a)	21(a)	14(a)	
	(170,171)		59(a)	56(a)	37(a)	17,5(a)	13(a)	
	(153)		51(d)	51(d)	37(d)	20(d)	14(d)	
Mitocondria de levadura (Saccharomyces cerevisiae)	(101)		58,5(a)	54(a)	38,5(a)	31(a)	12(a)	
	(102)		60(a)	54(a)	42(a)	32(a)	11,5(a)	
	(179)		58,5(a)	55(a)	34(a)	10(a)	8,6(a)	
Mitocondria de levadura (Schizosaccharomyces pombe)	(103)		61(a)	58(a)	32(a)	14(a)	8(a)	

TABLA VI (Continuación)

PESOS MOLECULARES DE F₁-ATPasas Y SUS SUBUNIDADES
(Células procarióticas)

En esta tabla se representan los pesos moleculares de distintas lecturas BF₁ así como de sus subunidades ($\times 10^{-3}$ dalton). Las letras escritas entre paréntesis a continuación de cada valor de peso molecular indica la técnica utilizada para su determinación: (a), electrolisis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS; (b), equilibrio de sedimentación; (c), irradiación en gel en presencia de cloruro de guanidina; (e), peso molecular mínimo calculado a irradación en gel; (d) filtración en gel en presencia de cloruro de guanidina; (e), peso molecular mínimo calculado a partir del análisis de aminoácidos; (l), dispersión de neutrones a bajo ángulo.

Origen	Referencia	F ₁ -ATPase	α	β	γ	δ	ϵ
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	(105, 106)	350 (b)	54 (a)	50 (a)	32 (a)	13 (a)	7,5 (a)
<i>Rhodospseudomonas</i> <i>spueroides</i>	(107)	300 (c)					
<i>Escherichia coli</i>	(112, 113)	375 (c)	56,75 (a)	51,75 (a)	30,45 (a)	20,95 (a)	11,5 (a)
	(153)		50 (d)	50 (d)	33 (d)		14 (d)
	(452)	315 (l)					
Forma L de <i>Proteus</i>	(114)	360 (c)	64 (a)	58 (a)			
<i>Bacillus megaterium</i>	(118)	379 (b)	68 (a)	65 (a)			
<i>Micrococcus luteus</i>	(172)		65 (a)	55 (a)	35 (a)		
<i>Bacillus subtilis</i>	(119)	315 (c)	59 (a)	57 (a)			
<i>Streptococcus faecalis</i>	(173, 204)	385 (b)	60 (a)	55 (a)	37 (a)	20 (a)	12 (a)
<i>Bacillus stercorarius</i>	(130)	280 (b)					
PS ₃	(131)	380 (c)	56 (a)	53 (a)	32 (a)	15,5 (a)	11 (a)
	(153)	380 (b)	54,6 (b)	51 (b)	30,2 (b)	21 (b)	
	(153)		54 (d)	52 (d)	33 (d)	20 (d)	16 (d)
	(153)					20,4 (a)	15,8 (a)

estos (68). No obstante, ha sido descrita la presencia de hidratos de carbono por el grupo de Muñoz en F_1 -ATPasa de M. lysodeikticus (155-157) y cloroplastos (155,156), si bien estos resultados no han podido ser confirmados por otros autores (68, 158, 159). En este contexto, recientemente Nalin y col. no pudieron identificar hidratos de carbono unidos covalentemente en los factores F_1 de mitocondrias de corazón de buey, de cloroplastos y de E. coli (160).

Los coeficientes de sedimentación de los factores F_1 se sitúan en $13 \pm 1S$ y los de difusión en $3,4 \pm 0,5 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \times \text{seg}^{-1}$ (62). El volumen específico parcial ha sido generalmente estimado a partir de la composición de aminoácidos en $0,735 \pm 0,05 \text{ ml} \times \text{g}^{-1}$ (95,161), guardando una estrecha relación con los valores de 0,73 y 0,74 medidos experimentalmente (161,162). Los valores del coeficiente friccional relativo, f/f_0 , de $1,3 \pm 0,2$ (62) estimados a partir del peso molecular y del coeficiente de sedimentación, indican que la molécula de F_1 -ATPasa presenta un cierto grado de asimetría.

Si bien, las preparaciones de F_1 -ATPasa descritas han sido consideradas homogéneas en velocidad y equilibrio de sedimentación, filtración en gel, electroforesis en gel de poliacrilamida, etc; se ha observado, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, en condiciones adecuadas, la presencia de al menos tres especies moleculares de migración muy próxima, no distinguibles por otros procedimientos, en F_1 -ATPasa de mitocondrias, cloroplastos, Alcaligenes faecalis y M. lysodeikticus, cuya proporción relativa depende del procedimiento de purificación, edad de la preparación, actividad específica y acción de sustrato o inhibidores (163,164). Esta microheterogeneidad electroforética puede ser concomitante con una microheterogeneidad funcional o bien puede pensarse en la existencia de estados funcionales diferentes para cada una de estas especies electroforéticas. En cualquier caso, es importante definir en las preparaciones de enzima la naturaleza de la microheterogeneidad para una serie dada de experimentos ya que la falta de dicha definición puede ser una -

causa de las discrepancias en los resultados obtenidos en diferentes laboratorios (163).

1.7.3. Subestructura molecular. Subunidades, estequiometría y papel de las mismas.

El tratamiento de los factores F_1 con agentes desnaturizantes, como SDS, urea y clorhidrato de guanidina, pone de manifiesto la gran similitud entre los patrones de subunidades de estas enzimas (véase Tabla VI). En este aspecto, se advierte una presencia constante de dos subunidades mayoritarias denominadas α y β , cuyos pesos moleculares son asimismo relativamente homogéneos dentro de los diferentes factores F_1 , oscilando entre $56,9 \pm 4,9$ kilodalton para α y $53,5 \pm 3,7$ kilodalton para β . Estos dos componentes representan un 80-90% de la masa de la enzima. Por lo que se refiere a las subunidades minoritarias, referidas como γ , δ y ϵ , la situación se encuentra menos definida ya que aunque todas las F_1 -ATPasas aisladas de mitocondrias y cloroplastos constan de estos tres componentes, si bien en proporción variable, los factores BF_1 presentan toda una gama de posibilidades. Se han aislado F_1 -ATPasas constituidas únicamente por α y β en *B. megaterium* (118), *B. subtilis* (119) y formas L de *Proteus* (114), mientras que en *R. rubrum* (105,106), *E. coli* (112,113) y bacteria termófila PS3 --- (131,153) los factores F_1 poseen además las tres subunidades minoritarias mencionadas. En otros BF_1 se aprecian estados intermedios en cuanto al número de subunidades (véase Tabla VI). Estas discrepancias pueden responder a propiedades intrínsecas de cada factor F_1 , a la técnica de análisis utilizada y/o al proceso de extracción y purificación del mismo (véase Resultados y Discusión). A pesar de la presencia variable de estas subunidades minoritarias en las diferentes F_1 -ATPasas, de las que representan un 10-20% de su masa, se les asignan pesos moleculares semejantes que suelen oscilar entre 30.000-35.000 dalton para

γ , 15.000-21.000 dalton para δ y 5.000-12.000 dalton para ϵ .Esta última subunidad ha sido identificada en diversos laboratorios como el inhibidor natural de la actividad ATPásica (158,166,171), inicialmente -- descrito por Pullman y Monroy (159), asignando a dicha subunidad una función reguladora en el complejo de ATPasa, cuando éste se encuentra en su medio fisiológico, con el fin de prevenir un gasto inútil de ATP-- (174), ya que inhibe la actividad hidrolítica sobre el ATP sin afectar al proceso de la fosforilación (175). Sin embargo, otros investigadores -- han hecho recaer dicha función en una sexta subunidad (67, 176) de -- peso molecular 10.000-12.000 daltons.

Las diferencias en las tallas moleculares descritas para las subunidades de los distintos factores F_1 (Tabla VI), pueden representar diferencias reales entre los factores F_1 y/o ser un reflejo de la aplica-- ción de diferentes técnicas para su determinación. En este aspecto ca-- be resaltar que la mayoría de las determinaciones de pesos moleculares se han llevado a cabo por electroforesis en gel de poliacrilamida en pre-- sencia de SDS, lo que conlleva serias limitaciones (177). Por ejem-- plo, la presencia de hidrato de carbono en la proteína reduciría la pro-- porción de detergente unido a la cadena polipeptídica (177,178).

Una gran controversia existe en la actualidad en lo que se -- refiere a la estequiometría en subunidades de este tipo de enzimas. Limi-- tándose fundamentalmente a las subunidades α , β y γ de la enzima, ya que es difícil determinar el número exacto de copias de δ y ϵ presentes, de-- bido a su fácil disociación del conjunto de la enzima (véase Discusión), se puede decir que la controversia está centrada en dos tipos de este-- quiometría : $\alpha_3 \beta_3 \gamma_{162}$ y $\alpha_2 \beta_2 \gamma_{162}$. Quizá el principal motivo de esta falta de acuerdo radica en la carencia de pesos moleculares fia-- bles para la enzima F_1 -ATPasa y sus subunidades, ya que el valor -- máximo esperado para una estequiometría del tipo $\alpha_2 \beta_2$ sería apro-- ximadamente de 340000 dalton , mientras que para la opción $\alpha_3 \beta_3$ sería de unos 390.000 dalton o incluso algo superior si se tuviesen va-- rias copias de las subunidades minoritarias en la molécula. En la Tabla

VII, se encuentran recopilados varios trabajos que apoyan una u otra estequiometría según el método de estudio elegido. El fracaso al intentar establecer un tipo de estequiometría no ya en los factores F_1 de diferentes fuentes, sino en la misma F_1 -ATPasa de un mismo origen, refleja en parte las considerables dificultades técnicas originadas por la tendencia de estas moléculas a disociarse y degradarse.

Solamente, en el caso del factor CF_1 parece existir una gran concordancia de criterios, asignándosele una composición en subunidades de $\alpha_2 \beta_2 \gamma \delta \epsilon_2$ (186), aunque observaciones recientes (189,190) indican que la subunidad δ y posiblemente la subunidad ϵ pueden disociarse fácilmente de la enzima durante el aislamiento de CF_1 de la membrana, lo que parece ser una característica de todos los factores F_1 . Si los pesos moleculares de las subunidades y del factor CF_1 calculados son correctos, esta estequiometría del tipo $\alpha_2 \beta_2$ se correspondería con bastante aproximación con el peso molecular de 325.000 dalton, determinado por ultracentrifugación (95) y confirmado posteriormente por la aplicación de rayos X por dispersión a bajo ángulo (191). Sin embargo, es posible que las preparaciones utilizadas en estos experimentos no correspondieran a una enzima íntegra, ya que recientemente el grupo de Kagawa (153,193) ha encontrado un valor de talla molecular de 380.000 dalton para una preparación de CF_1 en tampón conteniendo metanol (161) con el fin de prevenir su disociación. Este mismo grupo de investigadores (153) basándose en la posible disociación de los factores F_1 mitocondrial, de cloroplastos y de bacterias mesófilas, ha reinvestigado las tallas moleculares de los mismos utilizando tampones estabilizantes que previenen la disociación de estas enzimas mesófilas (161), encontrando en todos ellos un peso molecular próximo a 380.000-390.000 dalton (153), lo que apoyaría una estequiometría universal del tipo $\alpha_3 \beta_3 \gamma_x \delta_x \epsilon_x$. Probablemente los resultados más fiables sean los obtenidos con el factor F_1 de la bacteria termófila PS3 (denominado TF_1). Este factor TF_1 presenta notables peculiaridades, no solamente es estable al calor (131), -

TABLA VII
 CONTROVERSA SOBRE LA ESTEQUIOMETRIA EN SUBUNIDADES DE LAS MO-
 LECULAS DE F₁-ATPasa.

Método de análisis	Modelo $\alpha_2 \beta_2$		Modelo $\alpha_3 \beta_3$	
	F ₁	CF ₁ BF ₁	F ₁ CF ₁	BF ₁
Intensidad de tinción en gel			(168,179)	(114,319)
Subunidades marcadas con ¹⁴ C		(56)		(57,115)
Contenido en -SH por subunidad	(180)		(471)	(181)
Fijación de ligandos	(182,183)		(184)	
Agentes entrecruzantes	(185)	(186)	(187)	
Reconstitución		(142)		(365)
Cristalografía	(451)			(188)

sino que también lo es, en gran medida, frente a todos los agentes disociantes ensayados (57). Esta energía extra de estabilización es proporcionada por la existencia de numerosos puentes salinos intra e intercatenarios (194,195) sin perturbación de la estructura terciaria o cuaternaria esencial para la actividad enzimática. La estequiometría de este factor TF_1 ha sido analizada extensivamente por Kagawa y su grupo (57, 181), quienes concluyen que la composición en subunidades de este factor TF_1 es del tipo $\alpha_3 \beta_3$, basándose en tres hechos experimentales: a) análisis de la razón de subunidades en TF_1 marcado radiactivamente (57,131), b) contenido de cisteína (3SH/ TF_1 y solamente 1SH/subunidad α) (181), c) determinación de pesos moleculares de las distintas subunidades por cuatro procedimientos diferentes (equilibrio de sedimentación a baja y alta velocidad, análisis de aminoácidos y filtración en gel en presencia de cloruro de guanidina) y del factor TF_1 por equilibrio de sedimentación (153).

Un punto de suma importancia a la hora de resolver la discrepancia existente entre los distintos tipos de estequiometría para los factores F_1 , consiste en reexaminar las propiedades de estos factores por un procedimiento en el cual la disociación de sus subunidades no tenga lugar. Mientras tanto y hasta que no se logre un acuerdo en cuanto a la estequiometría, no puede excluirse la posibilidad de que diferentes F_1 -ATPasas posean diferentes estequiometrías en subunidades.

La funcionalidad de las subunidades de estas enzimas F_1 -ATPasas ha sido estudiada por experimentos con anticuerpos obtenidos frente a cada una de las subunidades (196,197), por digestión proteolítica controlada de la enzima (97,172,198), por reconstitución de enzimas parcialmente disociadas (131, 142) y por reconstitución de la molécula de F_1 -ATPasa a partir de sus subunidades aisladas (176,199). Estos estudios, si bien no han permitido todavía obtener un esquema generalizado de la funcionalidad de las diversas subunidades, han puesto de manifiesto que la subunidad β parece ser esencial para que la hidrólisis de

ATP se lleve a efecto (176,200), llegándose a obtener enzimas funcionalmente activas que contienen tan sólo las dos subunidades de mayor peso molecular: α y β (134,172,198,200,201). No obstante, en otros casos, dicho complejo no resulta poseer actividad ATPásica (176). También existe bastante información que hace referencia a la necesidad de la presencia de la subunidad δ para la unión de F_1 -ATPasa a la membrana (141,189,202-205). La subunidad ϵ ha sido identificada por diversos investigadores como el inhibidor natural de la F_1 -ATPasa (158,166,171), aunque como se mencionó anteriormente existe cierta controversia en este punto (67,176,206). También se ha asignado a la subunidad ϵ una participación esencial en la unión de la enzima a membrana en E. coli (207). Con respecto a la subunidad α se la ha reconocido un posible papel en la función catalítica (115,134,170,172,200,201), así como una participación en la unión de la F_1 -ATPasa a la membrana en el caso de Streptococcus faecalis (205). En cuanto a la subunidad γ , su papel puede ser el más discutido, habiéndosele asignado distintas participaciones en las propiedades estructurales o funcionales de la enzima (158,199,201,208). Recientemente, Futai y Kanazawa han realizado una revisión en la que se tratan con minuciosidad todos los aspectos relativos a la funcionalidad de las distintas subunidades de las ATPasas translocadoras de protones (73).

1.7.4. Composición química

Las composiciones de aminoácidos de los distintos factores F_1 es muy semejante. Muestran una hidrofobicidad moderada, ausencia aparente de triptófeno y un contenido relativamente elevado de aminoácidos dicarboxílicos (Tabla VIII).

Tanto la F_1 -ATPasa mitocondrial como de cloroplasto contienen un total de 12 restos de cisteína por molécula- 8 grupos SH, de los que únicamente dos pueden titularse en la enzima nativa, y 4 grupos más de cisteína formando dos puentes disulfuro (209,210). Las F_1 -ATP

TABLA VIII

COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE DISTINTAS ENZIMAS F₁-ATPasas

Aminoácido	Mitocondria		Cloroplasto		Bacteria			
	Hígado de rata (91)	Corazón de buey (166)	Levadura (471)	Espinacas (95)	<i>S. faecalis</i> (173)	<i>M. lysodeikticus</i> (320)	<i>B. megaterium</i> (118)	<i>B. stearothermophilus</i> (131)
Asp	8,9	7,9	8,8	7,6	10,0	9,6	8,5	9,2
Thr	5,5	5,4	5,8	7,2	6,7	6,6	5,9	5,3
Ser	5,8	5,0	6,5	6,0	6,3	5,0	5,6	4,7
Glu	11,4	12,5	13,3	13,9	13,0	12,1	13,4	12,5
Pro	4,7	4,3	5,5	4,1	3,9	3,0	4,3	4,7
Gly	9,3	9,7	9,8	8,4	8,7	10,2	9,0	7,7
Ala	9,8	10,0	9,9	9,1	8,4	11,3	8,8	9,0
Val	8,8	8,2	6,9	7,2	6,8	9,5	8,9	8,0
Met	2,0	1,9	1,0	2,8	2,3	1,5	2,0	2,4
Cys	0,3	0,4	0,2	0,4	0,3	-	0,1	-
Ile	7,0	7,2	5,7	6,8	6,2	5,1	6,3	7,9
Leu	8,5	9,3	9,7	9,5	9,3	9,8	9,3	8,1
Tyr	2,7	2,5	2,3	2,8	3,3	2,2	2,7	2,8
Phe	3,0	2,9	3,3	2,8	3,1	2,8	3,3	3,8
Trp	-	-	-	-	-	-	0,4	-
Lys	5,9	6,1	5,8	4,4	6,1	3,8	5,1	5,6
His	1,7	1,4	1,5	0,8	1,7	1,9	1,6	2,4
Arg	4,7	5,4	4,5	6,3	4,5	6,6	5,6	5,9
Arg+Glu+Lys+Ser	43,9	43,7	46,6	46,2	48,3	45,5	45,7	45,5
Asp+Thr+His								
Asp+Glu	1,65	1,58	1,91	1,87	1,87	1,78	1,78	1,57
Lys+Arg+His								

Los valores se expresan en mol%.

asas bacterianas parecen poseer un contenido en grupos SH mucho menor (181,211). Otra característica de estos factores F_1 , radica en el hecho de que sus grupos N terminales se encuentran aparentemente bloqueados (95).

También se han determinado las composiciones de aminoácidos para las diferentes subunidades aisladas de mitocondrias, cloroplastos y bacterias (52), observándose una cierta analogía: α , β y γ , parecen fundamentalmente ácidas, mientras que δ y ϵ parecen ser básicas. Sin embargo, existen ciertas discrepancias sobre la composición química de algunas subunidades. Particularmente notable es el contraste de resultados descritos para la subunidad γ de F_1 mitocondrial de corazón de buey; mientras que Knowles y Penefsky (166) detectan 18 residuos de prolina/mol, Brooks y Senior (212) no encuentran cantidades apreciables.

1.7.5. Latencia.

El factor F_1 soluble o unido a membrana muestra una actividad ATPásica latente que puede ser estimulada por exposición al calor (213), a tripsina (213), ditiotreitol (214) o urea. Parece muy probable que esta activación sea una consecuencia de la disociación de un péptido de bajo peso molecular que específicamente inhibe la actividad hidrolítica de F_1 sobre el ATP sin afectar al proceso de la fosforilación oxidativa cuando el factor F_1 se encuentra unido a la membrana. Varios laboratorios han aislado estos péptidos inhibidores en mitocondrias de corazón de buey (77, 159, 206), hígado de rata (169, 215) y levadura (216-218) - así como en cloroplastos (171) y E. coli (219, 220). Estos inhibidores naturales de F_1 -ATPasa presentan propiedades comunes, como estabilidad al calor y gran sensibilidad a tripsina (169, 171, 220), pero también se observan numerosas diferencias (distinta composición de aminoácidos, talla molecular e interacción con la enzima). Por otra parte, dichos inhi

bidores manifiestan una clara especificidad hacia sus respectivos factores F_1 (171,220), mientras que el componente TN-I de la troponina, inhibidor de la actividad ATPásica de la actomiosina de músculo, inhibe las F_1 -ATPasas de mitocondria y cloroplasto (221).

La inhibición de la actividad hidrolítica por estos peptidos inhibidores es del tipo "no competitivo" respecto al ATP. De hecho, la adición de ATP facilita la interacción del inhibidor con F_1 , mientras que la energización de la membrana, inducida por la respiración disminuye la afinidad del inhibidor por F_1 (77, 175,222,223). Por otra parte y como ya ha sido mencionado con anterioridad, se han descrito resultados contradictorios sobre si este inhibidor se corresponde con una de las cinco subunidades de F_1 o representa una sexta subunidad unida debilmente a la enzima (83,165,166). Hasta el momento, tan sólo se ha identificado este inhibidor con la subunidad ξ en los factores F_1 de cloroplastos (171) y de *E. coli* (220).

Las diferencias observadas en la latencia de la actividad ATPásica de los factores F_1 procedentes de distintos orígenes son probablemente una consecuencia de las diferencias existentes en la facilidad con la que el inhibidor puede ser disociado del factor de acoplamiento.

1.7.6. Propiedades catalíticas del factor F_1 .

1.7.6.1. Sustrato, requerimientos iónicos y parámetros cinéticos

Como se ha mencionado anteriormente, las preparaciones de F_1 -ATPasa purificadas pierden la capacidad de sintetizar ATP, manifestando solamente una actividad ATPásica de hidrólisis de ATP. Esta actividad hidrolítica de la enzima unida a membrana o soluble presenta un requerimiento absoluto de cationes para su actividad, especialmente calcio y magnesio, observándose cierto antagonismo entre ciertos iones metálicos divalentes en determinados factores F_1 . Así por ejemplo, se ha descrito que la presencia de iones Mg^{2+} , pero no de Ca^{2+} , estimula la actividad

hidrolítica en la F_1 -ATPasa de *S. faecalis* (127), mientras que la acción inversa tiene lugar en la F_1 -ATPasa de *B. subtilis* (119). Una primera cuestión sobre la que existe cierta discrepancia radica en conocer cuál es el verdadero sustrato de la enzima. Selwyn (224) concluyó que $Mg \cdot ATP$ era el sustrato de la F_1 -ATPasa mitocondrial, al estudiar la dependencia de la velocidad de reacción enzimática con las concentraciones de Mg^{2+} y ATP libres. Sin embargo, Hilborn y Hammes (225) opinan que ATP y $Mg \cdot ATP$ se unen en el sitio activo de la enzima con aproximadamente la misma afinidad. A esta falta de acuerdo sobre cuál es el sustrato de la enzima, hay que añadir otros factores adicionales que confieren una gran complejidad a los estudios realizados hasta el momento sobre la cinética de hidrólisis y que pueden describirse brevemente del siguiente modo: a) como se verá más adelante, la enzima posee sitios de unión de ATP y catión divalente que no parecen estar implicados directamente en la hidrólisis de ATP, desconociéndose cuál es su influencia sobre la velocidad de hidrólisis; b) el producto de hidrólisis, ADP, es un inhibidor potente de la reacción; c) la enzima probablemente posee más de un sitio activo de hidrólisis, pudiendo ser distintas las especificidades de estos sitios.

Todas estas limitaciones han tenido como consecuencia que los estudios cinéticos se hayan realizado sólo parcialmente, empleándose en general concentraciones variables de ATP y catión, conservando constante la relación molar entre éstos. Así pues, los valores de K_m para ATP descritos en la bibliografía presentan discrepancias apreciables, incluso para F_1 -ATPasas de la misma procedencia, que oscilan entre 0,25 mM y 2,5 mM dependiendo del origen y del método empleado para su determinación (111, 128, 200, 222, 226, 227).

Aunque la mayoría de los investigadores han obtenido cinéticas típicamente michaelianas para la hidrólisis de ATP catalizada tanto por la enzima purificada como la unida a membrana, tampoco en este punto exis

te un acuerdo completo. Ebel (228) encontró para F_1 de hígado de rata, que las representaciones doble recíprocas de los datos de velocidad inicial, a concentraciones variables de ATP (manteniendo constante la relación ATP: Mg^{2+}), eran curvadas en ausencia de aniones activadores (véase apartado 1.7.7.3.), con coeficientes de Hill de 0,5, lo que podría sugerir la existencia de cooperatividad negativa. En presencia de aniones activadores no se observó ninguna curvatura en las gráficas de doble recíprocas. Por su parte Rossi y col (289) encontraron para la F_1 -ATPasa unida a membrana de mitocondria de corazón de buey gráficas trifásicas al representar la velocidad inicial frente a la concentración de ATP, que se correspondían con valores de K_m (ATP) de 12,5; 75 y 400 μM . Estos resultados dan de nuevo idea de la complejidad experimental del sistema.

Por otra parte, las actividades específicas descritas para diversas preparaciones de F_1 -ATPasa varían en gran medida, dependiendo del método de purificación y organismo utilizados, así como de la latencia y proceso de activación de la enzima. De este modo, es difícil comparar datos cinéticos obtenidos con preparaciones de F_1 que presentan actividades específicas muy dispares con la complicación adicional de la existencia de diferentes formas de la enzima en una misma preparación (véase apartado 1.7.2.).

1.7.6.2. Actividad en ausencia de iones metálicos.

Preparaciones de F_1 -ATPasa mitocondrial (232-234) y bacteriana (*S. faecalis*, *M. lysodaihticus* y *A. faecalis*) (152, 235, 236) catalizan bajas velocidades de hidrólisis de ATP sin añadir cationes divalentes. Las bajas actividades hidrolíticas han sido detectadas, en algunos casos, cuando se intentaba medir la fijación de ATP a la enzima (232, 233, 235). Estos datos han pasado inadvertidos para numerosos investigadores, sin embargo son de gran interés para establecer si la hidrólisis tiene lugar en un sitio separado del centro activado normalmente por

la adición de cationes.

1.7.6.3. Especificidad para nucleosidos trifosfato.

Los factores F_1 hidrolizan distintos nucleosidos trifosfato en el orden $ATP \cong ITP > GTP > UTP > CTP$ (55,62), aunque se han descrito algunas diferencias respecto al orden de magnitud de la actividad según el origen de cada factor F_1 y de su estado, soluble o asociado a membranas (52,229). De los datos actualmente disponibles se pueden conocer algunos aspectos de la estructura del nucleotido que pueden afectar a las propiedades catalíticas de la enzima. En principio, el grupo amino de la posición 6 en el anillo de purina no parece ser un requisito imprescindible, ya que las velocidades de hidrólisis de ITP y GTP son comparables a aquella de ATP (230). La inserción de un grupo eteno en esta parte de la molécula como en ϵ -ATP (1-N⁶-etenoadenosín-5'-trifosfato) no interfiere seriamente la actividad hidrolítica de la enzima (68). Sin embargo, la inserción de un átomo de oxígeno sobre el N-1 del anillo de purina disminuye la velocidad de hidrólisis (68). Ciertas alteraciones en el anillo de ribosa son toleradas por la enzima, hidrolizando deoxi-ATP (68) y arilazido- β -alanil ATP (231). No obstante, análogos de ATP con cadenas hidrocarbonadas sustituyendo al anillo de ribosa, no pueden ser hidrolizados por la enzima, inhibiéndose en gran medida la hidrólisis de ATP cuando la longitud de la cadena es de 3 ó 4 grupos metileno (55). Este hecho podría explicarse si se supone que el nucleotido objeto de hidrólisis interacciona con el factor F_1 en una conformación tensa. Así el cambio de un anillo de ribosa, más bien rígido, por una cadena hidrocarbonada de 3 ó 4 grupos metileno permite un elevado grado de flexibilidad a la molécula impidiendo su hidrólisis (55).

1.7.6.4. Grupos funcionales del sitio activo.

Poco se conoce de los restos de aminoácidos esenciales para la función catalítica de las F_1 -ATPasas, habiéndose llevado a cabo la -

mayoría de estos estudios mediante modificación química de ciertos grupos. El término de aminoácido "esencial" presenta, en este tipo de estudios, una definición meramente operacional, en el sentido de que su modificación es concomitante con una pérdida de actividad. Así, es difícil distinguir si el residuo modificado forma parte del sitio activo de la enzima, aun cuando se observe una cierta protección por parte de los sustratos, o si al modificarse químicamente impide un cambio conformacional necesario para la realización del proceso catalítico o provoca una distinta disposición de alguno de los grupos funcionalmente activos.

Senior ha demostrado la ausencia de grupos sulfhidrilos en el sitio de unión del sustrato para la F_1 -ATPasa mitocondrial (209), mientras que Ferguson y col. (237) han descrito que la modificación de un único resto de tirosina con 7-cloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3 diazol (NBD-Cl) producía una inactivación total de la molécula, lo que sugería la presencia de un único sitio activo o la existencia de interacciones cooperativas entre subunidades como una parte integral del mecanismo catalítico.

Experimentos con los reactivos específicos 2,3-butanodiona y fenilgloxal indicaron la posible presencia de restos de arginina en el sitio activo de la enzima mitocondrial (238-241). La actividad hidrolítica también era inhibida irreversiblemente por la acción del piridoxal fosfato (290-293). Estos resultados parecen generalizar la presencia de residuos de arginina y/o lisina en los sitios de fijación de ligando a la enzima cuando se trata de un ligando aniónico.

Por otra parte, la inhibición de la F_1 -ATPasa por 1-etoxicarboxil-2-etoxi-1,2 dihidroquinoleina (EEDQ) (242) y carbodiimidas (243) parece deberse a una modificación química de grupos carboxidos en la molécula.

Estudios recientes del efecto de ATP, ADP, y P_i sobre el marcaje e inactivación por distintos reactivos específicos de restos de aminoácidos (244, 245) han indicado que restos de Tyr, Arg, Lys y

Glu o Asp se encuentran localizados en el sitio catalítico de la enzima, - habiéndose propuesto tentativamente un mecanismo para la hidrólisis y - síntesis catalíticas de ATP en el que se describe cómo participarían dichos residuos (245).

1.7.7. Inhibidores y activadores de la actividad hidrolítica de los factores

F_1 .

1.7.7.1. Nucleótidos de adenina y análogos.

El nucleosido difosfato ADP ejerce una potente inhibición por producto en la actividad ATPásica de los factores F_1 , habiéndose descrito una gran variedad de valores de K_i (62,68) para las mismas u - homólogas preparaciones de F_1 -ATPasa, lo que podría reflejar diferentes estados de la enzima o diferencias en las condiciones experimentales de ensayo. Por otra parte, el incremento de los valores de K_i (ADP), por ciertos aniones (246), podría explicar alguna de las aparentes discrepancias.

El análogo de ATP, AMP-PNP, inhibe competitivamente la hidrólisis de ATP en la enzima soluble (233,247) y unida a membrana (233). De manera similar al inhibidor natural de ATPasa (véase apartado 1.7.5.), el AMP-PNP, cuyas propiedades se recopilan junto con las de otros análogos de ATP en una revisión de Yount (248), inhibe la actividad ATPásica pero no afecta a la fosforilación, es decir, a la síntesis de ATP (233,249). Este comportamiento podría ser el reflejo de la existencia de dos sitios catalíticos separados en F_1 -ATPasa, para la síntesis e hidrólisis de ATP. El hecho de que el AMP-PNP no pueda desplazar todo el $[^3H]$ ADP unido a F_1 -ATPasa, incluso a altas concentraciones del análogo (233,249), pudiera sugerir que éste es incapaz de interaccionar con el sitio de unión del ADP, particularmente durante la fosforilación oxidativa.

Otro inhibidor, quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona), exhibe una acción similar al AMP-PNP, inhibiendo la actividad hidrolítica de la F_1 -ATPasa soluble y unida a membrana, sin afectar a la fosforilación oxidativa en partículas submitocondriales (250).

1.7.7.2. Inhibidores de la fosforilación oxidativa.

La fosforilación oxidativa es inhibida por DCCD, aurovertina B, cloruro de tri-n-butil estaño, venturicidina y azida (62). Estas sustancias también inhiben a la F_1 -ATPasa asociada a membrana (62). En mitocondrias además lo son por oligomicina y rutamicina (52). De estos inhibidores tan sólo el antibiótico aurovertina B y azida (60,251) inhiben de forma no competitiva la actividad ATPásica del factor F_1 soluble, si bien esta inhibición no es total (62). Estudios de fijación han puesto de manifiesto que aurovertina se une a la subunidad β del factor F_1 de corazón de buey (182), de levadura (183,252) y de E.coli (253). Espegacina, un alcaloide dihidroindólico, parece actuar de forma similar a aurovertina (254).

1.7.7.3. Aniones.

Una apreciable activación de la actividad ATPásica tanto en la F_1 -ATPasa mitocondrial soluble como unida a membranas se observa en presencia de ciertos oxianiones (bicarbonato, bisulfito, selenito, sulfito, borato, maleato, tereftalato, dicromato, cromato, pirofosfato) (75,90,246,255,256). La estimulación de la enzima adquiere gran interés a causa de su posible significado fisiológico, pudiendo constituir un control metabólico en la célula. Se ha especulado con la posibilidad de que esta activación fuese debida a una participación de los aniones (bases de Lewis) como catalizadores de tipo básico (62) o a una inducción de cambios conformacionales (68). Moyle y Mitchell (256) han sugerido un cambio conformacional más específico inducido por aniones que implicarían transiciones entre formas activas e inactivas de F_1 -ATPasa. Por otra parte, se ha --

observado que los aniones activadores no muestran ningún efecto sobre la K_m (ATP) de la F_1 -ATPasa asociada a la membrana, pero disminuyen la K_m aparente en la forma soluble de la enzima (62).

El agente desocoplante 2,4-dinitrofenol activa también la F_1 -ATPasa mitocondrial soluble (84,99,255,257), habiéndose puesto de manifiesto la interacción directa del agente desacoplante [^{14}C] 2,4-dinitrofenol, con el factor F_1 mitocondrial (256).

1.7.8. Fijación de ligandos.

1.7.8.1. Nucleótidos de adenina.

Ya que los factores F_1 se requieren en la formación catalítica de ATP, deben de contener uno o más sitios de unión para el ADP. Por otra parte, al hidrolizar el ATP poseeran al menos un sitio de unión para el ATP. Se han detectado múltiples sitios de unión para los nucleótidos de adenina, pero la relación de estos sitios con la síntesis e hidrólisis de ATP está por establecer. Aunque se ha aceptado generalmente que un mismo sitio en la enzima fuese el responsable de la síntesis e hidrólisis de ATP, se ha mostrado en los últimos años cierta evidencia que sugiere la existencia de dos centros distintos para realizar ambas funciones (55,64,258).

Además de los sitios fosforilante e hidrolítico donde se requerirían recambios rápidos de nucleótidos, los factores F_1 aislados poseen sitios donde los nucleótidos interaccionan con alta afinidad, de forma que en todos los factores F_1 en los que se ha estudiado, se han encontrado nucleótidos fuertemente fijados. Estos se definen operacionalmente como aquellos nucleótidos que permanecen unidos a la enzima cuando se han eliminado de la solución todos los nucleótidos libres detectados (259). Así, Harris y col. (260) encontraron que el factor F_1 aislado de corazón de buey contenía cinco moles de nucleótido de adenina fuertemente unidos por mol de enzima (3 moles de ATP y 2 moles de ADP), los cuales se disociaban durante inactivación en frío de la enzima (260,261). Posteriores

Estudios llevaron a Harris y col. (262) a revisar el número de nucleótidos de adenina unidos-2,2 moles ATP/mol F_1 y 1,3 moles ADP/mol F_1 . Sin embargo Garret y Penefsky (263) pusieron de manifiesto la existencia de al menos cinco sitios de alta afinidad al lograr unir casi 5 moles del análogo de ATP, AMP-PNP, por mol de enzima, a la que -- previamente se había desprovisto de sus nucleótidos fijados por cromatografía de la proteína en columnas de Sephadex equilibradas con glicerol al 50%. Ya que la enzima utilizada en estos experimentos contenía 2 moles ADP y 1 mol ATP/mol F_1 , antes de someterla al tratamiento con glicerol, Garret y Penefsky concluyeron que debían existir en la molécula de proteína cinco sitios de fijación para los nucleótidos, tres de alta afinidad y dos reversibles (263).

También se ha puesto de manifiesto la existencia de dos sitios de fijación de nucleótidos en preparaciones de F_1 de hígado de rata (249) así como de nucleótidos fijados aunque a niveles menores que su homóloga de corazón de buey (< 2 mol/mol F_1) (62).

De igual forma que en los factores F_1 mitocondriales, los factores CF_1 y BF_1 también contienen nucleótidos fuertemente unidos, oscilando los niveles de ATP entre 0-2,0 mol/mol enzima y los de ADP entre 0,7 y 2,3 mol/mol enzima (64,69,264). Las diferencias en el número de nucleótidos fijados a la enzima pueden estar relacionadas con -- diferencias básicas entre las diferentes F_1 -ATPasas y/o con diferencias en los métodos de separación y purificación de las proteínas.

1.7.8.2. Fosfato.

Se ha prestado poca atención a la fijación de fosfato a la --- F_1 -ATPasa, a pesar de que al participar esta enzima activamente en la síntesis de ATP durante la fosforilación oxidativa, parecería razonable esperar que la enzima exhibiera sitios de unión para el P_i . Sin embargo este tipo de estudios se ha limitado al factor F_1 mitocondrial de co

razón de buey (265,266), encontrándose un sitio de alta afinidad para el Pi ($K_D = 80 \mu M$), aunque en presencia de Mn^{2+} , SO_4^{2-} y aurovertina se observaba la presencia de un segundo sitio de fijación sobre la molécula. El hecho de que la unión de Pi a la enzima sea modulado por activadores e inhibidores específicos de la actividad ATPásica y la fosforilación oxidativa apoya la idea de que el sitio de alta afinidad descrito se corresponde con el sitio de unión del Pi en el proceso de la fosforilación oxidativa (266).

1.7.8.3. Aurovertina.

Aurovertina es un potente inhibidor de la fosforilación oxidativa (267) que interacciona directamente con el factor F_1 formando un complejo fluorescente (251). El factor F_1 mitocondrial de corazón de buey exhibe dos sitios de unión para el antibiótico aurovertina (154,268), que parecen estar localizados sobre la subunidad β (182).

1.7.8.4. Aniones.

Como se mencionó en el apartado 1.7.7.3. una gran variedad de aniones puede interaccionar con las F_1 -ATPasas. Sin embargo, es probable que la afinidad de la proteína por los aniones sea baja como parece ocurrir para el sulfato (68).

La unión de ciertos agentes desacoplantes al factor F_1 puede considerarse como un caso especial de unión de aniones. Se ha descrito la interacción de 1-2 moléculas de 2,4-dinitrofenol por mol de F_1 -ATPasa mitocondrial de corazón de buey (257). Un análogo de 2,4-dinitrofenol, 2-azido-4-nitrofenol, se une a la subunidad α del factor F_1 (269).

1.7.9. Sitios catalíticos

El conocimiento del número de sitios catalíticos presentes en la F_1 -ATPasa es de capital importancia para cualquier consideración de un posible mecanismo de acción de la enzima. Como se mencionó en el apartado 1.7.6.4., la observación de que el compuesto NBD-Cl reacciona con un único grupo de tirosina de la subunidad β produciendo una inhibición total de la actividad ATPásica (237,270), sugería la posible presencia de un único sitio catalítico en la enzima soluble (237). Sin embargo, la presencia de más de una subunidad β en la molécula de enzima y la aparente ausencia de heterogeneidad en las preparaciones de dicha subunidad (83,168,212), parece sugerir una asimetría en las subunidades β provocada probablemente por cambios conformacionales producidos por la interacción con nucleótidos de adenina (270). Así, la pérdida total de actividad podía explicarse en términos de interacciones esenciales entre subunidades, de modo que la modificación de un aminoácido esencial en una subunidad impide la manifestación de actividad enzimática en cualquier otra subunidad (270). En este contexto, es conveniente destacar el hecho de que la fijación de aurovertina a F_1 -ATPasa mitocondrial no es estequiométrica con el número de subunidades, observándose dos sitios en presencia de ATP y uno en presencia de ADP o Mg^{2+} (268), lo que puede indicar la importancia de las interacciones entre las subunidades y la existencia de asimetría en la enzima inducida por la interacción con ligandos.

Como ya se ha descrito en el apartado 1.7.8.1., existen cinco sitios de fijación de nucleótidos de adenina sobre F_1 mitocondrial de corazón de buey (263), tres de los cuales son de alta afinidad que se intercambian con nucleótidos exógenos muy lentamente, incluso durante la hidrólisis de ATP, por lo que no parecen participar directamente en el paso catalítico (264).

Medidas de inhibición de CF_1 por NBD-Cl y de fijación de nu

cleotidos de adenina condujeron a Cantley y Hammes (271) a concluir - que, de los tres sitios de fijación encontrados para los nucleotidos solamente uno de ellos se correspondía con el sitio catalítico.

Estudios de fijación de nucleotidos en el factor F_1 de Alcaligenes faecalis, llevaron a Adofsen y Moudrianakis a sugerir la presencia de dos tipos de sitios de fijación tales que la interacción de ATP en uno de ellos provocaría un cambio conformacional en la enzima que facilitaría la expulsión de los productos de hidrólisis ADP y Pi en un segundo sitio (272). Estos autores postulan sugestivamente un mecanismo "flip-flop" en el que la enzima oscilaría entre dos estados conformacionales alternativos pero catalíticamente equivalentes (272).

En este contexto, Kozlov y Skulachev (55) postulan la presencia de dos sitios de fijación para nucleotidos de adenina partícipes en el proceso catalítico, pero solamente uno de ellos sería propiamente catalítico.

En los últimos seis años se ha mostrado cierta evidencia experimental apoyando la existencia de interacciones cooperativas en esta enzima (80, 255, 273-275). Sin embargo, como en tantas otras facetas de este sistema, el número de sitios catalíticos permanece como punto de controversia entre distintos laboratorios.

1.7.10. Cambios conformacionales.

Se han detectado cambios conformacionales en la enzima unida a membrana en respuesta a la iniciación de reacciones de transferencia electrónica o a gradientes de pH, y en la enzima soluble como resultado de la adición de una gran variedad de ligandos (ATP, ADP, Pi, Mg^{2+} , oxianiones, aurovertina, quercetina) y por cambios de pH (234, 268, 276-281). El conocimiento de la naturaleza de estos cambios conformacionales es de gran importancia para entender el mecanismo de acción de estos factores de acoplamiento en la fosforilación oxidativa. Así y con rela-

ción a la "hipótesis conformacional" formulada por Boyer (véase apartado 1.2.) , sería de capital interés el determinar la existencia de cambios conformacionales dependientes de un aporte energético en las F_1 -ATPasas asociadas a membrana, que se relacionasen con cambios en la afinidad de las enzimas por los nucleótidos de adenina y Pi. Una recopilación actualizada y crítica de trabajos relativos a este tema puede encontrarse en una revisión reciente de Penefsky (68).

1.7.11. Diferencias entre los factores F_1 soluble y unido a membrana.

Una característica de los factores F_1 radica en la manifestación del fenómeno de alotopía, mostrándose notables diferencias entre la enzima soluble y asociada a membrana.

Así, la baja actividad ATPásica de las membranas contrasta con la correspondiente a la enzima soluble, lo que condujo a Pullman y Monroy a la identificación de un péptido de pequeño peso molecular (~ 15.000 dalton) que al interaccionar con la forma soluble o unida a membrana de la enzima inhibía su actividad ATPásica (159). Estudios posteriores mostraron que para obtener un mismo grado de inhibición, se requería una mucho menor cantidad de proteína inhibidora para la enzima asociada a membrana que para la enzima soluble (77), lo que sugiere diferencias de afinidad en la interacción del inhibidor con las dos formas de F_1 .

Otra discrepancia entre la F_1 -ATPasa soluble y unida a membrana, observada tempranamente, consistía en la inhibición por oligomicina y por DCCD de la actividad enzimática del factor F_1 cuando se encuentra asociado a la membrana, lo que llevó al reconocimiento de una proteína presente en la membrana en asociación con la F_1 -ATPasa, con la que ambos compuestos interaccionaban (187,282,283).

Las propiedades catalíticas de las dos formas de enzima también muestran diferencias, como se deduce de los valores de K_m , para

ATP, más bajos en la F_1 -ATPasa unida a membranas ($\sim 100\mu\text{M}$ para F_1 de hígado de rata) (246) que en el caso de la forma soluble ($\sim 1\text{ mM}$ para F_1 de hígado de rata) (62). Estas observaciones parecen sugerir que la interacción de F_1 con la membrana aumenta su afinidad por ATP, lo que pudiera estar relacionado con diferentes estados conformacionales de las dos formas de proteína (62). En este contexto, el análogo de ATP, AMP-PNP, inhibidor competitivo de las dos formas de enzima, muestra una K_i de $0,33\ \mu\text{M}$ para F_1 soluble y de $0,16\ \mu\text{M}$ para F_1 unida a membrana (233), lo que concuerda con lo anteriormente dicho.

En un estudio comparativo de las dos formas de enzima, Hammes y Hilborn (226) sugirieron que la presencia de un grupo ionizable en la enzima soluble, con pK de aproximadamente 7, era esencial para la actividad, sin embargo el efecto de este grupo se encontraba aparentemente enmascarado en la enzima asociada a membrana, posiblemente debido a una alteración estructural o un cambio conformacional.

1.7.12. Organización de la enzima en la membrana.

La abundancia de hipótesis sobre la distribución topográfica de las subunidades de los factores F_1 , se manifiesta como un reflejo lógico de la controversia existente en cuanto a la estequiometría en subunidades de los mismos. Estas hipótesis pueden clasificarse básicamente en dos grandes grupos: las que propician un modelo hexagonal (Figs. 6a, 6b, 6c y 6d) y aquellas que apoyan un modelo tetragonal (Fig. 6e). En la figura 6 se ilustran distintas estructuras propuestas, dependiendo del número de copias y disposición de las subunidades. Una característica común a todas ellas reside en considerar que alguna o todas las subunidades minoritarias de la enzima (γ , δ y ϵ) constituyen un tronco que conecta el factor F_1 a F_0 , reflejando el papel asignado a estas subunidades en la unión de F_1 a la membrana (véase apartado 1.7.3. y Discusión).

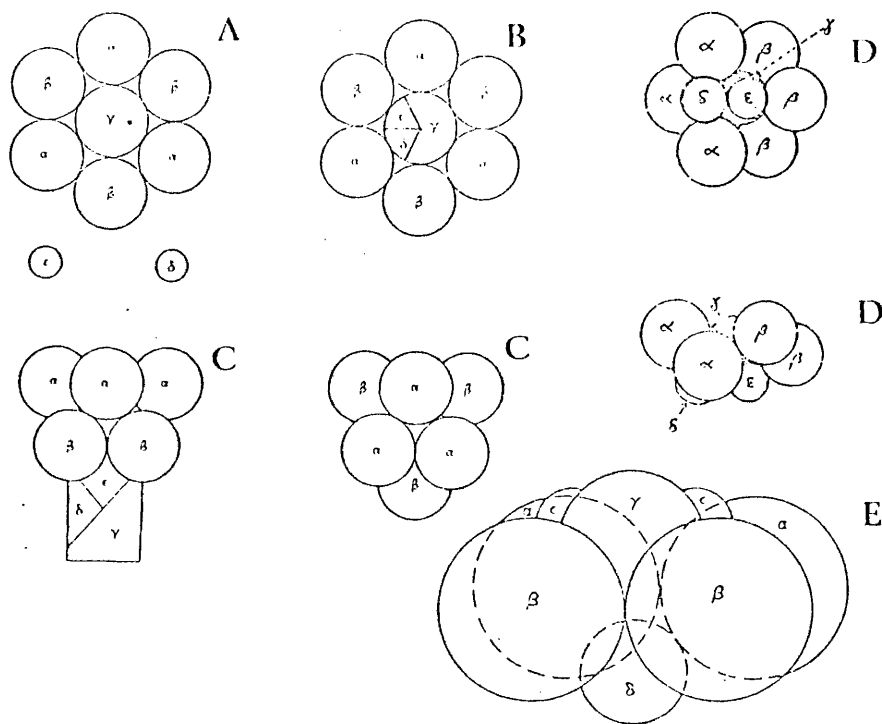


FIGURA 6.- Modelos para el factor F_1 . En la parte superior izquierda se ilustran dos modelos planos, propuestos por Kozlov y Mikelsaer para el factor F_1 mitocondrial, con alternancia de las subunidades mayoritarias y un núcleo central constituido por la subunidad γ (a) o por una copia de $\gamma + \delta + \epsilon$ que formarían el conjunto de una subunidad (b). En la parte superior se muestra un modelo no plano, propuesto por estos mismos autores, en visión lateral y desde arriba (c). En la parte superior derecha se muestra el modelo descrito por Bragg y Hou para el factor F_1 de *E. coli*, en visión lateral y desde abajo (d). En este modelo, las subunidades α y β ocupan los lados opuestos de un hexágono. Las subunidades δ y ϵ interaccionan con las subunidades α y β respectivamente, situándose en un plano inferior al ocupado por las subunidades mayoritarias. Por último, Baird y Hammes proponen un modelo tetragonal sin alternancia en las subunidades α y β para el factor F_1 de cloroplastos (e).

Para el factor F_1 mitocondrial han sido propuestos tres modelos hexagonales (Figs. 6a, 6b y 6c), basados principalmente en la apariencia hexamérica de la molécula de F_1 al microscopio electrónico. Dos de estos modelos (Figs. 6a y 6b) plantean una alternancia de las subunidades α y β y un núcleo central constituido por una copia de subunidad γ (62) o por una copia de una subunidad compuesta por $\gamma + \delta + \epsilon$ (87). Los autores de este último modelo, Kozlov y Mikelsaar, suponen que las tres subunidades minoritarias observadas en la mayoría de las preparaciones de F_1 -ATPasa pueden formar parte de una única subunidad "in vivo" (55,87) de tamaño molecular similar al de las subunidades mayoritarias (50.000-60.000), la cual se transformaría en las denominadas γ , δ y ϵ por la acción de enzimas proteolíticas durante el proceso de aislamiento de la enzima (55,87). Un tercer modelo (Fig. 6c), propuesto por estos mismos autores, sugiere una disposición alternante de las subunidades mayoritarias, pero ahora situadas en un plano distinto y con una especie de tallo constituido por la supuesta séptima subunidad ($\gamma + \delta + \epsilon$) (87).

La posible existencia de proteasas que se activaran durante el proceso de aislamiento del factor F_1 y actuaran sobre esta proteína oligomérica no ha sido rigurosamente excluida. Por el contrario, recientemente Rynie y Gallagher (284) han demostrado que el factor F_1 mitocondrial de levadura y el complejo de ATPasa pueden sufrir modificaciones proteolíticas durante el proceso de purificación de los mismos, sino se incluyen inhibidores de proteasas. En este contexto, es relevante el hecho de que un cierto porcentaje de la actividad proteásica celular (hasta un 50% en E. coli) (140) se encuentra unida a membrana (285) y no se solubiliza completamente aún después de someter las membranas a lavados exhaustivos. De este modo, ciertas proteínas pueden encontrarse estéricamente protegidas en la membrana, pero pueden sufrir una proteólisis limitada cuando la proteína, y presumiblemente la (s) proteasa(s), son extraídas de la membrana durante el proceso de purificación (284,

286). Esta proteólisis limitada podría explicar las discrepancias encontradas en las composiciones de aminoácidos, pesos moleculares y subestructura de los factores F_1 de un mismo o distinto origen. Además, si tuviera lugar esta actividad proteolítica, ésta probablemente actuaría en distinto grado sobre cada tipo de preparación enzimática.

El uso de reactivos entrecruzantes se ha mostrado como una técnica poderosa en el estudio de la estequiometría y disposición espacial de las subunidades en las proteínas oligoméricas (287). Los factores F_1 no han sido una excepción y estudios de este tipo han sido realizados sobre F_1 -ATPasa mitocondrial (185), de cloroplasto (186) y de E.coli (115,288), indicando la existencia de diferencias en la organización molecular de estas proteínas. Basándose en estos estudios, se ha propuesto un modelo hexagonal no alternante entre α y β para la F_1 -ATPasa de E. coli (288) y otro tetragonal para la F_1 -ATPasa de cloroplasto (186) (Figs. 6d y 6e).

1.8. Aspectos de los factores F_0 de acoplamiento. Proteínas responsables de la acción de DCCD.

De lo anteriormente descrito, se deduce que las posibilidades para estudiar el mecanismo de la fosforilación oxidativa con el factor F_1 se hayan limitadas por el hecho de que esta enzima en su estado soluble pierde propiedades importantes. Así, la constante de la reacción ATP-sintetasa catalizada por el factor F_1 solubilizado es tan pequeña que no puede medirse, incluso en condiciones favorables (p. ej. en presencia del sistema: hexoquinasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa) (55). El factor F_1 tampoco cataliza la reacción de intercambio ^{32}P -ATP (55).

De este modo, en la actualidad se está comenzando a prestar gran atención al aislamiento y caracterización de los complejos de ATP-asa, lo que plantea grandes dificultades al tener que solubilizar el factor F_1 juntamente con un sector F_0 intimamente integrado en la membrana. Sin embargo, varios complejos de ATPasa han sido preparados recientemente a partir de mitocondrias de corazón de buey (65, 295, 296), mitocondrias de hígado de rata (297), mitocondrias de levadura (101), cloroplastos (298), Escherichia coli (299), Rhodospirillum rubrum (300, 301), Mycobacterium phlei (302) y bacteria termófila PS3 (61), habiéndose utilizado deoxicolato, colato o Triton X-100 como agentes de extracción. Los complejos de ATPasa purificados de la bacteria termófila PS3, E. coli y R. rubrum contienen aparentemente tres polipeptidos, además de los cinco correspondientes al factor F_1 (61, 299, 300), mientras que el complejo H^+ -ATPasa de cloroplastos posee cuatro cadenas polipeptídicas adicionales (298). Las preparaciones mitocondriales son considerablemente más complejas (65, 284, 295, 297).

El grupo de Pedersen ha logrado obtener recientemente una preparación de H^+ -ATPasa, aislada de mitocondrias de hígado de rata, que observada al microscopio electrónico revela ser altamente disperso y poseer una disposición estructural similar a la ilustrada en la figura 5, -

consistente en: una esférula (F_1), una pieza basal y un tronco que conecta ambas unidades (297). El espesor de la pieza basal ($\sim 60 \text{ \AA}$) es suficiente para atravesar completamente la fase hidrofóbica de la membrana interna mitocondrial.

Las H^+ -ATPasas aisladas de organismos procarióticos y eucarióticos, generalmente contienen una subunidad altamente hidrofóbica que constituye el principal componente del factor membranal F_o (61,193,298,303,304). Esta subunidad de bajo peso molecular (6.000-9.000 dalton) constituye el sitio de acción del inhibidor dicitclohexilcarbodiimida (DCCD) que bloquea la actividad translocadora de protones de F_o (305-307). Este inhibidor, DCCD, constituye una prueba relativamente específica para el sector F_o . La actividad ATPásica se inhibe por DCCD, únicamente, cuando el factor F_1 se encuentra asociado a F_o . La separación de F_1 de F_o ó la modificación de la interacción de estos dos factores provoca un aumento en la permeabilidad a protones de la membrana, que puede bloquearse mediante la adición de DCCD (75). La primera correlación entre la acción de este inhibidor y la proteína fuertemente hidrofóbica se estableció en estudios llevados a cabo por Fillingame en E. coli, al lograr marcar covalentemente dicho polipéptido con $[^{14}C]$ DCCD en membranas de E. coli, cepa salvaje, pero no en membranas de un mutante resistente al efecto de DCCD (308).

En los últimos años se ha determinado la secuencia de aminoácidos de esta proteína fijadora de DCCD, aislada de mitocondrias (corazón de buey, Neurospora crassa, Saccharomyces cerevisiae), cloroplastos (espinaca) y bacterias (E. coli, PS3) (309-311). Una comparación de estas secuencias homólogas, pero distantes desde un punto de vista --evolucionista, permite obtener ciertas características comunes consistentes en: (a) dos secuencias hidrofóbicas de unos 25 residuos; (b) un residuo ácido en el centro de la segunda secuencia hidrofóbica; (c) una parte central polar que incluye dos residuos básicos y tres residuos hidrofílicos neutros; (d) el carácter polar de la secuencia N-terminal. La posi

ción del residuo de aminoácido ácido en la mitad del segundo segmento hidrofóbico parece ser de especial importancia. Es el único resto ácido que es conservado en todos los organismos. Además, este aminoácido es modificado específica y covalentemente por el inhibidor dicitohexilcarbodiimida (312). Recientemente se ha descrito un mutante de E.coli cuya H^+ -ATPasa era incapaz de translocar protones, encontrándose que el residuo ácido de la subunidad fijadora de DCCD estaba sustituido por un residuo de glicocola (313).

Esta proteína hidrofóbica se ha convertido en la actualidad en una de las subunidades mejor caracterizadas del complejo de ATPasa, encontrándose en dicho complejo en forma oligomérica (309). Junto con, al menos, otros dos polipéptidos hidrofóbicos más constituye el factor F_0 (61,314), formando un canal para el paso de protones (315). Recientemente se ha demostrado que este polipéptido aislado exhibe una actividad protonófora sensible a DCCD cuando se reconstituye en liposomas (306, 307).

1.9. Estudios genéticos.

El empleo de mutantes constituye una aproximación al estudio de las relaciones estructura-función y de ensamblaje de estos sistemas de fosforilación. A tal fin, la H^+ -ATPasa de E.coli ha sido ampliamente estudiada. Todas las mutaciones que afectan al complejo de ATPasa han sido mapeadas en un único locus denominado unc, y estos genes parecen estar organizados en un operon (69). Desde que Butlin y col. en 1971 obtuvieron el primer mutante de E.coli en el que la fosforilación oxidativa se encontraba desacoplada del transporte electrónico (316), numerosos laboratorios comenzaron a aislar distintos mutantes en los que se tenía alterada alguna propiedad de los sistemas de fosforilación. Así, este tipo de estudios ha permitido demostrar que las subunidades α , β de F_1 -ATPasa de E.coli juegan algún papel en la actividad catalítica, ya que una alteración genética de cualquiera de ellas suprime la actividad ATPásica. Recientemente, Futai y Kanazawa (73) y Downie y col. (69) han abordado en profundidad estos temas en sus respectivas revisiones.

1. 10. F₁-ATPasa de *Micrococcus lysodeikticus*.

En esta bacteria gram-positiva aerobia estricta, Ishikawa y - Lehninger identificaron inicialmente una proteína asociada a membrana - con actividad ATPásica como factor de acoplamiento de fosforilación oxi- dativa (132,317).

Muñoz y cols. estudiaron su solubilización selectiva de la mem- brana plasmática por tratamiento con tampón a baja fuerza iónica (124), identificándola con las estructuras hexaméricas asociadas a la membrana, que se observan al microscopio electrónico por tinción negativa (123). - También se ha descrito someramente la especificidad de sustrato y acti- vación por cationes para la enzima unida a membrana y soluble (152), - así como la purificación, peso molecular, composición de aminoácidos, - composición en subunidades (143,152,319,320) y la caracterización y -- propiedades de diferentes formas de la enzima purificada (321-324).

En su estado asociada a membrana, la F₁-ATPasa de M. -- lysodeikticus muestra una considerable especificidad por ATP, pero re- quiere la acción de tripsina para manifestar su actividad hidrolítica (124). Una vez solubilizada la enzima muestra unos niveles más bajos de laten- cia que llegan a ser inexistentes en la forma purificada. Esta pérdida de - latencia durante el proceso de purificación de F₁-ATPasa de M. lyso-- deikticus, podría ser el resultado de una actividad proteolítica ya que pue- de obtenerse una preparación de enzima homogénea que exhibe estimula- bilidad por tripsina mediante adición del inhibidor de proteasas de serina fenil-metil-sulfonil fluoruro (PMSF), durante el proceso de solubilización de la enzima (325).

Esta enzima requiere la presencia de cationes divalentes para ser activa, preferentemente Ca²⁺. Además, la enzima asociada a mem- brana presenta formas interconvertibles por cationes, con diferentes ca-

racterísticas de activación de Ca^{2+} y distinta latencia, de probable significación regulatoria (326-328). El óptimo de activación de $\text{F}_1\text{-ATPasa}$ soluble se encuentra para relaciones de $\text{ATP}:\text{Ca}^{2+}$ (1:1) y $\text{ATP}:\text{Mg}^{2+}$ (2:1) a pH 7,5, aunque en este último caso la actividad es cuatro veces mejor (123). Es significativo el hecho de que el catión Mg^{2+} sea un inhibidor de la actividad $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPasa}$. Esta inhibición alcanza un valor del 50% para una relación $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ de 1/10, no incrementándose al aumentar la concentración de Mg^{2+} (123,152). Oligomicina, 2,4-dinitrofenil y los iones monovalentes Na^+ , K^+ (a concentraciones inferiores a 100 mM) no ejercen ninguna influencia sobre la enzima soluble o unida a membrana. La enzima soluble presenta una alta especificidad -- por ATP y Ca^{2+} , no hidrolizando otros nucleótidos como ADP , UDP , AMP , ni *p*-nitrofenil fosfato en presencia de Ca^{2+} ó Mg^{2+} . De los inhibidores típicos de actividad ATPásica (*p*-cloromercuribenzoato, *N*-etilmaleimida, ouabaina, cianuro y azida sódica) solamente azida produce una inhibición del 60% a concentraciones de 0,1 mM, siendo resistentes a los demás hasta las concentraciones ensayadas (5 mM) tanto la enzima soluble como la unida a membrana (123,152). Además, ADP se muestra como un inhibidor de la actividad ATPásica dependiente de Ca^{2+} (70% de inhibición a 4 mM ADP en la enzima soluble) (123).

La purificación de esta $\text{F}_1\text{-ATPasa}$ se ha llevado a cabo por filtración en gel (152) y por electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida (143). La enzima purificada se muestra estable al frío y muy sensible al calor (1 min a 65°C causa la pérdida total de actividad) (152). La presencia de nucleótidos fuertemente unidos a la enzima (2 moles ATP y 2 moles $\text{ADP}/\text{mol BF}_1$), coeficiente de sedimentación (13,6 S), coeficiente friccional relativo (1,34), volumen específico parcial (0,72 ml/g), peso molecular (~ 350.000 dalton), análisis de aminoácidos y propiedades ópticas han sido descritas (318,319,329).

Se han purificado varias formas diferentes de la enzima (véase Tabla IX) que presentan diferencias en actividad hidrolítica, peso mo-

TABLA IX
ALGUNAS CARACTERÍSTICAS DE LAS DISTINTAS FORMAS DE F₁-ATPasa DE -
MICROCOCOCCUS LYSODEIKTICUS.

Cepa NCTC 2665	Forma de F ₁ -ATPasa	Subunidades ^a	Peso molecular	Actividad ^b específica (μ mol/minx mg)	Referencia
PWYE	A	$\alpha_3 \beta_3 \gamma \epsilon$	350.000-400.000	7 (-)	(319, 390)
PNB	B	$x(\alpha^1 + \alpha^{11})_3 \beta_3 \gamma \epsilon$	368.000	0,80 (-)	(321)
PNB	B	$x(\alpha^1 + \alpha^{11})_3 \beta_3 \gamma \epsilon$	365.000	2,5-5,0 (-)	(321)
PNB	B	$x(\alpha^1 + \alpha^{11})_3 \beta_3 \gamma \epsilon$		2,5-5,0 (+)	(330)

108

^a En las referencias indicadas el componente ϵ migra con el colorante marcador en electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico. Las proporciones relativas se determinaron a partir de los perfiles densitométricos.

^b El signo - indica no estimulabilidad por tripsina, mientras que el signo + indica que la actividad es estimulable por tripsina.

lecular, movilidad electroforética en gel de poliacrilamida, estimulabilidad y sensibilidad a tripsina, estructura en subunidades y comportamiento inmunológico (319,321,323,330-332). Las distintas formas moleculares de la enzima se obtienen simplemente cambiando las condiciones de crecimiento del microorganismo. La utilización repetida de caldo común para la resiembra y conservación de la bacteria, aunque luego se procese en la forma habitual (véase Materiales y Métodos) da origen a una sub- cepa que produce F_1 -ATPasa, forma B. Esta en estado purificado se puede presentar en la forma B_1 (enzima inactiva), cuya actividad específica es muy baja y no es estimulable por tripsina o en la forma B_A (enzima activa) de superior actividad específica que en algunos casos muestra estimulabilidad por tripsina (forma B_{AT}), llegándose a alcanzar hasta un 100% de estimulabilidad de su actividad basal. En este último caso, el patrón de subunidades muestra la presencia de un componente, ϵ , de peso molecular 25.000 dalton que ha sido identificado como el inhibidor natural de este BF_1 (330). Una característica común a la subestructura de todas las formas B consiste en la presencia de un componente, X, de alto peso molecular (97.500 dalton) y en la microheterogeneidad de la subunidad α que se muestra muy poco definida y próxima en tamaño a β . Por su parte la conservación y resiembra de la bacteria en un medio compuesto por peptona y extracto de levadura, creciéndose a continuación en la forma descrita en Materiales y Métodos, da origen a la forma A de la enzima para la que se ha descrito la presencia de tres tipos de subunidades α , β y γ bien definidas, además de uno o más componentes que migran con el colorante marcador en electroforesis en gel de poliacrilamida al 7% en presencia de SDS denominado " ρ ", y que es común a todas las formas de F_1 -ATPasa de M. lysodeikticus.

Este factor BF_1 constituye el único factor de acoplamiento para el que se ha descrito la presencia de hidratos de carbono (155-157). Las distintas formas A y B también difieren en este aspecto, presentándose diferencias en la composición de azúcares y un contenido más bajo

de hexosas en la forma B (155).

Un estudio comparativo de la solubilización de F_1 -ATPasa de M. lysodeikticus por n-butanol y "choque osmótico", realizado por Salton y Schor (134) muestra que sólo la proteína solubilizada por este último método, que contiene subunidades minoritarias, puede reasociarse a la membrana. La proteína obtenida en la fase acuosa de la extracción con n-butanol posee exclusivamente las subunidades mayoritarias, α y β . Estos autores postulan para las subunidades minoritarias un papel regulador y de asociación a membrana, además de una cierta participación en la estimulación por tripsina (134).

La proteína parece estar localizada exclusivamente en la cara interna de la membrana plasmática, según experiencias de marcaje con ^{125}I (333) y con anticuerpos conjugados con ferritina (334,335).

Se han preparado anticuerpos frente a BF_1 de M. lysodeikticus, inhibiendo completamente y de forma "no competitiva" su actividad hidrolítica, así como aquella en las enzimas homólogas de Sarcina flava, Sarcina lutea y parcialmente en Micrococcus varians, no mostrando ningún efecto sobre Sporosarcina ureae y Bacillus subtilis (336). Estas experiencias junto con otras de reactividad inmunológica cruzada y de movilidad electroforética sugieren una estrecha relación entre las estructuras de los factores BF_1 , de M. lysodeikticus, S. flava y S. lutea.

Así pues, el factor de acoplamiento BF_1 de M. lysodeikticus muestra ciertas similitudes con los correspondientes factores de mitocondrias, cloroplastos y otros microorganismos. No obstante, a medida que se realiza un estudio más minucioso de estos sistemas, van emergiendo diferencias tanto a nivel molecular como a nivel catalítico. Estas diferencias pueden tener gran interés para explicar las particularidades fisiológicas de cada enzima.

1.11. Esta tesis.

En el presente trabajo se tratan varios aspectos del factor BF_1 de M. lysodeikticus. Por una parte se define cuál es la subestructura de esta enzima, asignando a cada subunidad una función determinada. Estos estudios de relación estructura-función se han llevado a cabo mediante la aplicación de técnicas bioquímicas e inmunoquímicas y han permitido identificar una nueva subunidad, no descrita hasta el presente en esta F_1 -ATPasa, responsable de la interacción de la enzima con la membrana, así como dilucidar cuál es el núcleo catalítico de la proteína. Por otra parte también se pone de manifiesto la antigenicidad de los distintos componentes polipeptídicos del factor BF_1 , estudiándose por radioinmunoensayo la influencia de estos sobre las propiedades inmunoquímicas de la enzima. También se dan nuevos datos sobre la estequiometría en subunidades de la enzima. Posteriormente se describe la presencia de iones metálicos fuertemente unidos a la enzima que parecen jugar un papel catalítico y estructural. En esta tesis, uno de los puntos en los que se ha puesto una gran atención radica en el papel jugado por los iones metálicos en los aspectos catalíticos, reguladores y estructurales de esta enzima, tema prácticamente desatendido en el estudio de los factores F_1 de cualquier origen. Asimismo se ha estudiado la interacción del factor- BF_1 de M. lysodeikticus soluble con fosfato.

Estos estudios han sido realizados primordialmente con la forma A de la enzima, por lo que, salvo cuando se especificase, todos los resultados descritos en esta tesis hacen referencia a esta forma F_1 -ATPasa de M. lysodeikticus.

72.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Reactivos.

ATP (trifosfato de adenosina, sal disódica) y ADP (difosfato de adenosina, sal disódica) fueron obtenidos de Pabst Laboratories Biochemicals (Milwaukee, Wisconsin, EE.UU.). AMP-PNP (5-adenilil-imidodifosfato, sal tetrasódica) fué un producto de ICN Pharmaceuticals Inc. (Cleveland, Ohio, EE.UU.). EDTA (etilendiaminotetraacetato, sal disódica) de Fisher Scientific Co. (Fair Lawn, New Jersey, EE.UU.); cloruro de L-cisteína de British Drug House Biochemicals (Poole, Inglaterra); Zincon (2-carboxi-2'-hidroxi-5'-sulfotormazilbenceno) de Sigma Chem. Co. (St. Louis, Mo., EE.UU.) y batofenantrolina (4,7-difenil-1,10-fenantrolina) de Serva Fein biochemicals (Heidelberg, Rep. Federal Alemana). Lisozima fué un producto de Boehringer (Mannheim, Rep. Federal Alemana) y de Calbiochem (San Diego, California, EE.UU.); RNAsa A, pepsina, albúmina de huevo y seroalbúmina bovina fueron de Sigma; tripsina y DNAsa de Calbiochem; inhibidor de tripsina de soja de Boehringer. DTT (ditiotreitol) y Triton X-100 fueron productos de Calbiochem. SDS (dodecil sulfato sódico), especialmente puro, se obtuvo de BDH y urea de Merck (Darmstadt, Rep. Federal Alemana). Acrilamida; N,N', metilen-bisacrilamida y TEMED fueron productos de Eastman Kodak Co. (Rochester, N.Y., EE.UU.). Coomassie R250 y Coomassie G250 de Serva, y fucsina de Merck. Sephadex G-200, G-100, G-50 y G-25 fueron obtenidos de Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Suecia). Agarosa fué un producto de Sigma. Azul de bromofenol fué de BDH y azul dextrano de Pharmacia. ^{125}I (16 mCi/ μg); $^{65}\text{Zn}^{2+}$ (1,69 mCi/mg como cloruro de zinc en HCl 0,1 N) y Pi (10 mCi/ml, como ortofosfato en solución acuosa) fueron obtenidos de The Radiochemical Centre (Amersham, Inglaterra). Cloramina T y Tris (trishidroximetil-aminometano) fueron de Merck.

Todos los demás reactivos empleados fueron de grado analítico y obtenidos de Merck.

2.2. Microorganismo y condiciones de crecimiento.

Se emplearon dos cepas A y B de la eubacteria gram-positiva Micrococcus lysodeikticus (NCTC 2665) conservadas en un medio sólido de agar-PWYE (bactopectona, 5%; extracto de levadura, 0,1%; NaCl, 0,5%, ajustado a pH 7,5 con hidróxido sódico y suplementado con agar al 2%) (337) y en medio sólido agar-PNB (bactopectona, 0,5%, extracto de carne, 0,3%; suplementado con agar al 2%) respectivamente. Aunque ambas cepas tuvieron el mismo origen, se encontraron diferencias en el crecimiento cuando se cultivaron en medio líquido PWYE. La apariencia al microscopio, composición de peptidoglicano y los requerimientos nutricionales mostraron que ambas cepas presentaban las características propias de M. lysodeikticus (NCTC 2665) (321). El proceso de crecimiento del microorganismo que a continuación se describe, así como los restantes apartados hacen referencia a la cepa A, excepto cuando se especifique lo contrario. Similares procedimientos se realizan con la cepa B.

Las células se crecen a 30°C con una agitación constante de 250 r.p.m. en un incubador New Brunswick durante 18 h en matraces de 2 litros de capacidad conteniendo 400 ml de medio líquido PWYE. Como inóculo se utilizan 4 ml de un preinóculo constituido por 50 ml de medio en un matraz de 250 ml y crecido en las condiciones antes citadas hasta alcanzar el final de la fase logarítmica de crecimiento o fase estacionaria temprana, lo que se logra al obtenerse una medida de densidad óptica de 1,0 a 750 nm, a partir de una dilución 1/6 del cultivo.

Las células, de color amarillo intenso, obtenidas mediante este proceso, se sedimentan por centrifugación a 16.300 x g durante 10 min a 0°C y se lavan dos veces con agua destilada o tampón Tris-HCl 30 mM (pH 7,5).

2.3. Preparación de membranas.

Las membranas se preparan según el procedimiento descrito por Muñoz y col. (123,124) con la modificación de añadir $MgCl_2$ - 10 mM durante la lisis osmótica.

Las células se resuspenden en tampón Tris-HCl 30mM, - $MgCl_2$ 10mM (pH 7,5) suplementado con sacarosa 0,8 M en un volumen final dado por la siguiente expresión : $0,0065 \times \text{volumen de cultivo (ml)} \times 6 \times (\text{D.O. } \frac{1}{950})$, lo que da lugar a una concentración de 20-30 mg de peso seco bacteriano/ml de suspensión. Las células así resuspendidas se incuban con lisozima (EC 3.2. 1.17) (0,075 mg/ml) - con agitación constante durante 30 min a temperatura ambiente. Los - protoplastos se recogen mediante centrifugación a 0°C (30 min, 34.800 x g) y posteriormente se someten a un medio hipotónico constituido por tampón Tris-HCl 30 mM, $MgCl_2$ 10 mM (pH 7,5) en un volumen final similar al anteriormente calculado (todos los procesos posteriores se realizan en este mismo volumen). A continuación se añade DNAsa - (EC 3.1.4.5) (0,075 mg/ml) y se incuba a temperatura ambiente hasta reducir notablemente la viscosidad de los lisados (aproximadamente 30 min). Posteriormente, las membranas son sedimentadas a 0°C - (40 min, 34.800 x g) y lavadas cuatro veces en tampón Tris-HCl - 30 mM (pH 7,5) en ausencia de cationes divalentes. Estas membranas que contienen aproximadamente el 13% de la proteína celular (véase - Resultados) se conservan a -20°C para su uso.

2.4. Solubilización de la enzima.

En la figura 7 se muestra un esquema del proceso de aislamiento de la enzima. La F_1 -ATPasa se solubiliza, por "choque osmótico", resuspendiendo las membranas en tampón de baja fuerza iónica, Tris-HCl 3 mM (pH 7,5) (124,152). La proteína soluble (0,5-1,0 - mg/ml) se concentra hasta unos 8-10 mg/ml por ultrafiltración en -

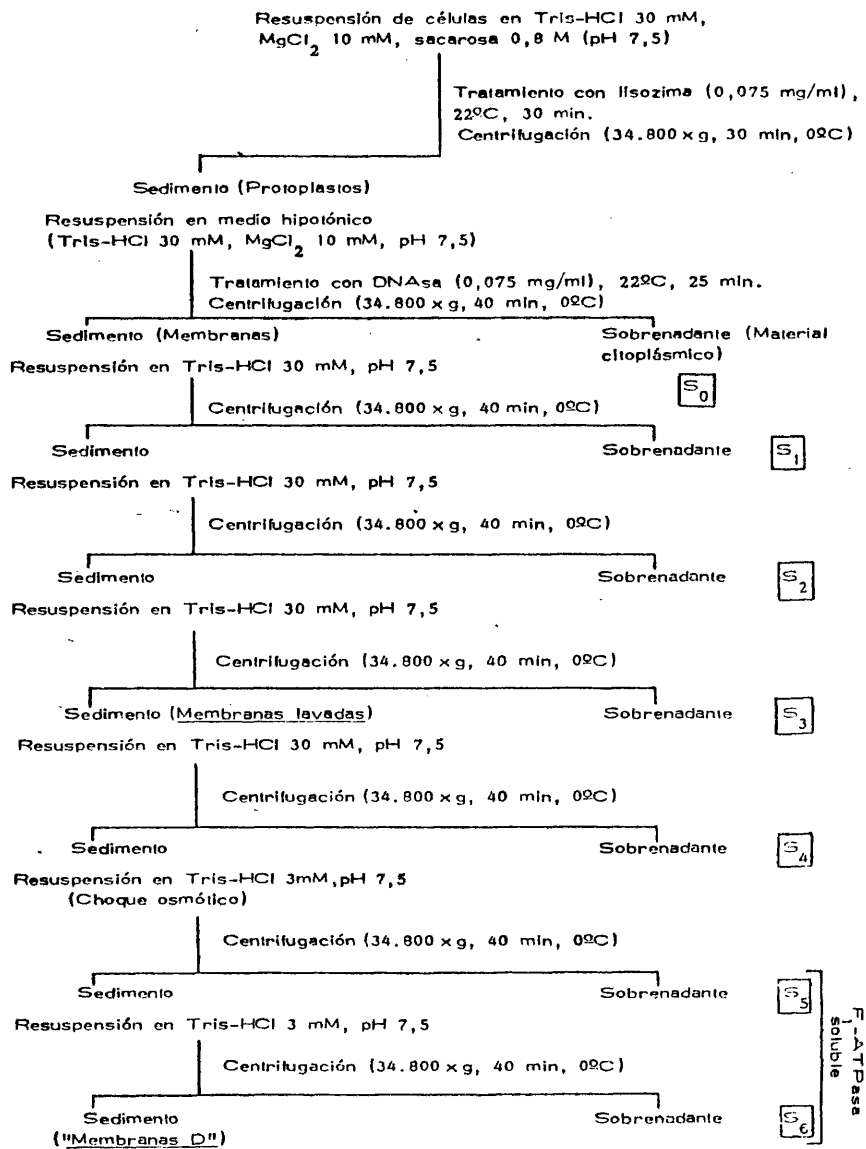


FIGURA 7.- Esquema del aislamiento de F₁-ATPasa de M. lysodeik-
ticus.

Hollow fiber modelo DC 2 (Amicon, Oosterhout, Holanda) con cartucho dialiber HD x 50 . A continuación se centrifuga a 0°C durante 60 min a 100.000xg para separar algunos componentes pesados. El sobrenadante se concentra hasta unos 4-8 mg proteína/ml por ultrafiltración a través de una membrana Diaflo XM-50 en un ultrafiltro Amicon, bajo una presión de 1,5 Kg/cm² de N₂ y se conserva a -20°C.

Las membranas de las que se ha extraído la F₁-ATPasa - se conservan a -20°C para su posterior utilización y las denominaremos "membranas D" (membranas desprovistas de actividad ATPásica). Estas membranas dan cuenta del 7% de la proteína celular y retienen - menos del 4% de las unidades totales de actividad ATPásica (véase Resultados).

2.5. Purificación de la enzima.

La purificación se lleva a cabo principalmente mediante electroforesis en gel de poliacrilamida a escala preparativa según el método descrito por Andreu y Muñoz (143) con ligeras modificaciones (véase apartado 2.7.1.). Siguiendo este proceso podían ser purificados crudos de hasta 110 mg de proteína.

Otro procedimiento de purificación de la enzima es mediante filtración en gel (152) por flujo invertido (338) en columna de 2,5x145 cm de Sephadex G-200 equilibrada con tampón Tris-HCl 30 mM (pH = 7,5) y eluida con el mismo tampón a 4°C. Los volúmenes de exclusión (V_o) e inclusión (V_o+V_i) se determinan a partir de los volúmenes de elución del azul dextrano y de glucosa respectivamente (V_o= 151 ml y V_o+V_i= 350 ml). El flujo se mantiene a una velocidad aproximada de - 7 ml/h con ayuda de una bomba peristáltica Sage 375 A (Sage Instruments, Cambridge, Mass, EE.UU.). Este método fué utilizado para - purificar preparaciones de hasta 20 mg de proteína cruda.

En cualquiera de los dos procedimientos se registra continuamente la absorción del eluido a 278 nm y 206 nm por medio de un monitor de doble haz modelo 2089 Uvicord III (LKB, Bromma, Suecia), además de determinarse la actividad enzimática y el patrón electroforético en condiciones nativas de las distintas fracciones recogidas. Las fracciones activas mostrando una única banda de movilidad relativa igual a F_1 -ATPasa se recogen y concentran hasta 4-8 mg/ml por ultrafiltración a través de Diaflo XM-50 (aprox. 1,5 Kg/cm² de N₂). En ambos procesos se obtienen rendimientos del 10-15%. La pureza de estas preparaciones se analiza por electroforesis analítica en gel de poliacrilamida en ausencia o presencia de SDS, siendo mayor del 97%.

Las soluciones de F_1 -ATPasa purificada se conservan en tampón Tris-HCl 0,1 M (pH 7,5) o Tris-HCl 30 mM (pH 7,5) a -20°C y en pequeñas alícuotas de 100 µl a fin de evitar sucesivas descongelaciones y congelaciones que ocasionan una paulatina pérdida de actividad enzimática (164).

2.6. Aislamiento de subunidades.

Las subunidades α , β y γ de la enzima se aíslan como polipéptidos de cadena estadística por electroforesis en gel de poliacrilamida de F_1 -ATPasa purificada en presencia de urea 8M, requerido para disociar totalmente la enzima (143,320,329).

Las subunidades γ y δ también se han obtenido mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS a escala micro-preparativa mediante elución de las bandas de proteína correspondientes a dichos componentes.

Estas preparaciones de subunidades, dializadas exhaustivamente frente a tampón Tris-HCl 30 mM (pH 7,5), muestran una pureza mayor del 98% al analizarlas por electroforesis analítica en gel de -

poliacrilamida en presencia de SDS. Todas las subunidades se aíslan a partir de la forma A de la enzima debido a que es la forma más estable (332).

2.7. Electroforesis en gel de poliacrilamida.

2.7.1. PAGE preparativa.

Se lleva a cabo en un Poly-Prep 200 (Buchler Co.) termostaticado a $6 \pm 1^\circ\text{C}$ con geles, cuya composición se muestra en la Tabla X, de 80 ml en las condiciones descritas por Andreu y col. (143,320).

2.7.2. PAGE analítica.

Se realiza en todos los casos a $\text{pH } 8,5 \pm 0,2$ en geles de $\sim 0,6$ cm de diámetro y 4 ó 10 cm de longitud, según el proceso general descrito por Davis y Ornstein (340, 341) modificado ligeramente (véase Tabla X). Se emplean geles al 7% de acrilamida: 0,18% de N,N' metilenbisacrilamida, al 10% de acrilamida: 0,26% de N,N' metilenbisacrilamida ó al 12% de acrilamida: 0,31% de N,N' metilenbisacrilamida. Las electroforesis se realizan a temperatura ambiente, primero a ~ 2 mA/gel (20 min) y luego a 5 mA/gel hasta que el azul de bromofenol, utilizado como marcador, llega aproximadamente a 1 cm del extremo inferior del gel.

En presencia de EDTA, los geles y los tampones empleados contienen EDTA 2 mM, mientras que las muestras son tratadas con distintas concentraciones de agente quelante a temperatura ambiente durante tiempos diferentes (12 h ó 24 h).

En presencia de SDS, se añade 0,1% SDS a los geles y al tampón de electroforesis, siendo las muestras previamente tratadas con una razón detergente: proteína de 10:1 a 85°C durante 5 min.

TABLA X

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

	PAGE preparativa	PAGE analítica			
	Condiciones nativas	Condiciones nativas	EDTA	SDS	UREA
pH del sistema	8,0	8,7	8,7	8,7	8,7
Tampón superior	Tris-glicocola 53 mM (pH 8,0)	Tris 5 mM Glicocola 37,5 mM EDTA 2 mM (pH 8,6)	Tris 5 mM Glicocola 37,5 mM SDS 0,1% (pH 8,6)	Tris 5 mM Glicocola 37,5 mM SDS 0,1% (pH 8,6)	Tris 5 mM Glicocola 37,5 mM Urea 8 M, DTT 1 mM (pH 8,6)
Tampón inferior	Tris-HCl 0,4 M (pH 8,0)	idem.	idem.	idem.	Tris 5 mM (pH 8,6) Glicocola 37,5 mM
Tampón gel	Tris-HCl 0,38 M (pH 8,0)	Tris-HCl 0,38 M (pH 8,7)	Tris-HCl 0,38 M EDTA 2 mM (pH 8,7)	Tris-HCl 0,38 M SDS 0,1% (pH 8,7)	Tris-HCl 0,38 M Urea 8 M, DTT 1 mM (pH 8,7)
Acrilamida (p/v)	6,5%		7%, 10% ó 12%		
N,N' metilen bisacrilamida (p/v)	0,17%		0,16%, 0,26% ó 0,31%		
Acrilamida/bisacrilamida	38		38		
TEMED (v/v)	0,03%		0,03%		
Persulfato amónico (p/v)	0,1%		0,07%		
Tiempo de polimerización	40 min a t. amb.		40 min a t. amb.		
Marcador	Azul de bromoleno		Azul de bromoleno		
Migración hacia	ánodo		ánodo		
Pretratamiento de las muestras	20 min a t. amb., RNasa 0,1%; EDTA 0,5 mM, 20 min a t. amb., DNasa 0,1%; MgCl ₂ 2mM.		12 h a 24 h en presencia de EDTA	50°C, 5 min (razón sueronaive/seroafine de 10/1)	Urea 10 M DTT 5 mM
Condiciones de la electroforesis	18 vatios				2mA por gel durante los primeros 20 min, continuando a 5 mA/gel.

En presencia de urea, los geles y el tampón superior contienen urea 8M, DTT 1 mM, tratándose las muestras con urea 10M, - DTT 5 mM antes de ser sometidas a electroforesis. Las soluciones de urea fueron preparadas inmediatamente antes de cada uso para evitar la carbamoylación de proteínas (342).

Las movilidades relativas se calculan según (343). Los pesos moleculares de las distintas cadenas polipeptídicas se determinan por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS según (344,345), utilizándose patrones de peso molecular conocido.

2.7.3. Tinciones.

Los geles se tiñen con azul de Coomassie R 250 (346) o por el procedimiento rápido con azul de Coomassie G 250 (347), obteniéndose los perfiles densitométricos de bandas de proteína mediante la absorción de los geles a 575 nm en un espectrofotómetro Gilford 2400 equipado con un transportador lineal modelo 2410-S.

Ocasionalmente se emplea la tinción histoquímica de ATPasa según una simplificación de la técnica descrita por Weinbaum y Markman (348). Los geles se incuban a 37°C durante 60 min en una mezcla de reacción de 4,5 ml de tampón Tris-HCl 30 mM (pH 7,5) conteniendo 40 μ moles de ATP, 40 μ moles de CaCl_2 y sobre la que se añaden lentamente 0,5 ml de acetato de plomo al 2%. Los perfiles densitométricos se obtienen por absorción a 620 nm.

La visualización de hidratos de carbono se obtiene por el método del ácido peryódico-reactivo de Schiff (tinción PAS) (381). Los perfiles densitométricos se obtienen, en este caso, por absorción de los geles a 570 nm.

2.8. Ensayos de actividad enzimática.

La actividad enzimática se mide mediante la liberación de Pi a partir de ATP en una mezcla de reacción compuesta de (volumen final 0,5 ml): 4 μ moles de ATP, 4 μ moles de CaCl_2 , cantidades variables de enzima purificada (3-20 μ g) o de membranas (100-150 μ g proteína de membrana) y tampón Tris-HCl (pH 7,5) a una concentración final de 30 mM (124). En ensayos de actividad ATPásica en membranas o de estimulabilidad por tripsina de diferentes preparaciones de enzima se añaden 6 μ g de tripsina a la mezcla de reacción. Las incubaciones se llevan a cabo a 37°C durante 5 min deteniéndose la reacción por adición de 3,2 ml de agua fría. El Pi liberado se determina por el método de Vambutas y Racker (213), midiendo la absorbancia del complejo fosfomolibdico reducido a 650 nm. En estas condiciones experimentales, 1 μ mol de Pi corresponde a 0,7 unidades de absorbancia (319). Una unidad de actividad ATPásica se define como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μ mol de Pi por minuto a 37°C bajo las condiciones experimentales anteriormente citadas (143). Las actividades específicas se expresan como unidades/mg de proteína.

En otros casos, los iones Ca^{2+} fueron sustituidos por iones Zn^{2+} como activadores de la reacción.

Ocasionalmente se determina la actividad ATPásica mediante la liberación de protones que tiene lugar durante la hidrólisis de ATP usando la técnica del pH-stato (164). La reacción fué seguida constantemente con un aparato combinado de Radiometer (pH-metro pHM 26, titulador II, bureta ABU 12, registrador SBR 2c y electrodo semimicro combinado GK 2320 C). La mezcla de reacción se mantiene a 37 \pm 0,1°C mediante agua circulante a través de la recámara del recipiente de reacción por medio de un baño a temperatura constante (Lauda K2RD, Rep. Federal Alemana). El electrodo se estandariza

a 37°C con un tampón patrón Beckman a pH 7,0. La equivalencia entre el fosfato inorgánico liberado y la cantidad de NaOH añadida para neutralizar los protones liberados y mantener el pH constante se deduce de las curvas obtenidas por Dyson y Nollman (349).

2.9. Inhibición de la actividad enzimática por antisuero.

La capacidad de los antisueros-anti-(F_1 -ATPasa forma A), anti-(F_1 -ATPasa forma B), anti-(subunidad α) y anti-(subunidad β) - para inhibir la actividad enzimática de la F_1 -ATPasa unida a membranas, se lleva a cabo incubando 110 μ l de preparación de membrana (500 μ g de proteína de membrana) durante 2 h a temperatura ambiente con cantidades crecientes de antisuero en un volumen final de 600 μ l de tampón Tris-HCl 30 mM (pH 7,5). Posteriormente se procede a medir la actividad enzimática residual, incubando a 37°C durante 27 min alícuotas de 150 μ l de las mezclas anteriores con : 4 μ moles de ATP, 4 μ moles de $CaCl_2$ y 6 μ g de tripsina en un volumen final de 0,5 ml - de tampón Tris-HCl 30 mM (pH 7,5). La reacción se detiene por adición de 0,2 ml de ácido tricloroacético al 12,5%, analizándose el Pi liberado en el sobrenadante resultante tras una centrifugación a 34.800x g durante 30 min a 0°C.

De una forma análoga, la capacidad de los antisueros - anti-(F_1 -ATPasa forma A), anti-(F_1 -ATPasa forma B), anti-(subunidad α), anti-(subunidad β) y anti-(subunidad γ) - para inhibir la actividad enzimática de la F_1 -ATPasa purificada se realiza incubando la enzima (0.06 unidades) con cantidades crecientes de antisuero durante - 2 h a temperatura ambiente en un volumen final de 200 μ l de tampón - Tris-HCl 30mM (pH 7,5). Transcurrido este tiempo se ensaya la actividad ATPásica residual (véase apartado 2.8.) con la modificación de que la reacción se detiene añadiendo 0,2 ml de ácido tricloroacético al 12,5%, midiéndose a continuación el Pi liberado en el sobrenadante ob-

tenido al centrifugar a 34.800xg durante 30 min a 0°C.

Los sueros control se obtienen a partir de la sangre de los conejos antes de ser inmunizados.

2.10. Tratamiento con agentes quelantes.

La capacidad de diversos agentes complejantes de iones para inhibir la actividad ATPásica se ensaya incubando la enzima purificada (0,02-0,04 unidades) con cantidades crecientes de distintos agentes quelantes en 200 µl de tampón Tris-HCl 30 mM (pH 7,5). Posteriormente se retiran alícuotas de 100 µl en las que se determina la actividad enzimática. En este tipo de ensayos se realizan los controles necesarios para tener en cuenta el efecto quelante sobre el ión Ca^{2+} , requerido para la actividad enzimática. En particular, la actividad ATPásica de muestras conteniendo EDTA se compara con aquella de controles en los que se ha añadido una concentración de iones Ca^{2+} , disminuida en una cantidad igual a la presente de EDTA en las muestras en las que se está estudiando su efecto. Esta corrección se realiza para considerar la capacidad de este agente quelante para formar complejos de estequiometría 1:1 con todos los cationes y, por lo tanto, con los iones Ca^{2+} .

Las actividades se refieren en porcentajes respecto a controles realizados con muestras de enzima incubadas en las condiciones anteriormente descritas, pero en ausencia de agente quelante.

Los experimentos de "prevención" y "reversión" de estas inhibiciones se llevan a cabo según se indica en las leyendas de las tablas respectivas.

2.11. Otras determinaciones analíticas.

La concentración de proteína se determina según el método

de Lowry y col. (350) y ocasionalmente en soluciones muy diluidas - mediante absorción a 230 nm (351), usando en ambos casos seroalbúmina bovina como patrón, o bien, en las soluciones de F_1 -ATPasa, mediante el valor del coeficiente de extinción molar $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 6,9 \pm 0,1$ a 276 nm, calculado previamente para la forma A (164) y corroborado para la forma B_1 de la enzima (321).

Las medidas de pH se realizan con un pH-metro modelo - 26 de Radiometer (Copenhague, Dinamarca), equipado con un electrodo semimicro combinado GK2320 c de Radiometer, adecuadamente estandarizado antes de cada medida (352).

2.12. Reinserción de F_1 -ATPasa y sus subunidades a membranas desprovistas de enzima.

Se emplean dos tipos de experimentos para medir la reinsertión de la enzima completa a "membranas D" :

a) Se incuba F_1 -ATPasa purificada (0,12 unidades) con "membranas D" (500 μg de proteína de membrana) en un volumen final de 200 μl de tampón Tris-HCl 30 mM (pH 7,5) y en presencia de cationes divalentes. La mezcla se agita vigorosamente durante 5 min y se incuba a 37°C durante 15 min más, sometiéndola finalmente a centrifugación a 0°C (43.000xg durante 30 min). Una vez recuperado el sobrenadante y el sedimento, éste es lavado dos veces con 200 μl de tampón Tris-HCl 30 mM (pH 7,5) y resuspendido en 100 μl del mismo tampón para la posterior medida de actividad ATPásica tanto en el sobrenadante como en el sedimento. Muestras en ausencia de iones divalentes sirvieron como controles de reinsertión inespecífica de enzima.

b) En otros casos se realizan experimentos de reinsertión

con F_1 -ATPasa purificada marcada con tritio (cedido amablemente por la Dra. C. Muñoz) o con F_1 -ATPasa purificada marcada con ^{125}I (véase apartado 2.18.). El proceso seguido es semejante al anteriormente expuesto, incubando $[^3H]$ F_1 -ATPasa (3.000 cpm) o $[^{125}I]$ F_1 -ATPasa (20.000 cpm) con "membranas D" (500 μ g de proteína de membrana) y determinando la enzima reinsertada como el porcentaje de radiactividad medido en el sedimento.

Los resultados obtenidos por ambos métodos presentaron una correlación excelente.

Para el estudio de la reinsertión de F_1 -ATPasas defectivas en alguna subunidad así como de las propias subunidades a "membranas D", se sigue el mismo proceso ya descrito, marcando previamente las distintas proteínas con ^{125}I (véase apartado 2.18.).

2.13. Tratamiento con Tripsina.

Varias muestras de F_1 -ATPasa se incuban con tripsina a 37°C durante diferentes tiempos en un volumen final de 200 μ l de tampón Tris-HCl 30 mM (pH 7,5) con una relación tripsina/ F_1 -ATPasa de 1/20 ó 1/15, según se estudie la correlación del efecto de la proteasa sobre las subunidades de la enzima con la actividad enzimática o con la capacidad de reinsertión a membranas de la molécula F_1 -ATPasa. La acción proteolítica se interrumpe añadiendo un exceso de inhibidor de tripsina de soja (inhibidor de tripsina/tripsina = 2/1). Después de estos tratamientos, se determina la actividad enzimática o la capacidad de reinsertión a membranas de las muestras, correlacionando estas propiedades con sus respectivos patrones electroforéticos en presencia de SDS o urea. La realización de distintos controles, indica que la presencia del inhibidor de tripsina no afecta a las propiedades de la F_1 -ATPasa.

En los tratamientos de las subunidades mayoritarias, α y β con tripsina el proceso seguido es análogo al descrito siendo la relación subunidad/tripsina de 20/1.

El aislamiento de formas distintas de F_1 -ATPasa obtenidas tras un tratamiento con tripsina se lleva a cabo mediante electroforesis a escala micro-preparativa en gel de poliacrilamida. Las muestras, cada una conteniendo aproximadamente 40 μ g de proteína, se aplican sobre un mínimo de seis geles de poliacrilamida al 7%, efectuándose la electroforesis al mismo tiempo. Posteriormente, uno de dichos geles se tiñe con azul de Coomassie G 250 (347) a fin de localizar rápidamente las bandas de proteína, mientras en otro se realiza la tinción histoquímica de actividad ATPásica (véase apartado 2.7.3.). Una vez que las movilidades relativas de las respectivas bandas son medidas, las proteínas se eluyen con tampón Tris-HCl 30 mM (pH 7,5) a partir de pequeños cortes producidos en las zonas correspondientes de los geles restantes. Tras este proceso, en el que se recupera más del 90% de la proteína, se procede a medir la actividad ATPásica y a analizar los patrones electroforéticos en los sistemas de urea y SDS de los diferentes eluidos. Muestras de F_1 -ATPasa no tratadas con tripsina y analizadas en las mismas condiciones sirven como controles.

2.14. Preparación de antisueros.

Se inoculan subcutáneamente varios conejos blancos de la raza New Zealand de 1,5 Kg de peso con enzima pura (0,4 mg) incorporada en adyuvante completo de Freund (353) en un volumen de 1 ml de tampón Tris-HCl 30 mM (pH 7,5). Posteriormente se procede a repetir el proceso semanalmente mediante inyecciones subcutáneas de 0,4 mg de enzima purificada en un volumen final de 1 ml de tampón Tris-HCl 30 mM (pH 7,5) con adyuvante incompleto por un periodo de 3 semanas. Transcurridas dos semanas después de la última inyección

se vuelve a inocular una vez más en la forma ya descrita, y siete días más tarde se extrae la sangre (~30 ml) mediante una punción en la vena marginal de la oreja, tras ser irritada ésta con xileno. A continuación se deja coagular la sangre (2 h a temperatura ambiente y 18 h a 4°C), recogiénose el suero por centrifugación (3.000x g durante 5 min), el cual una vez calentado a 55°C durante 30 min para inactivar el sistema del complemento (354) se almacena a -20°C.

Para obtener antisueros frente a las subunidades α , β y γ purificadas se procede de forma análoga a la descrita anteriormente con la modificación de que la cantidad de proteína utilizada en cada inyección resulta ser de 300 μ g.

Sueros control se obtienen a partir de los mismos conejos antes de inocularlos con el antígeno correspondiente.

2.15. Titulación de antisueros.

Se realizan distintas diluciones de cada antisuero (desde 1/100 hasta 1/51200) con tampón TNE (Tris 10 mM, NaCl 0,25 M, EDTA 1 mM, a pH 7,2), tomándose 200 μ l de cada una en tubos de borosilicato a los que se añade antígeno marcado radiactivamente (20.000 cpm) con 125 I (véase apartado 2.18.). La mezcla se incuba durante 2 h a 37°C y luego 18 h a 4°C. Transcurrido este tiempo se añade a cada tubo 50 μ l de una suspensión de organismos de Staphylococcus aureus, fijados al 10% (p/v) con formol, para precipitar los complejos antígeno-anticuerpo (355), incubándose durante 3 h a temperatura ambiente. Por último, se adiciona a cada tubo 1 ml de tampón TNE conteniendo Triton X-100 al 0,05% y se centrifuga a 0°C (3.000xg durante 15 min). Se separa sedimento y sobrenadante, midiéndose la radiactividad en los mismos. La dilución de antisuero capaz de unir el 50% de antígeno marcado, bajo estas condiciones experimentales, se define como el título del suero (356).

2.16. Inmunodifusión doble bidimensional.

Esta técnica denominada también como doble inmunodifusión de Ouchterlony, se realiza en geles de agarosa al 0,8% en tampón Tris-HCl 30 mM (pH 7,5) según una modificación del método de Campbell (357). Las muestras, aproximadamente 35 μ g de proteína, se introducen en pocillos de 1,5 mm de diámetro equidistantes 4 mm de otro central relleno con el antisuero correspondiente. Tras una incubación de 16 h ó 30 h en una cámara húmeda se observan directamente las bandas de precipitación.

2.17. Inmunolectroforesis.

Se lleva a cabo en placas de agarosa (10x8x0,8 cm) al 0,8% en tampón Tris-HCl 30 mM (pH 7,5) (353). Las muestras, conteniendo aproximadamente 25 μ g de proteína se introducen en pocillos de 1,5 mm de diámetro equidistantes 6 mm del eje longitudinal de la placa y se someten a electroforesis (300 voltios durante 2 h a 10°C) en un aparato LKB (Bromma, Suecia) empleándose Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), como tampón y azul de bromofenol, como marcador. Tres pliegues de papel Whatman, impregnados del tampón mencionado y colocados sobre los extremos de la placa de agarosa, conectan la disolución tampón en los compartimientos anódico y catódico con la superficie del gel de agarosa.

Después de efectuar el paso electroforético, se realiza un canal de 2,5 mm de anchura en el eje longitudinal de la placa y una vez relleno con el antisuero correspondiente, se deja en una cámara húmeda, observándose el desarrollo de las bandas de precipitación a las 24 y 48 horas.

2.18. Marcaje de proteínas con 125 I.

La enzima F_1 -ATPasa purificada, sus subunidades α ,

β , γ y δ , así como F_1 -ATPasas defectivas en alguna de estas subunidades se marcan radiactivamente con ^{125}I mediante una modificación del método de la cloramina-T (358,359). Por este procedimiento el ^{125}I es introducido preferentemente en los residuos de tirosina, si bien los restos de histidina también pueden ser objeto de halogenación (360, 361). La mezcla de reacción (volumen final de 300 μl) contiene tampón TNE, Triton X-100 al 0,05%, 10 μg de proteína, 1 mCi [^{125}I] y 10 μg de cloramina-T. Tras una agitación suave a 22°C durante 1 min, la reacción se detiene mediante la adición de 120 μg de metabisulfito sódico y 16 μg de KI. La separación de la proteína marcada del exceso de ^{125}I libre se efectúa por filtración en gel utilizando columnas de Sephadex G-50 (0,9 cm x 15 cm) o Sephadex G-25 (0,9 cm x 15 cm) según el tamaño de la cadena polipeptídica marcada. Las columnas fueron equilibradas previamente con tampón TNE conteniendo Triton X-100 al 0,05% y eluidas con el mismo tampón. La muestra fue suplementada con 100 μl de una solución de seroalbúmina bovina (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) con el fin de minimizar la adsorción de la proteína marcada sobre las paredes de la columna cromatográfica. El empleo del detergente no iónico, Triton X-100, tanto en la mezcla de reacción como en el equilibrado de la columna y en el tampón de elución resulta ser un requerimiento imprescindible para evitar la formación de agregados durante el proceso de marcaje (véase Resultados). Se analiza el contenido en ^{125}I de las fracciones recogidas y aquellas conteniendo la proteína iodada se dializan frente a 1 litro de tampón Tris-HCl 30 mM (pH 7,5) con cambios frecuentes hasta obtener fondo en los líquidos de diálisis (generalmente 3 cambios al cabo de 10, 20 y 30 h). La proteína así marcada se almacena a -20°C para su uso posterior.

El estado molecular de las proteínas marcadas fue analizado por electroforesis en gel de poliacrilamida en ausencia y en presencia de agentes disociantes (véase Resultados), no detectándose ningún cambio en el estado molecular de aquellas.

2.19. Localización de radiactividad en geles.

Una vez realizadas las electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas o disociantes de las distintas proteínas marcadas radiactivamente, los geles se cortan en pequeñas rodajas de 1 mm de espesor mediante un cortador de geles Mickle (The Mickle Lab. Eng. Co., Gomshall, Surrey, Inglaterra) y se introducen en sus correspondientes viales para medir radiactividad (véase apartado 2.24).

2.20. Radioinmunoensayo de la enzima F₁-ATPasa y de sus subunidades α , β y γ .

Los experimentos de radioinmunoensayo se llevan a cabo en tubos de borosilicato (10 mm x 75 mm). La mezcla de reacción, en un volumen final de 200 μ l, contiene tampón TNE suplementado con Triton X-100 al 0,05%. Sobre este volumen se añade a cada tubo 20 μ l del antisuero correspondiente obteniéndose una dilución final algo superior al valor de su título. A continuación se adicionan diferentes cantidades de proteína no marcada (de 3 a 15.000 ng) seguidas de la adición de una cantidad fija de proteína iodada (aproximadamente 20.000 cpm). Después de una leve agitación, las mezclas de reacción son incubadas durante 3h a 37°C y posteriormente a 4°C durante 18 h. Transcurrido este tiempo se añaden 50 μ l de una suspensión al 10% (p/v) de Staphylococcus aureus, tratado previamente con formol para inactivarlo, dejándose incubar 20 min a 22°C con una agitación constante. Tras la adición de 1 ml de tampón TNE conteniendo Triton X-100 al 0,05%, se centrifugan todos los tubos a 5.000xg durante 20 min recogiendo cuidadosamente sobrenadante y sedimento para medir radiactividad en ambas fracciones en un Radioinmunoanalizador Beckman.

Los datos representados en las figuras correspondientes no presentan el valor medio de un mínimo de dos determinaciones. Todos los resultados se corrigieron por unión antígeno-anticuerpo no específico.

ca. Las curvas se ajustaron por un programa de computación de ajuste de mínimos cuadrados (388).

2.21. Fijación de fosfato a F_1 -ATPasa.

Se incuban 0,17-0,20 mg/ml de enzima purificada en 100 μ l de tampón Tris-HCl 30 mM (pH 7,5) durante 30 min a 23°C con distintas concentraciones de Na_2HPO_4 no radiactivo y trazas de $^{32}\text{P}_i$ (300.000 cpm) en las condiciones indicadas en las leyendas de las figuras. Transcurrido este tiempo, el P_i unido a la proteína se separa del exceso de $^{32}\text{P}_i$ libre mediante filtración en columnas de Sephadex G-100 o G-25 (0,9 cm x 15 cm; $V_o = 4,0$ y 5,0 ml, respectivamente). Se recogen fracciones de 150 μ l, determinándose radiactividad en las mismas (véase apartado 2.24.).

Para calcular las concentraciones molares de la enzima F_1 -ATPasa o sus subunidades, se hace uso de los pesos moleculares de 350.000 dalton para F_1 -ATPasa, 55.000 dalton para subunidad α y 50.000 dalton para subunidad β , determinados previamente (319).

2.22. Análisis de metales.

La presencia de metales se analiza por espectrofotometría de absorción atómica en un espectrómetro Perkin-Elmer, modelo 305B. Las determinaciones de zinc, hierro y calcio se realizan a 213,9 nm, 248,3 nm y 422,7 nm respectivamente. Para obtener valores cuantitativos se tratan 3 mg de enzima en un volumen final de 1 ml completado con agua desionizada con 0,1 ml de H_2SO_4 conc. y 0,1 ml de HNO_3 conc. durante 2 horas en agua hirviendo. La posible presencia de metales existente en los tampones empleados durante la purificación de la enzima se corrige utilizando como controles los ultrafiltrados de cada preparación enzimática.

Las soluciones patrón de metales se preparan a partir de sales espectrograficamente puras (Merck, Darmstadt, Rep. Federal Alemana) disueltas en agua desionizada.

El agua empleada en este tipo de experimentos se destila y desioniza a través de un sistema de purificación de resina de intercambio iónica (Dafa, Modelo Mar-606). El material de vidrio se trata con soluciones de EDTA, lavándose repetidamente con agua desionizada inmediatamente antes de su utilización. Se toman las precauciones necesarias contra la contaminación de posibles trazas de metales siguiendo las recomendaciones descritas por Thiers (362) y siempre que es posible se emplea material de polietileno.

2.23. Reconstitución de Zn^{2+} -(F₁-ATPasa).

Estos experimentos se llevan a cabo midiendo la incorporación de $^{65}Zn^{2+}$ a la proteína desprovista de Zn^{2+} obtenida por tratamiento con EDTA de la enzima nativa como se describe en Resultados.

2.24. Medidas de radiactividad.

La radiactividad de ^{125}I y de ^{65}Zn se mide directamente en un Radioinmunoanalizador Beckman.

La medida de ^{32}P se lleva a cabo en un contador de centelleo líquido Intertechnique (Francia). A las muestras acuosas se les añade 10 volúmenes de líquido de centelleo Tolueno/Triton (363), constituido por una mezcla de 2 volúmenes de Tolueno, 1 volumen de Triton y 0,5% de butil-PBD.

2.25. Medidas de absorción.

Las medidas de absorción se hacen en un espectrofotómetro de haz sencillo Spectronic 70 (Bausch & Lomb., Rochester, New

York, EE.UU.). Los espectros de absorción se registran en espectrofotómetros de doble haz Varian modelo 635 D o Varian Cary 16 S (Varian Cary Instruments, Monrovia, California), usándose cubetas de 5 y 10 mm de camino óptico, velocidades de 20 nm/min y abertura pequeña de rendija.

2.26. Medidas de fluorescencia.

Las medidas de fluorescencia se realizaron con un espectrofluorímetro diferencial Fica 55 MkII (Le Mesnil, St. Denis, Francia) equipado con una lámpara de xenón de 450 vatios y célula de rodamina B, mantenida a $32 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ mediante un baño de temperatura constante Haake NB 22 (Karlsruhe, Rep. Federal Alemana). Las condiciones de medida de emisión fueron: una rendija de 7,5 nm, una ganancia de medida de 5 a 10, una constante de tiempo de 3 s y una velocidad de barrido de 10nm/min. Las cubetas (0,5 cm x 0,5 cm) se mantuvieron a la temperatura deseada circulando agua a través del compartimiento celular y los portacubetas por medio de un baño Lauda K2RD. Ambas cubetas (muestra y referencia) contenían el mismo tampón, ajustándose el cero previamente a la adición de la proteína. La exposición de las proteínas a los rayos de excitación fué minimizada para evitar fotólisis. El registro de las medidas de fluorescencia se realizó en un registrador XY Ohnigrafic 200 (Houston Instruments, Bellaire, Texas, EE.UU.), utilizándose la escala de 50 mV, una constante de tiempo de 3 s y una velocidad de registro de 20 nm/min. Se emplearon unidades arbitrarias de fluorescencia, tomando como 100 la emisión a 340 nm de una solución de F_1 -ATPasa a 25°C a una concentración de 80 $\mu\text{g/ml}$ en tampón Tris-HCl 30 mM (pH 7,5), usando como referencia este mismo tampón y excitándose con radiación de 276 nm.

3. RESULTADOS

96

3.1. SUBESTRUCTURA DEL
FACTOR BF_1 .

3.1.1. Aislamiento y análisis de la enzima soluble.

El tratamiento de membranas de M. lysodeikticus, obtenidas según se ha descrito en Materiales y Métodos, con tampón de baja fuerza iónica libera aproximadamente el 55% de la actividad ATPásica unida a membranas (Tabla XI), valor algo inferior al descrito por Muñoz y col. (124,152). El análisis de esta enzima soluble por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no disociantes y en presencia de dodecilo sulfato sódico se muestra en la figura 8. La presencia de tres componentes de pesos moleculares aproximados de 55.000, 50.000 y 35.000 dalton en el gel con SDS corresponderían a las tres subunidades α , β y γ identificadas en este factor BF_1 (319). La banda de movilidad relativa 0,85 (aproximadamente 19.000 dalton) podría asimilarse a la subunidad δ presente en las F_1 -ATPasas mitocondriales, de cloroplastos y de algunas bacterias (vease Introducción), pero no descrita hasta el momento en M. lysodeikticus; mientras que el componente de movilidad relativa 0,67 (aproximadamente 26.000 dalton) podría corresponderse con la subunidad ϵ de peso molecular 25.000 dalton presente en las preparaciones de M. lysodeikticus forma $B_{\Delta T}$ (véase Introducción) e identificada por Carreira y col. (330) como el supuesto inhibidor natural de la enzima y responsable de su latencia.

Por otra parte, la electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no disociantes de la enzima soluble muestra la presencia de tres bandas de proteína de movilidades relativas 0,29, 0,58 y 1,00, además de un cierto porcentaje de proteína que apenas se introduce en el gel (figura 9). El aislamiento de estos componentes y su posterior análisis por PAGE en presencia de SDS (Fig. 9) permite visualizar la composición de cada una de las bandas teñidas. De este análisis se infiere que gran parte del componente de peso molecular 19.000 dalton apenas se introduce en el gel, mientras que la mayor parte del componente de 26.000 dalton migra con el frente cuando la electroforesis se lleva a cabo

TABLA XI

ESQUEMA CUANTITATIVO DEL PROCESO DE SOLUBILIZACION DEL FACTOR BF₁ DE MEMBRANAS DE MICROCOCCUS LYSDIETICTUS Y DE SU POSTERIOR PURIFICACION. (Véase figura 7)

Fración	Proteína total mg	%	Actividad enzimática unidades	%	Actividad específica unidades/mg
S ₀	3717	76,17	110	15,83	0,03(+)
S ₁	261	5,35	58	8,34	0,22(+)
S ₂	128	2,62	46	6,62	0,36(+)
S ₃	77	1,58	38	5,47	0,49(+)
S ₄	61	1,25	41	5,90	0,67(+)
S ₅	201	4,12	298	42,88	1,48(+)
S ₆	81	1,66	79	11,37	0,97(+)
Membranas D	354	7,25	25	3,60	0,07(+)
Total	4880	100	695	100	
SOLUBILIZACION					
PURIFICACION					
ATPasa soluble (S ₅)	201	5100	298	100	1,48(+)
ATPasa purificada por					
a) PAGE preparativa	23,6	11,7	151	50,7	6,40(-)
b) Sephadex G-200	19,8	9,8	122,7	41,2	6,20(-)

El signo "+" indica estimulabilidad por inipaline de la actividad ATPásica, mientras que el signo "-" indica que la preparación no es estimulable.

Dependiendo del tipo de experimento a realizar pueden unirse los sobrenadantes S₅ y S₆ para su posterior purificación. Condiciones en Materiales y Métodos.

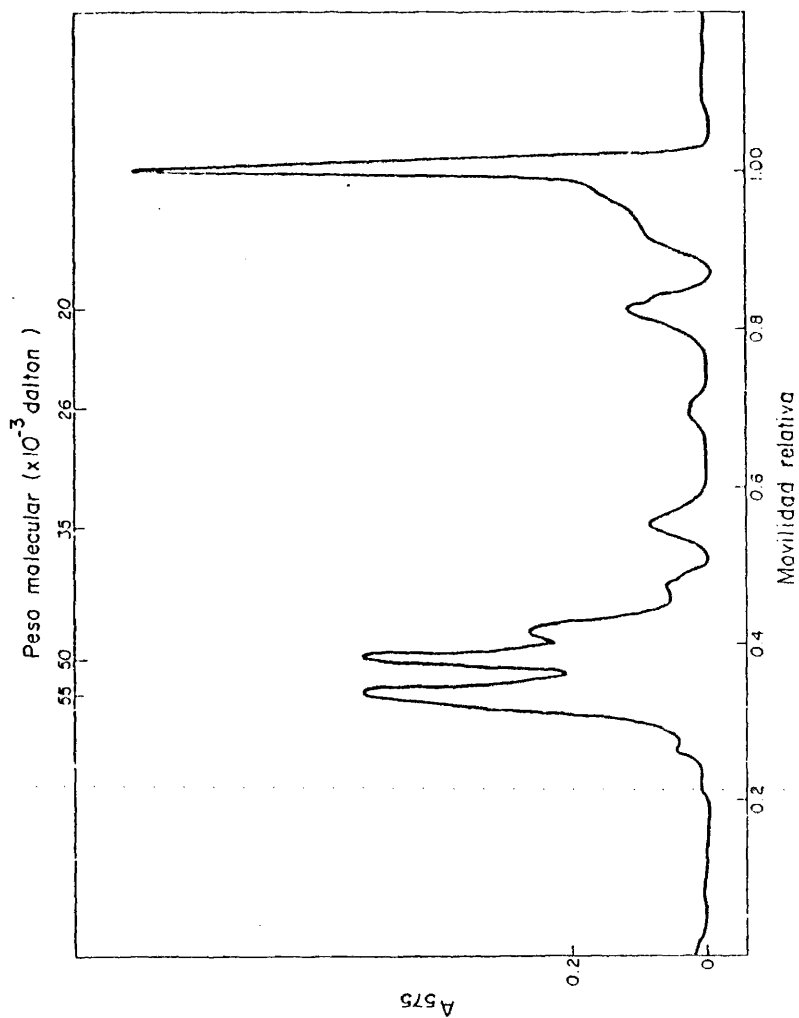


FIGURA 8.- Electrophoresis en gel de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS 0,1% de -
aproximadamente 60 μg de BF_3 , soluble de M. lysodeikticus (condiciones en Materiales y Méto-
dos).

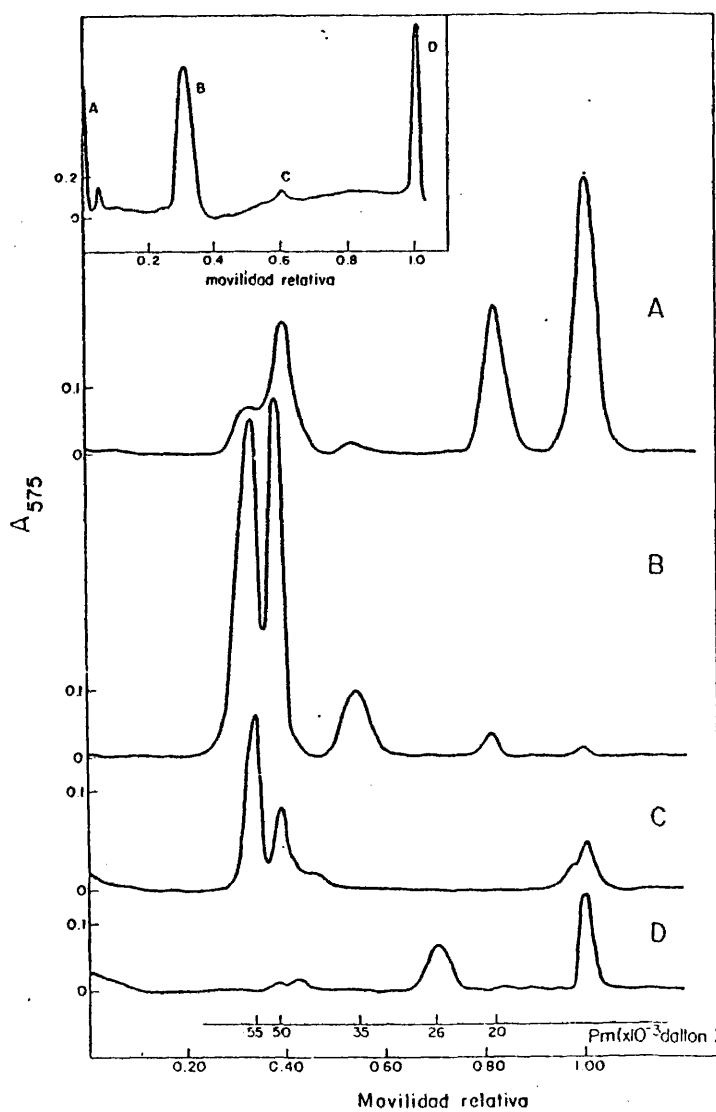


FIGURA 9.- Registro electrolorético de BF₁ soluble (aprox. 40 µg) - después de electroforesis en gel de poliacrítamida al 7% en condiciones no disociantes; y perfiles densitométricos de las cuatro bandas de proteína A, B, C y D aisladas y sometidas a electroforesis en gel de poliacrítamida al 12% en presencia de SDS 0,1% (condiciones en Materiales y Métodos).

en condiciones no disociantes. Por otra parte, la banda de movilidad relativa 0,29, correspondiente a F_1 -ATPasa, cuya actividad no muestra - ahora estimulabilidad por tripsina, exhibe un patrón electroforético constituido por las subunidades α , β y γ ya definidas junto con un componente de unos 19.000 dalton de peso molecular. Un análisis comparativo de la subestructura de la enzima soluble estimulable y no estimulable por tripsina (compárese figuras 8 y 9 b) sugiere que el componente de peso molecular de 26.000 dalton o alguno de los que migran con movilidad relativa 1,00 (peso molecular inferior a 10.000 dalton) podría ser el responsable de la latencia de la actividad enzimática. Sin embargo la adición del componente de 26.000 dalton, parcialmente purificado, no afecta significativamente a la actividad ATPásica cuando se incuba con la enzima purificada en distintas condiciones experimentales (ausencia de cationes divalentes; presencia de Mg^{2+} o Ca^{2+} ; distintas temperaturas, 4°C y 37°C).

3.1.2. Identificación de un nuevo componente en la subestructura de F_1 -ATPasa de *M. lysodeikticus*.

Un esquema del proceso de solubilización y purificación de la enzima se muestra en la tabla XI.

Tras la purificación a homogeneidad de esta enzima, se obtiene una única banda de proteína de movilidad relativa $0,27 \pm 0,02$ en electroforesis en gel de poliacrilamida al 7% en condiciones no disociantes. No obstante, un examen más detallado por PAGE analítica a más alta resolución, aplicando pequeñas cantidades de enzima en geles de 10 cm de longitud, permite visualizar el desdoblamiento de la banda correspondiente a F_1 -ATPasa en al menos tres, solapadas parcialmente entre sí, poniéndose de manifiesto la característica microheterogeneidad existente en las preparaciones de esta enzima (164,321,323).

La actividad específica de estas preparaciones de F_1 -ATPasa de *M. lysodeikticus* dependiente de Ca^{2+} resulta ser de $6,42 \pm 1,08$

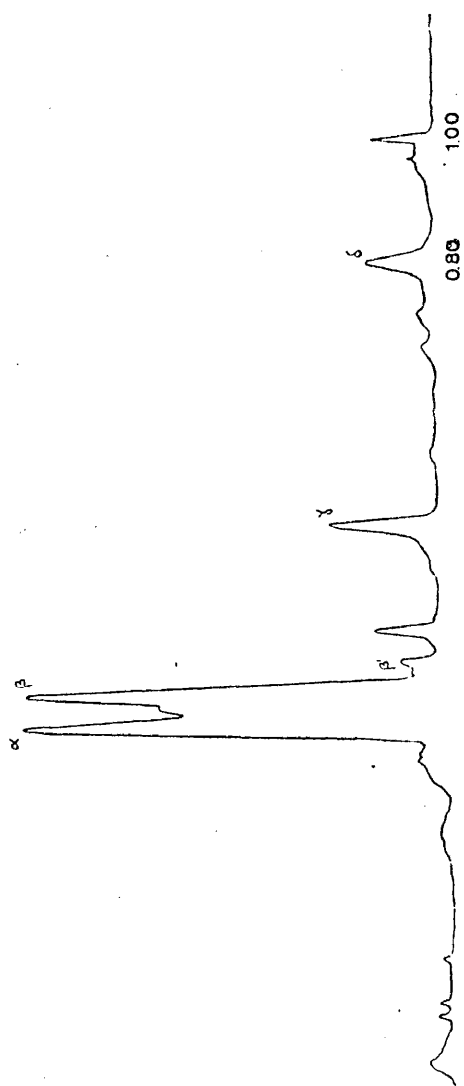
$\mu\text{mol Pi/mg prote\u00edna}\cdot\text{min}$ (diez preparaciones), no siendo estimulable por tripsina.

El empleo de geles de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS permite identificar la presencia de cuatro bandas de prote\u00edna en la F_1 -ATPasa purificada, correspondiendo tres de ellas a las subunidades α , β y γ descritas previamente como componentes propios de la enzima -- (319), y una cuarta banda a un nuevo componente no descrito hasta el momento en la F_1 -ATPasa de M. lysodeikticus de movilidad relativa $0,81 \pm 0,01$ (cinco determinaciones) (v\u00e9ase Fig. 10), correspondiente a un peso molecular de 20.000 ± 700 dalton (cinco determinaciones) (Fig. 11). La utilizaci\u00f3n de reductores como DTT (364) no produce ning\u00fan cambio sustancial en estos patrones electrofor\u00e9ticos.

La presencia constante de esta nueva cadena polipept\u00eddica -- en todas las preparaciones de F_1 -ATPasa, con independencia de la cepa A o B del microorganismo empleado para su aislamiento, parecen -- identificarla como una subunidad intr\u00ednseca de la enzima. Este nuevo componente puede equipararse con la subunidad δ de otros factores F_1 de -- acoplamiento, tanto desde el punto de vista funcional como de su talla molecular (v\u00e9ase Discusi\u00f3n).

De esta manera, la estructura cuaternaria de este factor -- de acoplamiento BF_1 se encuentra constituida por cuatro tipos de subunidades denominadas: α , β , γ y δ con pesos moleculares aproximados de -- 55.000, 50.000, 35.000 y 20.000 dalton respectivamente, calculados en -- los sistemas de poliacrilamida en presencia de SDS (344) con las limitaciones inherentes a este m\u00e9todo (177,178,345,382).

Por otra parte, adem\u00e1s de los cuatro componentes mencionados, en el patr\u00f3n electrofor\u00e9tico del factor BF_1 en presencia de SDS -- (v\u00e9ase Fig. 10) se puede apreciar la presencia de otros dos polip\u00e9ptidos debilmente te\u00f1idos, uno de ellos denominado β' (peso molecular aproximado de 47.000 dalton) y otro que migra junto con el colorante marcador ---



Movilidad relativa

FIGURA 10.- Perfil densitométrico del factor BF_1 purificado (aprox. 40 μ g) después de electroforesis en gel de poliacrilamida al 2% en presencia de SDS 0,1% (condiciones en Materiales y Métodos).

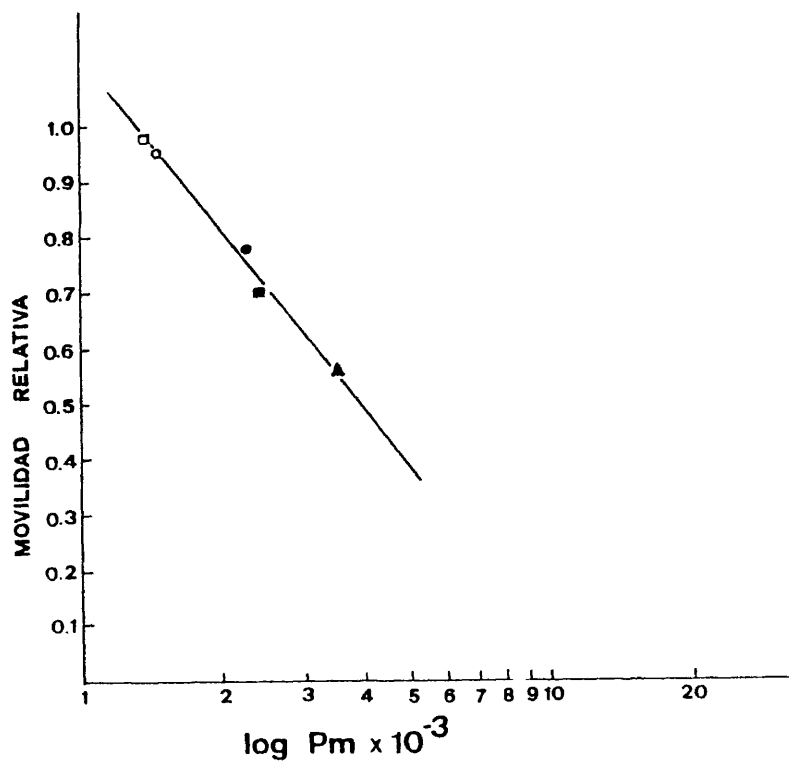


FIGURA 11.- Representación del logaritmo del peso molecular frente a movilidad relativa en electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS 0,1 % de varios patrones de peso molecular conocido: (□), ribonucleasa (p.m. 13.700 dalton); (O), lisozima (p.m. 14.500 dalton), (●), inhibidor de tripsina de soja (p.m. 22.700 dalton); (■), tripsina (p.m. 23.000 dalton); y (▲) pepsina (p.m. 35.000 dalton).

(movilidad relativa de 1,0 ; correspondiente a un peso molecular máximo de 13.000 dalton). Sin embargo la variabilidad en su presencia y/o contenido de preparación a preparación parece sugerir que no constituyen componentes intrínsecos del factor BF_1 . Por el contrario, el hecho de que su presencia se vea favorecida por el envejecimiento de la enzima parece indicar que provienen de procesos degradativos sobre las subunidades de mayor talla molecular.

3.1.3 Relación estequiométrica de subunidades .

La medida de las intensidades de cada una de las bandas (áreas bajo los picos en los perfiles densitométricos) obtenidas después de analizar distintas preparaciones de F_1 -ATPasa en geles con SDS, permite realizar un cálculo aproximado de la proporción relativa en que las distintas subunidades se encuentran en la proteína. Los resultados de estas estimaciones se muestran en la Tabla XII, apreciándose una gran variabilidad en lo que respecta al contenido en subunidad δ . En la mayoría de las preparaciones se encuentra una molécula de δ por molécula de complejo $\alpha_3\beta_3\gamma$, considerado previamente como el complejo intrínseco de la enzima (319), sin embargo se obtienen preparaciones conteniendo dos copias de subunidad δ (Tabla XII). De este modo, en principio se podría formular una estequiometría $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$ ó $\alpha_3\beta_3\gamma\delta_2$ con las que si los pesos moleculares de las subunidades y del factor BF_1 calculados son correctos, se obtendrían pesos moleculares de 370.000 ó 390.000 dalton respectivamente, compatibles con la talla molecular de 345.000 ó 400.000 dalton determinada previamente (319,339).

TABLA XII

PROPORCIÓN RELATIVA ENTRE SUBUNIDADES DE DIFERENTES PREPARACIONES DE F₁-ATPasa DE M.LYSODEIKTICUS

Preparación	Relación molar ^a		
	α	β	δ
1	3,05	3,00	0,81
2	2,90	3,00	0,85
3	3,02	3,00	0,98
4	2,95	3,00	1,44
5	2,80	3,00	0,78
6	3,48	3,00	1,11
7	2,73	3,00	1,40
	$2,99 \pm 0,24$	3,00	$1,05 \pm 0,27$
			$1,35 \pm 0,74$

^a Las relaciones molares se determinaron a partir de los perfiles densitométricos de diferentes preparaciones de F₁-ATPasa sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS 0,1%, según se describe en Materiales y Métodos. Los valores medios se expresan con sus respectivas desviaciones estándar.

3.2. ANTIGENICIDAD DE LA ENZIMA
F₁-ATPasa Y SUS SUBUNIDADES.

3.2.1. Caracterización de antisueros.

Las figuras 12 y 13 muestran los experimentos inmunológicos en los que se pone de manifiesto la antigenicidad de la enzima purificada de M. lysodeikticus forma A, así como de sus subunidades α , β y γ aisladas en presencia de urea (véase Materiales y Métodos). En la figura 12 A se observa la presencia de una única banda de precipitación por difusión de la F_1 -ATPasa contra su antisuero. De igual modo, la enzima completa reacciona con los antisueros obtenidos frente a las subunidades α y β (véase Fig. 12 B), los cuales no presentan reacción cruzada entre sí (véase Fig. 13 A y 13 B). Estas tres subunidades reaccionan con suero anti- $(F_1$ -ATPasa) y con sus respectivos antisueros (Figs. 13 A y 13 B), lo que indica que los determinantes antigénicos de las subunidades se expresan en el conjunto de la enzima. También merece comentario la mayor movilidad hacia el ánodo de la subunidad β respecto a la subunidad α , lo que refleja las diferencias existentes entre ambas subunidades en cuanto a la relación entre aminoácidos básicos y ácidos de cada una de ellas (320).

Por otra parte, la antigenicidad del factor BF_1 aislado de M. lysodeikticus forma B ha sido previamente puesta de manifiesto, así como el diferente comportamiento de las dos formas de F_1 -ATPasa purificadas de las subcepas de M. lysodeikticus A y B (331, 332), debido al gran polimorfismo de la molécula F_1 -ATPasa de cada forma (332). Esta microheterogeneidad de la enzima parece ser consecuencia de su inestabilidad, basada en la labilidad de sus subunidades α (164, 320, 330) y repercute en su comportamiento como antígeno e inmunógeno (332).

Estos resultados corroboran la antigenicidad del factor BF_1 aislado de M. lysodeikticus descrita con anterioridad (152, 336), a la vez que demuestran por primera vez la antigenicidad de las subunidades de este factor. Además, esta es la primera demostración de que las subunidades aisladas en presencia de urea son antigénicas ya que en estudios

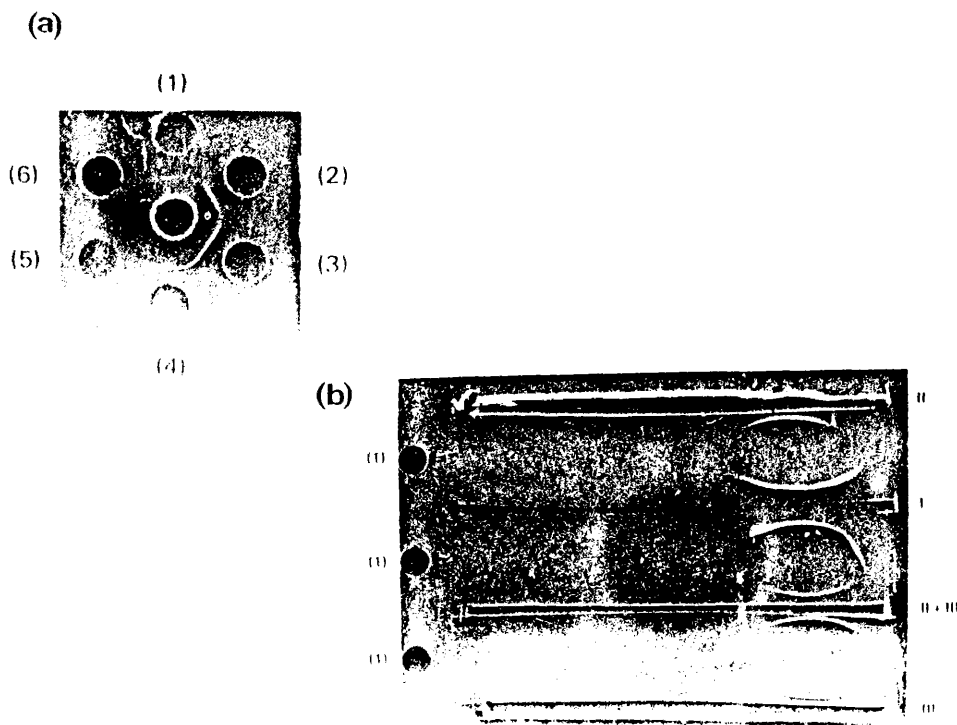


FIGURA 12.- Reactividad y especificidad de los anticuerpos preparados frente a F₁-ATPasa de *M. lysodeikticus* y sus subunidades α, β y γ. (A) Los experimentos de inmunodifusión muestran la reacción de suero anti-(F₁-ATPasa) con la holoenzima. Pocillo central, 35 µg de F₁-ATPasa purificada. Pocillos externos, diluciones de suero anti-(F₁-ATPasa): (1), sin diluir; (2), 1/5; (3) 1/10; (4), 1/20; (5), 1/40; (6), 1/80. (B) Inmunolectroforesis de F₁-ATPasa frente a sueros anti-(F₁-ATPasa) y anti-(subunidades α y β). Muestras de F₁-ATPasa (20 µg) se introdujeron en el pocillo (1); los canales longitudinales contenían 150 µl de los sueros siguientes: I, anti-(F₁-ATPasa), II, anti-(subunidad α); III, anti-(subunidad β); pero en la mezcla de sueros anti-(subunidad α) y anti-(subunidad β) se utilizaron 75 µl de cada suero.

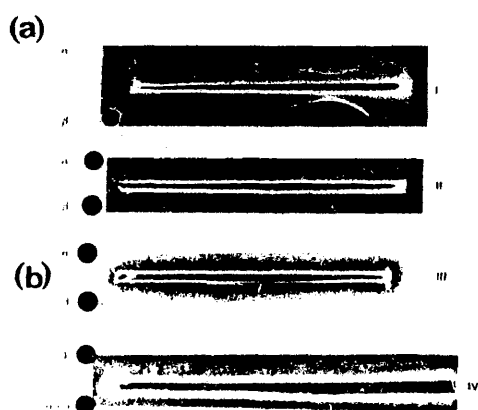


FIGURA 13.- Reactividad y especificidad de los anticuerpos preparados frente a F_1 -ATPasa de *M. lysodeikticus* y sus subunidades α , β y γ . (A) Inmunolectroforesis de las subunidades α y β aisladas frente a suero anti- $(F_1$ -ATPasa) (I). Las muestras de cada subunidad contenían 30 μ g de proteína; los canales longitudinales contenían 150 μ l de suero (B) Inmunolectroforesis de las subunidades α , β y γ aisladas frente a sus antisueros (II, anti- α ; III, anti- β ; IV, anti- γ). Las muestras de cada subunidad contenían 30 μ g de proteína, excepto en las mezclas de las subunidades $\alpha + \beta$ (15 μ g cada una); los canales longitudinales contenían 150 μ l de cada suero.

previos con F_1 -ATPasa aislada de cloroplastos y E.coli, se utilizaron como antígenos los complejos subunidad-SDS (196,197) y más recientemente en el factor BF_1 de la bacteria termófila PS3, las subunidades se aislaron en presencia de clorhidrato de guanidina (153).

Las propiedades inmunológicas de la subunidad δ no han podido ser estudiadas debido a que hasta el momento actual se carece de un método de purificación de dicha subunidad que preserve sus propiedades antigénicas. El aislamiento de la subunidad δ por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS conduce a una pérdida o cambio de sus propiedades inmunológicas.

3.2.2. Título de los sueros.

La figura 14 ilustra los títulos de los distintos antisueros: - 1/12.000 para anti- $(F_1$ -ATPasa), 1/6.400 para anti-(subunidad α), - 1/3.200 para anti-(subunidad β) y 1/200 para anti-(subunidad γ). - Por otra parte, el título del suero anti- $(F_1$ -ATPasa) calculado al emplear su propio antígeno marcado con ^{125}I así como sus subunidades (Fig. 15) resulta ser de 1/12.000 con ^{125}I F_1 -ATPasa, 1/1.600 con ^{125}I subunidad α , 1/6.400 con ^{125}I subunidad β y 1/800 ^{125}I subunidad γ .



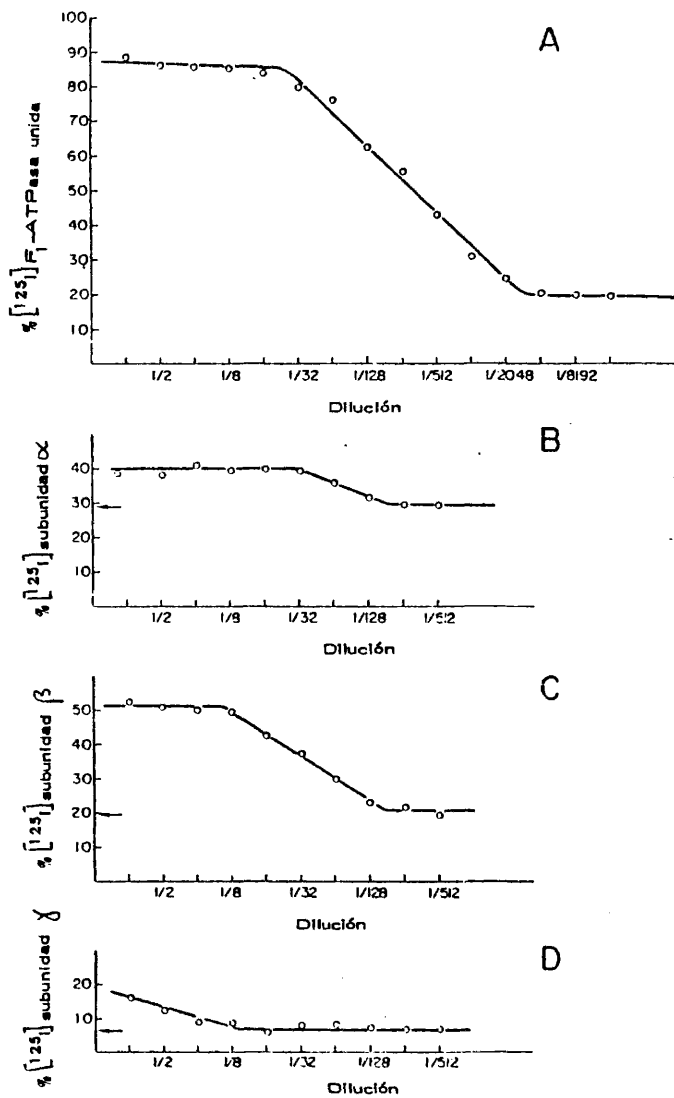


FIGURA 14.- Titulación de sueros: (A), anti-(F₁-ATPasa) frente a [125I] F₁-ATPasa; (B), anti-(subunidad α) frente a [125I] subunidad α; (C), anti-(subunidad β) frente a [125I] subunidad β; (D), anti-(subunidad γ) frente a [125I] subunidad γ (condiciones en Materiales y Métodos).

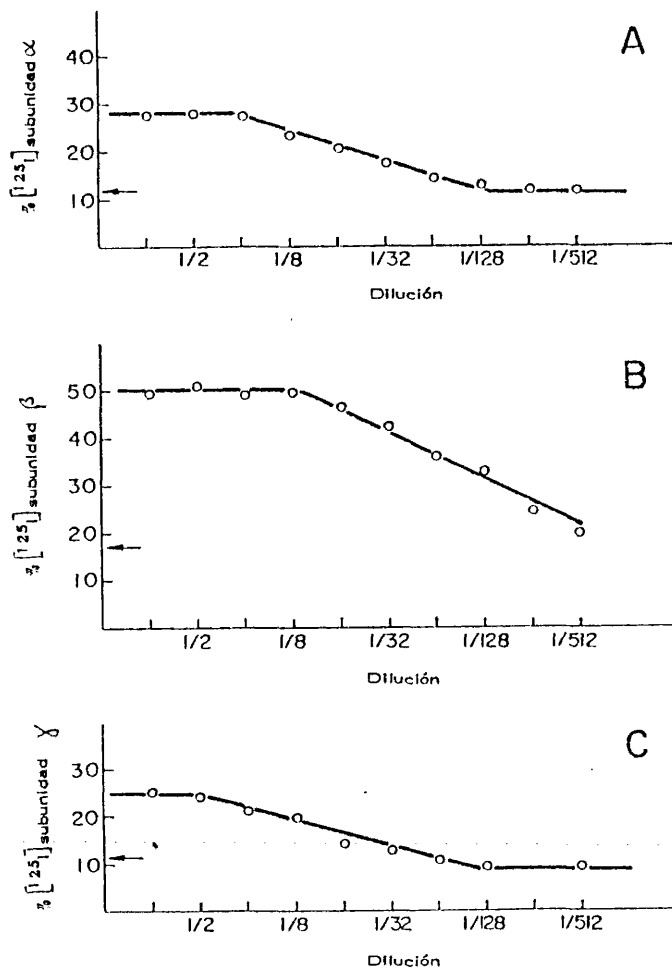


FIGURA 15.- Título del suero anti- $(F_1\text{-ATPasa})$ medido frente a ^{125}I subunidad α (A), ^{125}I subunidad β (B) y ^{125}I subunidad γ (C).

3.3. RADIOINMUNOENSAYO DE F_1 -ATPasa
Y SUS SUBUNIDADES. INFLUENCIA
DE LAS SUBUNIDADES α , β Y γ
SOBRE LAS PROPIEDADES INMUNO
QUIMICAS DE LA ENZIMA.

3.3.1. Marcaje y estado molecular de la molécula F_1 -ATPasa y de sus subunidades α , β y γ .

La enzima F_1 -ATPasa así como sus subunidades α , β y γ aisladas en presencia de urea se marcaron con ^{125}I mediante una modificación del método conocido como de la cloramina T (véase Materiales y Métodos). Un inconveniente que suscitó esta técnica de marcaje radicaba en la formación de agregados durante el proceso de iodación (compárense Figs. 16 y 17). Esta dificultad fué fácilmente subsanable mediante la adición del detergente no iónico Triton X-100 al 0,1%, a la mezcla de reacción y al tampón del gel (Figs. 18 y 19). Las proteínas marcadas (enzima completa y subunidades α y β) se corrieron en geles de poliacrilamida en condiciones nativas obteniéndose los resultados mostrados en las figuras 19, 20 y 22. Simultáneamente, se corrieron las mismas proteínas sin marcar en geles de poliacrilamida de idéntica composición a los anteriormente citados, obteniéndose los perfiles densitométricos ilustrados en las figuras 18 y 21. La perfecta correspondencia existente entre los perfiles obtenidos en las electroforesis de la proteína "fría" y marcada, indica la presencia de una única especie molecular y la ausencia de cambios en el estado molecular y en la movilidad relativa de la molécula F_1 -ATPasa y de cualquiera de sus subunidades después del proceso de marcaje con iodo. La subunidad α no se teñía con Coomassie R250 cuando se realizaba una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no disociantes y en presencia de Triton X-100 al 0,1%.

También fué examinado el estado molecular de la proteína F_1 -ATPasa así como el de sus subunidades α , β y γ después del marcaje mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS (Fig. 23) mostrándose de nuevo la preservación de su integridad molecular.

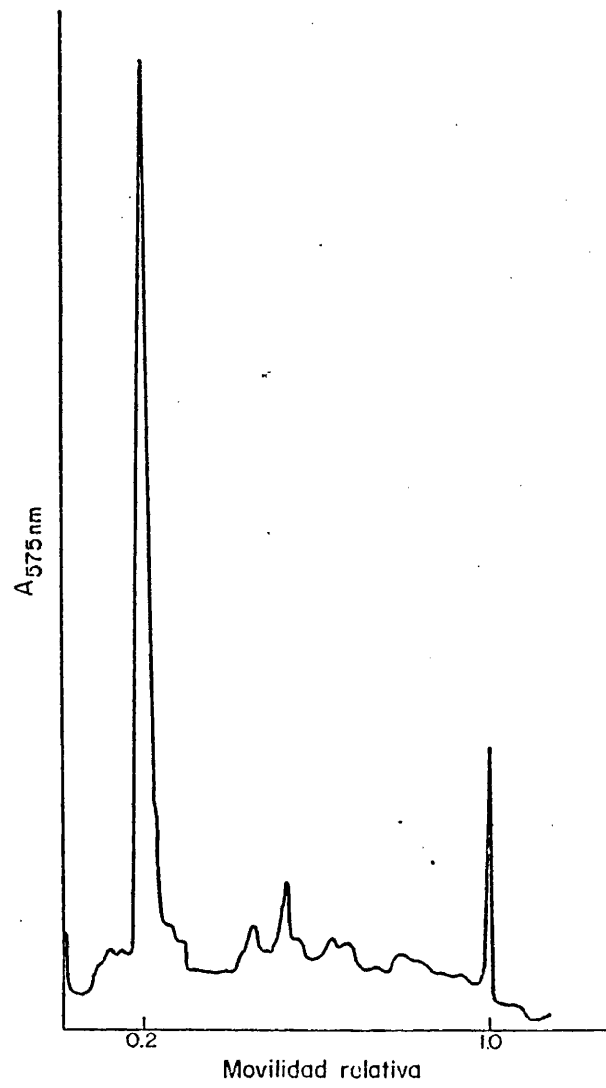


FIGURA 16.- Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7% de F₁-ATPasa purificada (aprox. 20 μg) (condiciones en Materiales y Métodos).

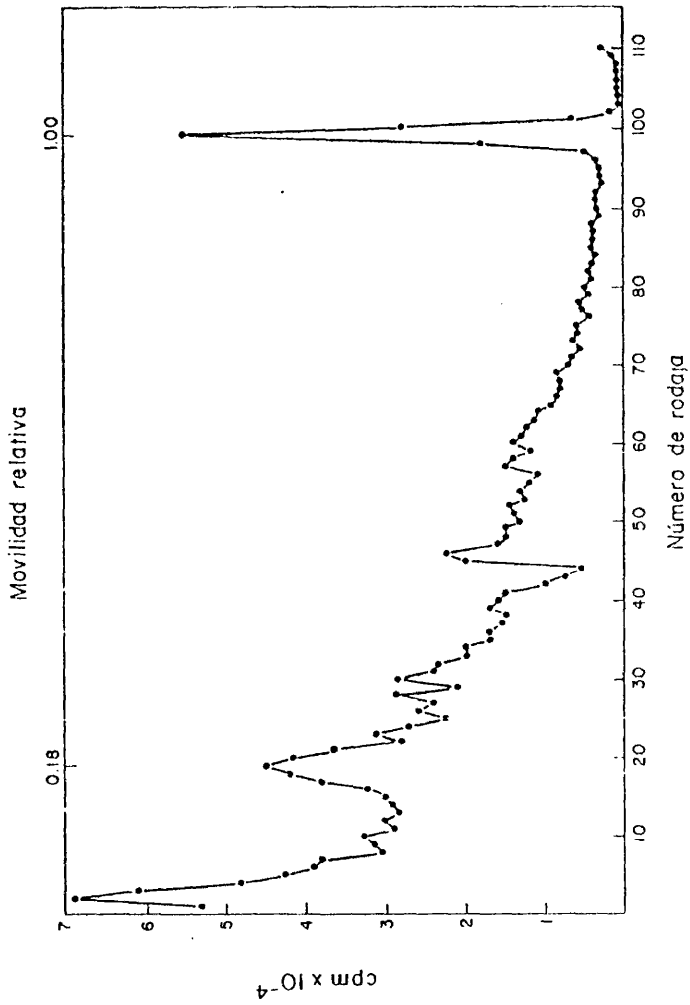


FIGURA 17.- Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7% de $[^{125}\text{I}] \text{F}_1\text{-ATPasa}$ (condiciones en Materiales y Métodos).

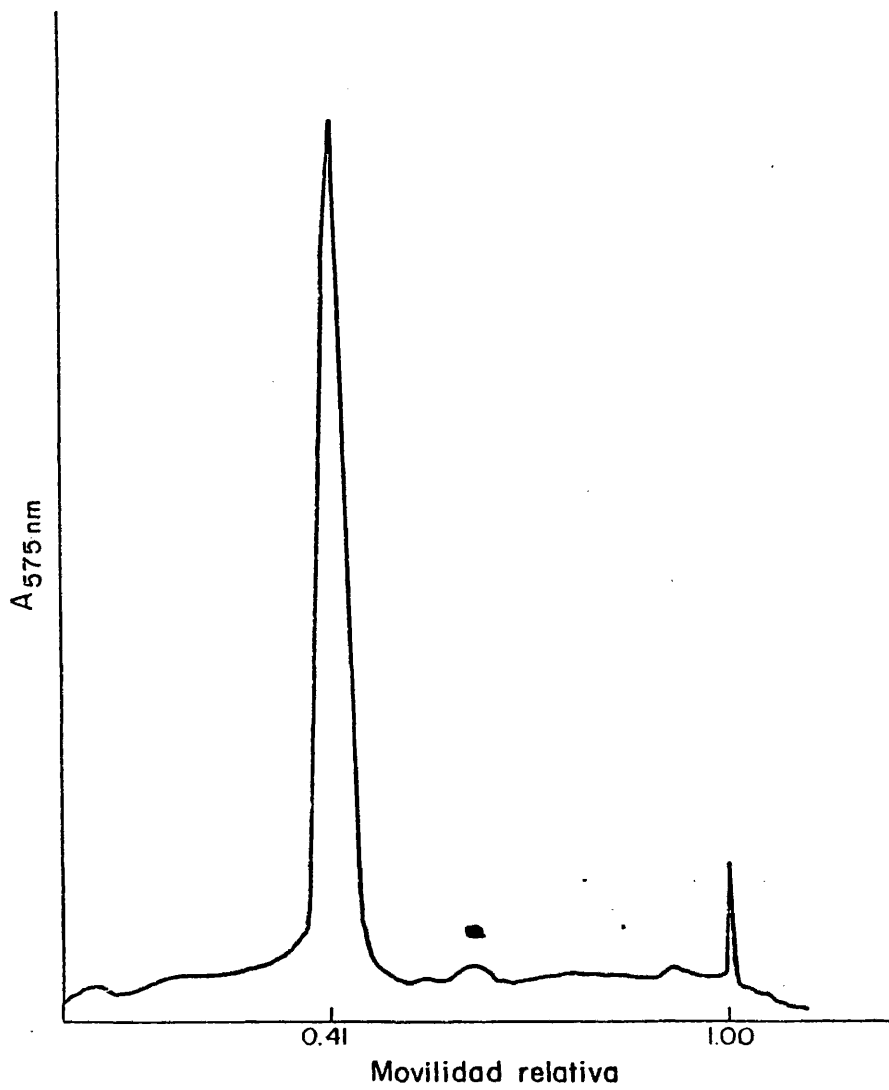


FIGURA 18.- Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% en presencia de Triton X-100 0,1% de F_1 -ATPasa purificada (aprox. 20 μ g) (condiciones en Materiales y Métodos).

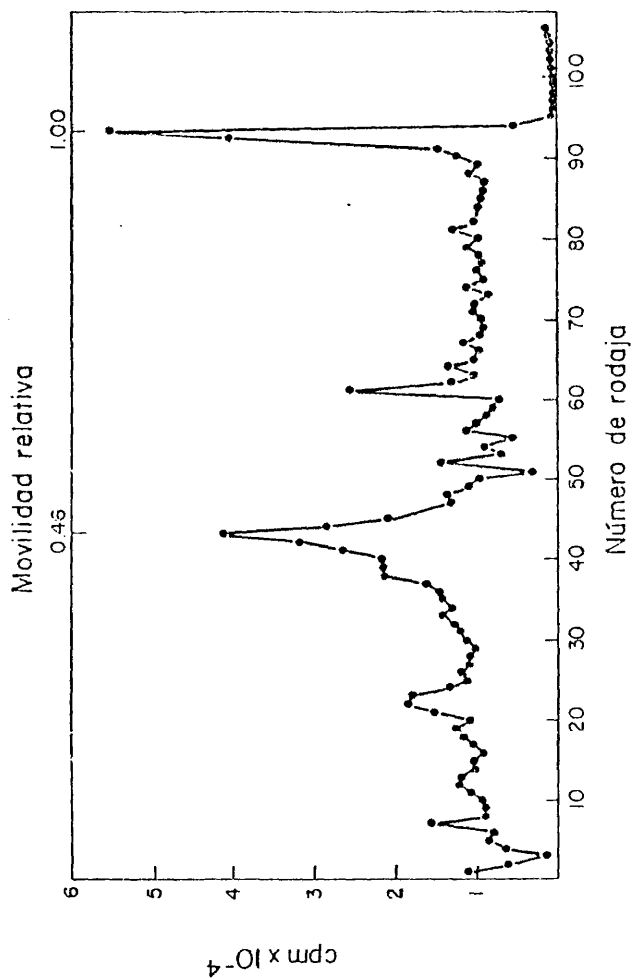


FIGURA 19.- Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% en presencia de Triton X-100 0,1% de $[^{125}\text{I}]\text{F}_1\text{-ATPasa}$ (condiciones en Materiales y Métodos).

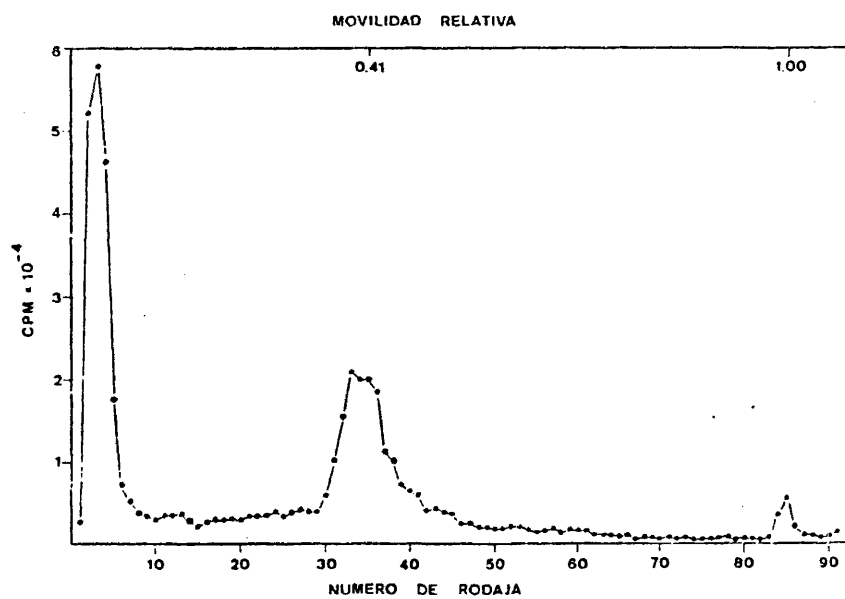


FIGURA 20.- Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7% en presencia de Triton X-100 al 0,1% de $[^{125}\text{I}]$ subunidad α (condiciones en Materiales y Métodos).

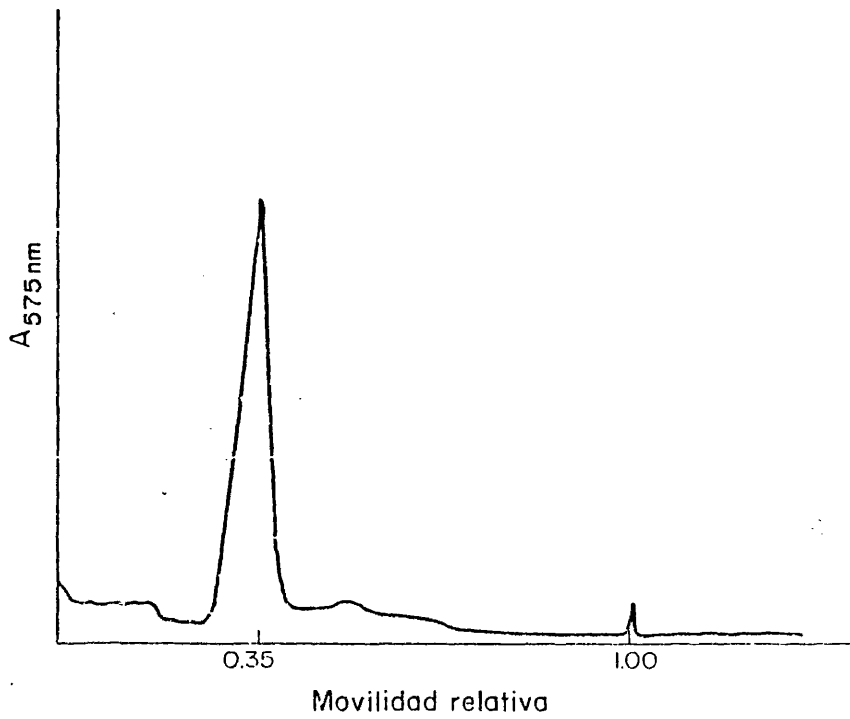


FIGURA 21.- Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7% en presencia de Triton X-100 al 0,1% de aproximadamente 30 μ g de subunidad β (condiciones en Materiales y Métodos).

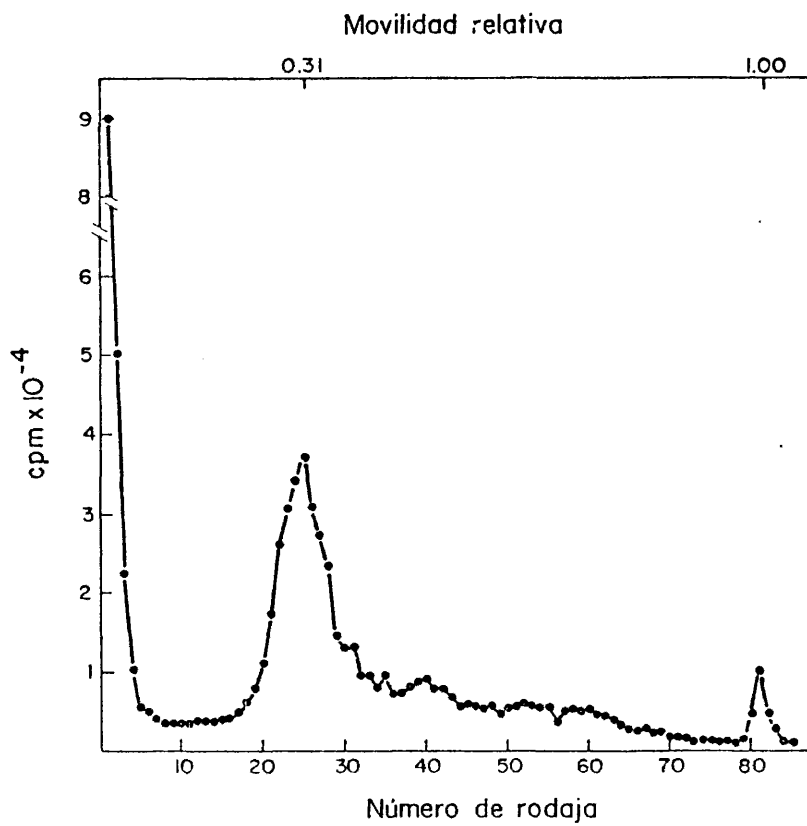
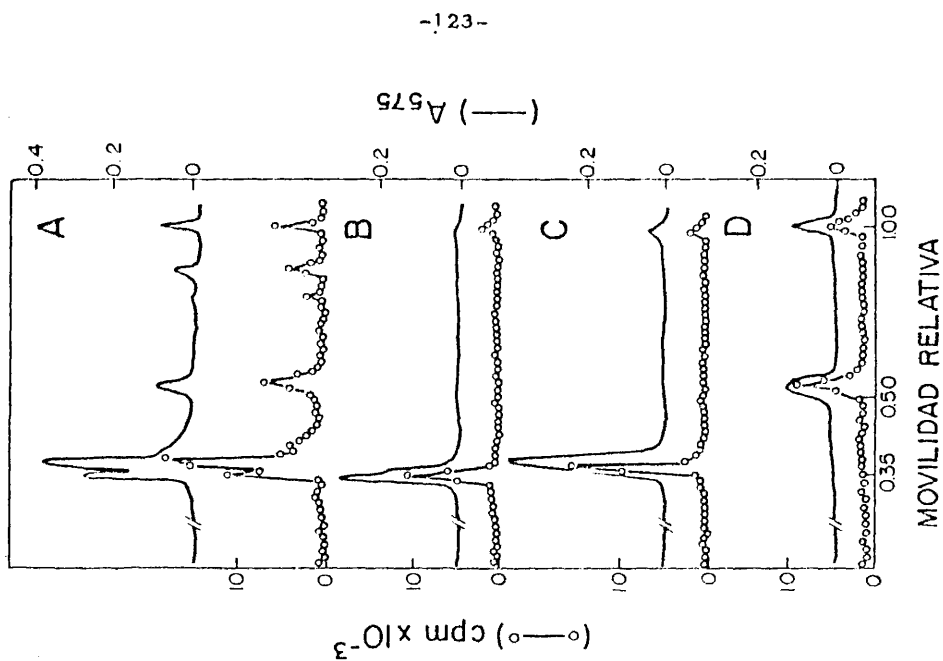


FIGURA 22.- Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7% en presencia de Triton X-100 al 0,1% de $[^{125}\text{I}]$ subunidad β (condiciones en Materiales y Métodos).

FIGURA 23.- Pureza y estado molecular de la F_1 -ATPasa de *M. lysodeikticus* y sus subunidades. Las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS (Materiales y Métodos) antes de ser marcadas con ^{125}I para registrar su pureza y después del marcaje para comprobar la preservación de su integridad molecular. A) 40 μ g de F_1 -ATPasa (70.000 cpm); B) 25 μ g de subunidad α purificada (50.000 cpm); C) 25 μ g de subunidad β purificada (55.000 cpm); D) 8 μ g de subunidad γ (50.000 cpm). Tinción de proteína (—); radiactividad (o—o).



Las radiactividades específicas de las diferentes subunidades α , β , γ resultaron ser de 1,23; 1,35 y 4,5 mCi/ μ mol respectivamente mientras que la molécula de F_1 -ATPasa poseía una radiactividad específica de 260 μ Ci/ μ mol en condiciones no disociantes, pero en presencia de Triton X-100, necesario para aumentar la eficiencia del marcaje y la dispersión molecular de la enzima.

3.3.2. Radioinmunoensayo de F_1 -ATPasa.

La curva estándar para el radioinmunoensayo de la enzima completa se muestra en la figura 24, así como la influencia de las subunidades α , β y γ sobre el porcentaje de $[^{125}I] F_1$ -ATPasa unido a los anticuerpos anti-(F_1 -ATPasa). Como puede apreciarse, una inhibición del 30% en la unión antígeno marcado-anticuerpo se obtiene al añadir 22 ng de F_1 -ATPasa, 220 ng de subunidad γ (10% de competición), 460 ng de subunidad α (4,8% de competición) y 625 ng de subunidad β (3,5% de competición), lo que en bases molares implica que la sensibilidad de la reacción entre los anticuerpos anti-(F_1 -ATPasa) y la molécula de F_1 -ATPasa resulta ser 100 veces mayor que aquella de las subunidades α y γ , y más de 500 veces que la correspondiente a la subunidad β . Estos resultados parecen sugerir la existencia de un efecto cooperativo en las propiedades inmunogénicas de las subunidades en la enzima completa y/o de determinantes antigénicos conformacionales inducidos por la macromolécula F_1 -ATPasa en su conjunto.

Las sensibilidades del ensayo resultaron ser de 3 ng para F_1 -ATPasa, 20 ng para la subunidad γ , 55 ng para la subunidad α y 65 ng para la subunidad β , mientras que los límites superiores del ensayo fueron de 1.000 ng para F_1 -ATPasa y de 10.000 ng para cada una de sus subunidades. Por otra parte, las pendientes de las curvas obtenidas difieren significativamente, pero no como consecuencia de simples efectos de dilución.

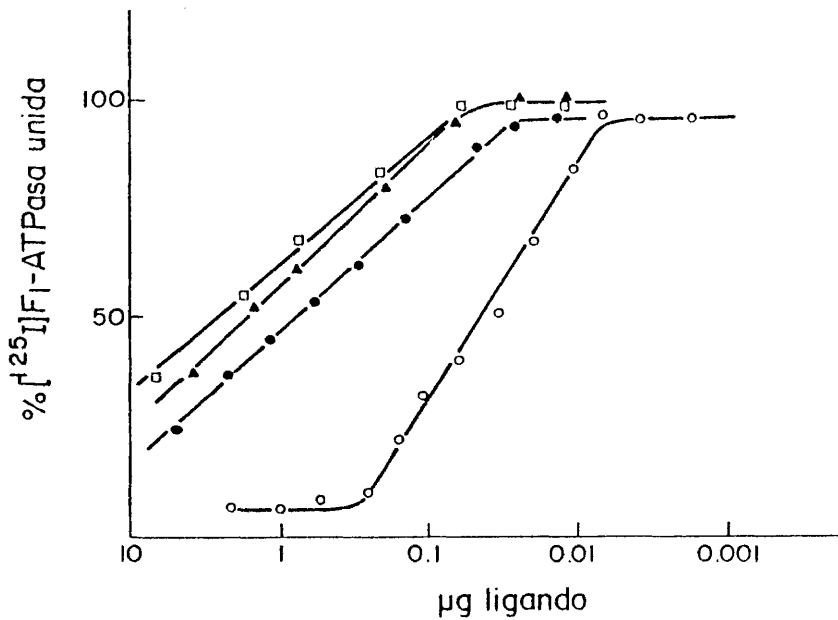


FIGURA 24.- Radioinmunoensayo de la enzima $F_1\text{-ATPase}$ de *M. lysodeikticus* y competición de sus subunidades α , β y γ (condiciones en Materiales y Métodos). Los resultados se expresan como porcentaje de $[^{125}\text{I}]F_1\text{-ATPase}$ unida a suero anti- $(F_1\text{-ATPase})$. (O—O), $F_1\text{-ATPase}$; (\blacktriangle — \blacktriangle), subunidad α ; (\square — \square), subunidad β ; (\bullet — \bullet), subunidad γ .

3.3.3. Radioinmunoensayo de las subunidades α , β y γ .

Se estudió el efecto de la enzima F_1 -ATPasa y sus subunidades sobre la unión de $[^{125}I]$ subunidad α , $[^{125}I]$ subunidad β y $[^{125}I]$ subunidad γ al suero anti- $(F_1$ -ATPasa) con el fin de establecer similitudes y diferencias entre las subunidades α , β y γ (véase Fig. 25). En estas gráficas es notoria la disparidad existente entre las pendientes de las curvas, particularmente entre aquellas correspondientes a las subunidades α y γ (véanse Fig. 25a y 25c). También es de destacar el comportamiento inmunológico intermedio entre α y β que presenta la subunidad γ (véanse Figs. 25a y 25b, y también Fig. 24), excepto en el caso representado en la figura 25c, en el que la subunidad γ se muestra como el componente más efectivo en el desplazamiento de $[^{125}I]$ subunidad γ del anticuerpo. La posible contaminación de la subunidad γ por parte de la subunidad α parece excluida por el hecho de que a concentraciones pequeñas, la adición de subunidad γ inhibía en mayor grado la unión de $[^{125}I]$ subunidad α a sus respectivos anticuerpos que la adición de la propia subunidad α (véase Fig. 25a), siendo lógico pensar que un contaminante nunca sería más efectivo que el propio componente puro.

Por su parte, el comportamiento inmunológico de las subunidades α y β es muy diferente, pareciendo por lo tanto obvia la aseveración de que las subunidades mayoritarias de la enzima F_1 -ATPasa poseen una identidad propia, muy diferenciadas entre sí por métodos inmunoquímicos como ya podría sugerirse de los resultados obtenidos por inmunolectroforesis (véase apartado 3.2.).

3.3.4. Reconstitución de las propiedades antigénicas de la molécula de F_1 -ATPasa a partir de sus componentes polipeptídicos.

Los resultados obtenidos al intentar reconstituir las propie -

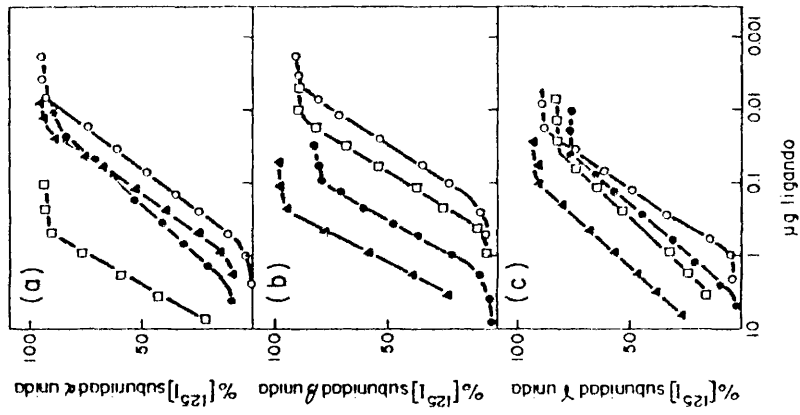


FIGURA 25.- Unión de las subunidades α (a), β (b) y γ (c), de la F_1 -ATPasa de *M. lysodeikticus* marcadas con ^{125}I a suero anti- $(F_1$ -ATPasa) y competición de F_1 -ATPasa y sus subunidades sin marcar por dicha unión. (○—○), F_1 -ATPasa; (▲—▲), subunidad α ; (□—□), subunidad β ; (●—●) subunidad γ (condiciones en Materiales y Métodos).

dades antigénicas de la molécula de F_1 -ATPasa a partir de sus subunidades se ilustran en la figura 26 y la Tabla XIII, en las que se aprecia la influencia de diferentes combinaciones de subunidades sobre el radioinmunoensayo de la F_1 -ATPasa.

La titulación de una solución de subunidad β (7,36 μ g en 2 μ l) con cantidades crecientes de subunidad α , producía cambios progresivos en la pendiente de la curva, aproximándose ésta al valor correspondiente de la F_1 -ATPasa ($n_{ATPasa} = 1,57$, $n_{\alpha} = 1$, $n_{\beta} = 0,89$, $n_{\gamma} = 0,92$) a medida que la relación molar se aproximaba a 1:1 (7,12 μ g de subunidad α). Así, el empleo de cantidades equimoleculares de α y β daba lugar a una curva cuya pendiente era muy semejante a la propia de F_1 -ATPasa (véase Fig. 26) con una competición del 35% (Tabla XIII). Este resultado indica una reconstitución parcial de las propiedades inmunológicas de la molécula de F_1 -ATPasa de M. lysodeikticus, al mismo tiempo que apoya la idea de considerar a la subunidad γ como un componente intrínseco de la enzima con identidad propia. Si la preparación de la subunidad γ poseyera una fuerte contaminación por parte de las subunidades α y β se obtendría un grado de competición análogo entre el componente γ y la mezcla $\alpha + \beta$ sobre la unión de $^{125}_I$ F_1 -ATPasa a suero anti-(F_1 -ATPasa). Como puede apreciarse existe una diferencia notable (Tabla XIII): subunidad γ , 10% de competición y mezcla $\alpha + \beta$, 35% de competición.

Por otra parte, un análisis cuantitativo de los datos representados en la figura 26 indica que el desplazamiento del 100% de $^{125}_I$ F_1 -ATPasa por parte de las subunidades mayoritarias $\alpha + \beta$ se obtiene con la adición de 350-400 ng de la mezcla equimolecular y el 50% de desplazamiento con 40 ng de la misma. Teniendo en cuenta que el peso molecular medio de las subunidades mayoritarias oscila alrededor de 60.000 dalton, puede estimarse que en estas condiciones se hallan

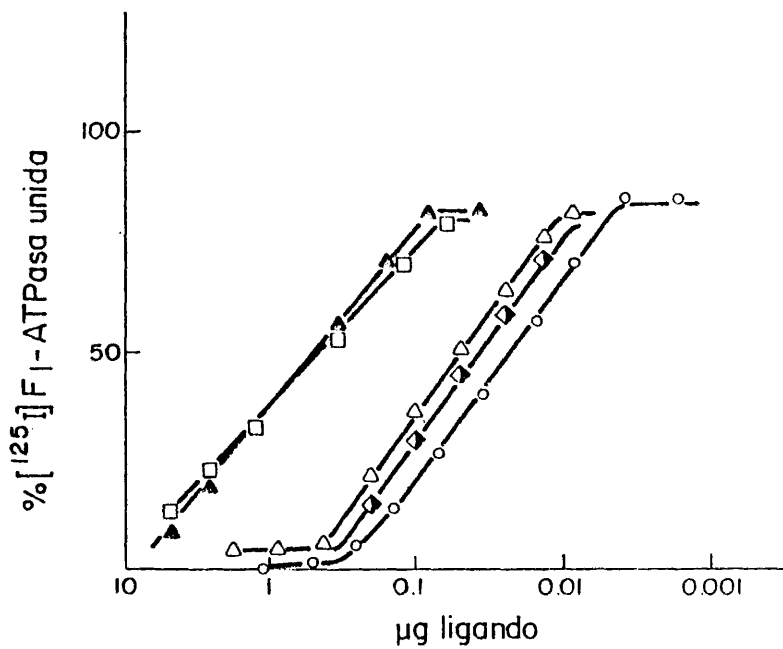


FIGURA 26.- Efecto de distintas combinaciones de subunidades α , β y γ sobre la unión de $[^{125}\text{I}] \text{F}_1\text{-ATPasa}$ a suero anti- $(\text{F}_1\text{-ATPasa})$. (O—O), $\text{F}_1\text{-ATPasa}$; (▲—▲), subunidad α ; (□—□), subunidad β , se muestran como controles. (Δ—Δ), $\alpha + \beta$ (razón molar, 1:1); (◊—◊), $\alpha + \beta + \gamma$ (proporción molar, 3:3:2) (condiciones en Materiales y Métodos).

TABLA XIII

COMPETICION DE LAS SUBUNIDADES α , β Y γ DE F_1 -ATPasa DE M. LYSODEIKTI_ CUS CON LA MOLECULA DE F_1 -ATPasa EN RADIOINMUNOENSAYO.

Los resultados estan tomados a partir de los experimentos ilustrados en las Figs. 24 y 25. Los porcentajes de competición expresan la capacidad de cada subunidad para competir con la enzima F_1 -ATPasa en el radioinmunoensayo y son calculadas como la proporción inversa de las diferencias cantidades de cada ligando requeridas para obtener una unión del 70% de F_1 -ATPasa a su antisuero, tomando como 100% la correspondiente a la curva de F_1 -ATPasa.

Subunidades	Porcentaje de competición
α	4.8
β	3.5
γ	10.5
$\alpha + \beta$ ^a	34.5 ± 2.5
$\alpha + \beta + \gamma$ ^b	57.4

^a Proporción equimolecular. Valor medio de tres experimentos.

^b Proporciones molares de las subunidades (3:3:2).

presentes seis copias de dichas subunidades, lo que favorecería una estequiometría del tipo $\alpha_3 \beta_3$ para la molécula de F_1 -ATPasa, ya que las subunidades se añadieron en proporciones equimoleculares.

Estas observaciones ponen de manifiesto la reconstitución de las propiedades inmunoquímicas del factor BF_1 de M. lysodeikticus. La adición de subunidad γ a la mezcla $\alpha + \beta$ aumentaba este grado de reconstitución, el cual encontraba su máximo con la adición de las tres subunidades α , β y γ en una relación molar de 3:3:2 (véase Tabla XIII y Fig. 26), dando lugar a una curva con pendiente similar a la de F_1 -ATPasa y con un 57,4% de competición.

Estos resultados apoyan una estequiometría en subunidades del tipo $\alpha_3 \beta_3 \gamma_2$, en concordancia con la propuesta recientemente para la F_1 -ATPasa de M. lysodeikticus (365) mediante experiencias con agentes entrecruzantes. Además, estos experimentos resaltan una contribución a las propiedades antigénicas de la enzima debida a la interacción entre las propias subunidades, lo que sugeriría la presencia de determinantes antigénicos, probablemente conformacionales, originados del plegamiento y ensamblaje de las subunidades en la molécula de F_1 -ATPasa.

Resultados similares se obtuvieron al efectuar radioinmunoensayos complementarios con las diferentes subunidades, según se ilustra en la figura 27 para las subunidades α y β . El título tan bajo que exhibía el suero anti-(subunidad γ) (véase apartado 3.2.) dificultaba la comparación en términos cuantitativos del radioinmunoensayo de esta subunidad a causa del desplazamiento hacia la derecha de las curvas. Estos experimentos muestran como cabía esperar, que la enzima F_1 -ATPasa compite hasta un 100% con cada suero anti-subunidad. En concordancia con lo expuesto anteriormente, la subunidad γ mostraba un comportamiento intermedio entre las subunidades β y α , si bien más próximo a esta última. Por otra parte y según se deduce de la figura 25, la en-

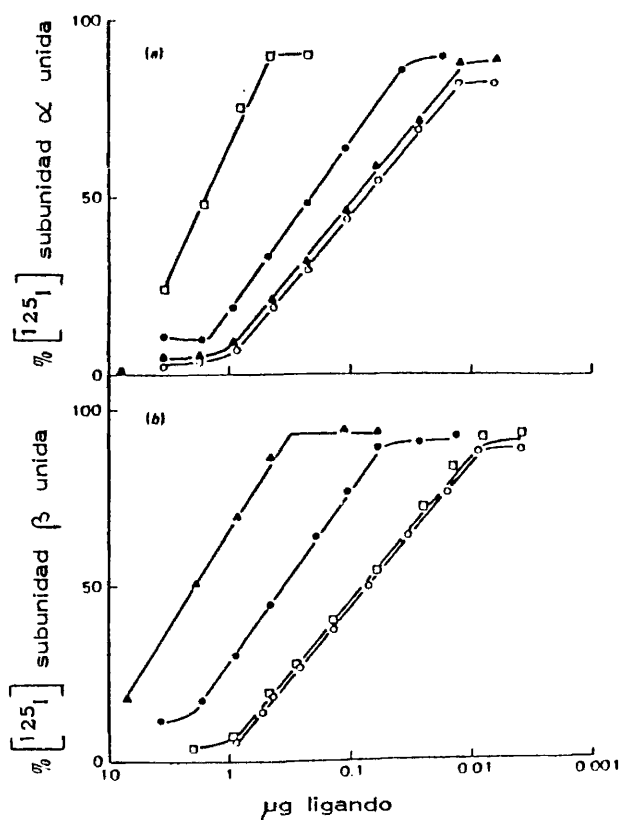


FIGURA 27.- Radioinmunoensayo de la subunidad α (a) y de la subunidad β (b) del factor BF_1 de *M. lysodeikticus*, mostrando las competiciones de la enzima F_1 -ATPasa purificada y de sus tres subunidades de mayor talla molecular. Los resultados se expresan como porcentajes de $[^{125}I]$ subunidad α o $[^{125}I]$ subunidad β unidas a sus respectivos antisueros. ○, F_1 -ATPasa; ▲, subunidad α ; □, subunidad β ; ●, subunidad γ .

zima F_1 -ATPasa es capaz de competir un 300% con la subunidad α , un 150% con la subunidad γ y un 400-500% con la subunidad β , ajustándose a la estequiometría y características inmunológicas descritas anteriormente.

Todas estas experiencias se habrían visto completadas con la introducción de la subunidad δ en las mismas, sin embargo, en la actualidad, el único método de aislamiento de este componente a partir del factor BF_1 de M. lysodeikticus reside en el empleo de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, lo que conlleva una pérdida o modificación de las propiedades inmunológicas de la subunidad δ (véase apartado 3.2.), ya que no se observa ningún tipo de inmunoprecipitación al incubar dicho componente con suero anti-(F_1 -ATPasa) a distintas diluciones (desde 1/2 hasta 1/25.600).

Es bien conocido que el detergente aniónico SDS se une fuertemente a las proteínas para formar un complejo soluble, rígido y asimétrico (367,368). La eliminación completa de SDS de estos complejos es muy difícil de conseguir. Así el empleo de diálisis de equilibrio, método seguido en nuestro caso, requiere varios días para alcanzar razones molares de 1:1 (369,370). Han sido descritos otros métodos de eliminación del detergente más efectivos (370-373), sin embargo actualmente se está intentando aislar esta subunidad δ a partir de la F_1 -ATPasa purificada de M. lysodeikticus por medio de técnicas que no necesiten la acción de detergentes (véase apartado 3.8.).

3.4. PAPEL DE LAS SUBUNIDADES
DE F_1 -ATPasa EN LA ACTIVIDAD
ENZIMÁTICA.

3.4.1. Dos aproximaciones experimentales para afrontar un mismo problema.

El estudio de las subunidades responsables de la actividad enzimática de los factores F_1 puede ser abordado desde distintas aproximaciones experimentales (véase apartado 1.7.3.), pero quizás la más concluyente sea la reconstitución de las propiedades catalíticas de la enzima a partir de sus subunidades constituyentes. En el factor BF_1 de M. lysodeikticus estos estudios de reconstitución se han visto dificultados por el hecho de que las subunidades de esta enzima no pueden disociarse a menos que se utilicen condiciones totalmente desnaturalizantes (164, 339). Por lo tanto el presente trabajo aborda el problema de un modo indirecto, mediante la aplicación de: a) digestiones controladas de la enzima con tripsina, correlacionando la degradación progresiva de las distintas subunidades con la disminución en actividad ATPásica; y b) incubación de la enzima con distintos antisueros obtenidos frente a la molécula F_1 -ATPasa completa y frente a sus subunidades constituyentes.

3.4.2. Efecto de distintos antisueros sobre la actividad ATPásica de la enzima purificada.

La figura 28 ilustra el efecto de los distintos anticuerpos sobre la actividad ATPásica de la enzima purificada. Como se puede apreciar el suero anti- $(F_1\text{-ATPasa})$ inhibe totalmente la actividad enzimática, lo que contrasta con la acción de los restantes sueros anti-subunidades. Tan sólo y muy ligeramente el suero anti-(subunidad β) ejerce un ligero poder inhibitorio.

Los resultados obtenidos incubando la enzima F_1 -ATPasa con combinaciones de diferentes anticuerpos se muestran en la figura 29. Se logra una inhibición de hasta el 50% de la actividad enzimática con una combinación de sueros anti-(subunidad β) y anti-(subunidad α) o anti-(subunidad β) y anti-(subunidad γ), sin que este efecto inhibitorio se

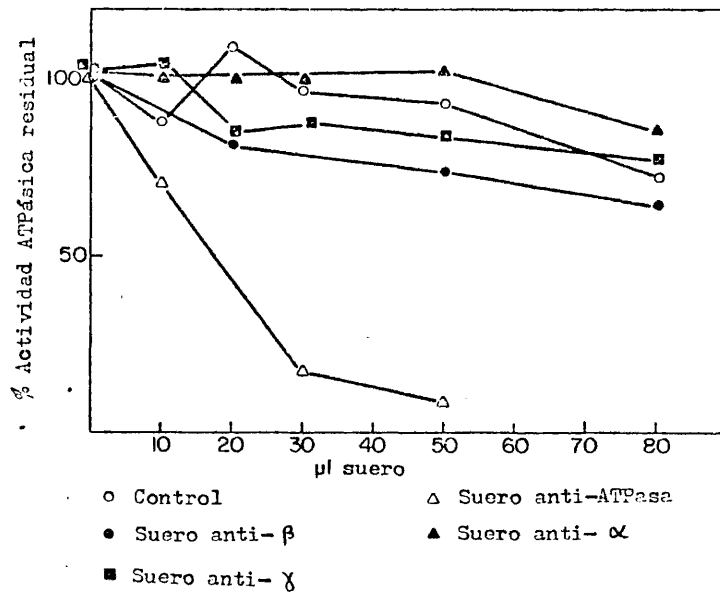


FIGURA 28.- Efecto de distintos antisueros sobre la actividad ATPásica del factor BF_1 de M. lysodeikticus (condiciones en Materiales y Métodos).

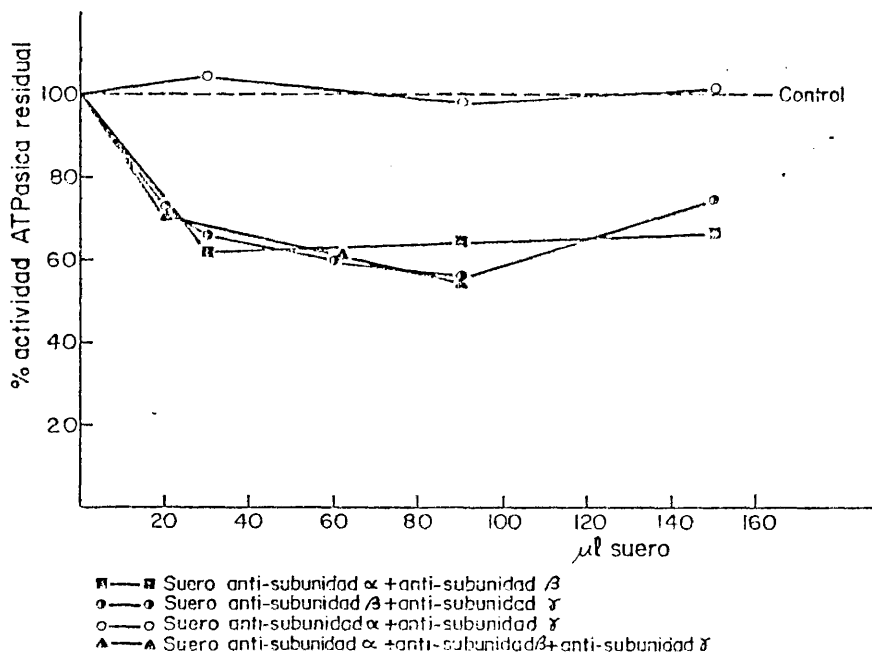


FIGURA 29.- Efecto de distintas combinaciones de sueros anti-subunidades sobre la actividad ATPásica del factor BF_1 de M. lysodeikticus (condiciones en Materiales y Métodos).

incremente al incubar la enzima con una mezcla de los tres sueros anti-subunidades. La combinación de sueros anti-(subunidad α) y anti-(subunidad γ) no muestra ningún efecto.

3.4.3. Sensibilidad a tripsina de la enzima purificada. Su efecto sobre la actividad enzimática.

La incubación del factor BF_1 con tripsina provoca un descenso gradual en la actividad ATPásica a partir de los 10 primeros minutos (véase Fig. 30) hasta alcanzar un valor aproximado de un 50% del valor original al cabo de unos 50 minutos. Una incubación con la proteasa durante otro período de 2 h no modifica sustancialmente el 40% de actividad catalítica residual. Este hecho confirma la presencia de un núcleo catalítico en la F_1 -ATPasa de M. lysodeikticus resistente a la digestión trípica como parecía sugerirse del trabajo previo realizado con otras formas activas de la enzima(323). En este contexto, merece atención el hecho de que se observe una ligera activación de la enzima (véase Fig. 31) mediante incubación a 37°C de la misma en ausencia de la enzima proteolítica (experimentos control).

A fin de correlacionar estos cambios en la actividad con modificaciones en la estructura de la enzima, se sometieron muestras digeridas a diferentes tiempos con tripsina a electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS o urea. El empleo del detergente aniónico permitía obtener una gran resolución en los componentes minoritarios mientras que con urea se lograba una mejor separación entre los componentes mayoritarios de enzima.

La figura 32 A ilustra los experimentos en los sistemas con SDS, mostrando que la digestión de la subunidad γ y el desplazamiento de la subunidad α hacia la movilidad correspondiente a β no se relacionan con la pérdida de actividad enzimática (compárense Figs. 30 y 32). Por su parte, en la figura 32 B se aprecian los perfiles densitométricos

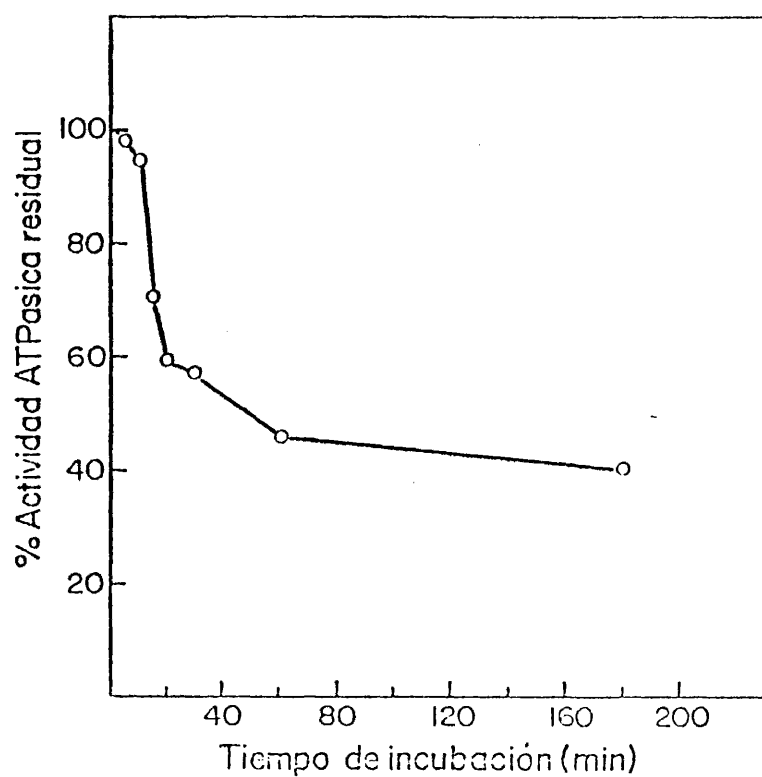


FIGURA 30.- Efecto de tripsina sobre la actividad ATPásica del factor BF_1 (% referidos a actividad en controles, incubados en idénticas condiciones pero sin proteasa). Las incubaciones se llevaron a cabo a $37^{\circ}C$. Relación F_1 -ATPasa/tripsina de 20/1 (condiciones en Materiales y Métodos).

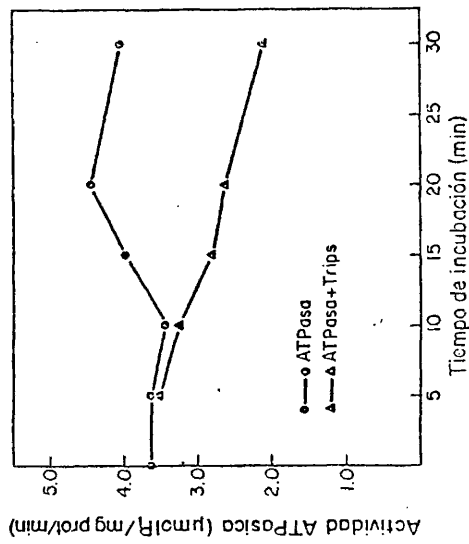
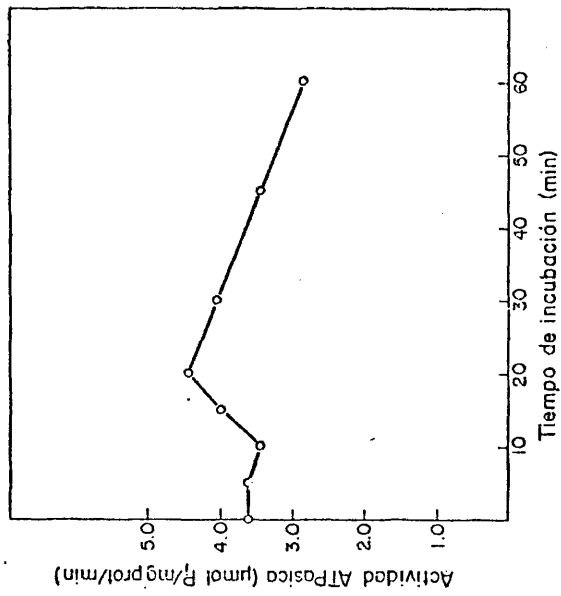


FIGURA 31.- Efecto de la incubación a 37°C de F₁-ATPase purificada en presencia o ausencia de tripsina (condiciones en Materiales y Métodos).

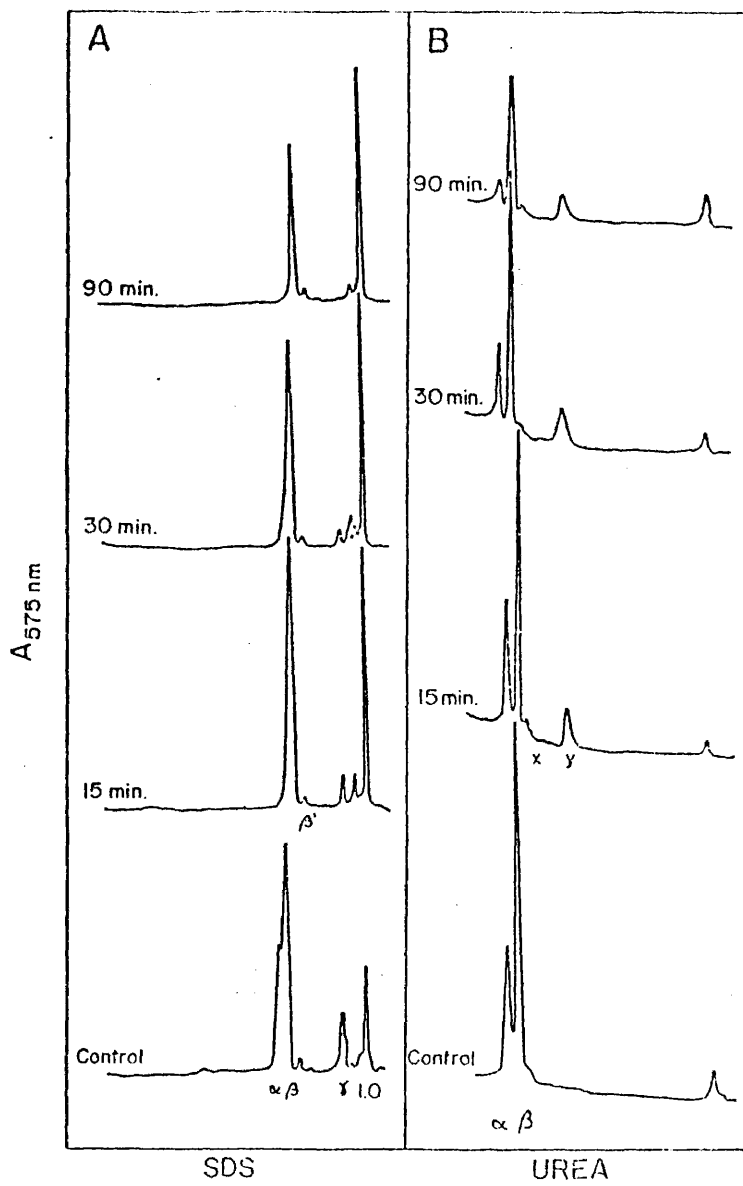


FIGURA 32.- Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7% en presencia de SDS 0,1% (A) y en presencia de urea 8M (B) de F_1 -ATPasa (aprox. 40 μ g) tratada con tripsina a diferentes tiempos de incubación (condiciones en Materiales y Métodos).

de los sistemas conteniendo urea, los cuales muestran claramente la progresiva destrucción de la subunidad α y la relativa resistencia de la subunidad β durante la digestión de F_1 -ATPasa con tripsina. En ambos sistemas es posible identificar la presencia de componentes derivados de la degradación de las subunidades, tales como, β' (Fig. 32 A) y "x" e "y" (Fig. 32 B), que permanecen prácticamente inalterados a través del proceso de digestión de la enzima. Un análisis cuantitativo de estos resultados se muestra en las Tablas XIV y XV, siendo especialmente interesante esta última en la que se aprecia que la actividad ATPásica residual mantiene una estrecha correlación con el porcentaje residual de $\alpha + \beta$, en general, y con aquel de la subunidad β , en particular. Sin embargo, dicha correlación no se observa con la cantidad presente de subunidad γ (Tabla XV), aunque no puede ser totalmente descartado un requerimiento de pequeñas cantidades de esta subunidad para el mantenimiento de una estructura funcionalmente activa.

Por otra parte estos resultados ponen de manifiesto el diferente comportamiento frente a la acción proteolítica de la F_1 -ATPasa forma A de M. lysodeikticus con respecto a aquel correspondiente a la forma B de la enzima (323,331) y a la F_1 -ATPasa de Streptococcus faecalis (366).

3.4.4. Aislamiento de distintas formas de F_1 -ATPasa obtenidas por digestión con tripsina.

El análisis electroforético en geles de poliacrilamida al 7% en condiciones nativas de la F_1 -ATPasa digerida por tripsina se muestra en la figura 33. La acción de la enzima proteolítica sobre el factor BF_1 induce la aparición de cuatro bandas distintas de proteína de movilidades relativas: 0,34, 0,59, 0,86, 1,00, las cuales presentan una intensidad variable, dependiente del tiempo de acción de la tripsina sobre la F_1 -ATPasa. De esta forma, a medida que el tiempo de incubación aumen

TABLA XIV

SENSIBILIDAD A TRIPSINA DE LAS SUBUNIDADES α , β Y γ DEL FACTOR BF₁ DE MICROCOCCLUS LYSODEIKTIQUS Y SU COMPARACION CON LOS PRODUCTOS DE SU DIGESTION TRIPTICA

Muestras de F₁-ATPasa de M. lysodeikticus (60 μ g de proteína) fueron tratadas con tripsina (3 μ g) durante diferentes tiempos según se ha descrito en la sección de Materiales y Métodos. Parte de la mezcla de incubación (5 μ g de F₁-ATPasa) se ensayó para medir actividad ATPásica y el resto de la muestra se sometió a electroforesis. Después del análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS o urea (fig. 32), las áreas de las distintas subunidades fueron calculadas a partir de los perfiles densitométricos de los geles teñidos con azul de Coomassie R-250.

Tratamiento con tripsina (min)	Area (cm ²)										Actividad ATPásica (%)
	Electroforesis en presencia de										
	SDS					Urea					
	$\alpha+\beta$	γ	β'	$\alpha+\beta/\gamma$	$\alpha+\beta/\beta'$	α	β	α/β	x	y	
0	9,70	1,03	0,18	9,4	53,9	4,91	5,71	0,92	?	0,03	100
15	6,94	0,32	0,12	21,7	57,8	2,28	4,44	0,51	0,14	0,83	70
30	6,50	0,15	0,14	43,3	46,4	1,43	3,56	0,40	0,18	0,81	58
90	3,25	0,06	0,22	50,0	14,8	0,49	2,03	0,24	0,13	0,59	45

TABLA XV

SENSIBILIDAD A TRIPSINA DE LAS SUBUNIDADES α , β Y χ DEL FACTOR BF₁
DE MICROCOCCUS LYSODEIKTICUS

Muestras de F₁-ATPasa de M.lysodeikticus (60 µg de proteína) fueron tratadas con tripsina (3 µg) durante diferentes tiempos según se ha descrito en la sección de Materiales y Métodos. Parte de la mezcla de incubación (5 µg de F₁-ATPasa) se ensayó para medir actividad ATPásica y el resto de la muestra se sometió a electroforesis. Después del análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS o urea (Fig. 32), las áreas de las distintas subunidades fueron calculadas a partir de los perfiles densitométricos de los geles teñidos con azul de Coomassie R-250.

Tratamiento con tripsina (min)	Area de cada subunidad (% respecto del valor a tiempo cero)				Actividad ATPásica (%)
	Urea		SDS		
	α	β	$\alpha+\beta$	χ	
0	100	100	100	100	100
15	56,9	77,8	71,5	31,1	70
30	35,7	62,3	67,0	14,6	58
90	12,2	35,6	33,5	6,8	46

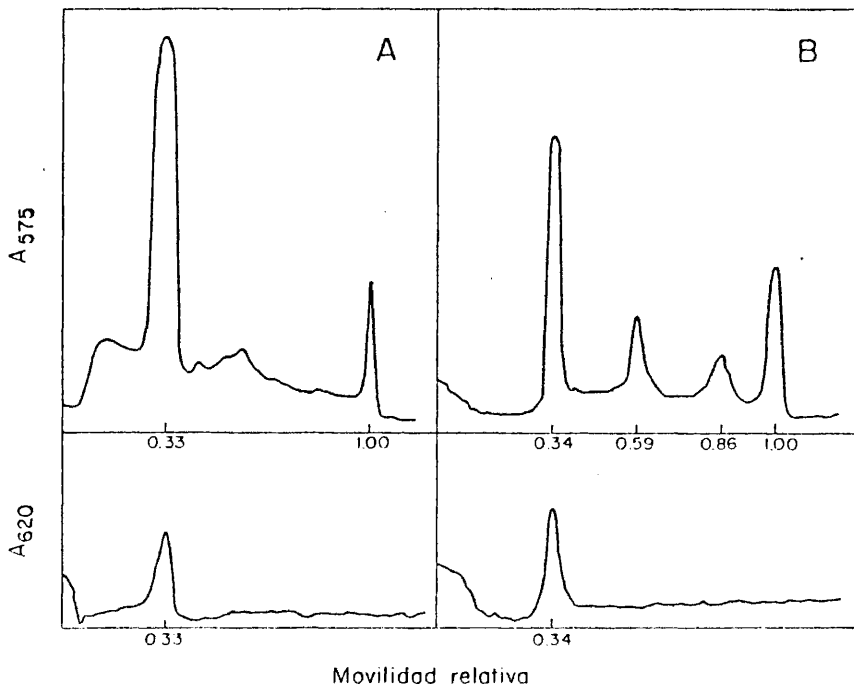


FIGURA 33.- Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7% de : (A, parte superior), F_1 -ATPasa (aprox. 40 μ g) sin tratar con tripsina (tinción de proteína); (A, parte inferior), F_1 -ATPasa (aprox. 40 μ g) sin tratar con tripsina (tinción enzimática); (B, parte superior), F_1 -ATPasa (aprox. 40 μ g) tratada con tripsina durante 30 min a 37°C (tinción de proteína); (B, parte inferior), F_1 -ATPasa (aprox. 40 μ g) tratada con tripsina durante 30 min a 37°C (tinción enzimática). Relación F_1 -ATPasa/tripsina de 20/1 (condiciones en Materiales y Métodos).

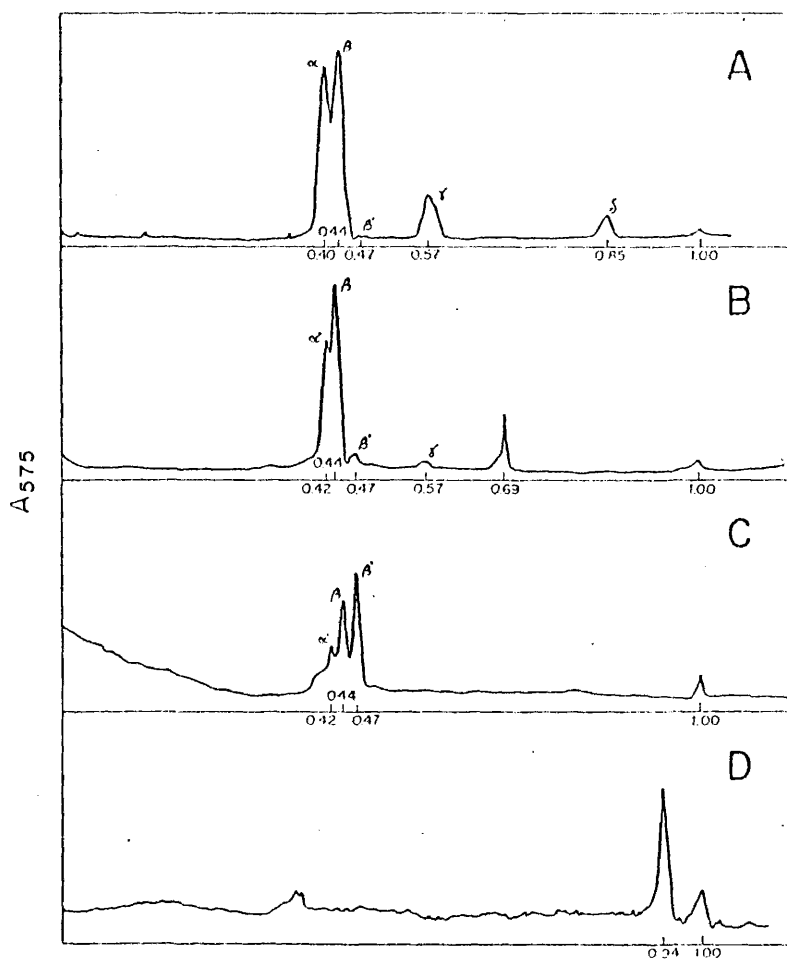
ta, se observa un incremento en la intensidad de las bandas de mayor movilidad relativa, lo que sugiere que la fracción más lenta es digerida en dichos componentes. Además, al hecho de que no se obtenga en las digestiones realizadas ningún componente de movilidad electroforética idéntica a aquella de la proteína sin tratar, indica que la enzima nativa es transformada sin pasos intermedios en los cuatro componentes citados. De estos, tan sólo el correspondiente a movilidad relativa 0,34 muestra actividad ATPásica (Fig. 33 B).

En un intento adicional de definir el papel jugado por las distintas subunidades en la actividad enzimática de la F_1 -ATPasa de M. lysodeikticus, se aíslan distintas formas de proteína después de su tratamiento con tripsina. La figura 34 y la Tabla XVI resumen las propiedades de los principales componentes obtenidos tras una digestión de 30 min de F_1 -ATPasa con tripsina:

-a) Banda de movilidad relativa 0,34 (Banda activa).- Esta banda da cuenta del 47,5% de la proteína teñida en el gel y posee una actividad específica 2,5 veces mayor que la actividad original de la F_1 -ATPasa nativa, con lo que se sugiere una purificación del núcleo activo de la enzima. Un análisis de la composición de esta forma activa (figura 34 B) permite conocer la presencia mayoritaria de la subunidad β , junto a una cierta proporción de α' (proveniente de una reducción de unos 2.000 ó 3.000 dalton en la talla molecular de α), así como también de una exigua cantidad de β' y γ (Tabla XVI).

-b) Banda de movilidad relativa 0,59 (Banda inactiva).- Esta banda representa el 14,3% de la proteína teñida, no posee actividad ATPásica y su subestructura se limita a la presencia de los componentes: α' , β y β' en las proporciones descritas en la Tabla XVI.

-c) Banda de movilidad relativa 1,00 (Banda inactiva).-Esta banda constituye el 26,3% de la proteína teñida estando constituida exclusivamente por un componente de unos 10.000-13.000 dalton de peso



MOVILIDAD RELATIVA

FIGURA 34.- Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS 0,1% de distintas formas de F_1 aisladas por PAGE a escala micro-preparativa tras una digestión con tripsina (véase Fig. 33). (A) F_1 -ATPasa purificada (aprox. 40 μ g) sin tratar con tripsina (componente de movilidad relativa 0,33 en la Fig. 33 A); (B) Banda de movilidad relativa 0,34 en la Fig. 33 B; (C) Banda de movilidad relativa de 0,59 en la Fig. 33 B; (D) Banda de movilidad relativa de 1,00 en la Fig. 33 B (condiciones en Materiales y Métodos).

TABLA XVI

RELACION ENTRE ACTIVIDAD ENZIMATICA Y COMPOSICION EN SUBUNIDADES DE FORMAS DE F₁-ATPasa AISLADAS DESPUES DE LA ACCION DE TRIPSINA SOBRE EL FACTOR BF₁ DE MICROCOCOCCUS LYSODEIKTICUS.

La F₁-ATPasa se trató con tripsina durante 30 min y el producto de digestión se analizó y - procesó según se ha descrito en Materiales y Métodos. La cantidad de proteína correspondien- te a cada banda se calculó a partir de los perfiles densitométricos de los geles. (Para ulterio- res detalles véase texto).

-148-

Forma de la enzima	Movilidad relativa (azul de bromo- fenol= 1,00)	Proteína teñida (%del total)	Actividad específica (μ mol/min xmg)	Relación molar α : β : γ
F ₁ -ATPasa control	0,28-0,33	85,64	6	2,72:3,00:0,03:1,30
Banda activa de F ₁ -ATPasa	0,34	47,45	15 ^a	1,67:3,00:0,16:0,17
Banda inactiva de F ₁ -ATPasa	0,59	14,31	0 ^a	0,43:3,00:5,38:0,00

^a Hace referencia al componente(x)(véase texto).

molecular, lo que parece indicar que proviene de la digestión de las distintas subunidades. Este componente, cuya intensidad se incrementa al aumentar el tiempo de incubación del factor BF_1 con la enzima proteolítica, se comporta como el último estadio molecular en la digestión de la F_1 -ATPasa.

De la comparación de las proporciones de subunidades entre las diferentes formas (Tabla XVI) puede concluirse que la subunidad β desempeña el papel de subunidad esencial para la hidrólisis enzimática del ATP, si bien se requeriría una cierta organización estructural de la proteína para que se manifieste esta acción catalítica. En este sentido, la presencia de al menos una subunidad α , aun algo modificada (se hace referencia al componente denominado α'), por cada 3 copias de subunidad β , parece ser necesaria para lograr dicha estructura funcionalmente activa. Sobre esta base, un papel por parte de la subunidad γ en la actividad ATPásica parece muy improbable. Por otra parte, estos resultados demuestran que el componente denominado β' , que parece ser un producto de degradación de la subunidad α , no está implicado en la actividad ATPásica. Este componente β' suele presentarse en preparaciones de enzima donde la subunidad α se encuentra parcialmente degradada.

Los diferentes grados de digestión proteolíticas de las distintas subunidades de F_1 -ATPasa por tripsina se deben de considerar como reflejo de la diferente accesibilidad de las mismas a la proteasa, ya que la incubación de las subunidades aisladas con tripsina conduce a una degradación total de dichas cadenas polipeptídicas a un componente de unos 12.000-13.000 dalton de peso molecular (véase Fig. 35).

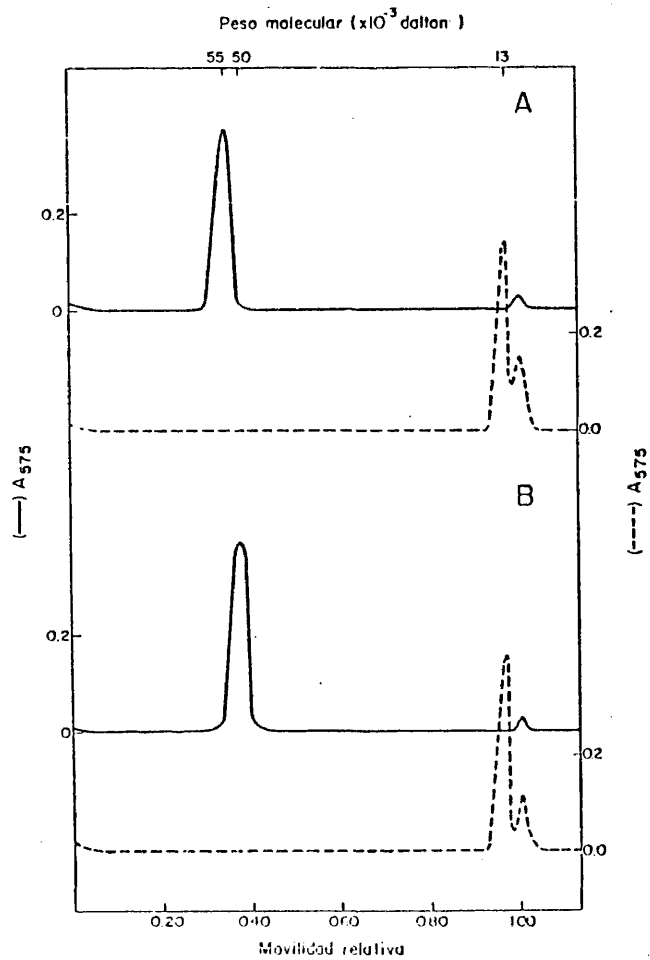


FIGURA 35.- Perfil densitométrico de electroforesis en gel de polia
crlamida al 12% en presencia de SDS 0,1% de : (A), subunidad α
aislada (aprox. 40 μ g) (trazo continuo) y digerida con tripsina (tra
zo discontinuo); (B), subunidad β aislada (aprox. 40 μ g) (trazo con
tinuo) y digerida con tripsina (trazo discontinuo) (condiciones en Ma
teriales y Métodos).

111

3.5. INMUNOQUIMICA DEL FACTOR BF₁
UNIDO A MEMBRANA.

3.5.1. Efecto de los sueros anti-(F₁-ATPasa) sobre la actividad enzimática del factor BF₁ unido a membranas y purificado.

Los sueros anti-(F₁-ATPasa, formas A y B) inhiben totalmente la actividad ATPásica asociada a membranas (véase Fig. 36), mostrándose el antisuero preparado frente a F₁-ATPasa (forma A) como el más efectivo (compárense las partes I y II de la Fig. 36). Este hecho apoya la idea de que la forma A de la enzima presenta una mayor capacidad inmunogénica que la respectiva forma B (332), lo que concuerda con la mayor estabilidad de la forma A de la proteína y en particular, con la de su subunidad α (320,321). Por otra parte la F₁-ATPasa forma A unida a membrana parece comportarse como un mejor antígeno que la correspondiente forma B. En la parte superior de la figura 36, también se observa que el suero anti-(F₁-ATPasa forma A) presenta un comportamiento muy similar sobre la enzima unida a membranas y sobre la enzima purificada, correspondiéndose la mayor inhibición en esta última con las diferentes cantidades de antígeno (F₁-ATPasa) presentes en los ensayos, a saber, 50 µg en el caso de la enzima unida a membranas, asumiendo que este factor de acoplamiento representa un 10% de la proteína de membrana (152), y 10-20 µg en el caso de la enzima purificada.

Estos resultados sugieren que la acción de los anticuerpos anti-(F₁-ATPasa) sobre la enzima asociada a membrana no se ve obstaculizada por impedimentos estéricos o limitaciones de accesibilidad, a la vez que indican que las moléculas de F₁-ATPasa se encuentran libremente expuestas a su antisuero. Las diferencias en el comportamiento de los antisueros preparados frente a las dos formas distintas de la proteína no parecen ser debidas a una simple consecuencia del título de cada suero, sino más bien reflejan las diferentes características de cada forma de factor BF₁ como antígeno e inmunógeno.

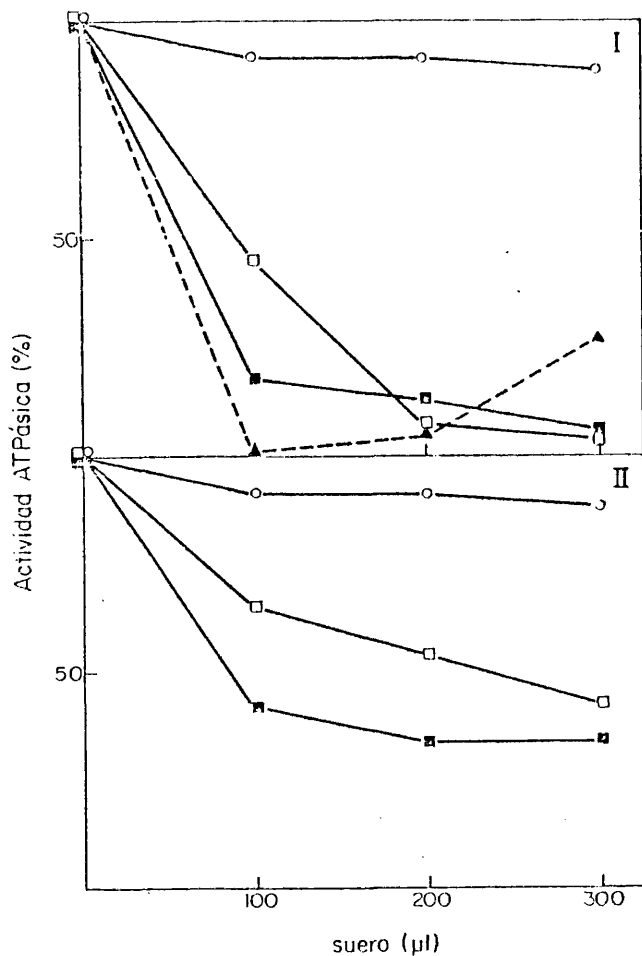


FIGURA 36.- Efecto de los sueros anti-(F₁-ATPasa, formas A y B) sobre la actividad ATPásica asociada a membranas de *M. lysodeikticus*, subtipos A (I) y B (II). (■—■), suero anti-(F₁-ATPasa forma A); (□—□), suero anti-(F₁-ATPasa forma B); (○—○), suero control. La línea de trazo discontinuo (▲—▲) ilustra el efecto del suero anti-(F₁-ATPasa forma A) sobre la enzima purificada de esta subtipo (para ulteriores detalles véase Materiales y Métodos).

3.5.2. Efecto de los sueros anti-subunidades sobre la actividad enzimática del factor BF_1 unido a membranas y purificado,

La figura 37 muestra el diferente comportamiento expresado por los sueros anti-subunidades sobre la actividad ATPásica dependiendo del estado físico en que se encuentre la enzima. Los sueros anti-(subunidad α) y anti-(subunidad β) inhiben la actividad enzimática de la F_1 -ATPasa unida a membrana, mientras que ésta permanece prácticamente inalterada cuando se trata con el factor BF_1 solubilizado, como se pudo apreciar en el apartado 3.4. Por otra parte, merece una especial significación la fuerte inhibición producida por el suero anti-(subunidad α), ya que se ha mostrado en el apartado 3.4. una gran evidencia en favor de ubicar el sitio catalítico en la subunidad β de la enzima.

A la luz de estos resultados parece deducirse que la inhibición de la actividad ATPásica unida a membrana por los sueros anti-(F_1 -ATPasa) resulta de la superposición e interacción de los anticuerpos anti-(subunidad α) y anti-(subunidad β) presentes en dichos sueros. La Tabla XVII resume estos resultados, de los que se deduce que los anticuerpos anti-(subunidad α) participan en un alto grado en la reacción inhibitoria de la enzima asociada a membrana.

Una explicación que diera cuenta de los datos aquí descritos podría ser la que a continuación se describe. En el estado unido a membrana, la F_1 -ATPasa presenta restricciones conformacionales. De este modo, la enzima se encontraría con una(s) cierta(s) conformación(es), más bien rígida, en la que las subunidades α y β mostrarían una estrecha interrelación. En estas condiciones, los anticuerpos anti-(subunidad α) afectarían indirectamente a las subunidades β , a causa de un gran acoplamiento existente entre ambos tipos de subunidades o por un efecto de cooperatividad positiva sobre los anticuerpos anti-(subunidad β). Por el contrario, en el estado soluble (la enzima purificada) los anticuerpos

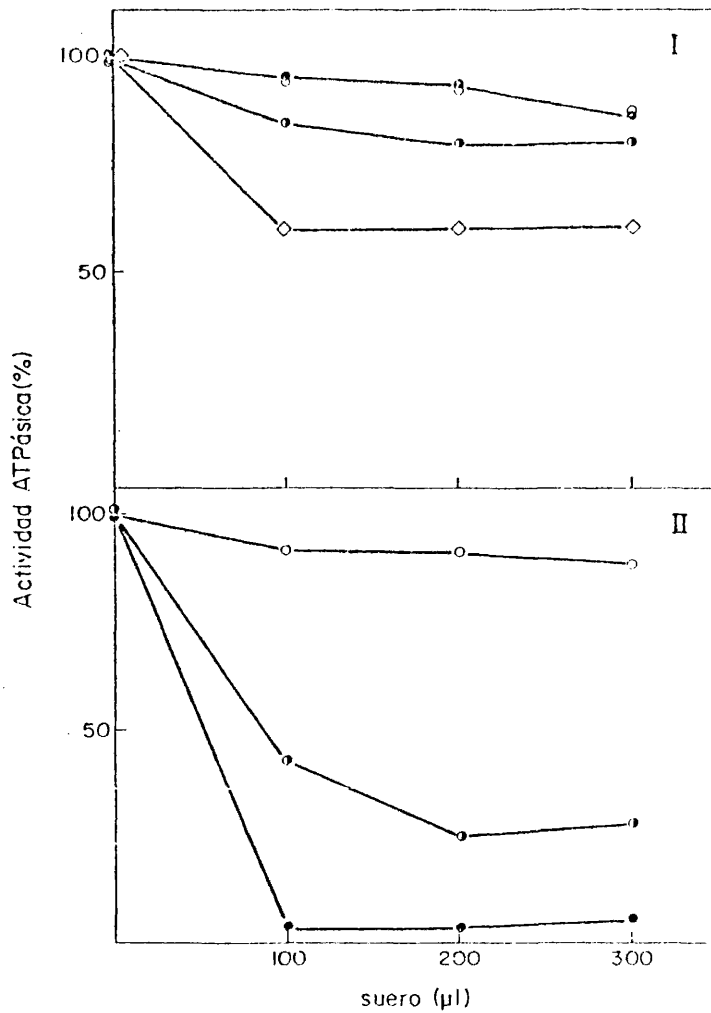


FIGURA 37.- Efecto de los sueros anti-(subunidad α) y anti-(subunidad β) sobre la enzima F_1 -ATPasa forma A en su estado soluble (I) y asociado a membrana (II). (O—O), suero control; (●—●), suero anti-(subunidad β); (○—○), suero anti-(subunidad α); (◊—◊), suero anti-(subunidad α) + suero anti-(subunidad β) (condiciones experimentales en Materiales y Métodos).

TABLA XVII

INHIBICION DE LA ACTIVIDAD ATPásica ASOCIADA A MEMBRANAS DE M. LYSODEIKTIQUS. (SUBCEPAS A Y B) POR SUEROS ANTI-(F₁-ATPasa, FORMAS A Y B) Y ANTI-SUBUNIDADES (FORMA A).

Suero añadido	Concentración (μl)	% Inhibición de actividad ATPásica asociada a membrana de subcepa.	
		A	B
anti-(F ₁ -ATPasa forma A)	100	82	55
	200	86	93
	300	94	96
anti-(F ₁ -ATPasa forma B)	100	58	35
	200	66	46
	300	66	57
anti-subunidad α	100	96	40
	200	96	80
	300	94	80
anti-subunidad β	100	57	52
	200	75	64
	300	72	72

anti-(subunidad α) serían incapaces de afectar a las subunidades β , debido a un acoplamiento y/o interacción menos intensa de estas subunidades en la proteína (365), o a un efecto de cooperatividad negativa sobre los anticuerpos anti-(subunidad β). Si esta última posibilidad fuera cierta, la progresiva destrucción de las subunidades α en la enzima soluble debería verse acompañada por una mayor sensibilidad de F_1 -ATPasa a los antisueros. Los resultados mostrados en la figura 38 y la Tabla XVIII apuntan hacia esta dirección ya que el efecto inhibitor del suero anti-(F_1 -ATPasa) es aumentado cuantitativamente después de la digestión proteolítica de la enzima.

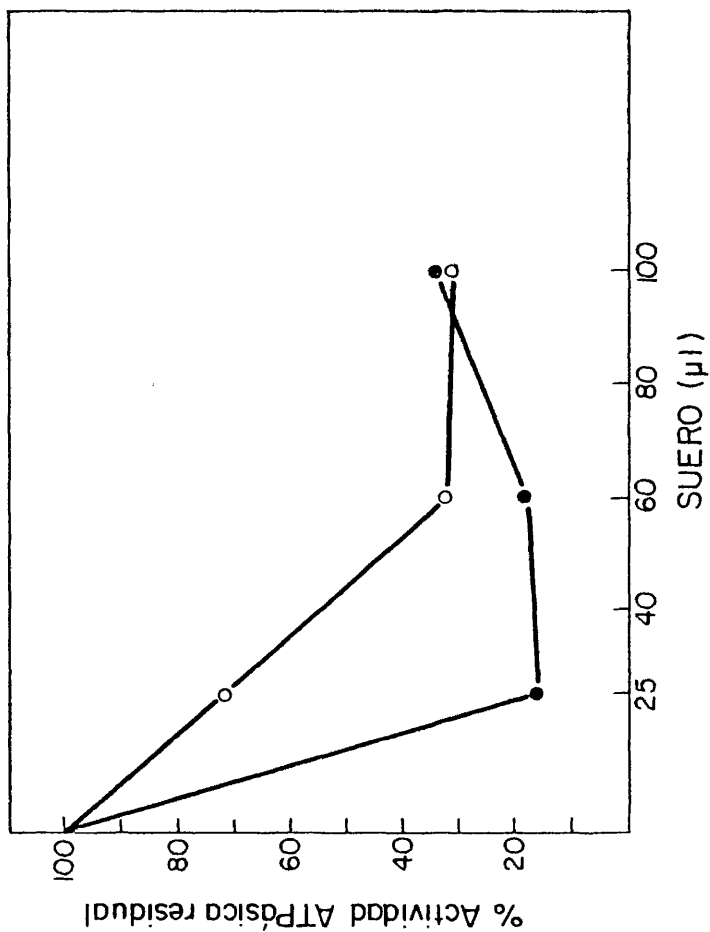


FIGURA 38.- Efecto de suero anti-(F₁-ATPasa, forma A) sobre la actividad ATPásica de una preparación de BF₁ de *M. lysodeikticus* antes (○—○) y después (●—●) de ser tratada con tripsina (condiciones en Materiales y Métodos).

TABLA XVIII

RELACION ENTRE LA DIGESTION DE F_1 -ATPasa DE M. LYSODEIKTICUS FORMA A POR TRIPSINA Y SU SENSIBILIDAD A LA INHIBICION POR SUERO ANTI- $(F_1$ -ATPasa)

Suero añadido	Concentración (μ l)	Digestión ^a por tripsina	% Actividad ATPásica	
			Residual despues de la digestión por trip- sina.	Inhibición por antisuero.
anti- $(F_1$ -ATPasa)	20-40	-	100	30
anti- $(F_1$ -ATPasa)	20	+	40	84

^a Para detalles experimentales ver Materiales y Métodos.

3.6. PAPEL DE LA SUBUNIDAD δ Y
LOS IONES Mg^{2+} EN LA FIJACION
DE LA MOLECULA F_1 -ATPasa A
MEMBRANAS.

3.6.1. Efecto de la presencia de iones divalentes sobre la reinsertión de enzima a membranas.

Las figuras 39,40,41 y 42 muestran los resultados obtenidos al estudiar el efecto de diferentes cationes divalentes sobre la reinsertión de la molécula F_1 -ATPasa a "membranas D" (véase Materiales y Métodos). La enzima objeto de estudio mostraba una relación molar en subunidades $\alpha : \beta : \gamma : \delta$ de 3,48:3,00:1,11:2,37 (Fig.43) - por PAGE en presencia de SDS. De estos resultados se deduce que los cationes divalentes pertenecientes al grupo II B del sistema periódico junto con el Cu^{2+} logran una efectividad en la reinsertión de la enzima superior a la del resto de los cationes ensayados, lo que conlleva la obvia aseveración que el porcentaje de reinsertión del factor BF_1 a membranas depende del catión divalente presente en el medio.

En la Tabla XIX se representa la reinsertión de la enzima obtenida en presencia de distintos cationes a una concentración de 1mM. La presencia de cationes divalentes con afinidades semejantes por ligandos provoca grados de reinsertión de la proteína muy similares entre sí, con independencia de otras características iónicas. Esto sugiere que la presencia de cationes con diferentes afinidades por ligando determina formas distintas de reinsertión de F_1 -ATPasa a la membrana.

3.6.2. Reversión de la fijación de F_1 -ATPasa a membranas.

A fin de comprobar si la reinsertión de la enzima a la membrana llevada a cabo en presencia de distintos cationes divalentes difería en algún aspecto según las características de afinidad por ligando de estos y con objeto de determinar si alguna de las fijaciones de proteína a la membrana obtenidas con el empleo de cationes divalentes poseía algún significado fisiológico, se procedió a revertir dicha fijación mediante tres métodos:

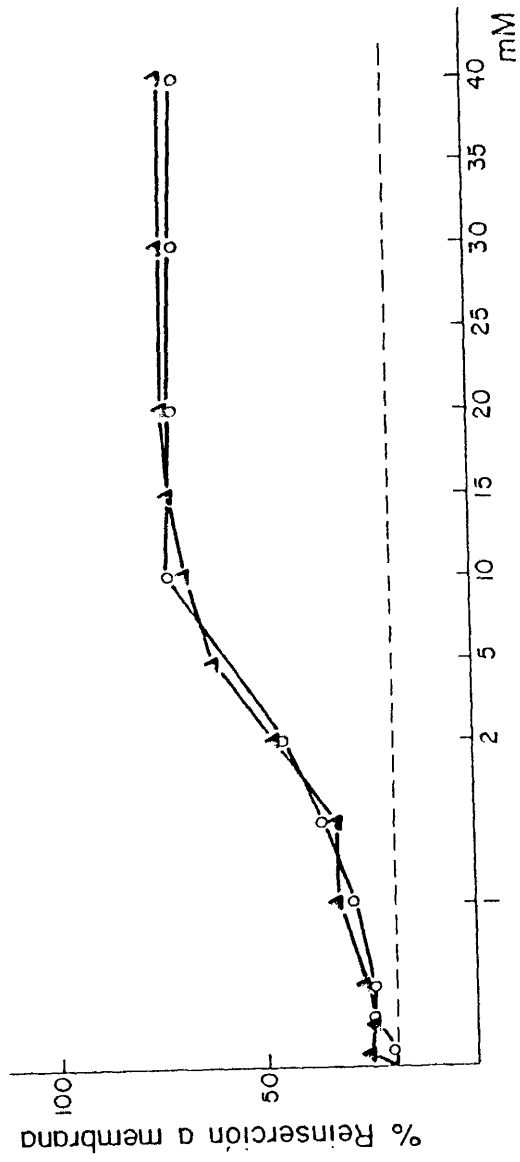


FIGURA 39.- Efecto de la concentración de iones Ca^{2+} (\blacktriangle) y Mg^{2+} (\circ) sobre la reinsertión de F_1 -ATPasa aislada de M. lysodeikticus a membrana desprovista de esta enzima (véase se Materiales y Métodos).

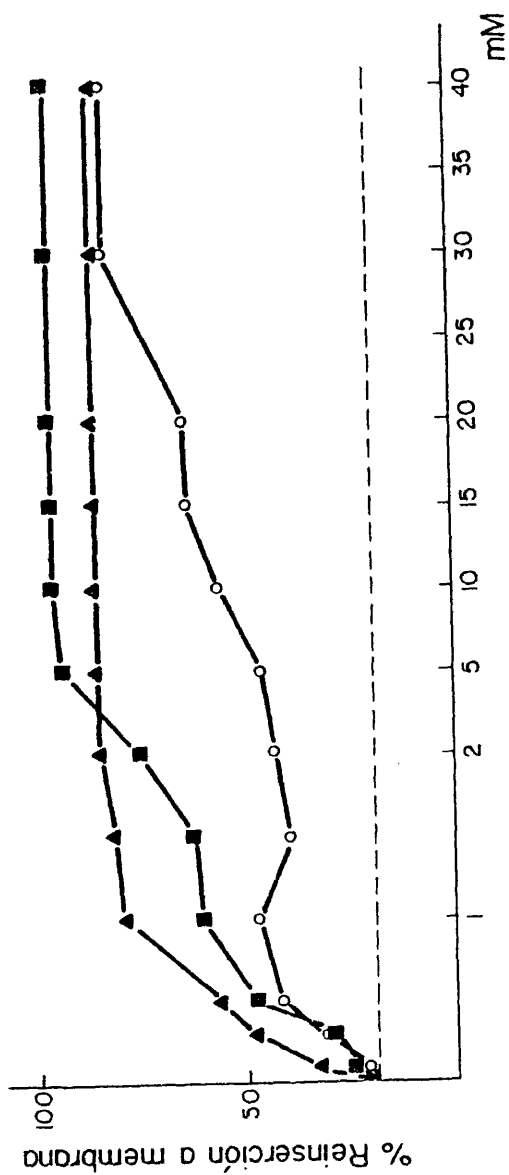


FIGURA 40.- Efecto de la concentración de iones Hg^{2+} (○—○), Cd^{2+} (▲—▲) y Zn^{2+} (■—■) sobre la reinsertión de F_1 -ATPasa aislada de *M. lysodeikticus* a membranas desprovistas de esta enzima (véase Materiales y Métodos).

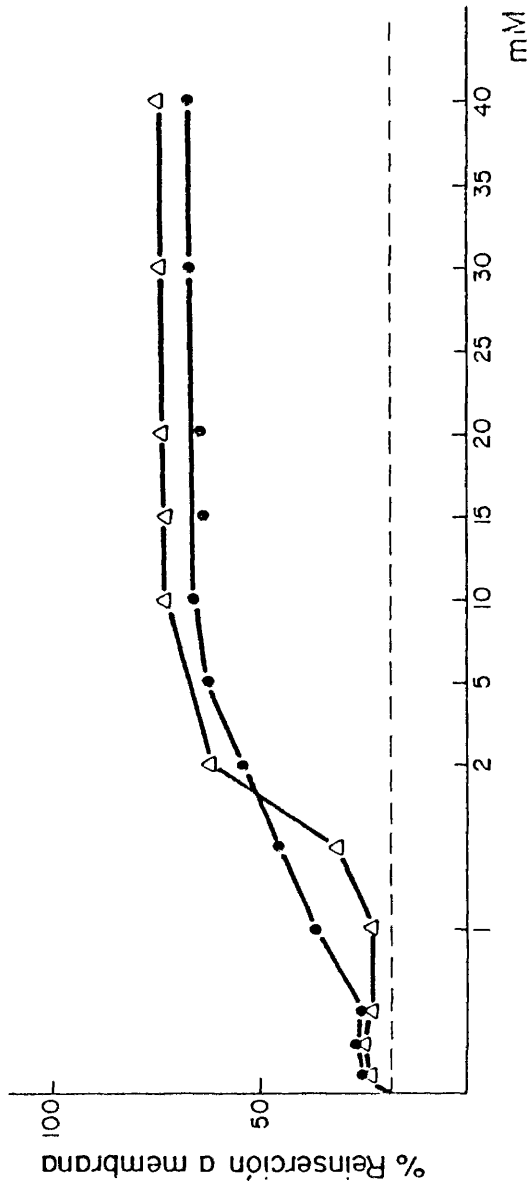


FIGURA 41.- Efecto de la concentración de iones Mn^{2+} (●—●) y Ni^{2+} (△—△) sobre la reinsertión de F_1 -ATPasa aislada de M. lysodeikticus a membranas desprovistas de esta enzima (véase Materiales y Métodos).

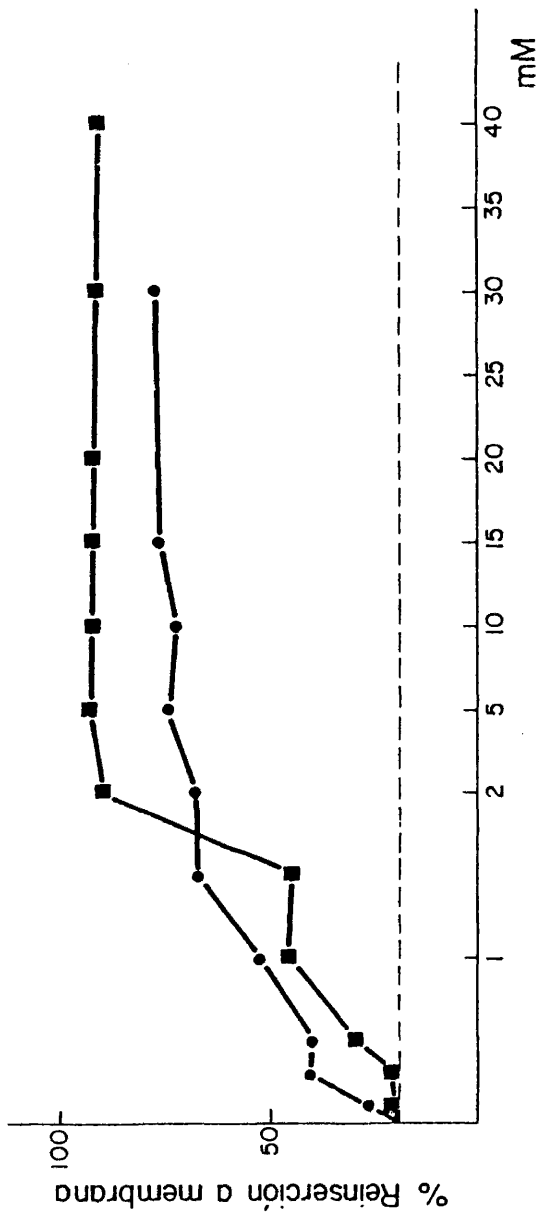


FIGURA 42.- Efecto de la concentración de iones Co^{2+} (●—●) y Cu^{2+} (■—■) sobre la reinsertión de $F_1-ATPasa$ aislada de M. lysodeikticus a membranas desprovistas de esta enzima - (véase Materiales y Métodos).

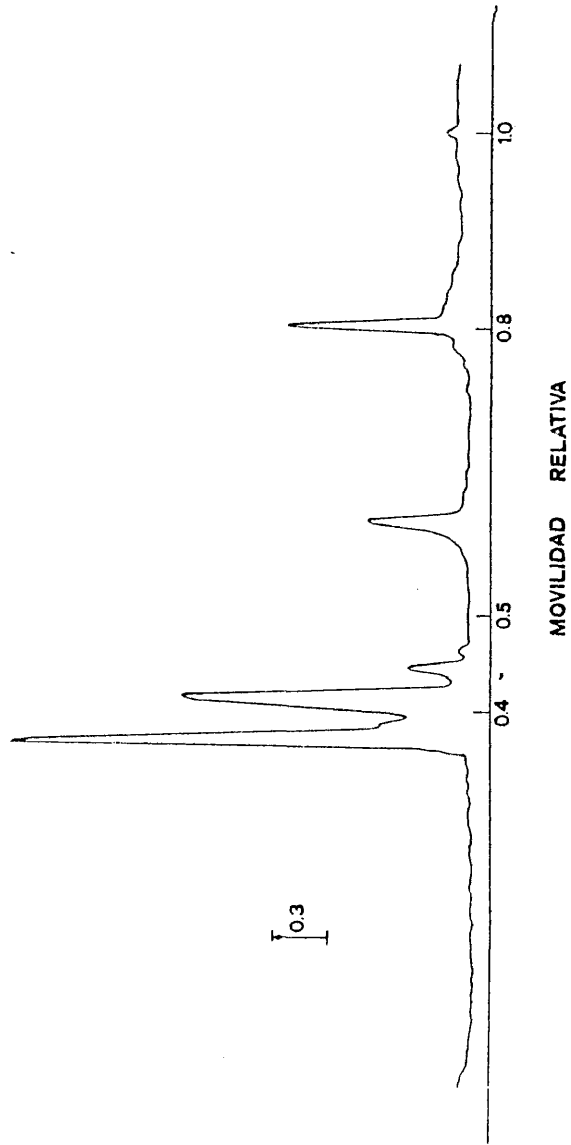


FIGURA 43.- Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS 0,1% de una preparación de F_1 -ATPasa de *M. lysodeikticus* conteniendo dos copias de subunidad δ por mol de enzima (condiciones en Materiales y Métodos).

TABLA XIX

EFFECTO DE DISTINTOS CATIONES DIVALENTES EN LA REINSENCION DE F₁-ATPasa DE MICROCOCUS LYSOLEIKTICUS A MEMBRANAS.

Los valores aquí representados se toman de las figuras 39, 40, 41 y 42. Los resultados se expresan como % respecto del total de enzima presente.

Adición	Concentración	Reinsección (%)	Afinidad por ^d ligando	Radio iónico ^a $\frac{P}{G}$
Ninguna	-	19	-	-
Hg ₂ ⁺	1 mM	37	S, N	1,10
Ca ₂ ⁺	1 mM	33	O	0,99
Cd ₂ ⁺	1 mM	79	S, N	0,97
Cu ₂ ⁺	1 mM	46	N, O	-
Mn ₂ ⁺	1 mM	36	S	0,80
Zn ₂ ⁺	1 mM	61	S, N	0,74
Co ₂ ⁺	1 mM	52	S, N	0,72
Ni ₂ ⁺	1 mM	24	S, N, O	0,69
Mg ₂ ⁺	1 mM	29	O	0,65

^aValores tomados de (377).

^bRadios iónicos según Pauling.

^cRadios iónicos según Goldschmidt.

^dSe intenta dar únicamente una ligera indicación. Véase referencia (377) para una amplia información sobre las características de las afinidades por ligando de los iones estudiados.

- a) Choque osmótico.
- b) Tratamiento con EDTA.
- c) Tratamiento con PCMB.

siendo el primero de ellos el único factible en la solubilización de la molécula de F_1 -ATPasa de la membrana nativa.

Para esta experiencia se estudiaron las reinsertiones de enzima logradas con el empleo de dos cationes tipo: a) Mg^{2+} a una concentración de 5 mM (afinidad por ligandos del tipo oxígeno) y b) Zn^{2+} a una concentración de 2 mM (afinidad por ligandos del tipo azufre y nitrógeno). Una vez reinsertada la proteína a la membrana, se procedió a lavar el complejo BF_1 -membrana con tampón Tris-HCl 30 mM pH 7,5 en ausencia de cationes divalentes, tal y como se realiza en el proceso de solubilización de la enzima (véase Materiales y Métodos), no observándose liberación apreciable de proteína (Tabla XX). A continuación se intentó extraer la enzima por medio de los tratamientos anteriormente descritos, obteniéndose los resultados expuestos en las figuras 44 y 45 y en la Tabla XXI. Estos resultados sugieren que la forma en que este factor BF_1 se une a la membrana en presencia de iones Mg^{2+} es análoga a como dicha molécula se encuentra asociada con la membrana "in vivo", ya que dicha reinsertión puede revertirse con la aplicación de los métodos empleados en la solubilización de la proteína. Por el contrario, la unión de la enzima a la membrana en presencia de Zn^{2+} parece producirse de una forma no fisiológica.

Por otra parte, la reinsertión obtenida en ausencia de iones Mg^{2+} (del 10 al 20%) podría ser debida probablemente a cantidades residuales de Mg^{2+} presentes en las membranas desprovistas de F_1 -ATPasa, sin embargo un pretratamiento de las mismas con EDTA no afecta al grado de reinsertión.

TABLA XX

EFEECTO PRODUCIDO POR LAVADOS SUCESIVOS CON TAMPON TRIS-HCl 30 mM (pH 7,5) SOBRE $[^{125}I]$ F₁-ATPasa UNIDA EN PRESENCIA DE Zn²⁺ y Mg²⁺ A MEMBRANAS DE MICROCOCCUS LYSDIETIKUS DESPROVISTAS DE DICHA ENZIMA.

Tratamiento	Porcentaje de solubilización de F ₁ -ATPasa unida a membranas en presencia de	
	Zn ²⁺	Mg ²⁺
Primer lavado con tampón Tris-HCl 30 mM (pH 7,5)	5,99	9,17
Segundo lavado con tampón Tris-HCl 30 mM (pH 7,5)	5,94	7,53
Tercer lavado con tampón Tris-HCl 30 mM (pH 7,5)	5,63	5,21
Cuarto lavado con tampón Tris-HCl 30 mM (pH 7,5)	6,36	6,41

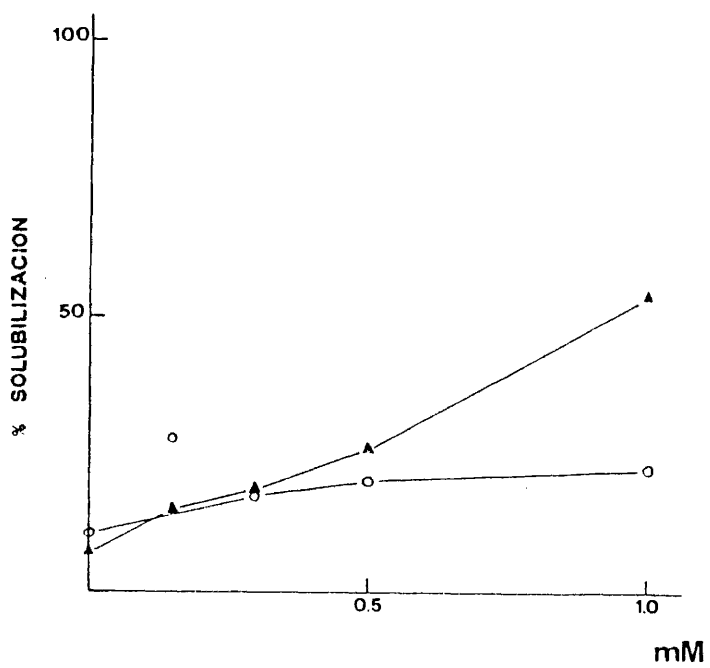


FIGURA 44.- Solubilización de $[^{125}\text{I}] \text{F}_1\text{-ATPasa}$ de *M. lysodeikticus* unida por medio de iones Zn^{2+} ($\blacktriangle\text{---}\blacktriangle$) y Mg^{2+} (O---O) a membranas desprovistas de esta enzima por tratamiento con EDTA (condiciones en Materiales y Métodos).

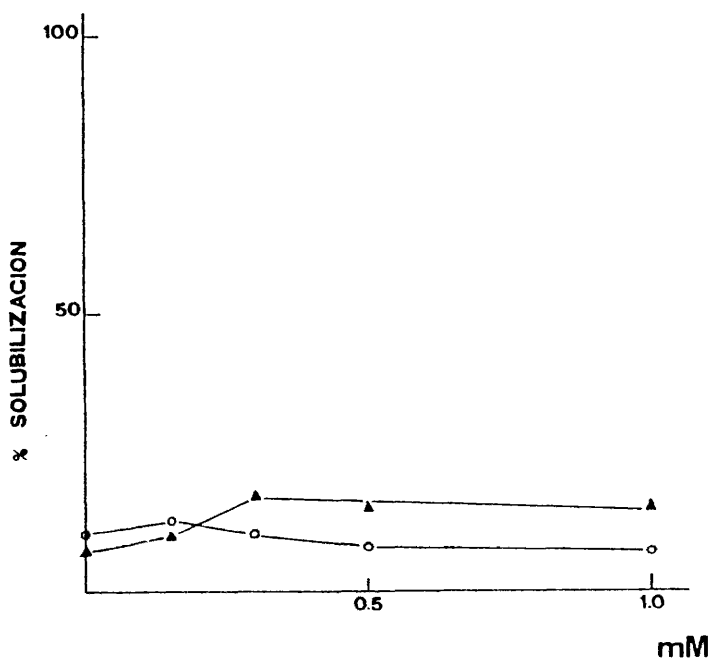


FIGURA 45.- Efecto de PCMB sobre la solubilización de $\left[\begin{smallmatrix} 1 \\ 25 \end{smallmatrix} \right]$ F_1 -ATPasa de *M. lysodeikticus* unida por medio de iones Zn^{2+} (▲—▲) y Mg^{2+} (○—○) a membranas desprovistas de dicha enzima (condiciones en Materiales y Métodos).

TABLA XXI

SOLUBILIZACION POR CHOQUE OSMOTICO CON TAMPON TRIS HCl 3 mM pH 7,5 DE ^{125}I -F₁-ATPasa UNIDA A MEMBRANAS DESPROVISTAS DE LA ENZIMA EN PRESENCIA DE Zn²⁺ Y Mg²⁺.

Tratamiento ^a	Porcentaje de solubilización de F ₁ -ATPasa unida a membrana en presencia de	
	Zn ²⁺	Mg ²⁺
Tris HCl 3mM pH 7,5	9,94	46,80

^a Previamente se habían lavado los complejos ^{125}I -ATPasa-membrana con tampón Tris HCl 30mM pH 7,5 (tabla XX)

3.6.3. Estudio comparativo de la solubilización de enzima y de la re-
versión del complejo BF_1 -membrana formado en presencia de
iones Mg^{2+} .

En la Tabla XXII se muestra el efecto de distintos agentes sobre la solubilización de la enzima F_1 -ATPasa nativa y unida a membrana en presencia de iones Mg^{2+} a una concentración de 5 mM. La analogía de los resultados sugiere que ambas proteínas se encuentran asociadas a la membrana en una forma similar. Además, la posible participación de cationes multivalentes en la formación y/o estabilidad del complejo BF_1 -membrana se ve apoyada por el hecho de que la solubilización de la enzima, por tratamiento de las membranas mediante tampón a baja fuerza iónica, se impide por la adición de pequeñas cantidades de cationes divalentes, tales como Mg^{2+} y Zn^{2+} (Tabla XXIII).

Todos estos resultados sugerirían que un catión multivalente, quizás Mg^{2+} "in vivo", actuaría como puente catiónico entre los sitios aniónicos de la enzima y de la membrana.

Por otra parte, es de particular interés la solubilización de enzima por tratamiento con urea a una concentración que no afecta a su actividad ATPásica (Tabla XXII y Fig. 46). Este procedimiento demuestra una cierta especificidad por F_1 -ATPasa, dando lugar a una enzima soluble que no muestra estimulabilidad por tripsina.

3.6.4. Digestión proteolítica controlada de la enzima purificada. Su efecto sobre la reinserción a membranas.

La figura 47 ilustra un experimento típico en el que se muestra el efecto de la tripsina sobre la capacidad de reinserción de la F_1 -ATPasa y su correlación con los patrones electroforéticos en presencia de SDS. Tras un tratamiento de 5 segundos con la enzima proteolítica, la subunidad α sufre una reducción en su talla molecular, convirtiéndose

TABLA XXII
 DISTINTOS PROCEDIMIENTOS DE REVERSION DEL COMPLEJO
 BF₁-MEMBRANA CONSTITUIDO EN PRESENCIA DE Mg²⁺ Y SU
 RELACION CON LA SOLUBILIZACION DE F₁-ATPasa A PARTIR
 DE MEMBRANAS NATIVAS DE M. LYSODEIKTICUS

Tratamiento ^a	Extracción de F ₁ -ATPasa del complejo recons- tituido. (%) ^b	Solubilización de ^b F ₁ -ATPasa ^c	
		%Proteína	% Unidades enzimáticas
Resuspensión en Tris- HCl 30mM	13,49± 2,37	8,98±0,32	12,32±2,69
Resuspensión en Tris- HCl 3mM	48,50± 2,12	28,08 ±3,97	64,02±12,09
EDTA 1,5 mM	18,13±5,38	14,95±1,97	13,92±2,36
EGTA 1,5 mM	20,47±5,85	12,57±3,15	15,90±0,96
LiCl 1M	8,07± 0,93	10,84±1,36	0,00
Urea 1,5 M	51,67±10,41	28,30±2,75	100
KSCN 100mM	9,33±2,52	—	—
Cardiolipina (200 µg)	9,00±1,00	—	—

^a Se realizan previamente cuatro lavados de las membranas con tampón Tris- HCl 30mM (pH 7,5).

^b Valores medios de tres experimentos.

^c Se refiere a la actividad ATPásica estimulada por tripsina. Únicamente en el caso de urea se obtiene una preparación no estimulable por tripsina.

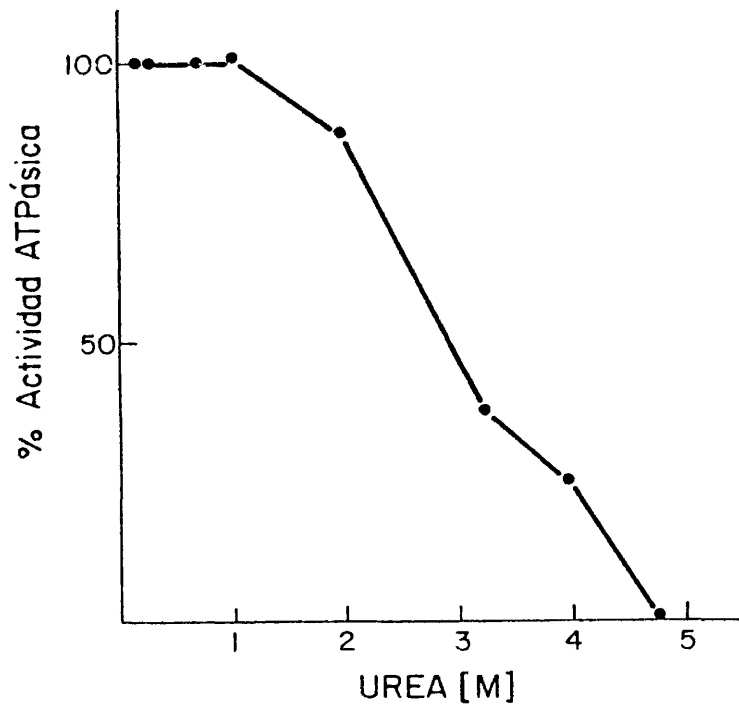


FIGURA 46.- Efecto de urea sobre la actividad enzimática de F_1 -ATPasa purificada. Se incuban 7 μ g de enzima purificada con cantidades crecientes de urea en un volumen final de 100 μ l completado con tampón Tris-HCl 30 mM (pH 7,5) durante 25 min a temperatura ambiente. Posteriormente se mide la actividad ATPásica residual en los incubados (condiciones en Materiales y Métodos).

TABLA XXIII

EFFECTO DE IONES DIVALENTES SOBRE LA SOLUBILIZACION DE F_1 -ATPasa DE MICROCOCCUS LYSODEIKTICUS.

Las membranas, una vez lavadas con tampón Tris HCl 30 mM (pH 7,5), se resuspenden en un tampón Tris HCl 3 mM (pH 7,5) en ausencia o presencia de iones divalentes, según se especifica en la tabla. Los resultados se expresan como % de proteína y unidades enzimáticas (actividad ATPásica) solubilizadas, considerando como 100% el contenido en proteína y actividad enzimática de hidrólisis de ATP de las membranas.

<u>Procedimiento</u>	<u>%Proteína</u>	<u>%Unidades enzimáticas</u>
Tris 3mM	21,6	42,2
Tris 3mM + Zn^{2+} 1,5 mM	9,4	-
Tris 3mM + Zn^{2+} 2,25 mM	6,8	-
Tris 3mM + Mg^{2+} 0,66 mM	1,9	-
Tris 3mM + Mg^{2+} 1,88 mM	-	-

El signo "-" indica que no se detecta una cantidad medible.

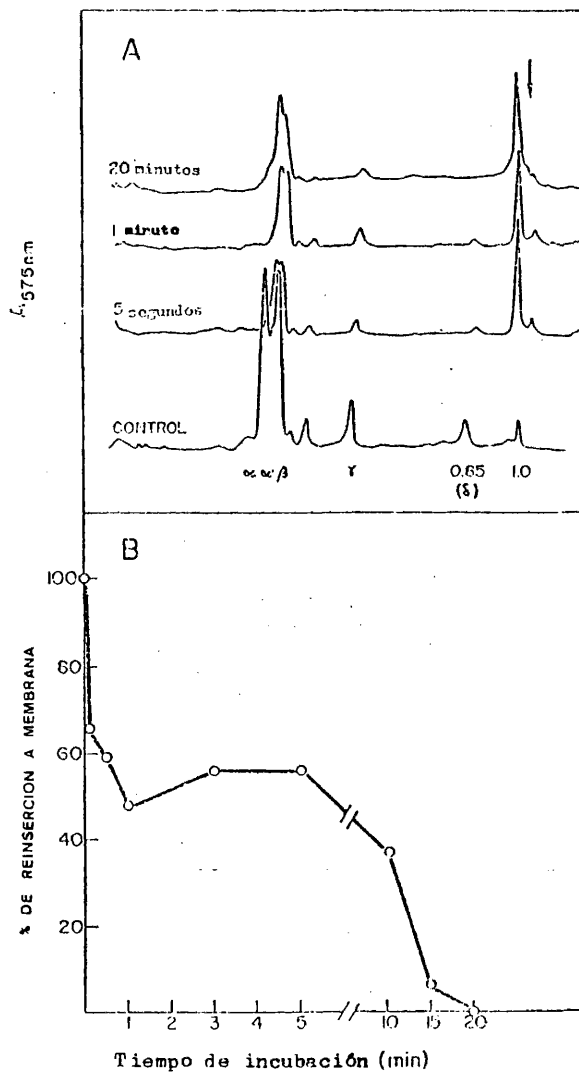


FIGURA 47.- Acción de tripsina sobre la reinsertión de F₁-ATPasa a membrana (B) y análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS 0,1% de las modificaciones producidas por la enzima proteolítica (A). Relación F₁-ATPasa/tripsina de 15/1. Control con doble cantidad de proteína (condiciones en Materiales y Métodos).

cuantitativamente en una forma α^1 de peso molecular entre 2.000 y 3.000 dalton inferior (Fig. 47 B). Por otra parte, las subunidades γ y δ se destruyen aproximadamente en un 50% (Fig. 47 B y Tabla XXIV), lo cual es concomitante con una disminución del 50% en la cantidad de F_1 -ATPasa fijada a las membranas (Fig. 47 A). La meseta observada en la figura 47 B, relativa a un grado de reinsertión de la enzima reducido en un 50%, se corresponde bien con la proporción residual de subunidad γ y δ , mientras que la desaparición total de este último componente se correlaciona con la pérdida de la capacidad de reconstituir el complejo BF_1 -membrana (Fig. 47 B y Tabla XXIV). Estos resultados parecen asignar a la subunidad δ un papel esencial en la unión de la enzima a la membrana, aunque un posible papel de la subunidad γ en esta función no puede ser totalmente excluido. Sin embargo la integridad total de la subunidad α no parece ser necesaria para la reinsertión de la F_1 -ATPasa de M. lysodeikticus a la membrana.

3.6.5. Reinsertión a membrana de una enzima con subunidad α modificada.

La figura 48 ilustra el patrón electroforético en gel de poliacrilamida en presencia del detergente aniónico SDS de una preparación de enzima en la que la subunidad α se encuentra parcialmente degradada en un componente α^1 de peso molecular 3.000 dalton inferior. El hecho de que esta preparación de estequiometría aproximada $\alpha_3^1 \beta_3 \gamma \delta$, muestre una capacidad de reinsertión a membrana similar a la de una enzima de estequiometría $\alpha_3 \beta_3 \gamma \delta$ permite concluir que no se requiere una integridad total de la subunidad α para reconstituir el complejo enzima-membrana.

3.6.6. Reinsertión a membrana de moléculas F_1 -ATPasa con contenido variable en subunidad δ .

TABLA XXIV

SENSIBILIDAD A TRIPSINA DE LAS SUBUNIDADES DEL FACTOR BF₁ DE MICRO-COCCUS LYODEIKTICUS EN RELACION A LA REINSECCION DE F₁-ATPasa A MEMBRANAS.

Muestras conteniendo 60 µg de F₁-ATPasa se trataron con tripsina (4 µg) durante 5 s ó 20 min como se ha descrito en Materiales y Métodos, y subsiguientemente, fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS (Fig. 47). Las áreas de las subunidades se calcularon a partir de los perfiles densitométricos de los geles teñidos con azul de Coomassie R 250, siendo correlacionadas con la capacidad de las muestras tratadas a reinsertarse en las membranas.

Tratamiento con tripsina	Reinserción de F ₁ -ATPasa (%)	Area de las subunidades (% del valor a tiempo cero)
0	100	100
5 s	50	76,5
20 min	0	71,05
		23,2
		0,0

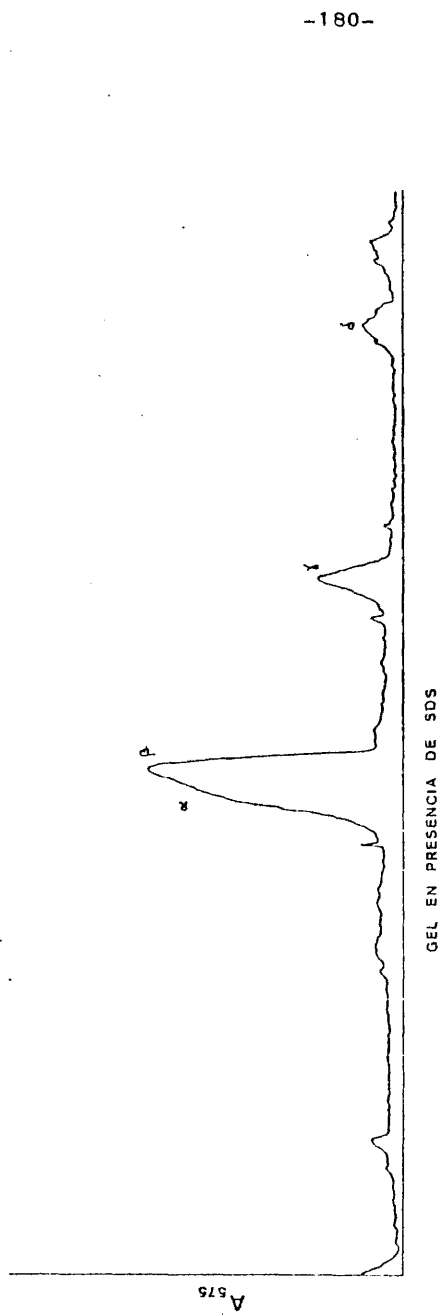


FIGURA 48.- Electroforesis en gel de poli(acrilamida al 10% en presencia de SDS 0,1% de una preparación de BF₁ de M. lysodeikticus con la subunidad α modificada (condiciones en Materiales y Métodos).

La figura 49 resume los resultados obtenidos al estudiar la reinserción a membrana de dos preparaciones de factor BF_1 con una estequiometría en subunidades distinta: $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$ y $\alpha_3\beta_3\gamma\delta_2$. La presencia de dos copias de subunidad δ por mol de enzima duplica el porcentaje de reinserción de la molécula de F_1 -ATPasa a la membrana. Por otra parte, el porcentaje de reinserción en ausencia de iones multivalentes se ve incrementado al poseer la enzima un mayor contenido en subunidad δ . Estos resultados, además de apoyar la idea de una participación esencial por parte de la subunidad δ en la capacidad de reinserción de la enzima a la membrana, favorecen una estequiometría en subunidades que contaría al menos con dos copias de subunidad δ por mol de F_1 -ATPasa.

Por otra parte, medidas de reinserción en función de la concentración de enzima indicaron que la saturación se producía a un valor próximo a 100 μg de F_1 -ATPasa unida/mg de proteína de membrana, lo que concuerda con estimaciones previas de la cantidad de F_1 -ATPasa presente en membranas nativas de M. lysodeikticus (152).

3.6.7. Reinserción a membrana de una enzima defectiva en subunidad δ obtenida por tratamiento con tripsina.

El aislamiento por electroforesis a escala micro-preparativa (véase Materiales y Métodos) de una enzima F_1 -ATPasa defectiva en subunidad δ por tratamiento de la enzima con tripsina durante 20 min, permitió ahondar en el papel jugado por dicha subunidad minoritaria en la reinserción del factor BF_1 a la membrana. La proteína aislada, con una composición en subunidades $\alpha_3\beta_3\gamma_{0,3}$, era incapaz de fijarse a la membrana, ya que menos del 7% de la proteína marcada con ^{125}I se encontraba en el sedimento después de realizarse el experimento de reinserción.

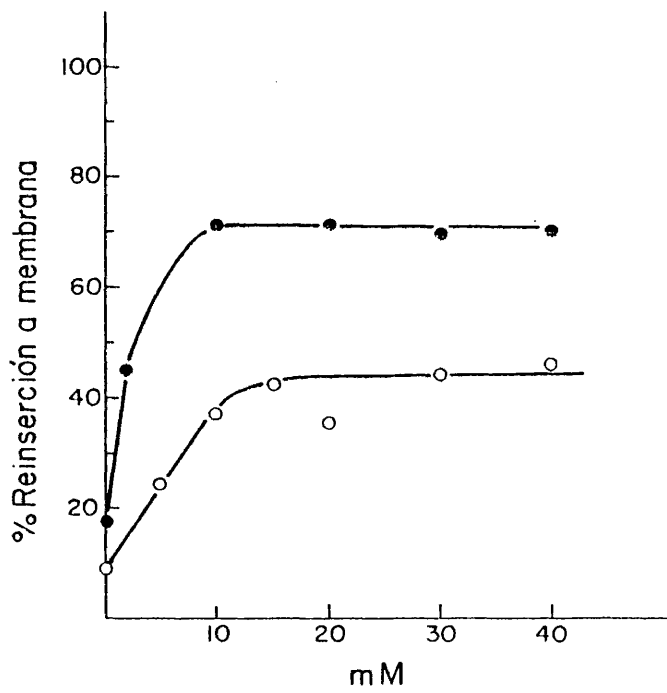


FIGURA 49.- Efecto de la concentración de iones Mg^{2+} (eje de abscisas) sobre la reinsertión de distintas preparaciones de F_1-ATP -asa a membranas desprovistas de esta enzima. (●—●) F_1-ATP asa con estequiometría $\alpha_3 \beta_3 \gamma \delta_2$; (○—○) F_1-ATP asa con estequiometría $\alpha_3 \beta_3 \gamma \delta$ (condiciones en Materiales y Métodos).

3.6.8. Reinserción de las subunidades aisladas del factor BF_1 a membranas.

Este estudio se llevó a cabo con las subunidades α , β y γ aisladas por electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida en presencia de urea, así como con preparaciones de subunidades γ y δ obtenidas por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (véase Materiales y Métodos), lo que presenta problemas inherentes a la difícil eliminación del detergente aniónico del complejo SDS-proteína (véanse apartados 3.2.1. y 3.3.4.). Como se ilustra en la figura 50, las subunidades α y β presentan un elevado grado de reinserción que puede ser explicado por su carácter parcialmente hidrofóbico (339). Por su parte, la subunidad γ aislada en presencia de urea manifiesta una débil reinserción a membrana, que resulta ser nula cuando este componente se prepara en los sistemas con SDS (Fig. 51). La subunidad δ presenta un grado de reinserción intermedio entre aquel de las subunidades mayoritarias y el correspondiente a la subunidad γ (Fig. 51). No obstante, este hecho puede ser imputable al método utilizado en el aislamiento de dicha subunidad, como queda puesto de manifiesto en el caso del componente γ (compárense Figs. 50 y 51).

El estudio del efecto de las distintas subunidades de la enzima F_1 -ATPasa sobre la reinserción de cada una de ellas a la membrana conduce a los resultados expuestos en las Tablas XXV-XXIX. La adición de subunidad δ incrementa en todos los casos ensayados el porcentaje de reinserción del resto de las subunidades de la enzima. Todos estos resultados parecen indicar la existencia de sitios de fijación a membrana en las subunidades α , β y δ aisladas. Un hecho que merece comentarse se presenta en el estudio de la reinserción de la subunidad δ (Tabla XXIX); al disminuir el porcentaje de fijación en presencia de cadena polipeptídica α o β . Esto parece sugerir una interacción de los sitios de fijación a membranas de las respectivas subunidades α y β

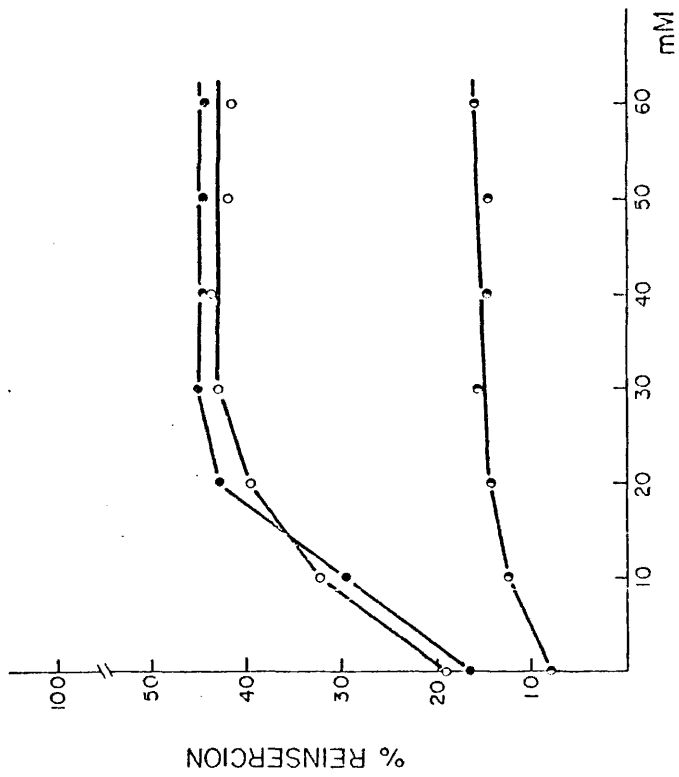


FIGURA 50.- Efecto de la concentración de iones Mg^{2+} sobre la reinsención a membrana de las subunidades α (O—O), β (●—●) y γ (○—○) aisladas por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de urea (véase Materiales y Métodos).

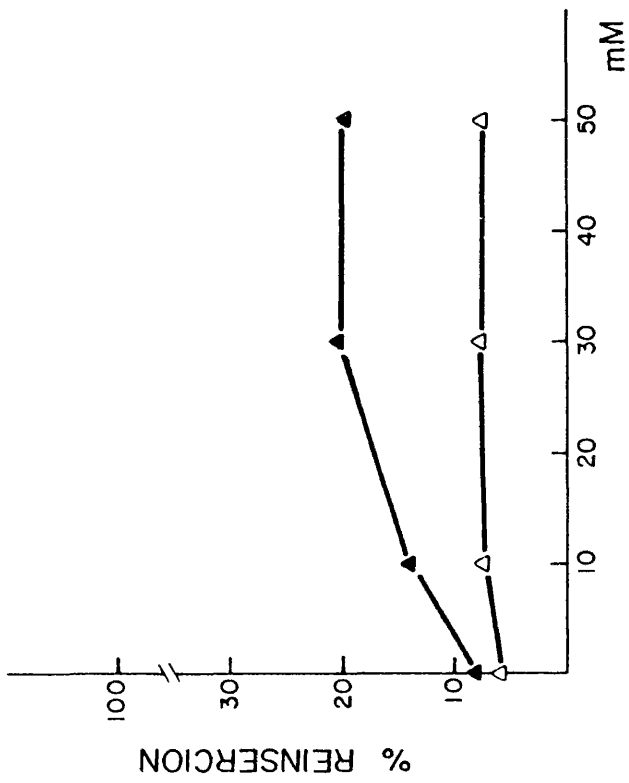


FIGURA 51.- Efecto de la concentración de iones Mg^{2+} sobre la reinsertión a membrana de las subunidades γ (Δ — Δ) y δ (\blacktriangle — \blacktriangle) aisladas por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (véase Materiales y Métodos).

TABLA XXV

EFFECTO DE LAS SUBUNIDADES β , δ Y δ DE LA F₁-ATPasa DE M. LYSODEIKTICUS SOBRE LA REINSENCION DE LA SUBUNIDAD α A MEMBRANAS.

La reinsención se obtenía incubando las distintas combinaciones con membranas desprovistas de F₁-ATPasa durante 15 min. a 37°C y 5 min. a temperatura ambiente en presencia de Mg²⁺ 20mM.

Adición de subunidades ^a	% Reinsención ^b
Ninguna	43,07 (100)
4 µg subunidad β	41,36 (96,03)
4 µg subunidad δ	49,32 (114,51)
4 µg subunidad δ	53,48 (124,17)
en ausencia de Mg ²⁺	20,93 (48,59)

^a Todas las subunidades fueron obtenidas por electroforesis en presencia de urea, excepto la subunidad δ que lo fue por electroforesis en presencia de SDS.

^b Entre paréntesis se representa la reinsención relativa a la obtenida con la subunidad α en presencia de iones Mg²⁺ (100%).

TABLA XXVI

EFFECTO DE LAS SUBUNIDADES α , γ Y δ DE LA F_1 -ATPasa DE *M. LYSODEIKTICUS* SOBRE LA REINSECCION DE LA SUBUNIDAD ^{125}I - β A MEMBRANAS.

La reinsención se obtenía incubando las distintas combinaciones con membranas desprovistas de F_1 -ATPasa durante 15 min. a 37°C y 5 min. a temperatura ambiente en presencia de Mg^{2+} 20mM.

Adición de subunidades ^a	% Reinsención ^b
Ninguna	34,89 (100)
4 μ g de subunidad α	32,66 (94,27)
4 μ g de subunidad γ	32,88 (94,24)
4 μ g de subunidad δ	38,62(110,69)
en ausencia de Mg^{2+}	17,29 (49,56)

^a Todas las subunidades fueron obtenidas por electroforesis en presencia de urea, excepto la subunidad δ que lo fue por electroforesis en presencia de SDS.

^b Entre paréntesis se representa la reinsención relativa a la obtenida con la subunidad β en presencia de iones Mg^{2+} (100%).

TABLA XXVII

EFFECTO DE LAS SUBUNIDADES α , β Y δ DE LA F_1 -ATPasa DE M.L.Y.SODEIKTICUS SOBRE LA REINSECCION DE LA SUBUNIDAD γ A MEMBRANAS.

La reinserción se obtenía incubando las distintas combinaciones con membranas desprovistas de F_1 -ATPasa durante 15 min. a 37°C y 5 min. a temperatura ambiente en presencia de Mg^{2+} 20mM.

<u>Adición de subunidades</u> ^a	<u>% Reinserción</u> ^b
Ninguna	12,13 (100)
4 μ g subunidad α	12,75 (105,11)
4 μ g subunidad δ	13,53 (111,54)
4 μ g subunidad β	14,41 (118,80)
en ausencia de Mg^{2+}	7,97 (65,70)

^a Todas las subunidades fueron obtenidas por electroforesis en presencia de urea, excepto la subunidad δ que lo fue por electroforesis en presencia de SDS.

^b Entre paréntesis se representa la reinserción relativa a la obtenida con la subunidad γ en presencia de iones Mg^{2+} (100%).

TABLA XXVIII

EFFECTO DE LAS SUBUNIDADES α , β Y δ DE LA F₁-ATPasa DE *M. LYSODEIKTICUS* SOBRE LA REINSECCION DE LA SUBUNIDAD ¹²⁵I- γ A MEMBRANAS. (LA SUBUNIDAD γ SE OBTUVO POR ELECTROFORESIS EN PRESENCIA DE SDS).

La reinserción se obtenía incubando las distintas combinaciones con membranas desprovistas de F₁-ATPasa durante 15 min. a 37°C y 5 min. a temperatura ambiente en presencia de Mg²⁺ 20mM.

<u>Adición de subunidades</u> ^a	<u>% Reinserción</u> ^b
Ninguna	7,75 (100)
4 μ g subunidad δ	12,26 (158,19)
4 μ g subunidad α	15,93 (205,55)
4 μ g subunidad β	6,76 (87,23)
en ausencia de Mg ²⁺	6,08 (78,45)

^a Todas las subunidades fueron obtenidas por electroforesis en presencia de urea, excepto la subunidad δ que lo fue por electroforesis en presencia de SDS.

^b Entre paréntesis se representa la reinserción relativa a la lograda con la subunidad γ (aislada en presencia de SDS) con Mg²⁺ 20mM.

TABLA XXIX

EFFECTO DE LAS SUBUNIDADES α , β Y γ DE LA F₁-ATPasa DE M. LYSODEIKTICUS SOBRE LA REINSECCION DE LA SUBUNIDAD δ A MEMBRANAS.

La reinsección se obtenía incubando las distintas combinaciones con membranas desprovistas de F₁-ATPasa durante 15 min. a 37°C y 5 min. a temperatura ambiente en presencia de Mg²⁺ 20mM.

<u>Adición de subunidades</u> ^a	<u>% Reinsección</u> ^b
Ninguna	13,59 (100)
4 μ g subunidad γ	15,19 (111,77)
4 μ g subunidad α	10,81 (79,54)
4 μ g subunidad β	10,53 (77,48)
en ausencia de Mg ²⁺	6,68 (49,15)

^a Todas las subunidades fueron obtenidas por electroforesis en presencia de urea, excepto la subunidad δ que lo fue por electroforesis en presencia de SDS.

^b Entre paréntesis se representa la reinsección relativa a la obtenida con la subunidad δ en presencia de iones Mg²⁺ (100%).

con aquellos correspondientes a la subunidad δ , ya que el empleo de grandes cantidades de membrana desprovistas de BF_1 en contraposición con la exigua cantidad de proteína utilizada, hace despreciable la consideración de posibles competiciones de las subunidades por los mismos sitios de unión a membrana. Una comparación de los porcentajes de reinsertión obtenidos en las Tablas XXV-XXIX sugeriría que la subunidad δ podría interaccionar con el resto de las subunidades α , β y γ , en las condiciones experimentales empleadas.

3.6.9. Efecto de distintos antisueros sobre la reinsertión de la enzima a la membrana.

Una incubación previa de 30 min a temperatura ambiente de F_1 -ATPasa marcada radiactivamente con distintas combinaciones de antisueros dió lugar a los resultados de reinsertión a membrana descritos en la Tabla XXX. Todos los antisueros inhiben la unión en una pequeña extensión. Sin embargo, no se observan descensos significativos, lo que no es sorprendente por la falta de suero anti-(subunidad δ) - (véase apartado 3.2.).

TABLA XXX

EFFECTO DE DISTINTOS ANTISUEROS SOBRE LA REINSE-
CION DE F_1 -ATPasa DE MICROCOCCUS LYSODEIKTICUS A
MEMBRANA.

Las muestras, conteniendo $[^{125}I]$ F_1 -ATPasa (20.000 cpm), se incu-
baron con distintos sueros anti-subunidades durante 30 min a tempera-
tura ambiente. Posteriormente se mide la cantidad de F_1 -ATPasa que
puede reinsertarse en membranas desprovistas de dicha enzima, según
se describió en Materiales y Métodos.

Tratamiento	% F_1 -ATPasa reinsertada ^a
anti- α	85,7
anti- β	76,1
anti- γ	87,7
anti- α + anti- γ	89,4
anti- α + anti- β	90,7
anti- β + anti- γ	78,6
anti- α + anti- β + anti- γ	86,9

^a Porcentaje del total de F_1 -ATPasa presente en el ensayo.

3.7. PAPEL DE LOS IONES METALICOS
EN LA F_1 -ATPasa.

3.7.1. Contenido en zinc de la enzima purificada.

La Tabla XXXI muestra los resultados obtenidos en la determinación de zinc por absorción atómica en muestras de F_1 -ATPasa purificada, así como su aparente correlación con el nivel de actividad ATPásica. Como puede apreciarse, los valores normales de actividad ATPásica de este factor BF_1 se corresponden con un contenido en zinc próximo a 1 átomo-gramo/mol de proteína, aunque no existe una relación lineal entre ambos valores (véase Tabla XXXI). La disminución en la cantidad de zinc presente en la enzima a un valor aproximado de 0,5 átomo-gramo/mol de proteína, se acompaña con una pérdida de un 50% en el nivel de actividad enzimática.

Por otra parte, y tal como se muestra en la Tabla XXXI, una diálisis prolongada de la enzima frente a EDTA provoca la eliminación casi completa del zinc, lo que se corresponde con una pérdida muy importante de la actividad hidrolítica de ATP por parte de este factor BF_1 . Estos resultados sugieren que el zinc es un componente intrínseco de la F_1 -ATPasa de *M. lysodeikticus* y esencial para su actividad enzimática dependiente de Ca^{2+} .

Otros análisis de metales por absorción atómica pusieron de manifiesto la carencia de hierro en las preparaciones purificadas de esta F_1 -ATPasa y la presencia de calcio en cantidades no estequiométricas (0,4 - 0,7 átomo-gramo/mol de proteína).

3.7.2. Efecto de varios agentes quelantes sobre la actividad enzimática.

Los agentes complejantes de iones Zinco, EDTA y L-cisteína inhibían la actividad ATPásica del factor BF_1 de *M. lysodeikticus*, según se muestra en la figura 52. El mercaptano L-cisteína resulta efectivo a concentraciones muy pequeñas, sin embargo este efecto re-

TABLA XXXI

CONTENIDO EN ZINC DE DIFERENTES PREPARACIONES DE F_1 -ATPasa DE MICROCOCCUS LYSODEIKTICUS ANTES Y DESPUES DE DIALIZARLAS FRENTE A EDTA Y CORRELACION CON LA ACTIVIDAD ATPásica.

Las muestras de enzima conteniendo aproximadamente 3 mg de proteína fueron analizadas por su contenido en zinc y otros iones metálicos divalentes como se ha descrito en Materiales y Métodos. En algunos casos, la enzima (1,0 ml de $8,49 \times 10^{-6}$ M proteína, peso molecular 350.000 dalton) fue tratado con 5×10^{-2} M EDTA en $5,7 \times 10^{-2}$ M Tris-HCl (pH 7,5) y subsiguientemente dialzada frente a 500 ml de 5×10^{-2} M EDTA en $5,7 \times 10^{-2}$ M Tris-HCl (pH 7,5) durante 44 h a temperatura ambiente con cambios después de 10, 20 y 30 h. El agente quelante se extrajo por diálisis exhaustiva contra el mismo volumen (tres cambios) de 3×10^{-2} M Tris-HCl (pH 7,5). La actividad ATPásica fué medida según se describió en Materiales y Métodos. Siempre que fué posible los resultados se expresaron como valores medios \pm desviaciones estándar con el número de análisis realizados y los valores máximo y mínimo obtenidos entre paréntesis.

Tratamiento de la muestra	Contenido en zinc (átomo-gramo/mol BF_1)	Actividad ATPásica (μ mol/min x mg)
_____	$0,787 \pm 0,008$ (3; 0,798; 0,782)	$5,85 \pm 0,019$ (3; 5,86; 5,82)
_____	0,610	5,61
_____	0,552	2,93
Diálisis frente a EDTA	0,028	0,32

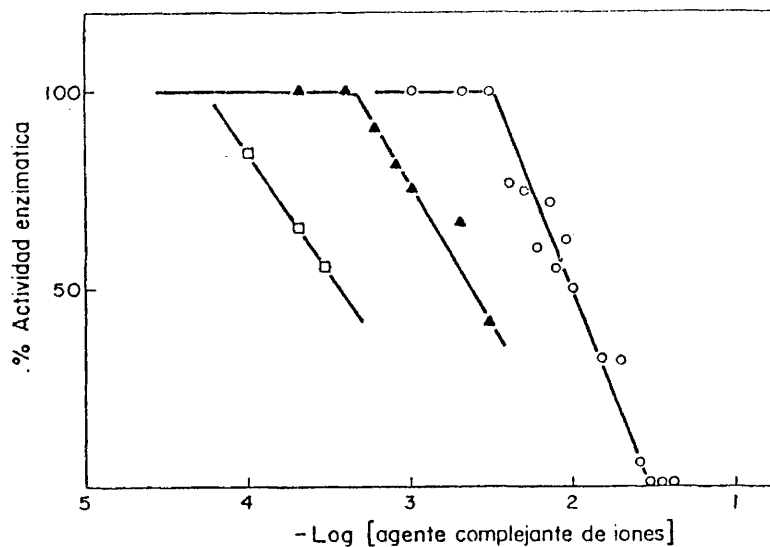


FIGURA 52.- Inhibición de la F_1 -ATPasa de M. Jysodeikticus mediante agentes quelantes. $3,9 \times 10^{-7}$ M de enzima fue incubada con concentraciones crecientes de EDTA (O—O), Zincon (▲—▲) y L-cisteína (□—□) durante 12 h , 15 min y 24 h respectivamente a temperatura ambiente, midiéndose a continuación la actividad ATPásica residual (condiciones en Materiales y Métodos).

quiere incubaciones mucho más prolongadas que los otros agentes quelantes. De este modo, y teniendo en cuenta estas dos variables, concentración requerida para alcanzar una inhibición del 50% y tiempo de incubación empleado, resulta que el Zincon se manifiesta como el más efectivo. Esta inhibición no se revierte por la adición del sustrato de la enzima (8 mM Ca^{2+} -ATP) ni por una titulación con Ca^{2+} de la cantidad de agente quelante presente en el ensayo. Por consiguiente, estos resultados aducen la presencia de un ión metálico como un requerimiento intrínseco para la actividad enzimática de la F_1 -ATPasa de M. lysodeikticus ya que la inactivación puede ser atribuible a su desplazamiento por los agentes complejantes de iones estudiados. A partir de los datos expuestos en el apartado anterior y conociendo la capacidad y especificidad de los agentes quelantes para competir con la proteína por el ión metálico, parece razonable suponer que el Zn^{2+} sea el ión metálico del que se trata.

La inhibición producida por L-cisteína muestra evidentes peculiaridades (Fig. 53). Como podría esperarse, dada la gran afinidad de todos los elementos del grupo II B de la tabla periódica y por ende del zinc por los grupos -SH, la inhibición se produce a muy bajas concentraciones, sin embargo, a medida que se aumenta la concentración del mercaptano, la inhibición desciende paulatinamente hasta ser nula a una concentración de 10 mM en las condiciones experimentales empleadas. También merece ser comentado que este efecto se ve reducido con el aumento del tiempo de incubación del mercaptano con la enzima -- (Fig. 53). En la actualidad no se tiene una explicación para este comportamiento, si bien la posible existencia de sitios activos y reguladores capaces de interaccionar con la L-cisteína podría estar relacionada con el susodicho comportamiento.

El efecto de otros agentes complejantes de iones sobre la -- actividad ATPásica de la enzima se muestra en la Tabla XXXII. Com

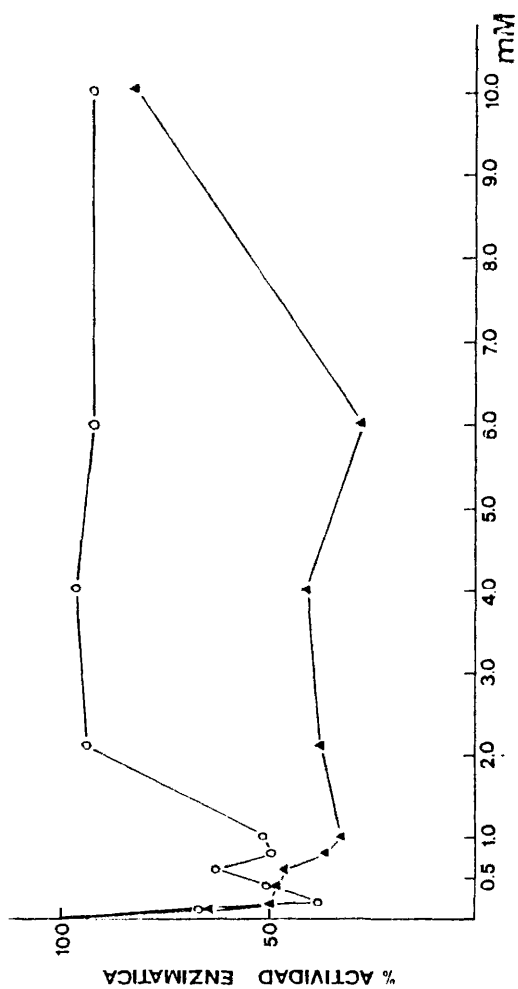


FIGURA 53.- Inhibición de la F_1 -ATPasa de M. lysodeikticus por L-cisteína. $3,9 \times 10^{-7}$ M de enzima fué incubada con concentraciones crecientes de L-cisteína durante 24 h (O—O) y 48 h (▲—▲) a temperatura ambiente, midiéndose a continuación la actividad ATPásica residual (condiciones en Materiales y Métodos).

TABLA XXXII

EFFECTO DE DISTINTOS COMPUESTOS CON CAPACIDAD COMPLEJANTE DE IONES SOBRE LA ACTIVIDAD HIDROLITICA DE F_1 -ATPasa.

Se incuban 15 μ g de enzima en presencia de los compuestos abajo especificados en un volumen final de 200 μ l de Tris HCl 30 mM (pH 7,5) durante toda la noche a temperatura ambiente. Los resultados se expresan como % de actividad ATPásica respecto de aquella correspondiente a ensayos control en los que no se añadía ningún compuesto.

Adiciones	[M]	%Actividad ATPásica
Ninguna	-	100
KSCN	1×10^{-3}	149,4
Imidazol	1×10^{-3}	116,6
Imidazol	1×10^{-2}	117,1
Imidazol	2×10^{-2}	127,1
Imidazol	5×10^{-2}	133,7
Imidazol	1×10^{-1}	143,3
KCN	$1,84 \times 10^{-2}$	156,8
KCN	$9,18 \times 10^{-2}$	209,3
KCN	$1,84 \times 10^{-1}$	218,9
Batofenantrolina	2×10^{-3}	105,4

puestos tales como KSCN, KCN e imidazol activan apreciablemente la actividad hidrolítica sobre el ATP de la enzima purificada, mientras que batofenantrolina no manifiesta ningún efecto.

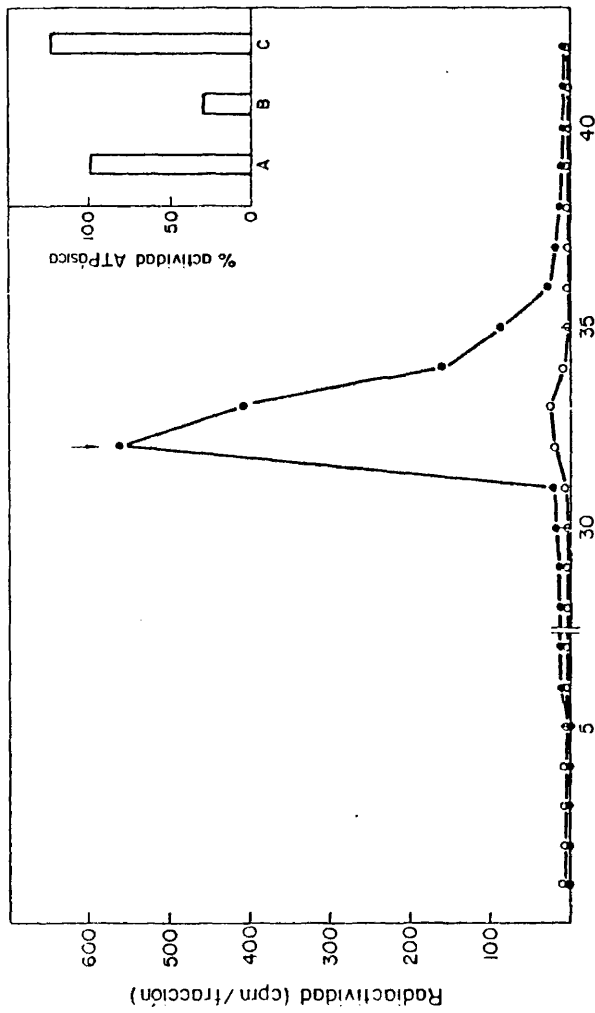
3.7.3. Reconstitución de $(Zn^{2+}) F_1$ -ATPasa y de su actividad.

La reconstitución de la metalo $(Zn^{2+}) F_1$ -ATPasa fue demostrada por la incorporación de $^{65}Zn^{2+}$ en la apoproteína según se ilustra en la figura 54. Sin embargo, la enzima nativa, $(Zn^{2+}) F_1$ -ATPasa, era incapaz de incorporar $^{65}Zn^{2+}$. La confirmación de que el $^{65}Zn^{2+}$ incorporado a la enzima se encontraba fuertemente unido se obtuvo por re cromatografía de la $(Zn^{2+}) F_1$ -ATPasa reconstituída. Este segundo paso eliminaba parte de la radiactividad, correspondiente a Zn^{2+} debilmente unido (aproximadamente 5 átomo-gramo/mol de proteína), y rendía una F_1 -ATPasa conteniendo aproximadamente 1 átomo-gramo de Zn^{2+} por mol de proteína. La reconstitución de la $(Zn^{2+}) F_1$ -ATPasa fue acompañada por una recuperación de la actividad enzimática como se muestra en el recuadro de la figura 54.

3.7.4. Acción de cationes divalentes en la prevención y reversión del efecto de los agentes quelantes.

Los ensayos de "prevención" y "reversión" de la inhibición producida por agentes complejantes de iones constituyen pruebas adicionales para examinar la especificidad de las interacciones de los mencionados agentes con las metaloproteínas y determinar que iones divalentes están implicados en el efecto de los agentes quelantes.

Si un agente quelante interacciona específicamente con un ión metálico de una metaloenzima, la inhibición puede prevenirse ocupando previamente el sitio complejante del agente con un átomo metálico. Por otra parte, una vez que se ha formado el complejo enzima-inhibidor, un exceso crítico de iones metálicos podría revertir la inhibición al compe-



Número de fracción

FIGURA 34.- Unión de $^{65}\text{Zn}^{2+}$ a $\text{F}_1\text{-ATPase}$ nativa (O—O) y a su forma libre de zinc (●—●) y comparación de la actividad ATPásica dependiente de Ca^{2+} de estas proteínas. Soluciones ($1,09 \times 10^{-6}$ M) de enzima nativa y libre de zinc fueron incubadas a temperatura ambiente durante 8 h en tampón Tris-HCl 30 mM (pH 7,5) conteniendo $1,0 \times 10^{-3}$ M Zn^{2+} y trazas de $^{65}\text{Zn}^{2+}$ (200.000 cpm). Estas soluciones se liliaron posteriormente por columnas de Sephadex G-25 para separar el $^{65}\text{Zn}^{2+}$ unido a la proteína, midiéndose la radiactividad de las fracciones recogidas (150 μl). La flecha indica el volumen de exclusión de la columna. En el recuadro superior se comparan las actividades ATPásicas de: A, BF_1 nativo; B, BF_1 libre de zinc; C, BF_1 reconstituido con Zn^{2+} .

tir con la metaloenzima por el inhibidor unido a su átomo metálico. Ambos tipos de experiencias han sido utilizadas ampliamente para interpretar el significado de datos de inhibición por agentes quelantes obtenidos con un gran número de sistemas (374-376), constituyendo dos pruebas clásicas y, a su vez, efectivas en la exploración del papel funcional de los iones metálicos en las metaloenzimas (un amplio tratamiento de estos aspectos se ofrece en (377)).

Los experimentos de reversión en los que los cationes divalentes se incuban con una F_1 -ATPasa modificada, debido a su interacción previa con los agentes quelantes, se llevaron a cabo empleando Zincon y EDTA. La Tabla XXXIII resume los resultados obtenidos. La inhibición producida por EDTA era total y específicamente revertida por la adición de Zn^{2+} . Por su parte, la inhibición por Zincon era parcialmente revertida por Zn^{2+} . La adición de Ca^{2+} se mostró indiferente o ligeramente activa, mientras que los iones divalentes restantes mostraban un efecto inhibitorio adicional, a excepción de Mn^{2+} , que ejercía una cierta reversión de la inhibición producida por EDTA o Zincon, si bien en una menor extensión que el Zn^{2+} . La adición de iones Hg^{2+} provoca resultados cuantitativamente distintos según el tipo de experimento realizado (compárense las columnas relativas a Zincon y EDTA en la Tabla XXXIII).

El efecto del Zincon era prevenido únicamente por zinc, cuando la concentración de éste era algo superior a la del agente quelante. Sin embargo, esto no acontece con el efecto del EDTA. La Tabla XXXIV ilustra el efecto de diversos cationes divalentes sobre la prevención de la inhibición producida por EDTA (10 mM) sobre la actividad ATPásica dependiente de Ca^{2+} de dos tipos de F_1 -ATPasa de *M. lysodeikticus*: uno de ellos con actividad enzimática normal y otro poseyendo una escasa actividad. Como puede apreciarse, los cationes Ca^{2+} , Ni^{2+} y Co^{2+} no protegen en ningún caso el efecto de

TABLA XXXIII

REVERSION POR IONES METALICOS DE LA INHIBICION POR EDTA Y ZINCON DE LA F_1 -ATPasa DE MICROCOCCLUS LYSO-DEIKTICUS.

Muestras de enzima ($3,9 \times 10^{-7}$ - $2,7 \times 10^{-7}$ M proteína) de actividad ATPásica normal y baja (véase texto) fueron incubadas durante toda la noche en presencia de 1×10^{-2} M EDTA en 0,1 ml de volumen final de 1 M Tris-HCl (pH 7,5) o con 2×10^{-3} M Zincon en 30 mM Tris-HCl (pH 7,5) durante 7 h a temperatura ambiente. A continuación se añadieron iones metálicos diferentes en una concentración final de 10 mM (experimentos con EDTA) o de 3×10^{-3} M (experimentos con Zincon). Después de 2 h a temperatura ambiente, la actividad ATPásica se determinó según se ha descrito en Materiales y Métodos, expresándose como porcentaje de inhibición con respecto a ensayos control, incubados bajo idénticas condiciones pero sin la adición de ningún compuesto. Siempre que es posible los resultados se expresan como valores medios \pm desviaciones estándar con el número de análisis realizados y los valores máximo y mínimo obtenidos entre paréntesis.

Ion metálico añadido	Inhibición de la actividad ATPásica por		
	EDTA sobre enzima de Actividad normal	Zincon sobre enzima de Actividad baja	Zincon sobre enzima de Actividad normal
	%	%	%
Ninguno	44,1 \pm 5,4(3;50;36,9)	53,7	33,8
Hg ²⁺	56,9	63,1	96,3
Mn ²⁺	46,0	35,7	25,3
Mg ²⁺	62,0	69,0	37,2
Co ²⁺	62,8	71,4	40,2
^a Fe ²⁺	--	88,1	--
Zn ²⁺	6,4 \pm 2,4(3;9;3;3,4)	4,8	12,8
Ca ²⁺	40,5 \pm 1,7(3;42;6;38,5)	54,8	29,1
Ni ²⁺	51,8	55,2	69,3
Cu ²⁺	--	54,8	56,4

^a El ión ferroso se oxidaba a Fe³⁺ durante los experimentos.

TABLA XXXIV
PREVENCIÓN POR IONES METÁLICOS DIVALENTES DE LA
INHIBICIÓN POR EDTA DE F_1 -ATPasa DE MICROCOCCUS -
LYSODEIKTICUS.

Muestras de enzima (2×10^{-7} M proteína) de diferente actividad ATPásica: normal (4,2-5,8 $\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg}$) o baja (1,9-2,0 $\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg}$), fueron incubadas con 1×10^{-2} M EDTA y 1×10^{-2} M de cada uno de los iones metálicos divalentes descritos en la parte inferior en Tris-HCl 1 M (pH 7,5) durante 14 h a temperatura ambiente. Las actividades enzimáticas residuales se ensayaron según se indicó en Materiales y Métodos, expresándose como porcentaje de inhibición con respecto a ensayos control, incubados bajo idénticas condiciones pero sin añadir ningún compuesto. Siempre que es posible los resultados se expresan como valores medios \pm desviaciones estándar con el número de análisis realizados y los valores máximo y mínimo obtenidos entre paréntesis. El signo + en las columnas de diferencia indica un incremento en la inhibición, mientras que el signo - indica una disminución en la inhibición o activación.

Ion metálico añadido	Inhibición de la actividad ATPásica			
	Enzima con act. normal	Enzima con act. baja		
	%	Diferencia (Me^{2+} -Ninguno)	%	Diferencia (Me^{2+} -Ninguno)
Ninguno	43,8 \pm 4(4;48;37,6)	0	60,3	0
Hg ²⁺	83,1	+39,3	100	+39,7
Mn ²⁺	---	---	-2,98	-63,3
Mg ²⁺	34,7	-9,1	47,8	-12,5
Co ²⁺	47,7	+3,9	65,7	+5,4
Zn ²⁺	-5,6	-49,4	3,0	-57,3
Ca ²⁺	46 \pm 3(2;49,7;42,3)	+2,2	62,7	+2,4
Ni ²⁺	49,1	+5,3	71,6	+11,3
Cd ²⁺	25,9	-17,9	32,8	-27,5

EDTA; Mg^{2+} y Cd^{2+} muestran un ligero efecto de prevención, mientras que Zn^{2+} y Mn^{2+} resultaban ser los más eficaces en la protección de la actividad enzimática. También es de destacar el efecto de los iones Hg^{2+} , aumentando la inhibición de la actividad ATPásica, - probablemente por desplazamiento del ión metálico nativo de la enzima.

Por otra parte, merece atención el distinto comportamiento de diversos iones metálicos divalentes, tales como, Mg^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} y Hg^{2+} , en los experimentos de "reversión" y "prevención" - (compárense Tablas XXXIII y XXXIV) y probablemente reflejen los profundos cambios y/o modificaciones inducidas en la molécula de F_1 -ATPasa por los agentes quelantes, y en particular por EDTA (véase apartado 3.8.).

3.7.5. Distinta funcionalidad de los iones metálicos divalentes.

De lo expuesto hasta el momento parece razonable concluir que existen, al menos, dos tipos de cationes divalentes implicados en la manifestación de la actividad enzimática de la F_1 -ATPasa de M. lyso-delkicus. Uno de ellos representaría un componente intrínseco de la - proteína, fuertemente unido a la misma, y que ha sido identificado como Zn^{2+} . El otro, se uniría a la proteína con una afinidad muy inferior, directamente o formando complejo con ATP, y actuaría como activador. De los experimentos aquí descritos se deduce que este papel sería -- desempeñado por los iones Ca^{2+} , confirmando de este modo suposiciones previas (152,328). Ambos cationes divalentes así como sus funciones no parecen ser intercambiables como se infiere de los experimentos descritos anteriormente y de los ilustrados en la figura 55, -- que muestra la actividad ATPásica de la F_1 -ATPasa purificada en -- función de la concentración de los iones Zn^{2+} y Ca^{2+} presentes en - en el ensayo de actividad enzimática (véase Materiales y Métodos). -

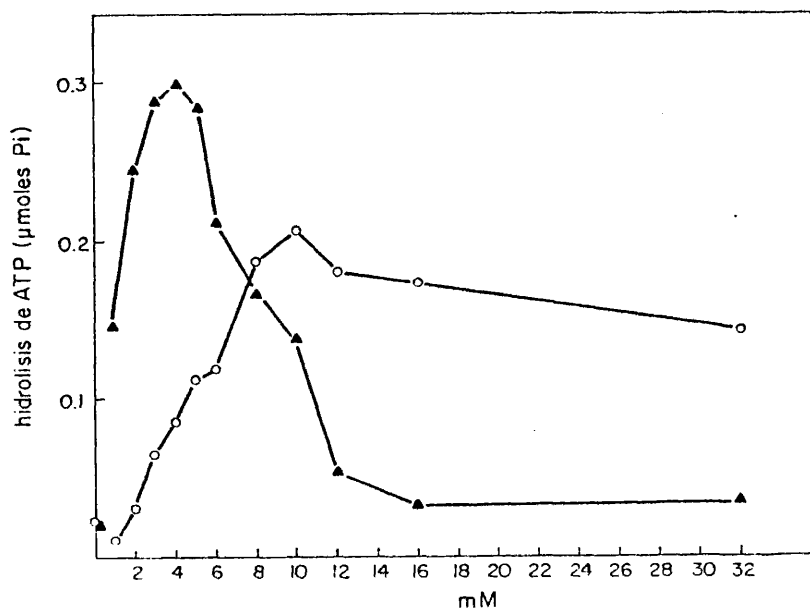


FIGURA 55.- Efecto de Zn^{2+} (▲—▲) y Ca^{2+} (○—○) como activadores de la actividad ATPásica del factor BF_1 de *M. lysodeik-ticus*. Este efecto se examinó en los experimentos de actividad enzimática (véase Materiales y Métodos) variando la concentración de iones Ca^{2+} o sustituyendo estos iones por Zn^{2+} en las concentraciones indicadas en el eje de abscisas. La concentración de ATP se mantuvo constante (8 mM) y el pH del ensayo se mantiene a 6,9 para evitar variaciones artefactuales inducidas por los iones Zn^{2+} .

La presencia de ión Zn^{2+} activa la enzima cuando éste se añade a baja concentración, mientras que a concentración elevada actúa como inhibidor. Los iones Ca^{2+} muestran un efecto distinto respecto a la concentración.

3.7.6. Efecto de cationes divalentes sobre la actividad enzimática.

El resto de los iones metálicos pueden desempeñar papeles similares a los del Zn^{2+} o Ca^{2+} , o comportarse independientemente, según las propias características de cada uno. De este modo, se examinó el efecto de distintos cationes divalentes añadidos externamente a la F_1 -ATPasa (véase Tabla XXXV). La actividad enzimática fué inhibida en orden decreciente por Hg^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} . Por el contrario, Zn^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} no mostraban efecto alguno sobre la actividad en las concentraciones empleadas. En estas experiencias debe de tenerse en consideración que el tampón Tris utilizado puede formar complejos con los iones metálicos (375). Por ende, las aparentes discrepancias en el efecto producido por los diferentes iones metálicos dependiendo de la fuerza iónica del tampón (compárense las dos columnas de la Tabla XXXV), puede atribuirse a la competición existente entre el anión del tampón y la enzima por el catión añadido (375, 378 y Discusión). La efectividad de la mayoría de los cationes divalentes inhibidores de la F_1 -ATPasa, por ejemplo, Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} y Hg^{2+} , parece afectarse por este hecho. Sin embargo, en el caso de los iones Mg^{2+} este efecto es menos evidente. El empleo de tampón Tris-HCl 1 M (pH 7,5) se requiere para mantener un pH constante de $7,4 \pm 0,1$ en presencia de elevadas concentraciones (hasta 10 mM) de cationes.

3.7.7. Influencia de diversos cationes sobre las propiedades ópticas

TABLA XXXV
 INHIBICION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA F₁-ATP
 ASIA DE MICROCOCCUS LYSCOSEIKTICUS POR INCUBACION
 CON IONES METALICOS.

Muestras de enzima ($2,7 \times 10^{-7}$ A1) se incubaron con distintas con-
 centraciones de iones metálicos en Tris-HCl 30 mM (pH 7,5) o en
 Tris-HCl 1 M (pH 7,5), durante 72 h a temperatura ambiente. Pos-
 teriormente se midieron las actividades ATPásicas residuales depe-
 dientes de Ca^{2+} según se describió en Materiales y Métodos.

Ion metálico añadido	Concentración mM	Actividad ATPásica en	
		Tris-HCl 30 mM %	Tris-HCl 1 M %
Hg ²⁺	0,1	54,3	—
"	1,0	2,2	70,9
"	1,5	0	—
"	10,0	—	43,7
Mn ²⁺	0,1	97,9	—
"	1,0	73,8	97,5
"	3,2	0	—
"	10,0	—	31,2
Mg ²⁺	0,1	93,4	—
"	1,0	50,0	68,4
"	2,4	53,4	—
"	10,0	—	43,9
Co ²⁺	0,1	94,8	—
"	1,0	35,6	65,8
"	2,2	34,9	—
"	10,0	—	49,1
Zn ²⁺	0,1	99,7	—
"	1,0	96,9	92,4
"	1,5	97,7	—
"	10,0	—	110,8
Fe ²⁺	0,1	31,9	—
"	1,0	11,6	65,9
"	10,0	—	39,9
Cd ²⁺	0,1	33,9	—
"	1,0	64,4	98,7
Ca ²⁺	0,1	90,5	—
"	1,0	78,1	84,7
"	1,5	90,7	—
"	5,0	83,7	—
"	10,0	—	25,1
Ba ²⁺	0,1	90,5	—
"	1,0	98,8	98,6
Ni ²⁺	0,1	79,8	—
"	1,0	91,6	73,4
"	10,0	—	54,0
Cu ²⁺	0,1	92,0	—
"	1,0	96,9	92,3

• El ión ferroso se oxidaba a Fe³⁺ durante los experimentos.

de la molécula de F_1 -ATPasa estudiadas por espectroscopia de fluorescencia.

Una especial atención ha sido puesta en el efecto de la presencia de Hg^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} y Zn^{2+} a una concentración de 1 mM sobre las propiedades ópticas de la molécula de F_1 -ATPasa. Primeramente se intentó correlacionar las acciones producidas por estos iones sobre la actividad enzimática (véase apartado 3.7.6.) con posibles diferencias en el espectro de fluorescencia de la proteína. Sin embargo, no se producía ningún cambio notable en la forma del espectro cuando los cambios en la actividad tenían lugar; tan sólo la proteína incubada con Hg^{2+} mostraba un ligero hombro a 302 ± 1 nm correspondiente a tirosina.

No obstante, al aumentarse el tiempo de incubación de los cationes divalentes con la proteína se producían modificaciones muy notables en los espectros de emisión de la F_1 -ATPasa, llegándose al cabo de 30 días a la situación mostrada en la figura 56. El espectro de fluorescencia de la proteína nativa presenta dos máximos a 326 y 337 nm. La incubación con Hg^{2+} o Mg^{2+} provoca la aparición de un máximo a 307 nm y un hombro a unos 337 nm, si bien ambos espectros muestran claras diferencias entre sí (Figs. 56 B y 56 D). Por su parte, la presencia prolongada de Zn^{2+} provoca la aparición de dos máximos a 314 nm y 341 nm, ensanchando el espectro de emisión característico de la enzima nativa (Fig. 56 C). Solamente la presencia de Ca^{2+} mantiene las propiedades ópticas de la proteína original (Fig. 56 C). Incluso la presencia de Ca^{2+} reverte el espectro de fluorescencia modificado de una preparación envejecida de proteína al del estado nativo de la misma (Fig. 57).

Los cambios reseñados en los espectros de emisión de una preparación reciente de F_1 -ATPasa son coincidentes con aquellos producidos al incubar los cuatro cationes citados con una preparación enveje-

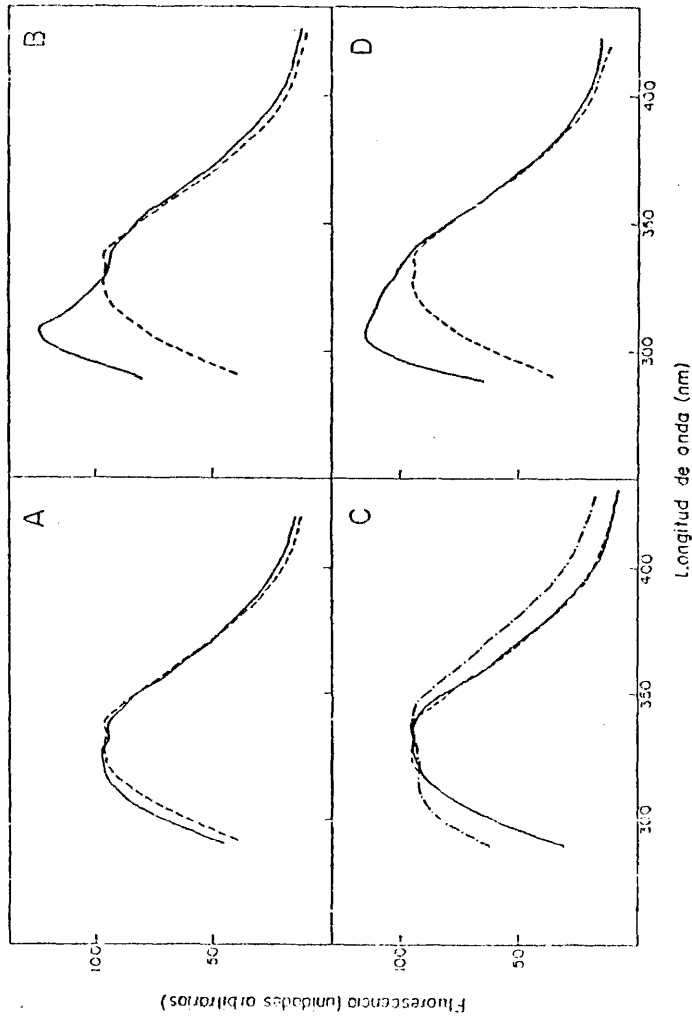


FIGURA 56.- Espectros de emisión (excitación a 276 nm) de: (A) F₁-ATPasa nativa (---) y después de una incubación de 30 días a 42°C (—); (B) F₁-ATPasa nativa (---) e incubada con Hg²⁺ 1 mM durante 30 días (—); (C) F₁-ATPasa nativa (---) e incubada con Zn²⁺ 1mM durante 30 días (-.-.-) o con Ca²⁺ 1 mM durante el mismo periodo de tiempo (—); (D) F₁-ATPasa nativa (---) e incubada con Mg²⁺ 1 mM durante 30 días (—) - (condiciones en Materiales y Métodos).

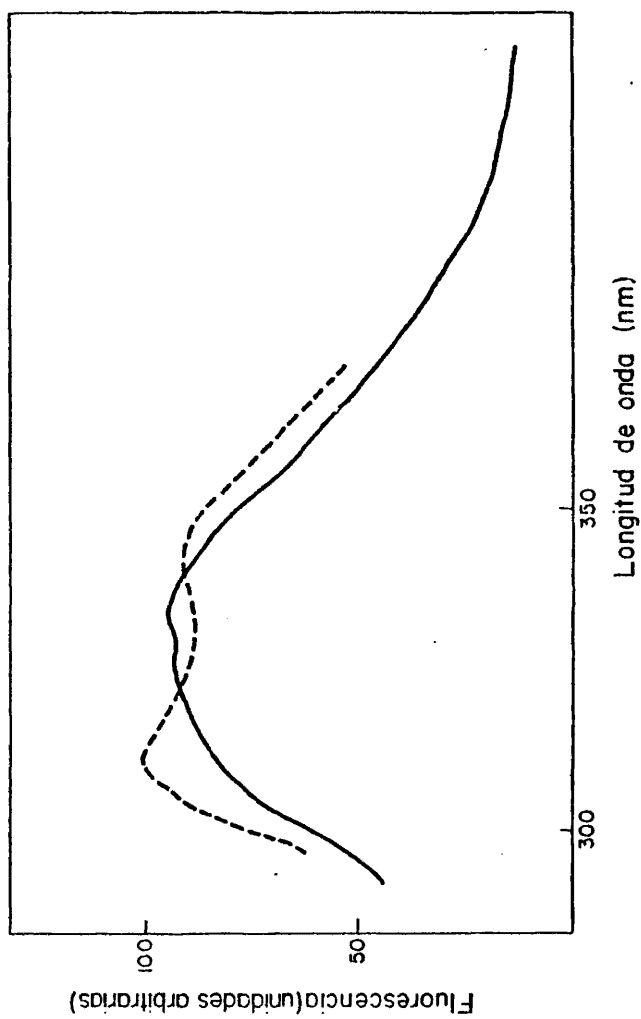


FIGURA 57.- Espectros de emisión (excitación a 276 nm) de una preparación antigua de $F_1-ATPase$ (---) y de la misma preparación incubada durante 3 días con Ca^{2+} 1 mM (—) (condiciones en Materiales y Métodos).

cida de enzima, si bien en este caso el tiempo de incubación requerido para obtener los espectros mostrados en la figura 56 resulta ser muy inferior (3 días).

De estas experiencias se puede concluir que los cambios - producidos en la actividad enzimática de la F_1 -ATPasa por parte de - los iones estudiados no se corresponden con cambios apreciables en - las formas de los espectros de fluorescencia de la proteína y que la - presencia de iones Ca^{2+} parece mantener una cierta conformación de la molécula de F_1 -ATPasa de M. lysodeikticus. Por otra parte debe - recordarse que esta enzima muestra una clara actividad catalítica de- pendiente de Ca^{2+} . Es tentador plantearse si esta conformación man- tenida por los iones Ca^{2+} no constituyera un requisito previo para la funcionalidad catalítica de la enzima.

113

3.8. EFECTO DEL AGENTE QUELANTE
EDTA SOBRE LA SUBESTRUCTURA
DEL FACTOR BF_1 .

3.8.1. Disociación de componentes polipeptídicos por tratamiento de F_1 -ATPasa con EDTA.

La acción del agente quelante EDTA sobre el factor de acoplamiento BF_1 de *M. lysodeikticus* produce cambios muy notables tanto en la subestructura de la enzima como en la expresión de su actividad ATPásica (véase apartado 3.7.), dependiendo de las concentraciones de EDTA empleadas así como de los tiempos de incubación. De esta manera se pueden distinguir cuatro fases en los efectos de este agente quelante:

a) La incubación de EDTA a baja concentración (1-4 mM) con distintas preparaciones de BF_1 de *M. lysodeikticus* da lugar a la obtención de moléculas de enzima cuyo patrón electroforético en presencia de SDS se encuentra constituido exclusivamente por las subunidades α , β , γ y δ , desapareciendo ciertos polipéptidos que con frecuencia se encuentran interaccionando de alguna forma con la enzima (véase Fig. 58) y que pudieramos clasificarlos como contaminantes o artefactos ya que su presencia no es constante y no parecen participar de ninguna función conocida de la enzima. Su disociación no afecta a las propiedades catalíticas ni a la reinserción de la enzima a la membrana. También, como puede apreciarse en la figura 58, el componente de movilidad relativa 1,00 se ve muy disminuido tras el tratamiento con EDTA. Por otra parte, las concentraciones empleadas en este caso de EDTA no afectan en modo alguno la actividad enzimática del factor BF_1 (véase Fig. 52). Estos resultados sugieren que ciertos cationes pudieran estar implicados en la asociación de cadenas polipeptídicas al núcleo de la molécula de F_1 -ATPasa, que estaría compuesto únicamente por cuatro tipos de subunidades, a saber, α , β , γ y δ .

b) La incubación de EDTA a concentraciones comprendidas entre 5 y 90 mM con la enzima no produce alteraciones en la subestructura

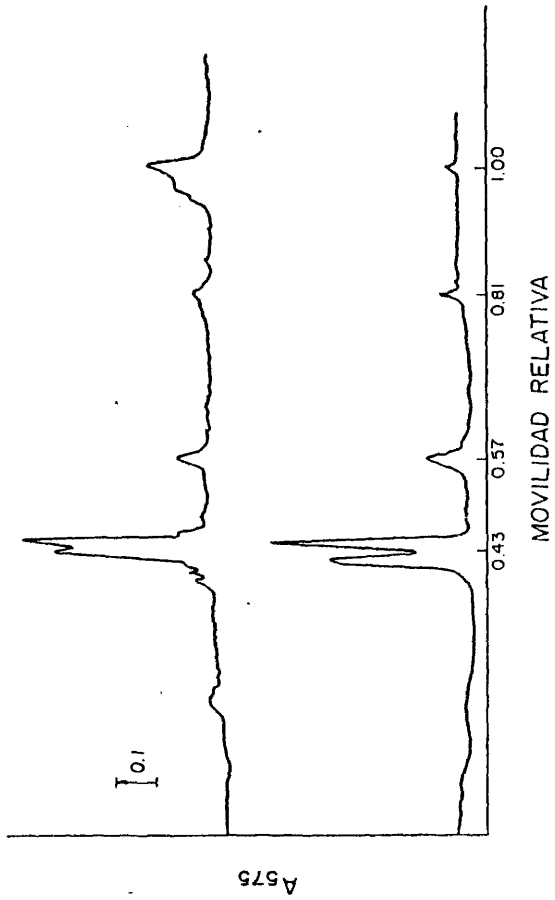


FIGURA 58.- Efecto del EDTA a bajas concentraciones sobre la molécula de F_1 -ATPasa de *M. lysodeikticus*. Parte superior: electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS 0,1% de F_1 -ATPasa sin tratar. Parte inferior: electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS 0,1% de 40 μ g de F_1 -ATPasa tratada con EDTA 2mM (condiciones en Materiales y Métodos).

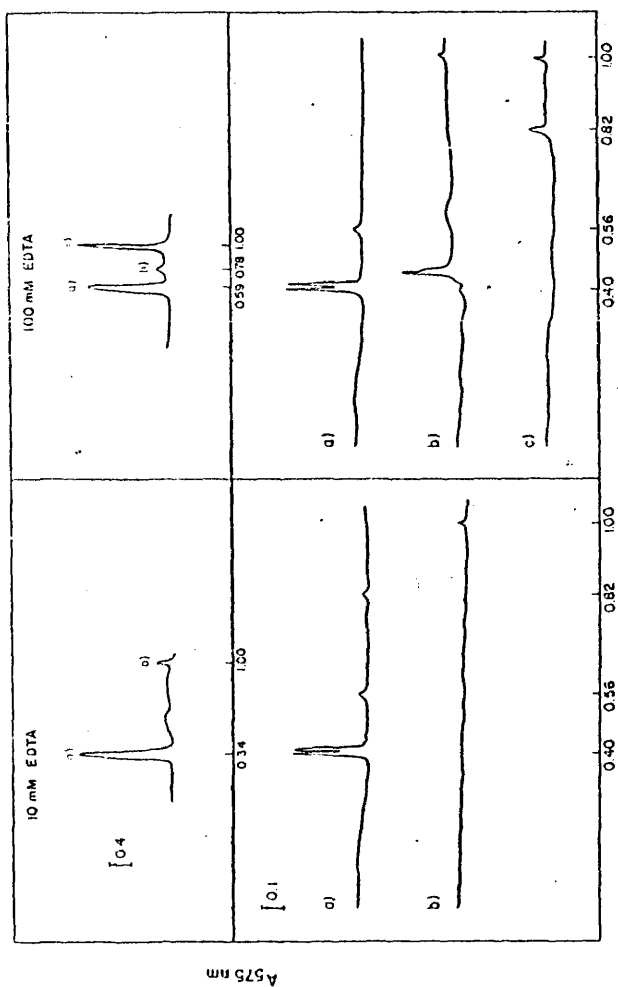
tura de la misma según el análisis por electroforesis analítica (Fig. 59). Se obtienen los mismos efectos descritos en el apartado anterior, si bien más acusados. En este caso, el componente de movilidad relativa 1,00 se elimina totalmente. En lo que se refiere a la actividad enzimática, - ésta es claramente inhibida (véase apartado 3.7.2.).

c) La incubación de EDTA a concentración elevada (0,1 M) con distintas preparaciones de factor BF_1 durante 12 horas a temperatura ambiente provoca la aparición de tres bandas distintas de proteína al realizar una electroforesis en gel de poliacrilamida al 7% en presencia de EDTA 2 mM (Fig. 59). Estas bandas muestran movilidades relativas de : 0,59; 0,78 y 1,00. Su aislamiento y posterior análisis por electroforesis analítica en gel de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS permite identificar los distintos componentes constituyentes de dichas bandas:

- Banda de movilidad relativa 0,59 - Esta banda que da cuenta del 66,60% de la proteína teñida en el gel no posee actividad enzimática (véase apartado 3.7.2.) y consta exclusivamente de las subunidades α , β y γ .

- Banda de movilidad relativa 0,78 - Esta banda se corresponde con el 3,42% de la proteína teñida, tampoco muestra actividad enzimática y se encuentra constituida por tan sólo un componente de unos 47.000 dalton de peso molecular, asimilable al componente denominado como β' de esta proteína F_1 -ATPasa (véase apartado 3.1.).

- Banda de movilidad relativa 1,00 - Esta banda que representa el 29,98% de la proteína teñida está constituida principalmente por un componente de unos 20.000 dalton de peso molecular, según electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS, que coincide con el peso molecular asignado a la subunidad δ de la molécula F_1 -ATPasa. También, como puede apreciarse en la figura 59, se obtienen componentes de pequeño peso molecular (menos de 12.000 dalton)



Movilidad relativa

FIGURA 59.- Efecto del EDTA sobre la subestructura de la molécula de F₁-ATPasa. Pac (la superior izquierda) Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7% en presencia de EDTA 2 mM de 30 µg de F₁-ATPasa tratada con EDTA 10 mM durante 12 h a temperatura ambiente. (Parte inferior izquierda) Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS 0,1% de las bandas de proteína a) y b) obtenidas por irratamiento de la molécula de F₁-ATPasa con EDTA 10 mM. (Parte superior derecha) Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7% en presencia de EDTA 2 mM de 30 µg de F₁-ATPasa tratada con EDTA 100 mM durante 12 h a temperatura ambiente. (Parte inferior derecha) Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS 0,1% de las bandas de proteína a), b) y c) obtenidas por irratamiento de la molécula de F₁-ATPasa con EDTA 100 mM (condiciones en Materiales y Métodos).

que migran con el frente en las condiciones experimentales empleadas.

d) La incubación de EDTA a concentraciones elevadas (0,1 M) con distintas preparaciones de enzima durante 24 horas a temperatura ambiente produce la aparición de tres bandas diferentes de proteína al analizarse mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 7% en presencia de EDTA 2mM (Fig. 60). Estas bandas muestran movilidades relativas de : 0,77; 0,92 y 1,00. El aislamiento de la primera y última banda y su posterior análisis conduce a los siguientes resultados (Fig. 60):

-Banda de movilidad relativa 0,77- Esta banda da cuenta del 68,46% de la proteína teñida en el gel, no posee actividad enzimática (véase apartado 3.7.2.) y su subestructura se limita a la presencia de las subunidades mayoritarias α y β .

- Banda de movilidad relativa 1,00 - Esta banda representa el 23,94% de la proteína teñida y su análisis por electroforesis en condiciones desnaturizantes muestra la presencia preponderante de los componentes minoritarios γ y δ de la molécula de F_1 -ATPasa.

Estos efectos disociantes del EDTA sobre la subestructura de F_1 -ATPasa pueden explicarse por tres causas posibles:

a) Presencia de determinados cationes que jueguen un papel crucial en el mantenimiento de la estructura molecular. La necesidad de utilizar concentraciones elevadas de EDTA sugeriría una difícil accesibilidad a dichos iones.

b) Unión de EDTA a la enzima de modo que las repulsiones provocadas por sus grupos carboxilos hicieran factible la disociación y separación de los polipéptidos constituyentes de la enzima mediante electroforesis. En este sentido, es de destacar la imposibilidad de poner de manifiesto la acción del EDTA sobre la subestructura de F_1 -ATPasa, al intentar separar los complejos formados al interaccionar el EDTA -

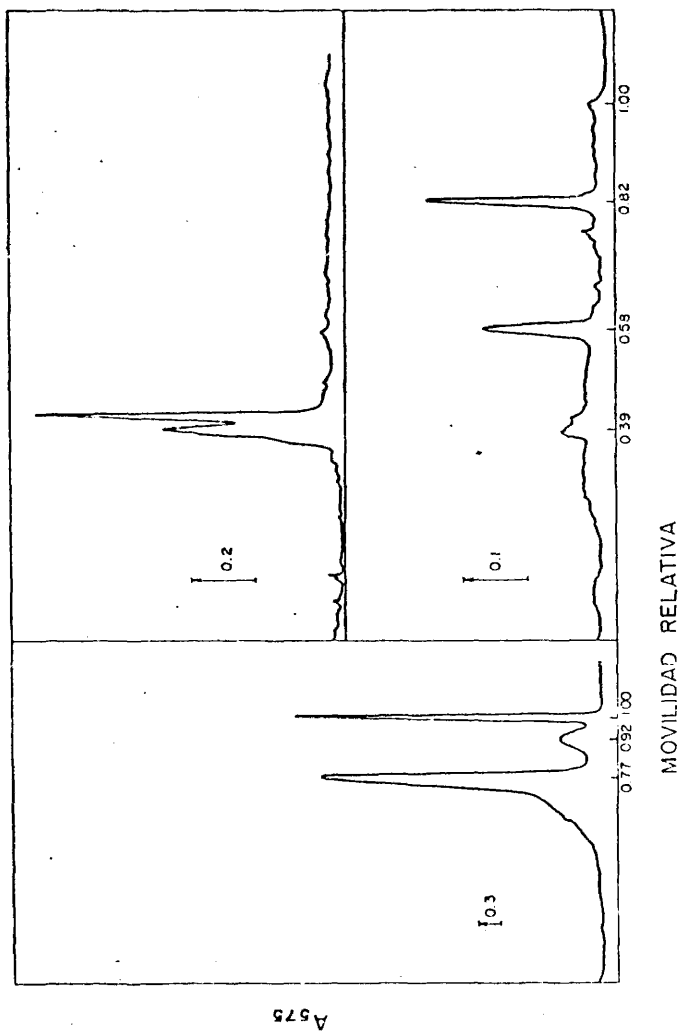


FIGURA 60.- Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7% en presencia de EDTA 2 mM de 30 μ g de F_1 -ATPasa tratada con EDTA 0,1M durante 24 h a temperatura ambiente (parte izquierda) y análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS 0,1% de las bandas de movilidad relativa 0,77 (parte superior derecha) y 1,00 (parte inferior derecha) obtenidas por dicho tratamiento (condiciones en Materiales y Métodos).

con la enzima, por filtración en columnas de Sephadex G-100. Por otra parte, se ha descrito que el factor F_1 aislado de mitocondrias de corazón de buey fija $[^{14}\text{C}]$ EDTA (265).

c) Acciones análogas a las provocadas por distintos agentes caotrópicos (cloruro de guanidina, urea) al emplear elevadas concentraciones de EDTA.

3.8.2. Efecto del EDTA sobre la tinción PAS de la enzima.

Como se mencionó en apartado 1.7.2. de la Introducción - este factor BF_1 de M. lysodeikticus constituye el único factor de acoplamiento en el que se ha descrito la presencia de hidratos de carbono. Sin embargo, según se muestra en la figura 61, la incubación de la enzima con EDTA 5mM produce una disminución apreciable en la tinción por reacción PAS de la proteína. Por otra parte, el tratamiento de F_1 -ATPasa con EDTA a mayores concentraciones (50mM) provoca que la banda de proteína no se tñe en absoluto con la reacción PAS. Estos resultados concordarían con los publicados por Nalin y col. (160) en el sentido de la no presencia de hidratos de carbono unidos covalentemente a la enzima. Parece probable aventurar que la porción sacarídica se encontraría unida al factor BF_1 , en un mayor o menor grado, mediante interacciones iónicas o por su presencia en los pequeños polipéptidos contaminantes que a menudo acompañan a las preparaciones de F_1 -ATPasa y que pueden ser separados fácilmente con tratamientos suaves de EDTA (véase apartado 3.8.1.)

3.8.3. Reinserción a membrana de una enzima defectiva en las subunidades minoritarias.

Como se ha descrito en apartado 3.8.1., un tratamiento prolongado de F_1 -ATPasa con EDTA 0,1 M permite el aislamiento de una

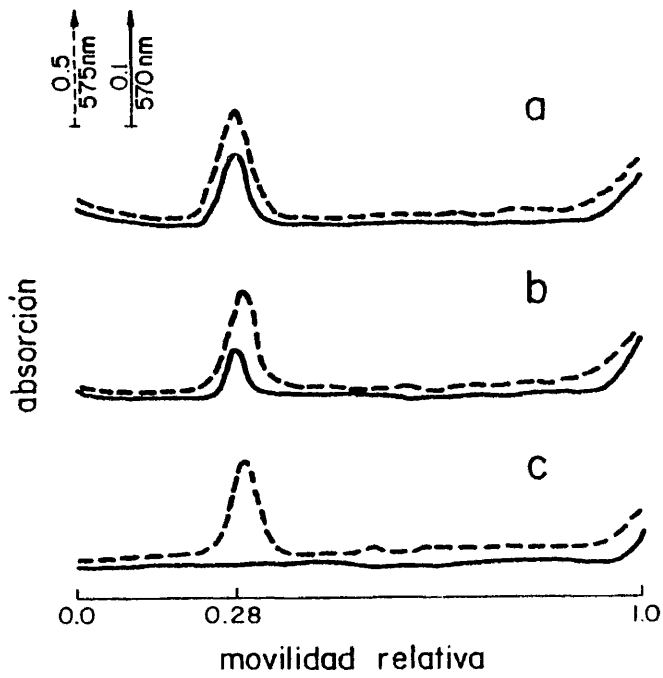


FIGURA 61.- Efecto de EDTA sobre la tinción de hidratos de carbono de la F_1 -ATPasa de *M. lysodeikticus*. Se incubó la enzima en distintas concentraciones de EDTA : (a) 0 mM EDTA; (b) 5 mM EDTA; (c) 50 mM EDTA. (—) tinción de hidratos de carbono; (----) tinción de proteína (condiciones en Materiales y Métodos).

enzima defectiva en las subunidades minoritarias. El estudio comparativo de la unión a membrana de esta proteína, constituida únicamente por las subunidades α y β , con respecto a la correspondiente a la enzima nativa y a las subunidades α y β aisladas, muestra la pérdida total de la capacidad de reinsertión a membrana de esta nueva forma de BF_1 en contraste con el elevado grado de reinsertión de las subunidades mayoritarias aisladas (véase Tabla XXXVI). La adición de las subunidades γ y δ aumenta apreciablemente el grado de reinsertión de la enzima F_1 -ATPasa defectiva (Tabla XXXVII), lo que corrobora el papel asignado a las subunidades minoritarias en esta función (véase apartado 3.6.) y proporciona nuevos datos sobre la distribución topográfica de esta enzima (véase Discusión).

Estos resultados sugieren que las interacciones responsables de la reinsertión a membrana de cada una de las subunidades mayoritarias aisladas mantienen la estructura del complejo ($\alpha + \beta$). Ya que ha sido demostrada la presencia de dominios hidrofóbicos en las superficies de estas subunidades (339), resultaría bastante factible que dichas interacciones sean principalmente hidrofóbicas.

TABLA XXXVI

REINSECIÓN A MEMBRANA DEL COMPLEJO ($\alpha + \beta$) COMPARADA CON LA CORRESPONDIENTE A SUS SUBUNIDADES COMPONENTES.

La reinsención se obtenía incubando las distintas preparaciones con membranas desprovistas de F_1 -ATPasa durante 15 min a 37°C y 5 min a temperatura ambiente en presencia o ausencia de iones Mg^{2+} .

Preparación ^a	% Reinsención	
	- Mg^{2+}	+ Mg^{2+} b
($\alpha + \beta$)	7,15	8,05
α	20,93	43,07
β	17,29	34,89
F_1 -ATPasa	18,50	70,65

^a Las subunidades α y β fueron obtenidas por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de urea. El complejo ($\alpha + \beta$) se aisló por tratamiento del factor BF_1 con EDTA.

^b Hace referencia al grado de reinsención obtenido en presencia de Mg^{2+} 20mM.

TABLA XXXVII

INFLUENCIA DE LAS SUBUNIDADES MINORITARIAS DEL FACTOR BF₁ DE
M. LYSODEIKTICUS SOBRE LA REINSECCION DEL COMPLEJO (α + β) A MEMBRA
 NAS.

La reinserción se obtenía incubando las distintas combinaciones con membranas despro-
 vistas de F₁-ATPasa durante 15 min a 37°C y 5 min a temperatura ambiente en presencia de -
 Mg²⁺ 20mM.

Adición de subunidades ^a	% Reinserción
Ninguna	8,05
γ	9,72
δ	10,01
γ + δ	19,23

^a Las subunidades γ y δ fueron aisladas por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia
 de SDS.

325

3.9. FIJACION DE FOSFATO
A F_1 -ATPasa.

3.9.1. Medida de fijación de Pi.

El método utilizado para el estudio de la unión de fosfato a la enzima se basa en el aislamiento del complejo enzima-ligando excluido de una columna de Sephadex (véase Materiales y Métodos) (272).

Los resultados de un experimento típico de fijación de Pi se muestran en la figura 62. La validez de los cálculos de razones molares de fijación, obtenidos por este método, puede ser cuestionada sobre la base de una disociación parcial de Pi unido a la proteína durante el paso de filtración en gel.

3.9.2. Fijación en función de la concentración de fosfato.

La cantidad de fosfato unido a la enzima como una función -- de la concentración de Na_2HPO_4 , determinada en experimentos de filtración en gel, se muestra en la figura 63. La afinidad del factor F_1 por el fosfato bajo las condiciones experimentales utilizadas se obtuvo a partir de una representación de Scatchard (379) de los datos representados en la gráfica de la figura 63. La extrapolación de estos datos indica la presencia de un único sitio de fijación por molécula de enzima con una constante de disociación de $185 \mu\text{M}$ (véase Fig. 64), valor algo superior al descrito en F_1 -ATPasa mitocondrial de corazón de buey ($K_D = 80 \mu\text{M}$) (265) y en F_1 -ATPasa de E.coli ($K_D = 120 \mu\text{M}$) (380), los dos únicos sistemas en los que se ha estudiado la fijación de Pi hasta el presente.

El hecho de que la unión de fosfato al factor F_1 de M.lyso-deikticus no requiera la presencia de cationes divalentes (véase Fig. 63) refleja una notable diferencia con los dos sistemas homólogos de mitocondria y E.coli en los que la adición de iones Mg^{2+} u otro tipo de ión divalente constituía un requerimiento esencial para la fijación de fosfato -- (265,380).

También es de destacar el que una incubación prolongada --

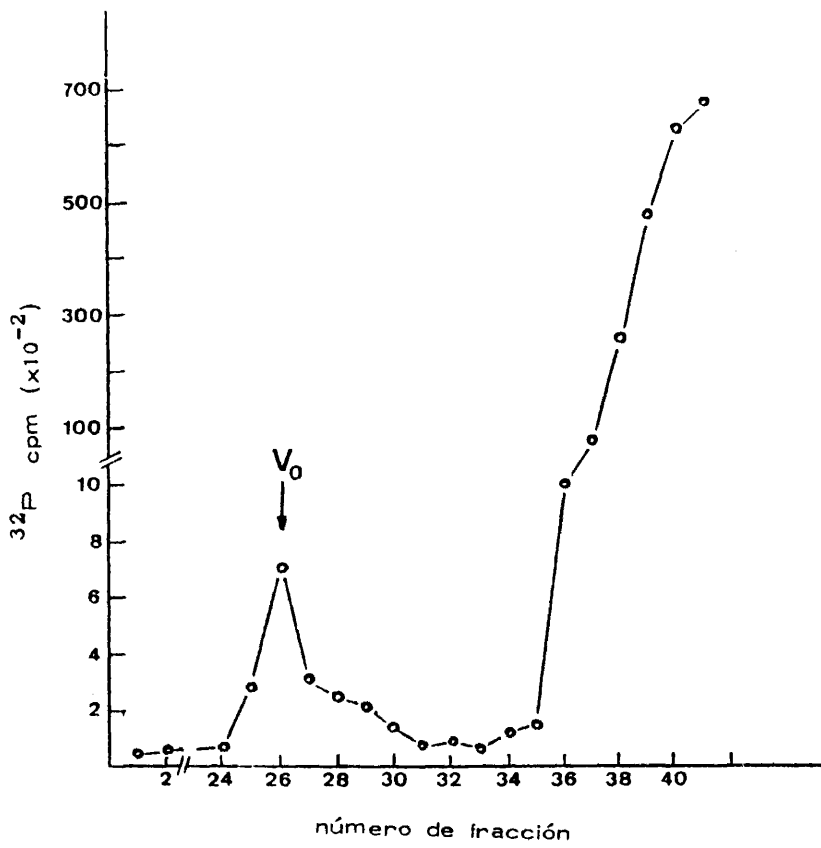


FIGURA 62.- Separación de P_i unido a la enzima del exceso de $^{32}\text{P}_i$ libre en un experimento típico de fijación de P_i al factor BF_1 de *M. lysodeikticus*. Condiciones en Materiales y Métodos.

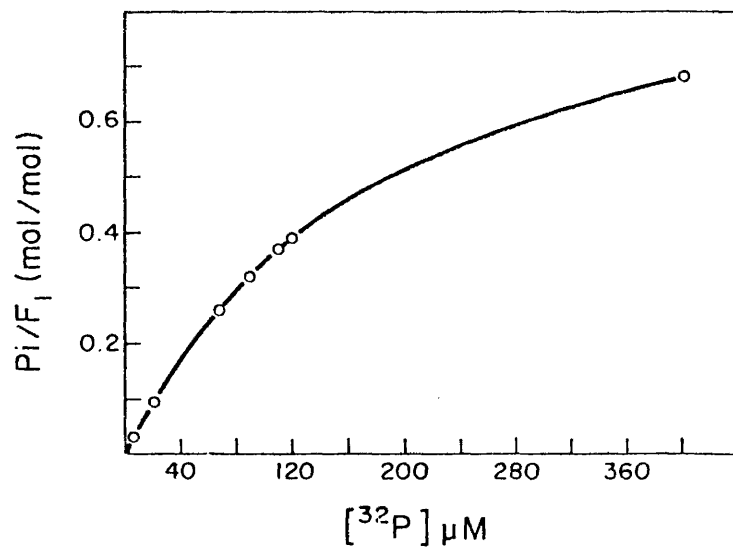


FIGURA 63.- Fijación de Pi a F₁-ATPasa de M. lysodeikticus en función de la concentración de Pi añadido (condiciones en Materiales y Métodos).

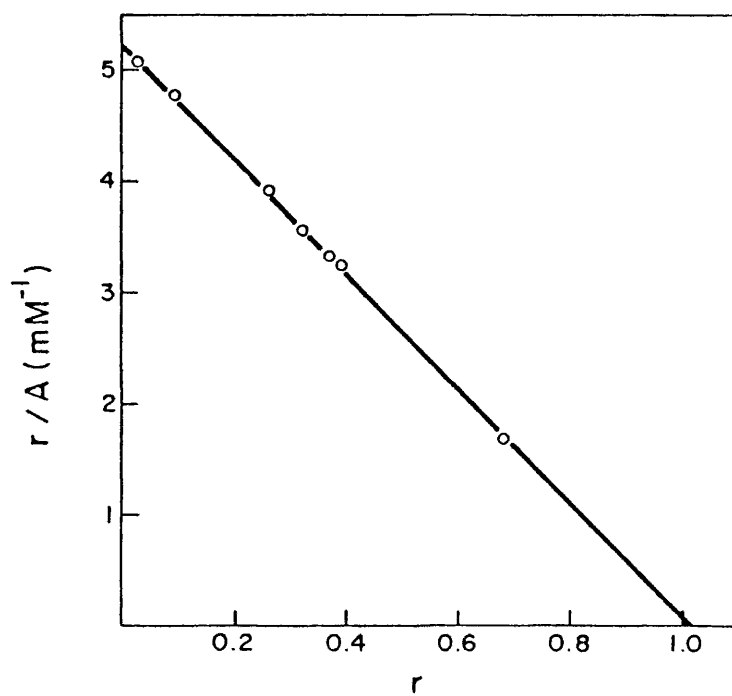


FIGURA 64.- Gráfica de Scatchard para la fijación de P_i a la F_1 -ATPasa de *M. lysodeikticus* (véase texto).

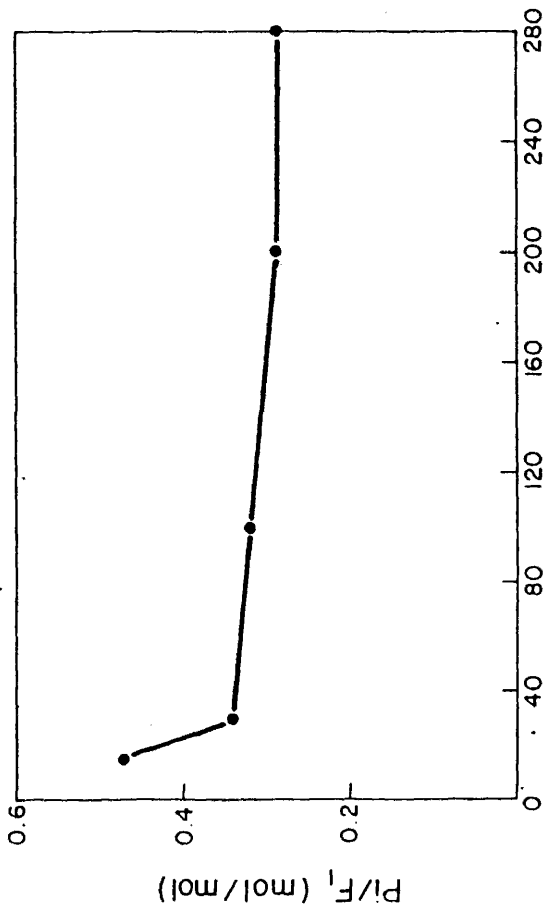
(24 horas) de la enzima con fosfato no aumentaba la cantidad de ligando fijado al cabo de 30 minutos de incubación.

Por otra parte la incubación del factor BF_1 de M. lysodeikticus en presencia de concentraciones elevadas de Na_2HPO_4 (4 mM) da origen a la aparición de un segundo sitio de fijación de fosfato a la enzima (1,79 mol Pi/mol enzima), lo que concuerda con la existencia de más de un sitio de unión en los factores F_1 de mitocondrias y E. coli (266,380). La presencia de este nuevo sitio se ponía de manifiesto por la acción de determinados agentes, tales como, Mn^{2+} , SO_4^{2-} o -- aurovertina, en F_1 -ATPasa mitocondrial (266) y por prolongados tiempos de incubación en F_1 -ATPasa de E. coli (380).

3.9.3. Efecto de la fuerza iónica, pH y temperatura.

La fijación de fosfato al factor BF_1 es afectada por una variedad de condiciones experimentales. El aumento de la fuerza iónica del tampón provoca una ligera reducción en la fijación (Fig. 65). La variación de pH produce efectos más drásticos (véase Fig. 66). En las condiciones experimentales empleadas, la máxima fijación tiene lugar a pH 8,0; disminuyendo a valores de pH inferiores y superiores. La disminución de la fijación de ligando a pH ácidos puede relacionarse con la inestabilidad de la enzima a estos valores de pH (164). Estos resultados están en clara contradicción con los descritos para la fijación de Pi en F_1 -ATPasa mitocondrial de corazón de buey (265).

La Tabla XXXVIII resume los resultados de fijación obtenidos al incubar F_1 -ATPasa ($6,43 \times 10^{-4}$ mM) en presencia de Pi (60 μ M) durante 30 min a temperaturas de 4°C, 23°C y 37°C. El hecho de que la fijación se incrementa al descender la temperatura no se corresponde con la mayor activación enzimática producida al preincubar el factor BF_1 a 37°C (véase apartado 3.4.2.).



Concentración Tris-HCl (mM)

FIGURA 65.- Efecto de la fuerza iónica en la fijación de Pi a F₁ - ATPasa de *M. lysodeikticus*. Las mezclas de reacción contenían 0,20 mg/ml de enzima y 90 μM Pi (3 x 10⁵ cpm de ³²Pi) en 100 μl de tampón Tris-HCl (pH 7,5) a concentraciones de 16 a 280 mM. - Tras una incubación de 30 min a 23°C, el Pi fijado se separó mediante filtración en gel del exceso de Pi libre (véase Materiales y Métodos).

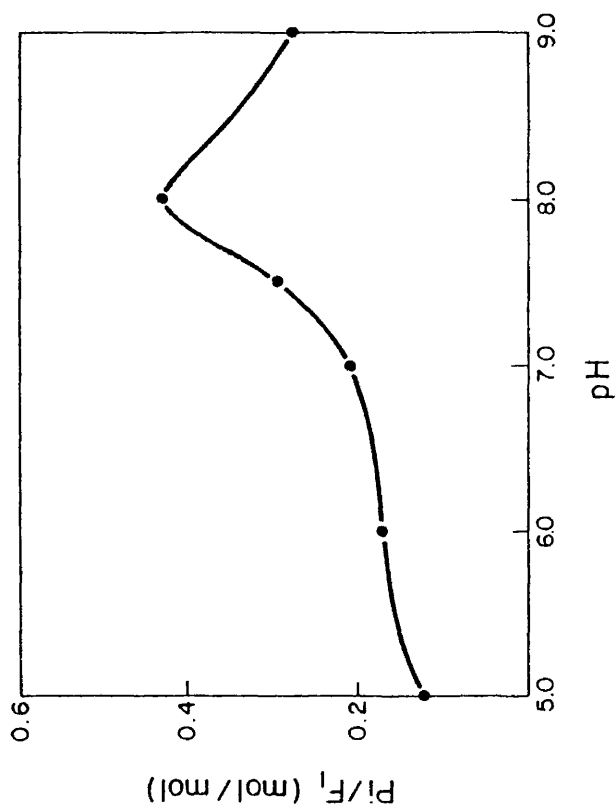


FIGURA 66.- Fijación de P_i a F_1 -ATPasa de M. lysodeikticus en función del pH. Las mezclas de reacción contenían 0,20 mg/ml de enzima y 80 μ M P_i (3×10^5 cpm de $^{32}P_i$) en 100 μ l de tampón Tris-acetato 30 mM a valores de pH de 5,0 a 9,0. Tras una incubación de 30 min a 23°C, el P_i no fijado se separó mediante filtración en gel (véase Materiales y Métodos).

TABLA XXXVIII

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA SOBRE LA FIJACION DE
Pi A F₁-ATPasa de M. LYSODEIKTICUS

Las mezclas de reacción contenían 0,20 mg/ml de enzima y 60 μ M -
Pi (3×10^5 cpm de 32 Pi) en 100 μ l de tampón Tris-HCl 30 mM (pH 7,5),
incubándose a continuación durante 30 min. a las temperaturas abajo in-
dicadas. La separación de Pi no fijado se realizó mediante filtración en
gel (Véase Materiales y Métodos).

<u>Temperatura</u>	<u>Pi/ F₁-ATPasa (mol/mol)</u>
42C	0,418
232C	0,220
372C	0,175

3.9.4. Influencia de nucleotidos de adenina, cationes divalentes y EDTA.

Los resultados ilustrados en la figura 67 muestran que el agente quelante EDTA reduce el grado de fijación de Pi al factor BF_1 . Esta inhibición se inicia a concentraciones de EDTA inferiores a las requeridas para afectar a la actividad enzimática de la enzima (véase Figs. 52 y 67). Esta acción del EDTA parece ser semejante a la ya descrita sobre el factor F_1 mitocondrial (265), en el que no se observaba virtualmente ninguna fijación de Pi a la enzima al emplear concentraciones del agente quelante superiores a 2 mM.

Los nucleotidos de adenina muestran un comportamiento desigual en cuanto a la fijación de Pi al factor BF_1 ; mientras que ATP y su análogo, AMP-PNP, se comportan como inhibidores de la unión, ADP, añadido en concentraciones similares, no muestra ningún efecto (véase Tabla XXXIX).

Los cationes divalentes Ca^{2+} y Mg^{2+} (este último, inhibidor de la actividad enzimática dependiente de Ca^{2+}) también presentan efectos diferentes sobre la fijación de Pi a la enzima, estimulando el -- primero e inhibiendo el segundo (Tabla XXXIX).

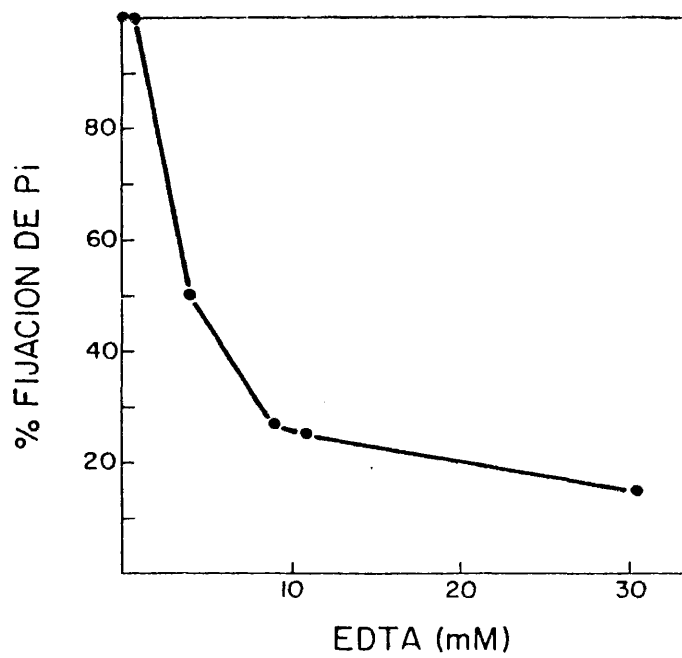


FIGURA 67.- Inhibición de la fijación de Pi a F_1 -ATPasa de M. lysodeikticus por EDTA. La mezcla de reacción contenía 0,20 mg/ml de enzima, 60 μ M Pi (3×10^5 cpm de 32 Pi) y EDTA en las concentraciones especificadas en un volumen final de 100 μ l de tampón - Tris-HCl 30 mM (pH 7,5). Tras una incubación de 30 min a 23°C, el Pi no fijado se separó mediante filtración en gel (véase Materiales y Métodos).

TABLA XXXIX

EFFECTO DE VARIOS AGENTES SOBRE LA FIJACION DE P_i Y SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA F_1F_0 -ATPasa DE MICROCOCCUS LYSEDEIKTICUS

Las mezclas de reacción contenían 0,20 mg/ml de enzima, 60 μ M P_i (3×10^5 cpm de $^{32}P_i$) y los agentes indicados en un volumen final de 100 μ l de tampón Tris-ClH 30 mM (pH 7,5). Tras una incubación de 30 min a temperatura ambiente, la reparación del P_i fijado se realizó mediante fijación en gel (véase Materiales y Métodos).

Adiciones	[M]	P_i/F_1 -ATPasa (mol/mol)	% Fijación	Actividad enzimática ^a
Ninguna		0,225	100	
ATP	$9,50 \times 10^{-5}$	0,132	58,66	
ATP	$1,51 \times 10^{-3}$	0,053	23,55	
AMP-PNP	$7,94 \times 10^{-5}$	0,147	65,33	-
AMP-PNP	$1,17 \times 10^{-4}$	0,136	60,44	-
ADP	$1,2 \times 10^{-3}$	0,227	100,88	-
Ca ²⁺	$1,81 \times 10^{-4}$	0,273	121,33	
Ca ²⁺	$1,21 \times 10^{-3}$	0,383	170,22	
Mg ²⁺	$1,13 \times 10^{-3}$	0,177	78,66	-
Mg ²⁺	$6,77 \times 10^{-3}$	0,131	58,22	-

^aEl signo "+" indica estimulación, mientras que el signo "-" indica inhibición de la actividad ATPásica dependiente de Ca²⁺.

237

4. DISCUSSION

238

4.1. PROPIEDADES ESTRUCTURALES
DEL FACTOR BF_1 DE
M. LYSODEIKTICUS.

4.1.1. Componentes intrínsecos.

Una importante conclusión deducida del presente trabajo reside en la definición de la subestructura de este factor BF_1 purificado (384), constituida por cuatro tipos de subunidades: α (peso molecular = 55.000 ± 5.000 dalton), β (peso molecular = 52.000 ± 4.000 dalton), γ (peso molecular = 34.000 ± 2.000 dalton) y δ (peso molecular = 20.000 ± 700 dalton). Las diferentes propiedades inmunoquímicas (384, 385), de funcionalidad catalítica (384 y apartado 3.4.) y de reinsertión a membrana (386) ponen de manifiesto la individualidad y absoluta independencia de estos cuatro componentes esenciales de la molécula de F_1 -ATPasa purificada de M. lysodeikticus. Estudios biosintéticos llevados a cabo en esta proteína conducen a una conclusión similar (387). Estos resultados excluyen la posibilidad de que alguna de las subunidades provenga de una degradación proteolítica de otros componentes, como ha sido sugerido por Kozlov y Mikelsaar (87) para las subunidades minoritarias de F_1 mitocondrial.

No obstante, en la mayoría de las preparaciones de esta enzima se observa con bastante frecuencia la presencia de dos polipéptidos adicionales designados como β' (peso molecular = 45.000 ± 2.000) y componentes de movilidad relativa 1.0. Estos componentes no pueden considerarse como subunidades propias a consecuencia de su variabilidad y desigual estequiometría. El polipéptido β' puede provenir de una proteólisis de las subunidades mayoritarias, particularmente de α , ya que su presencia es más patente con preparaciones enzimáticas en las que la subunidad α se encuentra parcialmente degradada. Este punto de vista se ve apoyado por la aparición de un polipéptido de peso molecular similar al de β' por digestión con tripsina de F_1 -ATPasa nativa (323, 331, 384). En lo que respecta a los componentes de movilidad relativa 1.0 es interesante observar que la adición de EDTA a bajas concentraciones elimina dichos componentes de la molécula de F_1 -ATPasa

sin afectar en absoluto a sus propiedades. Este hecho indica que ciertas cadenas polipeptídicas contaminantes o relacionadas con cierta modificación de la proteína pueden unirse, en mayor o menor extensión, al factor BF_1 propiamente dicho mediante interacciones electrostáticas o mediadas por iones multivalentes.

La asociación del componente δ al resto de la molécula de F_1 -ATPasa parece ser dependiente de cationes divalentes, ya que puede disociarse fácilmente por tratamiento del factor BF_1 purificado con EDTA (384 y apartado 3.8.). En cualquier caso, su asociación con el resto de la enzima es particularmente débil (384), dependiendo en gran manera su presencia cuantitativa en la estructura cuaternaria de la enzima del método y condiciones de aislamiento y purificación de la misma. Esta labilidad en la interacción de la subunidad δ con el resto del factor BF_1 parece ser la causa de su ausencia en la descripción de la composición en subunidades de esta enzima en trabajos previos (321, 339). Estos resultados muestran ciertas analogías con los descritos por Abrams y col. (204) en *S. faecalis*, quienes encontraron que la purificación de la enzima F_1 -ATPasa por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia o ausencia de iones Mg^{2+} implicaba la obtención de una enzima conteniendo o no la subunidad δ .

Además, tratamientos prolongados de la molécula F_1 -ATPasa con EDTA provocan la disociación del componente γ , lo cual puede reflejar tres posibles acciones del agente quelante al añadirse en cantidades elevadas e incubarse durante largos períodos de tiempo: a) complejante de iones, b) formación de repulsiones electrostáticas y c) catrónica; tal y como se señaló en el apartado 3.8.. Estos hechos indican que el agente quelante EDTA se comporta en determinadas condiciones experimentales como un verdadero agente disociante de la enzima, prometiendo ser una excelente herramienta de trabajo en el aislamiento de las subunidades minoritarias. Por otra parte, la disociación

de un componente de igual talla molecular que β' por efecto de EDTA, podría ser una premonición de su acción sobre las subunidades mayoritarias. Este tema será abordado en un futuro próximo.

Los resultados descritos en este trabajo sobre la estructura cuaternaria de la F_1 -ATPasa de M. lysodeikticus parecen extender las analogías estructurales entre los diferentes factores, a la vez que ponen de manifiesto las débiles interacciones que mantienen unidos a los polipéptidos minoritarios γ y δ . En este sentido la gran diversidad de composiciones en subunidades detectadas en las distintas F_1 -ATPasas, particularmente en aquellas de origen bacteriano (véase Introducción), podría reflejar propiedades intrínsecas de cada enzima o, muy probablemente, un diferente grado de interacción entre los polipéptidos constituyentes en cada factor F_1 . Quizás, las mayores diferencias existentes entre las F_1 -ATPasas de distinta procedencia radiquen en el tipo y/o intensidad de las interacciones que mantienen sus respectivas estructuras cuaternarias. En este sentido el efecto disociante del EDTA sobre el factor BF_1 de M. lysodeikticus muestra ciertas semejanzas con la disociación del factor BF_1 de E. coli por frío en soluciones altamente salinas (142).

4.1.2. Latencia.

La enzima F_1 -ATPasa solubilizada de M. lysodeikticus posee una actividad hidrolítica basal sobre el ATP, que puede activarse por la acción de la tripsina (152). Por el contrario, la enzima purificada o la enzima solubilizada en presencia de urea (véase apartado 3.6.3.) no muestra esta propiedad.

La activación por tripsina de la actividad ATPásica en el factor F_1 , con independencia de su origen, parece relacionarse con la distocación o degradación de un péptido inhibitor de pequeño peso molecular que en determinados factores F_1 se identificaba con la subunidad

ξ de los mismos (véase Introducción). En el caso de F_1 -ATPasa de M. lysodeikticus, Carreira y col. (330), identificaron un componente de peso molecular aproximado de 25.000 dalton como el inhibidor natural de la enzima. Sin embargo, una preparación parcialmente purificada de este componente se mostró incapaz de inhibir, en diversas condiciones experimentales, la actividad ATPásica de la enzima purificada. Nuestros resultados, por lo tanto, aconsejan una reconsideración en la asignación de la responsabilidad de esta importante regulación de la actividad ATPásica, y permiten adelantar dos posibilidades: a) si se confirmase que el componente de peso molecular aproximado de 25 kilodalton fuese el inhibidor natural de la enzima, su interacción con el factor BF_1 requeriría unas condiciones experimentales diferentes de las realizadas en el presente trabajo; b) otra posibilidad, quizás más plausible, haría recaer la responsabilidad de la estimulación por tripsina sobre un componente de peso molecular máximo de unos 13.000 dalton, que migraría con el colorante marcador al realizar una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS y que se encontraría débilmente unido al factor BF_1 . Además, la hipotética participación de este último componente en la latencia de la actividad ATPásica no puede excluirse de los resultados descritos por Carreira y col. (330).

4.1.3. Microheterogeneidad y labilidad.

La microheterogeneidad de las preparaciones de F_1 -ATPasa ha sido observada en mitocondrias, cloroplastos, A. faecalis y M. lysodeikticus (163,164).

BF_1 de M. lysodeikticus además sufre una degradación en medio alcalino, no habiéndose detectado inicialmente ningún tipo de actividad proteolítica convencional (164). Estos hechos llevaron a especular con la posible existencia de enlaces éster o glucosídicos insertados en

tre las cadenas peptídicas (318). Sin embargo, recientemente se ha -
mostrado cierta evidencia sobre la presencia de proteasas asociadas a
las membranas de M. lysodeikticus (388), que podrían afectar a la mo-
lécula de F_1 -ATPasa. El hecho de que estas actividades proteolíticas
de membrana puedan solubilizarse en las mismas condiciones que la en-
zima F_1 -ATPasa y permanecer, más o menos intensamente, asociadas
con el factor BF_1 podría explicar la labilidad de ciertas preparaciones
de F_1 -ATPasa así como su microheterogeneidad. Otra posible explica-
ción, que se deduce de los resultados obtenidos en este trabajo, podría
residir en la fácil disociación de las subunidades minoritarias de la en-
zima, propiedad general de todos los factores F_1 estudiados, que daría
cuenta del aislamiento y purificación de preparaciones enzimáticas con-
stituidas por moléculas de F_1 -ATPasa con un desigual contenido en di-
chas subunidades.

En cuanto a las distintas cadenas polipeptídicas de este fac-
tor BF_1 , la subunidad β se muestra como el polipéptido más estable o
más protegido en la enzima (384). Por el contrario, la subunidad α
presenta una extremada labilidad, degradándose bajo ciertas condiciones
experimentales a los componentes denominados α' ó α'' por ruptura
de fragmentos peptídicos de 2.000 a 5.000 dalton (321, 331, 389). Es-
ta transformación molecular se presenta, en términos cuantitativos, de
una forma similar en preparaciones de enzima inactiva (321, 389) y -
por la acción de la tripsina en la activación (323) o, al menos, conse-
cuación (384) de la actividad ATPásica. Por lo tanto, parece lógico su-
poner que las modificaciones de las cadenas polipeptídicas α del factor
 BF_1 de M. lysodeikticus inducidas por tripsina o probablemente por pro-
teasas endógenas "in vivo", se deben a la ruptura de distintos fragmen-
tos de análogo peso molecular pero ubicados en diferentes regiones o -
dominios de la F_1 -ATPasa.

4.1.4. Estequiometría en subunidades.

La medida de la intensidad de banda teñida en gel de poliacrilamida (véase apartado 3.1.3.), así como los estudios de reinsertión (véase apartado 3.6.6.) y de reconstitución de las propiedades inmunoquímicas de la molécula de F_1 -ATPasa a partir de sus componentes purificados (385 y apartado 3.3.4.), sugieren una estequiometría en subunidades de $\alpha_3 \beta_3 \gamma_2 \delta_2$. Estudios realizados con los agentes entrecruzantes dimetil suberimidato y ditiobis succinimidil propionato sobre este factor BF_1 (365) conducen a una estequiometría similar. La débil asociación de las subunidades minoritarias y en particular de la subunidad δ al resto de la enzima, podría indicar a presencia de alguna copia más del componente δ por mol de enzima. Esta estequiometría conduce a un peso molecular aproximado de 425.000-445.000 dalton, perfectamente compatible con el peso molecular de 430.000 dalton determinado recientemente para este factor BF_1 por equilibrio de sedimentación por centrifugación a baja velocidad (390). Además, el valor de coeficiente de sedimentación ($13,6 \pm 0,2 S$) y del radio de la esfera equivalente ($7,5 \pm 0,2 nm$) (390), sustentan pesos moleculares superiores a 400.000 dalton.

4.1.5. Consideraciones sobre la presencia de hidratos de carbono.

Andreu y col. (155,156) han descrito la presencia de oligosacáridos en la molécula de F_1 -ATPasa de M. lysodeikticus y cloroplastos. Sin embargo, Nalin y col (160) no han podido detectar la naturaleza glucoproteica en los factores F_1 mitocondrial de cloroplasto y de E. coli, utilizando la tinción PAS después de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico, una vez eliminado escrupulosamente el detergente aniónico. Por otra parte, Verheijen (380) ha encontrado por cromatografía de gases un cierto porcentaje de azúcares en preparaciones F_1 de E. coli y cloroplastos, si bien la canti-

dad y naturaleza de los mismos era muy variable de preparación a preparación. Además, los resultados obtenidos por Verheijen sobre la preparación de CF_1 mostraban unas grandes diferencias con los publicados por Andreu y col. (véase Tabla XL). Esta gran variabilidad en el contenido de oligosacáridos condujo a Verheijen a concluir que estos factores no poseían hidratos de carbono unidos covalentemente a la enzima. No obstante, la polémica sobre este tema continúa, habiéndose descrito resultados distintos sobre el estudio del efecto de la concanavina A (Con A), lectina específica para residuos de glucosa o manosa, en diferentes F_1 -ATPasas. Mientras que no se observa efecto alguno o muy débil sobre el factor F_1 de E. coli (380) y de mitocondrias de corazón bovino (391), Satav y col. (391) han demostrado que esta lectina se une e inhibe la actividad enzimática del complejo de ATPasa y de la F_1 -ATPasa de mitocondrias de levadura, sugiriendo el carácter glucoprotéico de la enzima. La potente inhibición descrita por estos autores les hace sugerir que el sitio de fijación de Con A sobre F_1 debe localizarse en las proximidades del sitio catalítico o tener un importante efecto estructural sobre el mismo. En este sentido, es interesante mencionar que al menos un sitio de unión para Con A parece ubicarse en la subunidad α de la F_1 -ATPasa de mitocondrias de levadura (391). La posible naturaleza glucoprotéica de la F_1 -ATPasa de M. lysodeikticus también se favorece por experimentos de marcaje de la proteína "in vivo" por incorporación de $[^{14}C]$ azúcares (157).

El presente trabajo ofrece una explicación a estos hechos aparentemente contradictorios al sugerir que la presencia de oligosacáridos en el factor BF_1 de M. lysodeikticus se debe a una interacción iónica y/o mediada por iones multivalentes. La ausencia de hidratos de carbono unidos covalentemente a F_1 -ATPasa queda puesta de manifiesto al disociar la parte sacarídica por tratamientos con EDTA que no afectan a la estructura cuaternaria de la enzima. De este modo, la detección

TABLA XL
 COMPOSICION EN HIDRATOS DE CARBONO DE DIFERENTES PREPARACIONES DE F₁-ATPase

Monosacárido	Origen del factor F ₁					
	<i>M. lysodactylicus</i> forma A	<i>M. lysodactylicus</i> forma B	Cloroplastos de espinacas mol/mol F ₁	<i>E. coli</i> cepa 1100	<i>E. coli</i> K 12 (λ) preparación I	<i>E. coli</i> K 12 (λ) preparación II
Ramnosa	32		4			
Fucosa			5			
Ribosa	0-1	5	4	29		
Arabinosa	39		20			
Manosa	59	56		2	+	1,3
Galactosa	6		25	+	2	4
Glucosa	83	56	16	17	24	3
Glucosamina	6	5-8	3			18
Galactosamina			9			7
Referencia	(155)	(155)	(155) (380)	(380)	(380)	(380)

† Detectado en muy pequeñas cantidades.

descrita anteriormente de hidratos de carbono en las preparaciones de F_1 -ATPasa de *M. lysodeikticus* podría deberse a la presencia de cadenas oligosacarídicas asociadas a la enzima por interacciones iónicas específicas y/o mediadas por cationes multivalentes. En este contexto, es notoria la capacidad de interacción de los cationes divalentes con la proteína, posibilitando así posibles interacciones catión-azúcar. De confirmarse esta posibilidad, la función de la porción sacarídica podría estar dirigida hacia la regulación de interacciones específicas y/o al enmascaramiento de las cadenas polipeptídicas a la acción de proteasas (392). Sin embargo, no puede excluirse la posibilidad de que la presencia de azúcares en la molécula de F_1 -ATPasa sea debida a contaminantes asociados a la enzima o a artefactos introducidos durante el proceso de aislamiento y purificación. En este caso, interacciones, presumiblemente inespecíficas, se corresponderían con grandes variaciones en la composición cuantitativa y/o cualitativa de los hidratos de carbono detectados en diferentes preparaciones de BF_1 .

En cualquier caso, una variabilidad moderada o esencialmente cuantitativa en el contenido de azúcares de distintos factores F_1 , no puede considerarse por sí sola como una prueba en favor de una presencia inespecífica e irrelevante de hidratos de carbono, ya que variaciones apreciables también se han descrito en otro tipo de ligandos (nucleótidos de adenina, iones metálicos divalentes), para los que se intenta encontrar una posible función. Ulteriores estudios deben realizarse para aclarar todas estas interrogantes.

211

4.2. PROPIEDADES INMUNOQUIMICAS
DE LA ENZIMA.

4.2.1. Antisueros y actividad enzimática.

Los estudios inmunológicos realizados en el presente trabajo amplían los realizados previamente por Whiteside y Salton (336). Estos autores demostraron que los anticuerpos anti-(F_1 -ATPasa) inhibían completamente la actividad ATPásica de forma no competitiva, sugiriendo que el antisuero actuaba sobre sitios adyacentes al sitio catalítico e inducía cambios conformacionales. Esto puede explicar los resultados descritos en este trabajo, mostrando una baja eficiencia de los anticuerpos anti-subunidades para inhibir la actividad ATPásica de la enzima purificada, aunque el mayor efecto obtenido con el suero anti-(subunidad β) concuerda con el papel asignado a esta subunidad en las propiedades catalíticas de la enzima F_1 -ATPasa de *M. lysodeikticus* (384 y apartado 3.4.).

Por otra parte, la falta de reacción inmunológica de la subunidad δ aislada en presencia de SDS, en contraste con la obtenida en las subunidades α , β y γ aisladas en presencia de urea, muestra la influencia del método de aislamiento sobre las propiedades de una cierta cadena polipeptídica. Mientras que en presencia de urea se obtienen estructuras que pueden asimilarse a la estructura nativa del factor BF_1 (339), en presencia de SDS parece muy improbable que tal replegamiento tenga lugar. Así, los estudios llevados a cabo en los factores F_1 de *E. coli* (197) y cloroplastos (196), en los que los anticuerpos anti-(subunidad α) o combinaciones de anticuerpos anti-(subunidad α) y anticuerpos anti-(subunidad γ) se mostraban como los más eficaces en la inhibición de la actividad enzimática, deben considerarse con ciertas precauciones (153), debido a que los antisueros se prepararon frente a las diferentes subunidades aisladas en sistemas con dodecil sulfato sódico. Por su parte, Yoshida y col. (153) observaron, en estudios similares a los aquí descritos, que entre los distintos anticuerpos preparados frente a cada una de las cinco subunidades del factor TF_1 de la bacteria termófila PS3, aisladas en condiciones en las que la estructura secun-

daria de las mismas se asemejaba en gran medida a la correspondiente a la enzima nativa, tan sólo los anticuerpos anti-(subunidad α) y anti-(subunidad β) inhibían eficazmente la actividad ATPásica de esta enzima transdutora de energía.

Los resultados expuestos en el apartado 3.5. demuestran que las diferencias existentes entre las dos formas A y B de la proteína, tanto como inmunógenos o como antígenos (332,393), son independientes del estado físico de la enzima: soluble o asociada a membrana (393). Además, los experimentos allí descritos permiten dar una explicación molecular de estas diferencias. La subunidad α parece constituir un componente de gran importancia en la expresión de las propiedades antigénicas de la enzima F_1 -ATPasa de M. lysodeikticus. De esta manera, las diferencias inmunológicas entre ambas formas, A y B, de la proteína reflejan una distinta expresión de los determinantes antigénicos de las subunidades α como consecuencia de su grado de integridad molecular. Así, es probable postular que la subunidad α juegue un papel regulatorio en la expresión de las propiedades inmunológicas de la F_1 -ATPasa de M. lysodeikticus, como ya ha sido propuesto para la actividad enzimática (392). Sin embargo, esta observación pone de manifiesto la gran cautela que debe tenerse en la interpretación de los resultados obtenidos al aplicar técnicas inmunológicas al estudio del papel de las subunidades en la actividad enzimática. Además, el hecho de que los sueros empleados contengan "familias" de anticuerpos, cada una de ellas específica para una parte diferente de la molécula y capaz de provocar efectos distintos o incluso opuestos sobre la actividad enzimática (469), ofrece una complicación adicional al estudio de la relación estructura-función de la enzima por estas técnicas.

Por otra parte, los resultados descritos en este trabajo indican que la accesibilidad de la molécula de F_1 -ATPasa y de sus dos

subunidades mayoritarias, α y β , a sus respectivos anticuerpos - no se haya afectada cuando la enzima esta asociada a la membrana. De hecho, los resultados obtenidos apuntan en la dirección opuesta, observándose un aparente incremento en la accesibilidad y/o sensibilidad a los anticuerpos del factor BF_1 asociado a membrana, lo que podría explicarse por la diferente flexibilidad conformacional de la - proteína dependiendo del medio en que se encuentre.

4.2.2. Radioinmunoensayo y estructura molecular.

Dada la complejidad de los patrones de subunidades de los diferentes factores F_1 aislados de distintos orígenes: mitocondrias, cloroplastos y bacterias (55,62,67), se ha planteado si todos esos componentes se encuentran realmente en los factores F_1 "in vivo", o son artefactos producidos por los métodos de aislamiento o análisis. De este modo, se ha sugerido, como ya se mencionó en el apartado 4.1.1., que las subunidades minoritarias, γ y δ , procediesen de una ruptura proteolítica de una subunidad de peso molecular comparable al de α y β en el factor F_1 mitocondrial (87). Por otra parte, la existencia de microheterogeneidad en las preparaciones de esta enzima, así como el posible efecto de proteasas asociadas a membrana no permiten, a priori, despejar las dudas antes mencionadas.

Este trabajo ofrece una cierta evidencia sobre una composición intrínseca en subunidades de este factor BF_1 acorde con la expuesta en el apartado 4.1.1. En este sentido, la técnica del radioinmunoensayo se mostró como una excelente aproximación experimental al estudio de la identidad propia de tres subunidades (α , β y γ) de las cuatro descritas en el factor BF_1 purificado de M. lysodeikticus (384), como paso previo al conocimiento de las funciones específicas que pudieran ser atribuibles a cada una de ellas.

La aplicación del radioinmunoensayo a esta enzima ha per

mitido, a su vez, explorar el papel de las subunidades en las propiedades inmunoquímicas de la molécula de F_1 -ATPasa. Estos resultados (véase apartado 3.3.) indican que los componentes α , β y γ contribuyen a las propiedades antigénicas del factor BF_1 de M. lysodeikticus, pero a su vez, muestran la existencia de determinados antigénicos adicionales, probablemente conformacionales, originados del plegamiento y ensamblaje de las subunidades en la molécula de F_1 -ATPasa.

Intentos previos de reconstitución de las propiedades enzimáticas de este factor BF_1 a partir de sus subunidades aisladas no fueron culminados con éxito (143,339). Sin embargo, ha sido posible reconstituir parcialmente las propiedades inmunológicas de la molécula de F_1 -ATPasa de M. lysodeikticus (385 y apartado 3.3.4.), lográndose la máxima efectividad al añadir las subunidades α , β y γ en una relación molar de 3:3:2.

Estos resultados confirman también la individualidad y especificidad de las subunidades α , β y γ de este factor BF_1 (la subunidad δ no pudo examinarse por problemas de aislamiento, según se describe en el apartado 3.3.4.).

Por otra parte la técnica de radioinmunoensayo, utilizada en nuestro estudio, puede aplicarse -debido a su especificidad, sensibilidad y rapidez- en la comparación de posibles similitudes entre las diferentes F_1 -ATPasas y homologías entre las subunidades de un factor F_1 determinado. Además, dada la sensibilidad del método se podría detectar la concentración en que la molécula de F_1 -ATPasa y cualquiera de sus subunidades se encuentran en la membrana, lo que permitiría detectar cambios en la concentración de la enzima o de cualquiera de sus componentes en función de las condiciones de crecimiento del organismo. En este sentido, la aplicación del método a estudios de biosíntesis parece obvio.

Por otra parte estos resultados presentan a la técnica de radioinmunoensayo como una aproximación experimental de gran efectividad en el estudio a nivel molecular de las proteínas oligoméricas, así como en el estudio biosintético de las mismas.

4.3. SUBUNIDADES Y ACTIVIDAD
ATPásica.

4.3.1. Papel de las subunidades mayoritarias, α y β .

La aplicación combinada de la digestión proteolítica y de anticuerpos específicos ha permitido demostrar que la subunidad β es esencial para la actividad ATPásica del factor BF_1 de M. lysodeikticus, -- aunque esta subunidad requeriría una cierta proporción minoritaria del componente α , a saber una molécula de α por cada tres moléculas de β , para ser activa (384). Una conclusión similar se obtuvo en la F_1 -ATPasa de Micrococcus A.T.C.C. 398 (172). Deters y col. (198) han descrito que CF_1 poseía una cierta actividad ATPásica residual -- tras un tratamiento prolongado con tripsina, aunque únicamente las subunidades α y β permanecían en el complejo.

Esta participación de las dos subunidades mayoritarias en las propiedades catalíticas de la enzima parece ser una constante en todos los factores F_1 estudiados.

F_1 -ATPasas activas conteniendo únicamente estas dos subunidades han sido aisladas de B. megaterium (117), B. subtilis (119) y formas L de Proteus (114). Complejos similares del factor F_1 también se han obtenido, bajo determinadas condiciones experimentales, en E. coli (115, 200), M. lysodeikticus (134) y mitocondrias (87).

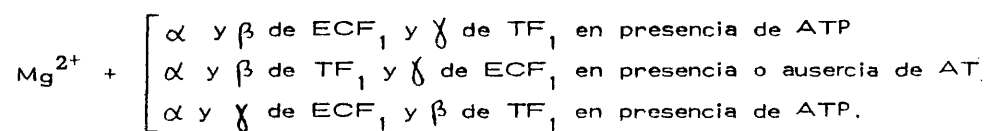
Estudios de reconstitución de la actividad enzimática a partir de distintas combinaciones de subunidades, llevados a cabo en las F_1 -ATPasas de la bacteria termófila PS₃ (176, 208) y de E. coli (199, 395), conducen a conclusiones similares. Las subunidades aisladas de estos factores de acoplamiento no poseen por sí mismas actividad ATPásica -- pero en ambos casos esta se podía reconstituir mediante mezclas apropiadas de subunidades. Sin embargo, existen algunas diferencias interesantes entre los experimentos de reconstitución de estos factores F_1 de bacteria termófila PS₃ (denominado también TF_1) y de E. coli (denominado también ECF_1) (176, 199, 208):

a) Mg^{2+} y ATP se requieren para la reconstitución de --

ECF₁, mientras que ATP no presenta ningún efecto sobre la reconstitución de TF₁. Es conocido el hecho de que el ATP estabiliza los factores F₁ mesófilos, sin embargo, no se requiere para la estabilización del factor TF₁ (131), aunque las conformaciones de las subunidades α y β de TF₁ son estabilizadas con ATP (396). En cualquier caso, debe señalarse que ECF₁ posee 3 moles de nucleótido fuertemente asociados que no pueden eliminarse durante el proceso de purificación (397), mientras que TF₁ no presenta nucleótidos fijados (131).

b) Una combinación de las subunidades α , β y γ de ECF₁ presenta una elevada actividad ATPásica. Una combinación de $\beta + \gamma$ o de $\alpha + \beta + \delta$ de TF₁ daba lugar a una apreciable actividad, pero una combinación similar de subunidades en ECF₁ se mostraba inactiva. Este resultado en ECF₁ estaría aparentemente en contradicción con el aislamiento de un complejo ($\alpha + \beta$) funcionalmente activo obtenido por tratamiento con tripsina (200). Sin embargo, experimentos llevados a cabo con antisueros específicos indicaron que un fragmento del componente γ permanecía en dicho complejo ($\alpha + \beta$) (198), por lo que podría pensarse en la necesidad de la presencia de la subunidad γ para un correcto ensamblaje de las subunidades α y β .

Además recientemente Futai y col. (399) han conseguido reconstituir "in vitro" la actividad ATPásica partiendo de las subunidades aisladas de los factores ECF₁ y TF₁. Las combinaciones que resultaron ser activas se resumen a continuación:



Estos autores también observaron que la subunidad β de TF₁ podía complementar el factor ECF₁ procedente de un mutante de *E. coli* defectivo en dicha subunidad. Estos resultados indican que las subunidades β y γ de ECF₁ y TF₁ desempeñan funciones similares ya que estas subunidades de ECF₁ podían substituirse por las corres-

dientes de TF_1 ; lo que da muestra de las analogías existentes entre las enzimas transductoras de energía, aunque estas procedan de organismos totalmente diferentes. En este sentido, la bacteria termófila - PS_3 , gram positiva, es capaz de crecer a $80^\circ C$ (131), mientras que *E. coli*, gram negativa, no puede desarrollarse a temperaturas superiores a los $45^\circ C$. Sin embargo, también se aprecian algunas diferencias. Así, la presencia de ATP se mostró como un requisito imprescindible para la reconstitución de la actividad ATPásica a partir de combinaciones de subunidades que incluyeran la subunidad α de ECF_1 , mientras que una mezcla de α y β de TF_1 y de γ de ECF_1 en ausencia de ATP mostraba una apreciable actividad. Estos resultados sugieren que la interacción de la subunidad α de ECF_1 con nucleótidos parece ser esencial para el ensamblaje con otras subunidades. A este respecto, se ha detectado un cambio conformacional en esta subunidad después de su interacción con ATP (400). La subunidad α de TF_1 o de ECF_1 no reconstituía la actividad ATPásica al añadirla a una combinación de subunidades β y γ de un origen diferente, sugiriéndose que las subunidades α son específicas para cada especie.

El tratamiento de cromatóforos de *R. rubrum* con LiCl 2 M en presencia de ATP conduce a la extracción de la subunidad β del factor BF_1 (182). Las vesículas tratadas con LiCl perdían las capacidades de síntesis o hidrólisis de ATP. De forma análoga la subunidad β purificada tampoco poseía actividad ATPásica, pero podía fijarse a las vesículas tratadas en presencia de Mg^{2+} y ATP. Las vesículas así reconstituídas recuperaban las actividades ATPásica y fotofosforilante.

Estudios de modificación química (198, 200, 237, 270, 290, 291, 401-403) y de marcaje de afinidad (404-409, 425) han puesto de manifiesto que únicamente las subunidades α y β poseen sitios de fijación de nucleótidos esenciales para la actividad catalítica de la enzima. Sin embargo los resultados obtenidos muestran diferencias en

tre los distintos factores F_1 , lo que en principio podría reflejar la gran diversidad existente en el número y afinidad de los sitios de fijación de nucleótido de las distintas F_1 -ATPasas. Así Wagenvoord y col. (406) encontraron dos sitios de fijación para 8-azido-ATP sobre la subunidad β del factor F_1 mitocondrial.

La unión de una única molécula de 8-azido-ATP sobre una de las subunidades β del factor BF_1 de Micrococcus luteus causaba una inhibición total de la enzima (405). Por el contrario, la mayor parte de este mismo análogo marcado radiactivamente se fijaba sobre la subunidad α de factor BF_1 de E.coli (70% de radiactividad en α y 30% en β) (404). El empleo de otro análogo, p-fluorsulfonilbenzoil-5-adenosina, inhibía de forma irreversible la F_1 -ATPasa mitocondrial, si bien esta inhibición era prevenida parcialmente por nucleótidos de adenina (410). Después de una inactivación del 90%, la subunidad α contenía 0,45 moles del análogo por mol, y la subunidad β , 0,88 moles. No obstante, el grado de inactivación de la actividad ATPásica se correspondía bastante bien con el número de moléculas de reactivo incorporadas en la subunidad β , sugiriéndose que el sitio catalítico se encontraba en dicha subunidad.

Todos estos resultados parecen indicar que la subunidad β alberga el sitio activo de la enzima, mientras que la subunidad α podría constituir un polipéptido regulador. En este sentido es interesante observar que el aislamiento de una forma de proteína constituida por tres copias de β y una de α con proporciones muy minoritarias de γ poseía una actividad específica 2,5 veces superior a la de una preparación normal de factor BF_1 de M.lysodeikticus (384). Por otra parte la subunidad α es capaz de unir ATP y ADP (411,418). Además, una interacción correcta entre las subunidades α y β parece ser esencial para la expresión de actividad enzimática. Por lo tanto, el papel desempeñado por la subunidad α parece estar íntimamente relacionado con la manifestación de la actividad ATPásica. Así, Kanazawa y col. (413) obtuvieron un factor ECF_1 carente de actividad ATPásica y defectivo en

subunidad α a partir de un mutante de E. coli. La adición de esta subunidad reconstituía la actividad enzimática.

Experimentos recientes han demostrado la existencia de cambios conformacionales en la subunidad α por acción de ATP (412), así como la influencia de la subunidad α sobre la conformación de la subunidad β (414). De este modo, y suponiendo que las propiedades observadas en el componente α aislado no se vieran drasticamente alteradas al incorporarse en la enzima F_1 -ATPasa se podría especular que la modificación de la subunidad α afectara a la proteína conduciendo a una activación o inhibición de factor F_1 . Estas modificaciones probablemente inducirían un cambio en la interacción entre las subunidades que se reflejaría en cambios conformacionales de la proteína (392). En este sentido, existe una amplia evidencia de cambios conformacionales en la enzima F_1 -ATPasa de M. lysodeikticus (164,321,323,415, apartado 3.7.7.) constituyéndose esta extraordinaria flexibilidad conformacional en una de las principales características de este factor de acoplamiento. Distintas conformaciones de la enzima pueden detectarse por cromatografía hidrofóbica (416), así como por resultado de la adición de distintos efectores, por ejemplo cationes divalentes y EDTA (apartados 3.7. y 3.8.). Este último, además, puede disociar las subunidades minoritarias del resto de la proteína (apartado 3.8.). Esta peculiar moldeabilidad de la enzima podría ser una consecuencia de su multifuncionalidad (417).

4.3.2. Interacciones entre las subunidades y comportamiento catalítico.

De lo anteriormente expuesto parece deducirse que la subunidad β contiene el sitio catalítico del factor F_1 , mientras que la subunidad α puede constituir un polipéptido regulador. Sin embar-

go, una interacción apropiada entre ambas subunidades aunque no necesariamente en una relación equimolecular, parece ser esencial para la expresión de la actividad enzimática. Quizás la subunidad γ , - aún en pequeña proporción, podría requerirse para configurar esta - estructura funcionalmente activa. Este posible papel de la subunidad γ proviene principalmente de estudios de reconstitución. No obstante, en experimentos de digestión proteolítica esta posibilidad no parece tan - evidente. Estos hechos podrían explicarse asumiendo que la forma - ción del núcleo ($\alpha + \beta$) a partir de las subunidades aisladas requiere la presencia de γ (experimentos de reconstitución), mientras que en los ensayos de digestión proteolítica dicho núcleo ya se haya pre formado.

Como puede apreciarse, se ha avanzado bastante en - la elucidación de las subunidades responsables de la actividad ATPásica en los distintos factores F_1 , observándose grandes analogías - entre los mismos. Pero ¿ cuál es el proceso a nivel molecular por el cual la enzima hidroliza el ATP? Esta es una interrogante que - todavía permanece por aclarar. Sin embargo el trabajo pionero de Ferguson y col. (270) ofrece ideas sugestivas a este respecto. Es - tos autores observaron que la modificación de una única subunidad β con NBD-Cl producía una pérdida total de la actividad del fac - tor F_1 mitocondrial. La presencia de tres o quizás dos subunidades β (véase Introducción), aparentemente homogéneas al purificarlas - (83,168,212), sugiere la posible existencia de asimetría en la mis - mas inducida por la fijación de ligandos. Así, la pérdida de activi - dad ATPásica podría explicarse en términos de interacciones esen - ciales entre subunidades, de modo que la modificación de un aminoá - cido esencial en una subunidad, imposibilitase por medio de un cam - bio conformacional (ó impidiendo un cambio conformacional necesá - rio) la manifestación de actividad en cualquier otra subunidad.

Además, se han descrito transiciones entre distintos estados estables en esta enzima F_1 -ATPasa, dependientes de la temperatura (419) y de distintos efectores (256,420,424), mostrando alguno de estos estados cooperatividad negativa (419). La posible existencia de sitios catalíticos alternativos (421,422) siguiendo un mecanismo similar al denominado "flip-flop" (423) constituye una hipótesis bastante atractiva y plausible para este sistema. Tal mecanismo permitiría un aprovechamiento gradual de pequeños "paquetes" de energía en la síntesis de ATP. De esta manera, el sistema diseñado para acoplar la oxidación al proceso de fosforilación operaría en una situación más próxima al equilibrio termodinámico, incrementándose la eficiencia del acoplamiento energético.

El presente trabajo también ha realizado una importante contribución al esclarecimiento a nivel molecular del proceso catalítico, demostrando la interacción, más o menos intensa de los iones metálicos con la enzima y poniendo de manifiesto su importante efecto catalítico y regulador (véase apartado 4.5.).

En cualquier caso, el comportamiento cinético de la enzima es difícil de abordar (véase Introducción) ya que en el medio de reacción siempre se encuentran tres parámetros: nucleótido libre, cationes libres y $ATP.Me^{2-}$, interaccionando cada uno de estos ligandos con la proteína y provocando distintos efectos todavía no totalmente conocidos.

252

4.4. UNION DE F_1 -ATPasa A
MEMBRANAS.

4.4.1. Requerimientos iónicos.

El estudio de la reinsertión "in vitro", añadiendo F_1 -ATPasa a membranas desprovistas de dicha enzima, ha puesto de manifiesto que la presencia de cationes divalentes es necesaria para la formación de complejos BF_1 -membrana estables (384). Estos requerimientos iónicos no parecen ser totalmente inespecíficos, es decir, su papel no parece limitarse a una simple compensación de cargas sobre la superficie de la membrana, ya que la adición de cationes divalentes diferentes provoca distintos grados de reinsertión de la proteína. El empleo de diferentes procedimientos para solubilizar la enzima, reinsertada en la membrana en presencia de distintos iones multivalentes, podría constituir un reflejo de una disposición diferente del factor BF_1 en la membrana, según el catión utilizado en la reinsertión. En este contexto, una interacción directa del ión correspondiente con la enzima parece obvia. Dentro de los distintos cationes ensayados, los iones Mg^{2+} son los únicos en conseguir una reasociación del factor BF_1 a la membrana de tal forma que las membranas así obtenidas comparten propiedades análogas con las membranas nativas, o dicho en otras palabras, los iones Mg^{2+} parecen inducir una fijación de la enzima a la membrana con significado fisiológico. Así, se requieren idénticos procesos para solubilizar la enzima en ambos tipos de membrana. De particular interés es la imposibilidad de extraer el factor BF_1 por acción de agentes quelantes (EDTA, EGTA) o por "choque osmótico" en presencia de pequeñas cantidades de catión divalente.

Por otra parte, un porcentaje pequeño de F_1 -ATPasa puede reinsertarse en la membrana sin necesidad de añadir Mg^{2+} , no afectándose por un tratamiento previo de la membrana con agentes quelantes. Este hecho podría deberse a la presencia de dominios hidrofóbicos sobre la superficie de la enzima (339,416). Es de destacar que este porcentaje de reinsertión en ausencia de iones multivalentes sea dependien

te del contenido en subunidad δ de la enzima (véase apartado 3.6.6.), aumentando al incrementarse la presencia de δ en la preparación enzimática, lo que aboga en favor de una participación de esta subunidad en este tipo de interacción.

No obstante, el requerimiento de cationes divalentes en la --reinserción de la molécula de F_1 -ATPasa a la membrana no explica el modo en que estos se ven implicados en la asociación "in vivo" de la --proteína con la membrana. En este sentido, pueden aventurarse tres --posibles funciones, no excluyentes entre sí, para estos cationes divalentes:

- a) Pueden actuar como puentes iónicos entre la enzima y la membrana.
- b) Pueden actuar como elementos compensatorios de cargas negativas localizadas en la superficie de la membrana, eliminando o disminuyendo posibles repulsiones electrostáticas entre la molécula de F_1 -ATPasa y la membrana.
- c) Pueden producir cambios conformacionales en la molécula de F_1 -ATPasa a fin de lograr una determinada conformación más favorable para su asociación con la membrana.

Los resultados descritos en este trabajo favorecen la primera y última alternativas, mientras que la segunda posibilidad no podría explicar por sí sola diversos hechos experimentales, tales como: especificidad por distintos cationes en la reinserción y asociación "fisiológica" de la enzima con la membrana en presencia únicamente de iones Mg^{2+} . La inducción de cambios conformacionales en la molécula de F_1 -ATPasa por adición de iones metálicos divalentes ha sido puesta de manifiesto en este trabajo (véase apartado 3.7.7.) aunque su relación con la constitución del complejo enzima-membrana permanece por dilucidar, así como el hipotético puente iónico entre el factor BF_1 y la membrana. Si este último punto se confirmase, los iones Mg^{2+} deberían in

teraccionar entre ciertas partes aniónicas de la molécula de F_1 -ATPasa y de la membrana, de tal forma que se obtuviese una disposición molecular de la enzima en la que los iones Mg^{2+} se encontrarían protegidos frente a la acción de los agentes quelantes, impidiendo de este modo la solubilización de la enzima por estos medios.

Estos resultados que demuestran la importancia de los iones metálicos divalentes, y en particular de los iones Mg^{2+} , en la unión del factor BF_1 a las membranas de *M. lysodeikticus*, concuerdan con los obtenidos por Abrams y col. (204,426) en *S. faecalis*, si bien estos autores no realizaron un estudio de la fijación del factor BF_1 en la membrana en función de distintos iones divalentes, sino que se limitaron a estudiar el papel del catión Mg^{2+} en la reconstitución "in vitro" del complejo BF_1 -membrana.

Por otra parte los estudios de reinsertión y solubilización llevados a cabo (véase apartado 3.6.), sugieren que la molécula de F_1 -ATPasa se encuentra unida a la membrana mediante dos tipos de interacciones: una interacción en la que participarían iones Mg^{2+} y otra que -- probablemente sería de tipo hidrofóbico. De este modo, el tratamiento de las membranas con tampón a baja fuerza iónica conduciría a la liberación de la enzima por la combinación de dos efectos, un debilitamiento de las interacciones hidrofóbicas y una lixiviación de los cationes multivalentes.

De esta manera una de las numerosas funciones de los iones Mg^{2+} "in vivo" sería mantener unida la enzima F_1 -ATPasa a la membrana.

4.4.2. Datos cuantitativos.

Los aspectos cuantitativos de la unión "in vitro", estudiados por adición de distintas cantidades de F_1 -ATPasa a una cantidad constante de membranas desprovistas de BF_1 , permitieron determinar que la enzima se reinserta a la membrana en presencia de iones Mg^{2+} siguiendo una -

curva de saturación, alcanzándose ésta a un valor aproximado de 100 μg de F_1 -ATPasa unida/mg de proteína de membrana. Este valor se correlacionaba perfectamente con estimaciones previas de la cantidad de F_1 -ATPasa presente en las membranas nativas de M. lysodeikticus (152). Estas características del sistema de re inserción indican que la membrana presenta un número bien definido de sitios receptores que son específicos para la enzima. Además, ya que el máximo grado de re inserción de la enzima restaura la actividad específica original de la membrana, puede concluirse que todos los sitios receptores se encuentran totalmente ocupados en las membranas nativas. Esto se confirmó por la incapacidad de reinsertar enzima adicional a las membranas nativas.

4.4.3. Papel de la subunidad δ .

La identificación del componente polipeptídico δ en el factor BF_1 de M. lysodeikticus fue decisiva para entender la unión de la enzima a la membrana (384). Tanto los estudios de digestión proteolítica como los de reconstitución "in vitro" del complejo BF_1 -membrana a partir de distintas formas de F_1 -ATPasa indican el papel de la subunidad δ en la re inserción de la enzima a la membrana. La Tabla XLI resume los grados de re inserción a membranas obtenidos con distintas preparaciones enzimáticas defectivas en alguna subunidad. Estos datos sugieren la participación esencial de la subunidad δ en la unión de la enzima a la membrana y, al mismo tiempo, indican la presencia de al menos dos copias de componente δ por mol de enzima.

Este papel asignado a la subunidad δ de este factor de acoplamiento se corresponde con una mayor hidrofobicidad relativa de dicho componente con respecto a las subunidades α , β y γ (véase Tabla XLII).

Experimentos recientes llevados a cabo en nuestro laboratorio

TABLA XLI

REINSECCION A MEMBRANA DE DISTINTAS PREPARACIONES DE F_1 -ATPasa DE M. LYSODEIKTICUS

Relación molar de subunidades de la enzima	% Reinserción ^e	
	-Mg ²⁺	+Mg ²⁺ ^d
$\alpha_3 \beta_3 \gamma \delta_2$ a	18,50	70,65
$\alpha_3 \beta_3 \gamma \delta$ a	9,5	43,8
$\alpha_3^1 \beta_3 \gamma \delta$ a	10,3	43,5
$\alpha_3 \beta_3 \gamma_{0.3}$ b	7,15	7,20
$\alpha_3 \beta_3$ c	7,15	8,05

^a Obtenida por el método normal de aislamiento y purificación de la enzima.

^b Obtenida por digestión proteolítica de la molécula de F_1 -ATPasa purificada.

^c Obtenida por tratamiento de la molécula de F_1 -ATPasa purificada con EDTA.

^d Hace referencia al grado de reinsertión obtenido en presencia de Mg^{2+} 20mM.

^e Porcentaje respecto del total de enzima presente.

TABLA XLII

COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LAS SUBUNIDADES α , β , γ Y δ DE DIFERENTES F₁-ATPasas

Aminoácidos	M. <u>Mlysoedelleicus</u> (mol/100 mol)				PS ₃				Cloroplasto				Mitocondria			
	α		δ		α		δ		α		δ		α		δ	
	α	β	γ	δ	α	β	γ	δ	α	β	γ	δ	α	β	γ	δ
Lys	3,58	2,98	4,06	2,99	4,14	4,14	6,14	4,25	3,73	3,96	6,91	5,39	6,35	5,23	8,58	3,27
His	1,96	1,59	2,03	2,63	1,45	2,40	2,53	0,53	0,56	0,99	0,30	1,90	1,19	1,74	1,65	1,31
Arg	7,43	5,27	5,46	6,59	5,59	5,88	6,14	8,51	5,78	5,94	5,71	2,99	5,36	4,14	5,28	2,61
Asp	9,43	11,55	9,35	9,06	9,11	8,93	10,47	7,98	7,09	8,71	10,81	10,18	8,33	7,62	9,91	7,34
Thr	5,57	7,78	5,41	5,50	4,97	4,79	6,50	2,66	6,72	7,33	6,61	5,39	4,96	5,88	5,61	6,54
Ser	7,03	6,63	9,46	7,57	4,35	3,27	3,97	4,79	6,16	5,94	5,40	10,18	7,34	5,23	8,58	6,54
Glu	13,66	12,12	11,17	10,95	13,25	14,38	14,44	15,96	15,30	11,48	12,01	13,77	11,51	12,64	9,57	14,38
Phe	2,76	3,13	4,12	4,56	4,97	5,01	4,69	3,19	3,17	5,15	4,50	2,39	3,57	5,23	5,94	3,92
Gly	10,32	10,09	11,91	11,80	9,73	9,59	4,69	6,91	9,02	9,70	6,01	13,17	11,31	10,02	5,94	6,54
Ala	9,61	8,66	10,69	11,76	9,70	8,28	8,66	11,17	10,82	8,51	10,51	8,38	9,92	10,46	10,56	17,65
Cys	-	-	-	-	0,21	0	0	0	0,37	0,59	1,80	0	0,59	0,22	0	0
Val	7,75	8,38	7,97	7,74	8,70	8,93	7,22	6,38	7,09	8,12	7,21	7,78	7,94	8,71	4,95	10,46
Mel	1,77	1,64	0,12	0	1,66	2,61	2,17	0,53	2,05	2,77	2,10	0,60	1,59	1,96	1,98	1,31
Ile	5,73	5,57	4,34	3,90	7,45	7,19	7,22	6,38	7,46	5,35	5,10	5,39	6,94	6,54	8,25	3,27
Leu	9,40	8,66	8,80	9,52	10,35	9,15	11,19	14,89	9,89	9,90	10,21	6,59	8,93	8,93	7,92	9,80
Tyr	1,15	1,94	2,81	2,26	2,28	1,96	1,08	2,13	3,36	2,38	2,10	2,99	1,79	2,40	3,30	0,65
Phe	2,61	3,63	3,31	3,16	3,11	3,49	2,89	3,72	2,42	3,17	2,70	2,99	2,38	3,05	2,97	3,92
Asp + Glu	1,79	2,44	1,78	1,64	2,00	1,88	1,68	1,80	2,22	1,85	1,17	2,35	1,54	1,82	1,19	3,09
Lys + Arg + His	48,86	48,02	45,94	45,29	42,86	43,79	50,19	44,68	45,34	44,35	47,75	49,70	45,04	42,48	48,18	42,49

El valor de cisteína en el caso de Mlysoedelleicus, no fué determinado. Sin embargo se conoce que el factor BF₁ de Mlysoedelleicus posee una cantidad muy escasa de este aminoácido (319).

Los datos referentes a F₁, CF₁ y TF₁ fueron tomados de las referencias (166), (54) y (153) respectivamente.

Las composiciones químicas de las subunidades minoritarias, γ y δ , de BF₁ de Mlysoedelleicus fueron realizadas en el presente trabajo sobre los correspondientes hidrolizados (HCl 6 N, 110°C durante 24 h), mientras que las correspondientes a las subunidades mayoritarias, α y β , fueron tomadas de (320).

apoyan esta conclusión. El tratamiento de las membranas nativas con tripsina no afecta a la subunidad δ de la enzima (Larraga, V. y Mimbrena, A., comunicación personal) indicando una cierta protección de la misma frente a la acción proteolítica por parte de la membrana.

Por otra parte, el hecho de que el complejo ($\alpha + \beta$) solo pueda reinsertarse en la membrana mediante la adición conjunta de las subunidades minoritarias, γ y δ , y no por la adición de cualquiera de ellas individualmente (apartado 3.8.) parece sugerir que la subunidad γ se requiera para la unión de la subunidad δ al resto de la proteína -- F_1 -ATPasa. En este sentido, Muñoz y col. (365) han demostrado la proximidad de ambas subunidades, γ y δ , en el factor BF_1 de M. lyso-deikticus mediante estudios con agentes entrecruzantes.

El papel de las subunidades minoritarias en la unión del factor F_1 a la membrana parece constituir una propiedad general de todos los sistemas estudiados (141,189,202-205,384). Sin embargo, este trabajo no apoya la idea de que la subunidad α o cualquiera de sus fragmentos juegue un papel en la reinsertión de la F_1 -ATPasa de M. lyso-deikticus a la membrana, confirmando de esta manera observaciones -- previas de Salton y Schor (134).

Estudios de reinsertión realizados en la enzima F_1 -ATPasa de E. coli indicaban que las subunidades δ y ϵ desempeñaban un papel crítico en la unión de la proteína a la membrana (207,395,428). Sin embargo se ha descrito que las subunidades α de algunos factores de acoplamiento también pueden jugar un papel en la unión de F_1 -ATPasa a la membrana. Abrams y col. (205,366,429) obtuvieron una digestión limitada del factor BF_1 de S. faecalis por tratamiento con quimotripsina. Esta preparación contenía las subunidades α modificadas, con un peso molecular, determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, aproximadamente 2.000 dalton inferior al correspondiente a una subunidad α normal. Esta enzima modificada (no se detectaron alteracio-

nes en las subunidades β , γ , δ y ϵ) poseía una actividad enzimática normal, pero era incapaz de unirse a membranas. Estos autores sugirieron la existencia de pequeños fragmentos de subunidad α , sensibles a quimotripsina, que sobresalían de la molécula de F_1 -ATPasa y se requerirían para su unión a la membrana, posiblemente a través de interacciones con sitios específicos. Tratamientos de F_1 -ATPasa de E.coli (115,427) y de Mycobacterium phlei (430) con tripsina provocaban modificaciones similares de las subunidades α y pérdida de la capacidad de reinserción a la membrana. Sin embargo, la degradación simultánea de las subunidades δ y ϵ de ECF_1 dificultaba la interpretación de los resultados. Recientemente Dunn y col. (431) han indicado en experimentos de reconstitución de la molécula de F_1 -ATPasa a partir de sus subunidades que enzimas reconstituidas conteniendo subunidades α modificadas por la acción de tripsina o quimotripsina, con la consiguiente pérdida de 15 ó 19 residuos respectivamente de la región amino terminal, se mostraban incapaces de unir subunidad δ . Este hecho proporciona una explicación de la pérdida de la capacidad de reinserción a membrana, ya que el papel de la subunidad δ en la unión de ECF_1 a membranas ha sido ampliamente documentado (207,395,432). En este sentido, Bragg y Hou (433) han demostrado la proximidad de las subunidades α y δ en ECF_1 mediante estudios con agentes entrecruzantes.

Todos estos resultados parecen generalizar el papel de la subunidad δ y de los iones Mg^{2+} en la unión "fisiológica" de la enzima F_1 -ATPasa a la membrana. Sin embargo, como ya ha sido comentado al comienzo de este apartado, la proteína puede reinsertarse en la membrana en diferentes formas, no todas con un significado fisiológico.

Sería muy interesante realizar un estudio de la unión de la enzima a membrana en los factores BF_1 de B.megaterium, B.subtilis y formas L de Proteus (114,118,119), constituidos únicamente por las subunidades α y β . Este estudio resultaría altamente rentable, ya que nos

daría una información muy valiosa sobre si la estructura de estas enzimas "In vivo" se corresponde con la descrita para las enzimas purificadas o constan de un mayor número de subunidades que se habrían disociado durante el proceso de aislamiento y purificación de la proteína debido a su débil interacción con el resto del factor de acoplamiento, como ocurre en BF_1 de M. lysodeikticus. Si esta última posibilidad fuese correcta, se ampliarían las analogías estructurales entre las enzimas transductoras procedentes de orígenes distintos.

4.4.4. Reinserción de las subunidades aisladas.

El estudio de la reinserción de las subunidades aisladas del factor BF_1 de M. lysodeikticus a la membrana presenta ciertos hechos notables. Las subunidades mayoritarias de la enzima, α y β , manifiestan una elevada capacidad de reinserción, aún en ausencia de iones multivalentes. Este hecho podría explicarse por la presencia de dominios hidrofóbicos en sus superficies (339). Sin embargo, al constituirse el complejo ($\alpha + \beta$) se pierde totalmente esta capacidad de reinserción, lo que podría indicar una contribución de los enlaces hidrofóbicos en el mantenimiento de la estructura del complejo. Una conclusión similar se obtuvo de los estudios de desnaturalización por pH en la F_1 -ATPasa de M. lysodeikticus (164).

La relativamente débil reinserción a membrana de la subunidad δ aislada en presencia de SDS puede atribuirse al método empleado en su aislamiento, como queda puesto de manifiesto en el caso del componente γ y en el apartado referente a las propiedades inmunológicas de la enzima (véase Resultados). En cualquier caso, la adición de subunidad δ incrementa, en todos los casos ensayados, el porcentaje de reinserción del resto de las subunidades de la enzima.

Todos estos resultados parecen indicar la existencia de sitios de fijación a membrana en las subunidades α , β y δ aisladas, de

los cuales sólo permanecerían funcionalmente activos los correspondientes a la subunidad δ cuando se considera la reinsertión "fisiológica" de la molécula de F_1 -ATPasa. Asimismo, se pone de manifiesto la alteración de las propiedades de las subunidades α y β aisladas cuando estas se encuentran en el factor BF_1 .

La disminución del porcentaje de reinsertión del componente δ en presencia de cantidades elevadas de cadena polipeptídica α o β , sugiere una interacción de los sitios de fijación a membranas de las respectivas subunidades α y β con aquellos correspondientes a la subunidad δ .

223

4.5. PAPEL DE LOS IONES
METALICOS EN LAS
 F_1 -ATPasas.

4.5.1. Las F_1 -ATPasas como metaloproteínas.

El presente trabajo muestra una serie de experimentos que permiten identificar la presencia de zinc como un componente intrínseco de la enzima F_1 -ATPasa de M. lysodeikticus y esencial para su actividad catalítica (434). La estequiometría en que este ión metálico se encuentra en la proteína purificada parece ser aparentemente de 1 átomo-gramo por mol de BF_1 , si bien no puede descartarse la posibilidad de que en su estado nativo contenga más de un átomo metálico por molécula de proteína. La presencia de zinc fue ya sugerida en F_1 -ATPasa de E. coli (435), sin embargo no se ofrecía una evidencia directa y -- concluyente. En el citado trabajo se indicaba un contenido de 4,1 Zn/ F_1 en una preparación parcialmente purificada de BF_1 de E. coli. Estudios recientes realizados por Senior y col. (436) sobre F_1 -ATPasa purificada de E. coli muestran un contenido en átomos metálicos de 2 Mg/ ECF_1 junto con cantidades subestequiométricas de Zn y de 1 a 2 Fe/ ECF_1 . - El procedimiento de purificación utilizado en este último caso daría una preparación de F_1 -ATPasa altamente purificada, lo que probablemente - explicaría las diferencias encontradas en ambos laboratorios. Por otra parte se ha detectado magnesio como un componente fuertemente fijado - al factor F_1 mitocondrial de corazón de buey (436,437) habiéndose demostrado que es esencial para su actividad enzimática. La presencia de hierro no se ha detectado en todas las muestras de F_1 -ATPasa o no se ha encontrado en cantidades estequiométricas (436,437,438), sugiriéndose que estos iones metálicos podrían unirse a sitios de baja afinidad. Sin - embargo, se ha identificado la presencia de 6 Fe/ F_1 en el factor F_1 mitocondrial de hígado de rata (439). Este hecho condujo a Santiago y - López-Moratalla (440) a proponer un modelo para la fosforilación oxidativa basado en la interconversión del complejo de ATPasa entre dos formas, oxidada y reducida, por una reacción redox reversible. Los re-

sultados obtenidos en el presente trabajo sobre una F_1 -ATPasa bacteriana no permiten evidentemente la aplicación de dicho modelo a este factor BF_1 .

En cualquier caso la detección de iones metálicos, esenciales para la actividad enzimática, en las F_1 -ATPasas mitocondriales -- (436,437) y bacterianas (434) permite clasificar a estas enzimas como metaloproteínas, abriendo nuevas perspectivas para entender sus propiedades estructurales y funcionales. Las diferencias en la naturaleza del ión metálico esencial para la actividad ATPásica, dependiendo del origen de las enzimas transductoras de energía, podrían constituir una explicación molecular al diferente comportamiento catalítico de las mismas.

Asimismo, la identificación de estas enzimas F_1 -ATPasas como metaloproteínas puede explicar observaciones previas que hacían referencia a la detección de hidrólisis de ATP sin adición de cationes divalentes (152,232-236) en preparaciones de F_1 -ATPasa de S. faecalis, M. lysodeikticus, A. faecalis y mitocondrias, que se inhibía en presencia de EDTA. Asimismo los experimentos llevados a cabo por el grupo de Crane con agentes quelantes encuentran ahora una nueva justificación. Es bien conocido que agentes quelantes lipofílicos inhiben la cadena -- transportadora de electrones y la actividad ATPásica asociada a membrana en mitocondrias, cloroplastos y E. coli (441-443). En estos estudios también se mostraba que la solubilización de la F_1 -ATPasa era acompañada por una aparente disminución en el efecto inhibitorio de estos agentes quelantes cuando se encontraban presentes en el medio con concentraciones elevadas de Mg^{2+} (>10 mM). Sin embargo, en presencia de bajos niveles de Mg^{2+} (≤ 2 mM) determinadas sustancias complejantes de iones inhibían la actividad ATPásica soluble (435,442). Estos hechos condujeron a Sun y Crane (435) a concluir que la F_1 -ATPasa de E. coli contenía zinc que se protegía de la acción de los agentes --

quelantes por concentraciones elevadas de Mg^{2+} o por la asociación de la enzima a la membrana. Además, estos autores proponían la existencia de otro sitio sensible a la acción de agentes quelantes lipofílicos en la membrana que controlaba la actividad de la proteína unida a membrana.

En este sentido es interesante observar las diferencias existentes en la respuesta de distintas F_1 -ATPasas de M. lysodeikticus (434), E. coli (435) y mitocondria (437), frente a la acción de diversos agentes quelantes. Estos resultados podrían sugerir la presencia de distintos iones metálicos y/o sitios en las F_1 -ATPasas que presentarían una accesibilidad variable al ataque de los agentes quelantes, dependiendo del estado soluble o asociado a membrana y del origen de la enzima.

4.5.2. Funciones estructurales y catalíticas de los iones metálicos divalentes.

El papel de los iones metálicos divalentes en estas proteínas puede ser estructural y funcional. Este comportamiento dual puede ser efectuado por los iones metálicos intrínsecos, es decir, por aquellos que se encuentran fuertemente unidos a la proteína y que confieren a ésta el carácter de metaloproteína. Otros cationes divalentes pueden regular la actividad (actúan como activadores o inhibidores), bien directamente o a través del complejo Me^{2+} -ATP. En este sentido, la apoproteína (F_1 -ATPasa libre de ión metálico) sería inactiva incluso en presencia del mejor sustrato Me^{2+} -ATP y a su vez, la metaloproteína requeriría la presencia adicional de cationes para hidrolizar el ATP. Por lo tanto, el papel de los iones metálicos divalentes parece más complejo que el que originalmente se supuso (439,440). Así, la presencia de iones Zn^{2+} en el factor BF_1 de M. lysodeikticus constituye una condición necesaria pero no suficiente para la manifestación

de la actividad ATPásica, requiriéndose la subsiguiente adición externa de iones Ca^{2+} .

Es de gran importancia mencionar que los resultados obtenidos con una F_1 -ATPasa bacteriana (434) así como los descritos por Senior y col. (436,437) sobre F_1 -ATPasa mitocondrial, sugieren la existencia de diferentes iones metálicos y/o sitios de fijación implicados en las propiedades catalíticas de las F_1 -ATPasas. En este contexto, los resultados aquí descritos favorecen la idea de que cada ión metálico desempeña un papel distinto y específico. Esto es particularmente evidente para los iones Zn^{2+} y Ca^{2+} que parecen ser los efectores naturales de la F_1 -ATPasa de M. lysodeikticus, no siendo sus funciones intercambiables. La especificidad en el papel de otros iones metálicos divalentes tales como Mg^{2+} , Mn^{2+} y Hg^{2+} también se deduce de estos estudios. Sin embargo, estas interpretaciones sobre la especificidad de determinados iones metálicos deben ser consideradas con cierta cautela en el sentido de que las diferencias observadas al incubarse dichos cationes con la enzima pueden ser atribuidas a efectos de competición entre el anión del tampón empleado y la proteína por los iones metálicos (444).

Este comportamiento dual por parte de los iones metálicos parece estar bastante extendido entre las metaloproteínas que pudiéramos denominar convencionales, tales como, fosfatasa alcalina y superóxido-dismutasa. Simpson y Vallee (445) demostraron la existencia de dos clases de átomos de zinc en la fosfatasa alcalina de E. coli, mientras que Anderson y col. (446) han identificado, más recientemente, magnesio en la misma enzima, poniendo de manifiesto su importante papel regulador en la actividad enzimática. Por otra parte, Valentine y col. (447) han descrito, en la superóxido-dismutasa de eritrocito bovino, una migración de iones Cu^{2+} dependiente del pH al sitio de fijación del zinc cuando éste se encuentra vacío, discutiéndose una hi-

potética función fisiológica.

Por otra parte, los estudios llevados a cabo en el presente trabajo sobre la influencia de ciertos cationes divalentes en las propiedades ópticas de la F_1 -ATPasa de M. lysodeikticus, indican, una vez más, el grado de flexibilidad de esta proteína así como el interesante efecto de Ca^{2+} , manteniendo una cierta conformación de la proteína. Este hecho junto con la notoria dependencia de Ca^{2+} de la actividad ATPásica de este factor BF_1 podría sugerir que dicha conformación constituyera un requisito previo para la función catalítica de la enzima.

De esta manera parece deducirse la posible existencia de dos sitios para iones metálicos que jugarían importantes papeles estructurales y regulatorios en el factor BF_1 de M. lysodeikticus (434, 448). En este sentido, se ha mostrado evidencia de la modulación de los cambios conformacionales y de la actividad enzimática en este factor BF_1 por cationes divalentes (448 y apartado 3.7.7.). Esta función reguladora que se asigna a los iones metálicos divalentes en la F_1 -ATPasa de M. lysodeikticus puede, muy probablemente, extenderse a otros factores F_1 . Así, se ha sugerido que la interacción de Mg^{2+} con F_1 mitocondrial conduce a una lenta transición conformacional de la enzima (256, 449).

Por otra parte, el efecto disociante del EDTA sobre el factor BF_1 de M. lysodeikticus (apartado 3.8.) sugiere que la presencia de iones multivalentes desempeña una función importante en el mantenimiento de la estructura cuaternaria de la enzima. Concretamente, y de los experimentos descritos en este trabajo, parece deducirse que la subunidad δ se encuentra unida al resto de la enzima mediante iones multivalentes. En este sentido, es significativo que los experimentos de reconstitución realizados a partir de las subunidades aisladas de los factores F_1 de bacteria termófila PS_3 (176,

208) y de E. coli (199,395) requieren la presencia de iones Mg^{2+} , así como la purificación del factor BF_1 conteniendo todas sus subunidades en S. ficalis (204).

270

4.6. FIJACION DE Pi.

4.6.1. Características de la fijación.

En la actualidad es generalmente aceptado que las enzimas F_1 -ATPasas constituyen el último eslabón en el proceso de la fosforilación oxidativa, catalizando la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i , por lo que parece razonable esperar que dichas enzimas posean sitios de fijación para P_i .

De los resultados descritos en el apartado 3.9. puede deducirse que el P_i se une al factor BF_1 de M. lysodeikticus sin necesidad de añadir cationes divalentes (454), lo que indica una evidente diferencia con la fijación de P_i en las enzimas homólogas de E. coli y mitocondrias de corazón de buey (265,266,380), únicos sistemas en los que se ha abordado este tema.

Aparentemente, la enzima F_1 -ATPasa de M. lysodeikticus muestra un único sitio de fijación para P_i , caracterizado por una constante de disociación de $185 \mu M$ a pH 7,5. No obstante, debe indicarse que esta constante de disociación fue calculada asumiendo que todo el P_i presente en la mezcla de reacción era capaz de fijarse al factor BF_1 . La fuerte dependencia de la unión de P_i por el pH podría sugerir que una única especie iónica de fosfato participa en la reacción de fijación, que un grupo ionizable y específico sobre la proteína está siendo titulado o que determinados cambios conformacionales importantes están teniendo lugar en la proteína. Estos valores obtenidos con BF_1 pueden compararse con la constante de disociación de $1,5 \text{ mM}$ calculada para el complejo miosina. P_i (453). Por otra parte, el valor relativamente bajo de la constante de disociación podría sugerir que el P_i se hubiese fijado al sitio de síntesis de ATP, o bien que la enzima se encontrara en una cierta conformación que dificultase la disociación del complejo F_1 -ATPasa. P_i , independientemente del sitio de fijación del fosfato, ya sea un sitio catalítico de hidrólisis, de síntesis (en el supuesto

de que sean distintos) o un sitio regulador. En este sentido, se ha descrito que el fosfato inorgánico se muestra como un inhibidor competitivo del factor BF_1 de *S. faecalis* (128). Experimentos recientes sobre F_1 -ATPasa de *M. lysodeikticus* también sugieren un efecto inhibitorio del P_i sobre la actividad ATPásica de la enzima purificada (Mollinedo, F., observaciones no publicadas).

La temperatura ejerce una gran influencia en la fijación, presentándose un efecto opuesto al observado sobre la actividad hidrolítica del ATP (véase apartado 3.4.3.). La fijación de P_i aumenta al disminuir la temperatura, lo que también podría atribuirse a una menor reversibilidad de la fijación en estas condiciones.

Por otra parte, la incubación de la enzima con cantidades elevadas de P_i pone de manifiesto la presencia de un segundo sitio de fijación. El estudio de estos nuevos sitios presenta interesantes perspectivas en relación con posibles interacciones cooperativas - entre las subunidades de este factor BF_1 .

4.6.2. Efecto de nucleótidos, cationes divalentes y agentes quelantes.

Los resultados descritos en el apartado 3.9.4. muestran una cierta relación entre los agentes que inhiben la fijación de P_i y aquellos que inhiben la actividad hidrolítica de la enzima.

Tanto ATP como su análogo, AMP-PNP, inhiben la fijación de P_i , mientras que ADP, añadido en las mismas concentraciones, no muestra ningún efecto. La relación entre el sitio de fijación de P_i y los restantes sitios de fijación sobre este factor BF_1 es de considerable interés. Si la unión del P_i a la enzima tuviese lugar en un sitio de unión de nucleótido podría sugerirse con bastante plausibilidad que el sitio de fijación de P_i coincidiese con aquel del grupo --

γ -fosfato del ATP. Sin embargo un posible desplazamiento del Pi u nido a la enzima por adición de ATP podría relacionarse con la presencia de sitios catalíticos alternativos, como se comentó en el apartado 4.3.2.

La observación de que la fijación se inhibe por EDTA parece sugerir la participación de iones metálicos multivalentes en la reacción de fijación. En este sentido y debido a que no se requiere la adición de cationes divalentes para la asociación de Pi a la enzima, el efecto del EDTA implicaría una acción directa sobre ciertos iones metálicos fuertemente unidos al factor BF_1 .

Por otra parte, el distinto comportamiento de dos cationes divalentes, Ca^{2+} y Mg^{2+} , sobre la fijación, activando el primero e --inhibiendo el segundo puede reflejar la existencia de efectos alostéricos.

Para encontrar un significado fisiológico, si existiese, a esta fijación de Pi debe realizarse un mayor número de experimentos. - Las experiencias descritas en el apartado 3.9. constituyen solamente el comienzo de un trabajo futuro encaminado hacia el conocimiento del número máximo de sitios de fijación, de la relación de estos con los sitios catalíticos o de fijación de ligandos y de la posible existencia de efectos cooperativos y/o alostéricos en este factor BF_1 .

284

4.7. RESUMEN DEL ESTUDIO
DE LA ENZIMA F_1 -ATPasa
DE MICROCOCCUS
LYSODEIKTICUS.

Este trabajo ha contribuido apreciablemente a un mejor conocimiento de los aspectos estructurales y funcionales de las enzimas transductoras de energía y, en particular, de la aislada a partir de membranas de M. lysodeikticus. La Tabla XLIII ilustra de forma esquemática las propiedades más sobresalientes de este factor de acoplamiento bacteriano.

La enzima F_1 -ATPasa de M. lysodeikticus constituye la parte hidrosoluble de la ATPasa translocadora de protones de esta membrana bacteriana (223). Como ya se ha mencionado anteriormente, su solubilización de la membrana se efectúa mediante lavados con tampón de baja fuerza iónica (123,124). Este proceso da lugar a una enzima F_1 -ATPasa soluble, cuya actividad ATPásica se muestra estimulable por tripsina (152). Esta latencia de la actividad enzimática se ha explicado por la presencia de un péptido inhibidor de 25.000 dalton (330), sensible a tripsina y debilmente unico a la enzima. No obstante, algunos resultados descritos en el presente trabajo hacen corresponder al mencionado péptido inhibidor un peso molecular máximo de 13.000 dalton (apartado 4.1.) en concordancia con los otros sistemas F_1 estudiados. La solubilización selectiva de la enzima también puede realizarse mediante urea 1,5 M (apartado 3.6.3.), obteniéndose en este caso una preparación de enzima soluble no estimulable por tripsina. La extracción de la proteína por tratamiento con cloroformo, utilizada ampliamente en otros factores F_1 (véase Introducción), no se muestra eficaz en el factor BF_1 de M. lysodeikticus, al no solubilizar un porcentaje del mismo superior al obtenido mediante lavados de membrana con tampón a baja fuerza iónica y dar lugar a preparaciones de F_1 -ATPasa con un patrón electroforético complejo al analizarlas por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (Pivel, J.P., Carneira, J. y Molli-

TABLA XLIII

PROPIEDADES DE LA ENZIMA F_1 -ATPasa DE Micrococcus lysodeikticus

Propiedad		Referencia
Peso molecular	340.000 ± 10.000 D 430.000 D	(319) (390)
Coefficiente de sedimentación	$13,6 \pm 0,2$ S	(319)
Volumen específico parcial	$0,720 \pm 0,005$ ml g ⁻¹	(390)
Coefficiente friccional relativo	1,34	(390)
Radio de la esfera equivalente	75 ± 2 Å	(390)
Subunidades	α (55.000 D), β (50.000 D), γ (35.000 D), δ (20.000 D)	(384, este trabajo)
Estequiometría probable	$\alpha_3 \beta_3 \gamma_2 \delta_2$ o 3	(365, 385, este trabajo)
Labilidad a frío	No	(152)
pH óptimo	7,5	(152)
Actividad enzimática dependiente de cationes	$Ca^{2+} > Mg^{2+}$	(152)
Inhibidores de la actividad dependiente de Ca^{2+}	ADP, N_3^- EDTA, Zincon, L-cisteína Hg^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+}	(152) (434, este trabajo) (este trabajo)
Iones metálicos asociados fuertemente a la enzima	Zn^{2+}	(434, este trabajo)
Estado fisiológico	Asociada a membrana plasmática	(123)
Extracción de la membrana	Lavados con tampón a baja fuerza iónica; urea 1,5 M	(124, este trabajo)
Tipo de interacción con la membrana	Mediada por iones Mg^{2+} ; interacciones hidrolíticas(?)	(este trabajo)

nedo, F_1 , observaciones no publicadas). La acción de agentes --
quelantes y de elevadas concentraciones de sales no extraen este --
factor BF_1 de la membrana (apartado 3.6.3.).

La purificación de la enzima por filtración en gel (152)
o electroforesis en gel de poliacrilamida a escala preparativa (143)
da lugar a una F_1 -ATPasa no estimulable por tripsina y capaz
de reinsertarse en la membrana bajo ciertas condiciones experi-
mentales (apartado 3.6.). Esta enzima purificada consta de cua-
tro cadenas polipeptídicas distintas: α , β , γ y δ (384 y apartado
4.1.) con pesos moleculares aproximados de 55.000, 50.000, ---
35.000 y 20.000 dalton respectivamente. Además, en numerosas
preparaciones del factor BF_1 se observan polipéptidos asociados --
debilmente a la enzima que pueden disociarse con relativa facilidad
por tratamiento con EDTA (apartado 4.1.). De igual forma, tam-
bien se detecta la presencia de hidratos de carbono unidos de forma
no covalente al factor BF_1 (apartado 3.8.). El mantenimiento de la
estructura cuaternaria de la proteína parece obedecer a interaccio-
nes hidrofóbicas y/o mediadas por iones multivalentes (164 y Re-
sultados). En cualquier caso, es evidente la debilidad de estas --
interacciones, obteniéndose preparaciones de enzima con un conte-
nido distinto en subunidades según el método de aislamiento y puri-
ficación empleado (véase Resultados). Este hecho constituye una --
característica general de todos los factores F_1 estudiados y podría
explicar el aislamiento de F_1 -ATPasas con un reducido número de
subunidades (114,118,119) y la microheterogeneidad de ciertas pre-
paraciones de enzima (163,164,321,323). Por otra parte, el em-
pleo de procedimientos diferentes para disociar distintos factores --
 F_1 en sus subunidades componentes: por frío, en *E. coli* (199); -
por agentes desnaturizantes, en *M. lysodeikticus* y PS_3 (208,339);
por agentes quelantes, en *M. lysodeikticus* (apartado 3.8.), etc, in

dica las grandes discrepancias referentes al tipo y/o grado de intensidad de las interacciones que mantienen la estructura cuaternaria - de las diferentes F_1 -ATPasas transductoras de energía. A este respecto, parece probable que al menos la subunidad δ se una al resto de la proteína por medio de iones multivalentes (apartados 3.8. y - 4.1.) en el caso del factor BF_1 de M. lysodeikticus.

Los experimentos descritos en este trabajo favorecen una estequiometría en subunidades de $\alpha_3 \beta_3 \gamma_2 \delta_2$, si bien debe indicarse que al haber sido deducida a partir de experimentos de reconstitución, en los cuales no se llegaba a alcanzar una reconstitución total de las propiedades estudiadas (apartados 3.3.4. y 3.6.6.), puede no ser del todo correcta. En este sentido no sería improbable la presencia de alguna copia adicional del polipéptido δ (apartado 4.1.4.).

La comparación de las composiciones de aminoácidos de las distintas subunidades del factor BF_1 de M. lysodeikticus muestra un mayor porcentaje de residuos no polares en la subunidad δ , sin embargo este resultado no constituye una propiedad general de las F_1 -ATPasas (véase Tabla LXII). Una característica notable de las subunidades constituyentes del factor BF_1 de M. lysodeikticus radica en la aparente ausencia de residuos de cisteína (319). Este hecho se ve apoyado por la carencia de marcaje por $[^{14}C]$ p-cloro-mercúribenzoato (PCMB) cuando la enzima se incubaba con este reactivo en condiciones nativas (Mollinedo, F., observaciones no publicadas); no obstante, se han encontrado ciertos indicios que podrían sugerir la presencia de grupos -SH en la subunidad γ de la enzima desnaturalizada (Mollinedo, F., observaciones no publicadas).

La Tabla XLIV resume las funciones asignadas a cada una de las subunidades de este factor BF_1 de acoplamiento.

Por otra parte se ha mostrado evidencia del papel desempeñado por los iones divalentes en esta F_1 -ATPasa. Así, los iones

TABLA XLIV

FUNCIONES DESEMPEÑADAS POR LAS SUBUNIDADES DEL
FACTOR BF₁ DE M. LYSODEIKTICUS.

<u>Subunidad</u>	<u>Función</u>	<u>Referencias</u>
α	-Junto con la subunidad β constituye la estructura mínima con actividad ATPásica.	(384, este trabajo)
	-Papel regulador.	(392, este trabajo)
β	-Centro catalítico de la hidrólisis de ATP.	(384, este trabajo)
	-Junto con la subunidad α forma la estructura mínima con actividad ATPásica	(384, este trabajo)
γ	-Posible papel en la formación de la estructura mínima ($\alpha + \beta$) con actividad ATPásica	(este trabajo)
δ	-Unión de la enzima a membrana.	(384, este trabajo)
ϵ	-Inhibidor natural	(330)

Mg^{2+} se requerirían para la unión fisiológica de la enzima a la membrana, mientras que otros cationes (Zn^{2+} , Ca^{2+}) desempeñarían -- funciones estructurales y catalíticas. La identificación de iones metálicos fuertemente asociados a la enzima (434, apartado 3.7.) representa un importante avance en el conocimiento del mecanismo molecular de la transducción de energía y abre nuevos caminos a estudios de reconstitución de actividad enzimática.

Todos estos datos, mostrados a lo largo del presente trabajo, ponen de manifiesto las grandes semejanzas existentes entre la enzima F_1 -ATPasa de M. lysodeikticus y aquellas procedentes de mitocondrias, cloroplastos y otras bacterias; sin embargo, también se observan claras diferencias entre ellas. Estas diferencias son fácilmente comprensibles si se tiene en cuenta el entorno tan diferente en que actúan los diferentes factores F_1 , las distintas funciones fisiológicas que desempeñan y las diferentes condiciones regulatorias a que se encuentran sometidos.

Se ha propuesto un modelo espacial para el factor BF_1 de M. lysodeikticus (365,417) que se ajustaría en gran medida a los resultados obtenidos en este trabajo. Este modelo, representado en la figura 68, muestra la existencia de dos planos en los que se situarían las subunidades α y β respectivamente de una forma totalmente asimétrica, en la cual la subunidad α sería capaz de interactuar únicamente con una subunidad β y en la que las interacciones $\beta - \beta$ no tendrían lugar. Esta disposición de las subunidades ha sido sugerida principalmente a raíz de los datos obtenidos con agentes entrecruzantes sobre este factor BF_1 (365); sin embargo, en este tipo de experimentos los resultados negativos deben de considerarse con extremada cautela (115,288).

De este modo, no se puede excluir la posibilidad de una disposición espacial en la que las subunidades β interaccionaran entre

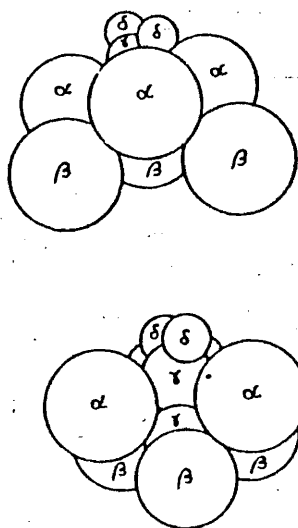


FIGURA 68.- Modelo del factor BF₁ de Micrococcus lysodeikticus propuesto por Muñoz y col. (365), mostrando dos visiones bajo dos ángulos de 0° y 45° aproximadamente. El modelo es asimétrico, agrupándose las subunidades α y β en dos planos diferentes.

sí y/o en la que la subunidad α pudiese interaccionar con más de una subunidad β . Estos supuestos se dan en los modelos espaciales diseñados a partir de los resultados obtenidos en este trabajo para el factor BF_1 de M.lysodeikticus y representados en la figura 69. En estos modelos, que a su vez pueden extenderse a otros factores F_1 , puede observarse la interacción directa de las subunidades δ con la membrana, así como la disposición central de la subunidad γ , que explicaría su posible participación en la organización de las subunidades α y β para formar una estructura funcionalmente activa. Por otra parte, la posibilidad de interacciones entre las subunidades catalíticas β y de la subunidad α con más de una subunidad β podría explicar plausiblemente la formación de un complejo $\alpha'\beta_3$ con actividad ATPásica (384, apartado 3.4.4.) así como una probable existencia de fenómenos cooperativos en las interacciones entre subunidades.

Sin embargo, la disposición estructural de los factores F_1 puede depender del proceso de aislamiento y purificación, así como de su estado funcional y/o de su interacción con distintos ligandos.

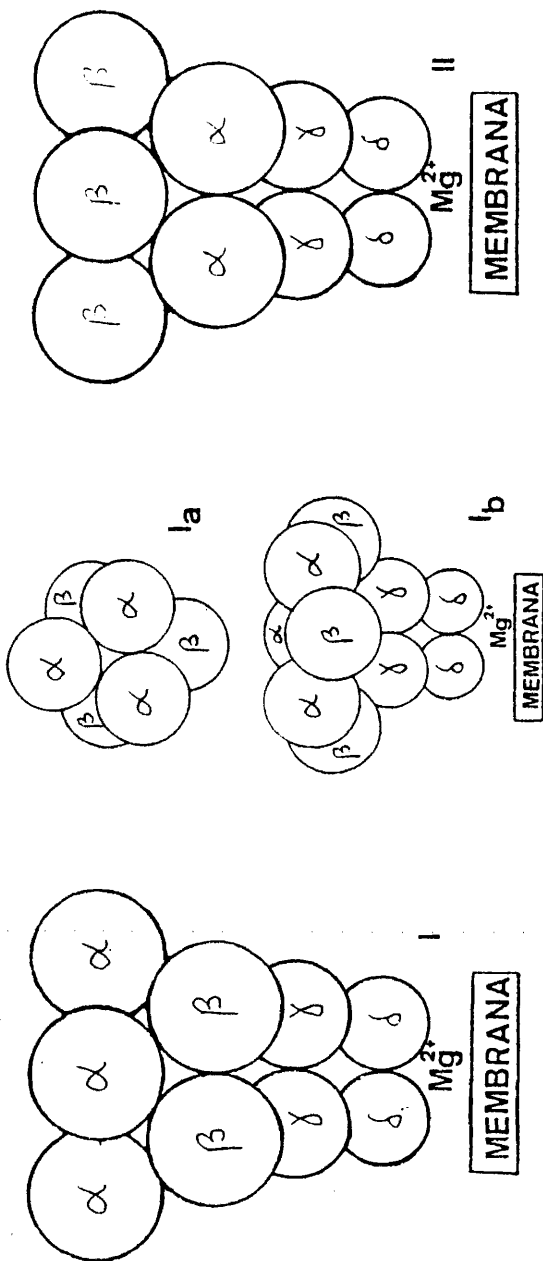


FIGURA 69.- En esta figura se ilustran dos posibles modelos (I y II) para la enzima F_1 -ATPasa de *M. luggoldii*. Las subunidades se han representado como esferas y las distancias entre las mismas se han distorsionado ligeramente para ofrecer una mejor idea del dibujo. Además de las visiones laterales I y II se representa una perspectiva desde el lado externo de la membrana (Ia) del modelo I y una forma más compacta (Ib) que probablemente podría sugerirse para la enzima, considerando con más rigor el tamaño y forma de estas subunidades. En ambos modelos se muestra la existencia de interacciones α - α , β - β y α - β (cada subunidad α podría interactuar con más de una subunidad β), así como un cierto papel estructural de la subunidad γ . La subunidad δ , así como la presencia de iones Mg^{2+} , participarían en la unión del factor F_1 a membranas. Ambas disposiciones espaciales se ajustarían en una buena aproximación a los datos de digestión proteolítica y de reincorporación a membranas comentados en el texto. El modelo I explicaría la gran resistencia de la subunidad β frente a la acción proteolítica por la protección del resto de las cadenas polipeptídicas; aunque también podría imaginarse una disposición estructural en la que la subunidad β estuviera más expuesta (II), pero de tal forma que su secuencia de aminoácidos se encontrara poco accesible a la acción de la tripsina. Los dos modelos representados se refieren a lecturas BF_1 con estequiometría $\alpha_3\beta_3\gamma_2\delta_2$, si bien es posible la presencia de alguna copia adicional de subunidad δ en la enzima "in vivo". La disposición espacial de los dos componentes mayoritarios así como la presencia de 1 ó 2 mol γ /mol enzima son temas bastante controvertidos.

4.8. COMPARACION ENTRE
DISTINTAS ATP_{asas}.

Entre las diferentes enzimas que se clasifican bajo el nombre genérico de ATPasas se encuentran las que pudieramos agrupar como "ATPasas bombeadoras de iones". Estas últimas son utilizadas por las células para crear gradientes de iones a expensas de la hidrólisis de ATP o para generar ATP a partir de un gradiente de iones. Dentro de las "ATPasas bombeadoras de iones", tres de ellas han sido profusamente estudiadas: la ATPasa translocadora de protones, de mitocondrias, cloroplastos y microorganismos, objeto del presente trabajo; la Ca^{2+} -ATPasa, localizada en las membranas de retículo sarcoplasmico y la Na^+ , K^+ -ATPasa de membrana plasmática. Sin embargo, sus funciones fisiológicas difieren. Mientras que la ATPasa translocadora de protones utiliza el flujo de protones generado por la cadena transportadora de electrones durante la oxidación de diversas sustancias o por la bacteriorodopsina (466) para formar ATP a partir de ADP y P_i , la Ca^{2+} -ATPasa y la Na^+ , K^+ -ATPasa emplean el ATP para bombear iones en contra de un gradiente de concentración. Estas funciones fisiológicas diferentes se traducen en una fuerte discrepancia en las propiedades estructurales de estas enzimas. Así, frente a la complejidad de la H^+ -ATPasa (véase Introducción) destaca la mayor simplicidad de las bombas de Ca^{2+} y de Na^+ - K^+ , como también se denominan.

La Na^+ , K^+ -ATPasa purificada consta de dos tipos de cadenas polipeptídicas cuando se analiza por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS. Una de ellas posee un peso molecular de 84.000 a 139.000 dalton, mientras que la más pequeña (una glucoproteína) presenta un peso molecular de 35.000 a 57.000 dalton (455-459). La relación molar en la que ambas subunidades se encuentran en la enzima permanece sujeta a controversia, habiéndose descrito razones de 1:2, 1:1 y 2:1 (el peso -

molecular de la enzima se ha estimado en unos 250.000 dalton (459). La subunidad de mayor talla molecular puede fosforilarse en presencia de Mg^{2+} , Na^+ y ATP (460), considerándose como la subunidad catalítica. Sin embargo, la función de la glucoproteína permanece por establecer. Se ha sugerido que este polipéptido de menor peso molecular estaría expuesto a la superficie externa de la membrana, mientras que la cadena polipeptídica de mayor peso molecular se orientaría predominantemente hacia la superficie interna (458). Por otra parte, y a diferencia de las F_1 -ATPasas (62), la Na^+ , K^+ -ATPasa muestra una cierta modulación por lípidos, aunque el papel preciso de estos no es conocido (459).

La bomba de calcio o Ca^{2+} -ATPasa de retículo sarcoplásmico es la más simple de las tres ATPasas bombeadoras de iones. Consiste de una cadena polipeptídica de 102.000 dalton que contiene el sitio catalítico de hidrólisis de ATP (461) y un sitio de actividad ionófora de Ca^{2+} (462); y de un proteolípido de 12.000 dalton de peso molecular, que contiene ácidos grasos unidos covalentemente (463) y actúa como ionóforo (464). La Ca^{2+} -ATPasa probablemente se dispone en la membrana como un sistema oligomérico, ya que se han encontrado varias subunidades del mismo peso molecular, pero con diferentes puntos isoelectrónicos (472). Como ocurría en la Na^+ , K^+ -ATPasa, la enzima puede ser fosforilada, envolviendo el ciclo catalítico de ésta la formación e hidrólisis de una enzima fosforilada, acoplando la hidrólisis de ATP al transporte vectorial de iones Ca^{2+} (473). La presencia de Mg^{2+} acelera la hidrólisis del intermedio fosforilado (474).

Por lo tanto, existen claras diferencias entre los tres tipos de ATPasas. No obstante, También pueden deducirse algunas analogías (51,459,467). Los tres sistemas son proteínas de membrana, se encuentran embebidas en la misma de una forma asimétrica,

pueden formar gradientes de iones a expensas de la hidrólisis de -- ATP y se ven influidas en su actividad enzimática por la presencia de iones divalentes. En este sentido es curioso destacar que estos - cationes divalentes (Mg^{2+} y Ca^{2+} , principalmente) se requieren para la manifestación de la actividad ATPásica de estas tres enzimas. Además se ha descrito la existencia de cambios conformacionales que afectan a la actividad enzimática de estas ATPasas. De forma inver- sa, los gradientes de iones pueden ser, a su vez, aprovechados en determinadas condiciones por las distintas bombas de iones para sintetizar ATP (467,468).

Otro tipo de ATPasas, como la ATPasa de miosina o la Apirasa, también muestran diferencias estructurales notables con las H^+ -ATPasas o con la parte catalítica de éstas, las F_1 -ATPasas. Mientras que la ATPasa de miosina se compone de cuatro tipos de subunidades con pesos moleculares de 220.000, 25.000, 18.000 y - 16.000 dalton (475), la Apirasa parece estar constituida por una - única subunidad de peso molecular, 58.000 dalton . Sin embargo, el proceso por el cual la ATPasa de miosina hidroliza el ATP a - ADP y P_i (véase Fig. 70) es de particular interés para el estudio del mecanismo molecular de la síntesis e hidrólisis de ATP en las ATPasas translocadoras de protones. De una forma esquemática, el proceso global, $Mg-ATP^{2-} + H_2O \longrightarrow Mg-ADP^- + P_i^{2-} + H^+$ (ATPasa de miosina), puede desglosarse en tres pasos fundamenta- les(473):

- (a) ATP ($Mg-ATP^{2-}$) se une con avidez, pero de una forma no covalente a miosina ($\Delta G_o^{\ddagger} = -20,6$ kJ/mol) e induce un cambio conformacional en la estructura de la enzima para formar un complejo miosina-ATP activado -- ($\Delta G_o^{\ddagger} = -53,8$ kJ/mol). (Pasos I y II de la Fig. 70).
- (b) El ATP unido a la enzima es hidrolizado con un peque

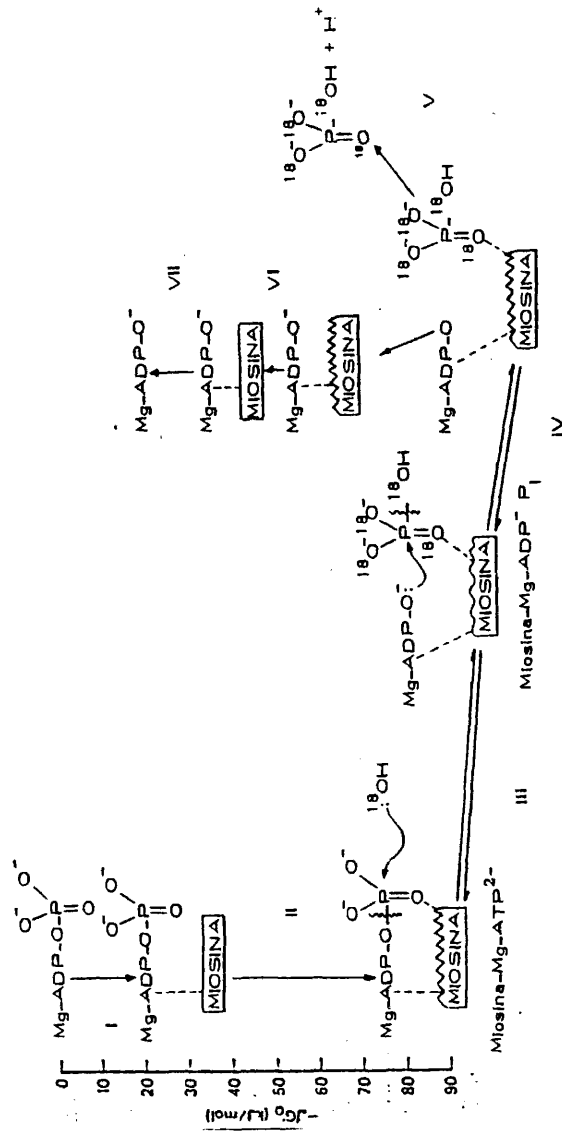


FIGURA 70.- En este esquema se representan las relaciones energéticas de fijación de ATP y de su posterior hidrólisis por la ATPasa de miosina. La molécula de miosina se representa por un rectángulo en el que la parte superior representa diferentes estados conformacionales. (véase texto).

ño cambio de energía ($\Delta G'_0 = -5,4$ kJ/mol). El complejo Mg-ADP-P_i-Miosina sufre otro reajuste estructural - con un ulterior cambio de energía relativamente pequeño ($\Delta G'_0 = -6,6$ kJ/mol). (Pasos III y IV de la Fig. 70).

(c) Disociación de P_i ($\Delta G'_0 = +11,8$ kJ/mol) (Paso V, Fig. 70) y posteriormente de Mg-ADP⁻. La disociación de -ADP implica, a su vez, dos acciones: un cambio conformacional del complejo miosina-Mg-ADP⁻ ($\Delta G'_0 = +13,8$ kJ/mol), seguido de la disociación de Mg-ADP⁻ ($\Delta G'_0 = +20,1$ kJ/mol). (Pasos VI y VII, Fig. 70).

Por lo tanto, el esquema global del proceso nos indica que en la unión de ATP (y de ADP) tienen lugar grandes cambios de energía y que la ruptura de la molécula de ATP a ADP y P_i - envuelve un cambio de energía libre muy pequeño. Una consecuencia de las relaciones energéticas representadas en la figura 70, es que cuando se añaden ADP y P_i a miosina, la molécula de ADP se une fuertemente a la enzima y se sintetiza ATP. Sin embargo, esta molécula de ATP permanece unida a la miosina, ya que su liberación requeriría un gran cambio positivo de energía libre. No obstante, debido a que los cambios de energía implicados en la interconversión de miosina-Mg-ATP²⁻ y miosina-Mg-ADP⁻-P_i (reacción IV) son pequeños, el átomo de ¹⁸O de H₂¹⁸O es fácilmente incorporado al fosfato inorgánico. Sobre la base de la reacción en la que una molécula de ATP es hidrolizada, debería esperarse la presencia de un ¹⁸O en la molécula de P_i. Sin embargo, los resultados experimentales muestran que cuando el ATP es hidrolizado - por la miosina en presencia de H₂¹⁸O, se encuentra más de un átomo de ¹⁸O en la molécula de P_i. Este hecho indica que las reacciones entre miosina-Mg-ADP⁻-P_i y miosina-Mg-ATP²⁻ (reacciones III y IV) son reversibles y sus velocidades son mayores que

las correspondientes a la liberación de Mg-ADP^- y P_i . Además, el P_i unido a miosina debe poseer una libertad completa de movimientos rotacionales a fin de no presentar siempre el mismo átomo de oxígeno para la eliminación.

En conjunto, la hidrólisis de Mg-ATP^{2-} por miosina es un proceso relativamente lento; muy probablemente, debido a la dificultad de disociar el producto Mg-ADP^- del complejo miosina- Mg-ADP^- . Sin embargo, en presencia de actina, la hidrólisis de ATP evoluciona mucho más rápidamente.

Recientemente, el grupo de Boyer ha proporcionado cierta evidencia que sugiere que el mecanismo de síntesis de ATP en las enzimas H^+ -ATPasas mitocondriales es muy similar en algunos aspectos al mecanismo conocido de la ATPasa de miosina (275, 476, 477). Así, se ha demostrado que en presencia de agentes desacoplantes, que inhiben la síntesis neta de ATP mitocondrial, las partículas submitocondriales catalizan una pequeña, pero reproducible síntesis de ATP unido a la enzima a partir de ADP y $^{32}\text{P}_i$. Esta síntesis de ATP es inhibida por oligomicina. La reacción de intercambio $\text{ATP-H}_2^{18}\text{O}$ se inhibe completamente por agentes desacoplantes, pero no así la reacción de intercambio entre $\text{P}_i\text{-H}_2^{18}\text{O}$. Esta última reacción se inhibe por oligomicina.

De esta manera, las reacciones de intercambio y la síntesis de ATP parecen ocurrir por cauces muy parecidos en la ATPasa de miosina y la H^+ -ATPasa mitocondrial. Boyer postula que la síntesis neta de ATP en mitocondrias tiene lugar utilizando la energía procedente de la cadena respiratoria en convertir ATP fuertemente unido a la enzima en ATP debilmente unido, y por lo tanto, fácilmente disociable (Fig. 71). Boyer supone que la energía procedente de la respiración no se utiliza para la síntesis de nuevo ATP sino para la disociación del ATP ya preformado, para lo cual se necesitaría un cambio conformacional en la estructura de

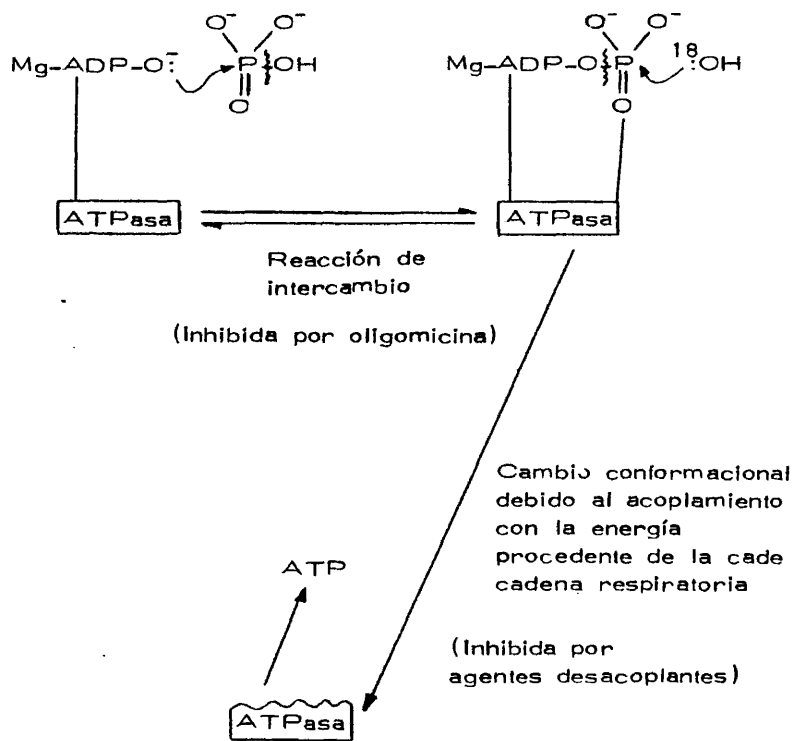


FIGURA 71.- Posible mecanismo de síntesis de ATP propuesto por Boyer para el complejo de ATPasa mitocondrial (véase texto).

la enzima.

La hipótesis de Boyer parece ser bastante satisfactoria y estimulante, pero se necesitará realizar una gran cantidad de trabajo antes de establecer su verisimilitud. La flexibilidad de estas enzimas así como la posible participación de iones metálicos fuertemente unidos a la enzima en el proceso catalítico se ajustan fácilmente a esta hipótesis. Sin embargo, debe entenderse que este postulado de Boyer no intenta ofrecer una alternativa a la hipótesis quimiosmótica de Mitchell (véase apartado 1.2.), totalmente aceptada en la actualidad en sus postulados básicos, sino que constituye una posible explicación de como la fuerza "protón-motriz", creada por la extrusión de H^+ por la cadena respiratoria y la consecuente formación de un potencial de membrana, puede ser utilizada para sintetizar -- ATP.

Muy recientemente, Boyer y col. han propuesto un mecanismo de "sitios alternativos" basados en los puntos citados anteriormente y que da cuenta de un gran cúmulo de datos experimentales. Este mecanismo postula que la energía producida durante el transporte electrónico se utiliza para promover simultáneamente la unión de P_i en un "sitio" de la molécula de F_1 -ATPasa y la liberación de ATP unido en un segundo "sitio". Este mecanismo es tratado con detalle en (421,422,478) y no será comentado en este trabajo.

También se han descrito otras muchas ATPasas capaces de translocar protones, tales como la ATPasa lisosomal (479) y la ATPasa secretora de HCl (480,481). Sin embargo, todavía existe poca evidencia para poder concluir si estas ATPasas son del tipo $(F_o . F_1) H^+$ -ATPasas.

De este estudio se deduce que los complejos de ATPasa de mitocondrias, cloroplastos y bacterias constituyen uno de los sistemas enzimáticos más complejos construidos por la célula. Sus funciones en la síntesis de ATP y en los procesos dependientes de -- ATP han sido preservados a lo largo de la evolución y son esenciales para la mayoría de los procesos vitales. Por lo tanto, la elucidación del mecanismo de acción de estas enzimas representa uno de los problemas más importantes y desafiantes en la biología molecular actual.

La resolución de este problema es de gran interés para el bioenergético, a quien agradecería entender como las mitocondrias, cloroplastos y bacterias utilizan sistemas enzimáticos bifuncionales para fabricar ATP bajo ciertas condiciones y emplean ATP para - realizar un trabajo bajo otras condiciones. De igual modo, resultaría de gran interés para el enzimólogo de membrana, quien estaría particularmente interesado en conocer en detalle como trabajan las enzimas vectoriales, así como para el patólogo, a quien gustaría conocer si durante algunos estados patológicos se producen alteraciones en el metabolismo energético (66).

En la década de los años 70 se ha realizado un avance considerable en la comprensión de las estructuras responsables de la transducción de energía en los sistemas fotosintéticos y no fotosintéticos. Sin embargo, el mecanismo molecular por el cual dicho proceso tiene lugar continua siendo desconocido. En este sentido, parece lógico pensar que en los años venideros se prestará una mayor atención al complejo de ATPasa en su conjunto (compuesto por F_0 y F_1), ya que únicamente este sistema es capaz de acoplar el transporte de protones a la síntesis o hidrólisis de ATP, pudiendo considerar de esta forma la naturaleza bifuncional (síntesis e hidrólisis de ATP), o más propiamente, multifuncional (síntesis de ATP y reac-

cones dependientes de ATP) de esta clase de enzimas transductoras de energía, así como los efectores fisiológicos que dirigen sus centros activos hacia la síntesis de ATP o hacia funciones dependientes de ATP. Así se tendrá que esperar a obtener una mayor información química y estructural del complejo de ATPasa antes de desvelar el mecanismo de la transducción de energía.

Sin embargo, e independientemente de los importantes estudios estructurales que deben llevarse a cabo sobre la H^+ -ATPasa, principalmente sobre la parte de la enzima embebida dentro de la membrana o F_0 , un gran esfuerzo del trabajo futuro deberá encaminarse hacia la consecución de un conocimiento profundo sobre ciertos aspectos de un interés fundamental: (a) el papel jugado por los iones metálicos en esta enzima; (b) la naturaleza y número de los sitios catalíticos; (c) las propiedades cinéticas y (d) los mecanismos de regulación de estos sistemas.

5. CONCLUSIONES

- 1.- Se ha identificado un nuevo componente intrínseco de la enzima, denominado como subunidad δ de peso molecular 20.000 ± 700 dalton .
- 2.- La subestructura del factor BF_1 de M.lysodeikticus se encuentra constituida por cuatro tipos de subunidades: α , β , γ y δ . También pueden encontrarse distintos polipéptidos asociados a la enzima, que pueden disociarse de la misma por tratamiento con EDTA.
- 3.- Las subunidades minoritarias γ y δ se encuentran debilmente unidas al resto de la enzima, particularmente la subunidad δ , cuya asociación a la proteína parece estar mediada por iones multivalentes. Este hecho justifica el contenido variable con que el componente δ se halla presente en la F_1 -ATPasa.
- 4.- La estequiometría en subunidades de la proteína parece ajustarse a $\alpha_3 \beta_3 \gamma_2 \delta_2$, aunque es posible la presencia de alguna -- copia adicional del polipéptido δ .
- 5.- La parte sacarídica descrita en este factor BF_1 parece estar asociada a la enzima de una forma no covalente, probablemente a través de interacciones electrostáticas y/o mediadas por cationes multivalentes.
- 6.- Tanto la enzima F_1 -ATPasa de M.lysodeikticus como sus subunidades constituyentes resultan ser antigénicas.
- 7.- Estudios inmunoquímicos de este factor ponen de manifiesto la identidad propia de cada una de sus subunidades y la contribución de las mismas a las propiedades antigénicas de la enzima. A su vez, existen determinantes antigénicos adicionales, posiblemente conformacionales, que se originan del plegamiento y ensamblaje de las subunidades en la molécula de F_1 -ATPasa.

- 8.- La molécula de F_1 -ATPasa y sus componentes polipeptídicos mayoritarios, α y β , se muestran accesibles a sus respectivos anticuerpos cuando la enzima se encuentra asociada a la membrana.
- 9.- La subunidad α parece jugar un papel regulatorio en la expresión de las propiedades inmunológicas de la enzima.
- 10.- Se encuentran diferencias en el comportamiento inmunológico de las formas A y B de la enzima que son independientes del estado físico de la proteína: soluble o asociada a membrana.
- 11.- La subunidad β parece albergar el sitio activo de la enzima, si bien requiere de la presencia de subunidad α , aun en proporciones no equimoleculares, para la expresión de la capacidad hidrolítica sobre el ATP. En este sentido se ha descrito la estructura mínima de una F_1 -ATPasa activa, constituida por las subunidades α' , β , β' y δ , en la siguiente relación molar 1,67; 3,00; 0,16; 0,17, respectivamente.
- 12.- La subunidad α parece desempeñar un papel regulador en las propiedades catalíticas de la enzima y se requiere, como se ha mencionado en el punto anterior, para constituir una estructura funcionalmente activa.
- 13.- La subunidad δ y los cationes Mg^{2+} constituyen los componentes responsables de la unión de la enzima a la membrana. Las subunidades α y β aisladas muestran una elevada capacidad de reinsertión a membrana, pero dicha capacidad se pierde al constituirse el complejo ($\alpha + \beta$).
- 14.- El factor BF_1 puede reasociarse de múltiples formas a la membrana, sin embargo, no todas presentan un significado fisiológico.
- 15.- Se ha detectado la presencia de zinc como un componente intrín

seco de la enzima F_1 -ATPasa y esencial para su actividad catalítica. La estequiometría en que este ión metálico se encuentra en la proteína purificada parece ser de 1 átomo-gramo/mol BF_1 .

- 16.- La presencia de iones Zn^{2+} en el factor BF_1 de M. lysodeikticus constituye una condición necesaria pero no suficiente para la manifestación de la actividad ATPásica, requiriéndose la subsiguiente adición externa de iones Ca^{2+} . Los iones Zn^{2+} y Ca^{2+} parecen ser los efectores naturales de este factor BF_1 , siendo sus funciones distintas y no intercambiables.
- 17.- Los cationes divalentes modulan los cambios conformacionales y la actividad enzimática de la enzima F_1 -ATPasa, sugiriéndose un papel regulador de los mismos en la proteína.
- 18.- El agente quelante EDTA es capaz de disociar, al menos, las subunidades minoritarias de la proteína. Se postula un importante papel funcional y estructural de los iones metálicos en esta enzima.
- 19.- El P_i se une al factor BF_1 de M. lysodeikticus sin necesidad de añadir cationes divalentes. Aparentemente, la enzima exhibe un único sitio de fijación para P_i , caracterizado por una constante de disociación de $185 \mu M$ a pH 7,5. La incubación de la enzima con cantidades elevadas de P_i indica, sin embargo, la presencia de un segundo sitio de fijación.
- 20.- En las F_1 -ATPasas procedentes de orígenes distintos se aprecian grandes analogías, sin embargo, un estudio más minucioso de las mismas pone de manifiesto la existencia de diferencias entre ellas.

6. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Singer, S.J. y Nicolson, G.L. (1972) *Science* 175, 720-731.
- 2.- Muñoz, E. (1979) en "Biología Celular y Molecular" (Cordoba, C.V., coord.), pp. 1-39, H. Blume Ediciones, Madrid.
- 3.- Korn, E.D. (1969) *Ann.Rev.Biochem.* 38, 263-288.
- 4.- Razin, S. y Rotten, S. (1976) en "Biochemical Analysis of Membranes" (Maddy, A.H., ed.), pp. 3-26, John Wiley & Sons, New York.
- 5.- Cook, G.M.W. (1976) en "Biochemical Analysis of Membranes" (Maddy, A.H., ed.), pp. 283-351, John Wiley & Sons, New York.
- 6.- Oseroff, A.R., Robbins, P.W. y Burger, M.M. (1973) *Ann. Rev.Biochem.* 42, 647-682.
- 7.- Pringle, M.J. y Chapman, D. (1980) *Biochemical Soc. Trans.* 8, 686-688.
- 8.- Maddy, A.H. y Dunn, M.J. (1976) en "Biochemical Analysis of Membranes" (Maddy, A.H., ed.), pp. 177-196, John Wiley & Sons, New York.
- 9.- Manavalan, P. y Ponnuswamy, P.K. (1978) *Nature* 275, 673-674.
- 10.- Vanderkooi, G. y Capaldi, R.A. (1972) *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 195, 135.
- 11.- Capaldi, R.A. y Green, D.E. (1972) *FEBS Lett.* 25, 205-209.
- 12.- Lenard, J. y Singer, S.J. (1966) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 56, 1828-1835.
- 13.- Ke, B. (1965) *Arch.Biochem.Biophys.* 112, 554-561.
- 14.- Wallach, D.F.H. y Zahler, P.H. (1966) *Proc.Natl.Acad. Sci.USA* 56, 1552-1559.
- 15.- Glaser, M. y Singer, S.J. (1971) *Biochemistry* 10, 1780-1787.
- 16.- Cone, R.A. (1972) *Nature New Biol.* 236, 39-43.

- 17.- Frye, L.D. y Edidin, M. (1970) *J.Cell.Sci.* 7, 319-335.
- 18.- Bretscher, M.S. y Raff, M.C. (1975) *Nature* 258, 43-49.
- 19.- de Petris, S. y Raff, M.C. (1973) *Nature New Biol.* 241, 257-259.
- 20.- de Petris, S. y Raff, M.C. (1972) *Eur.J.Immunol.* 2, 523-535.
- 21.- Lamm, M.E., Boyse, E.A., Old, L.J., Lisowska-Bernstein, B. y Stocker, E. (1968) *J.Immunol.* 101, 99-103.
- 22.- Marchesi, V.T. y Steers, E., Jr. (1968) *Science* 159, 203-204.
- 23.- Steck, T.L. (1974) *J.Cell.Biol.* 62, 1-14.
- 24.- Tomita, M. y Marchesi, V.T. (1975) *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 72, 2964-2968.
- 25.- Bretscher, M.S. (1973) *Science* 181, 622-629.
- 26.- Boyer, P.D., Chance, B., Ernster, L., Mitchell, P., Racker, E. y Slater, E.C. (1977) *Ann.Rev.Biochem.* 46, 955-1026.
- 27.- Slater, E.C. (1953) *Nature* 172, 975-978.
- 28.- Mitchell, P. (1961) *Nature* 191, 144-148.
- 29.- Griffiths, D.E., Hyams, R.L., Bertoli, E. y Carver, M. (1977) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 75, 449-456.
- 30.- Mitchell, P. (1967) *Fed.Proceedings* 26, 1370-1379.
- 31.- Harold, F.M. (1972) *Bacteriol.Rev.* 36, 172-230.
- 32.- Mitchell, P. (1976) *J.Theor.Biol.* 62, 327-367.
- 33.- Williams, R.J.P. (1961) *J.Theor.Biol.* 1, 1-17.
- 34.- Williams, R.J.P. (1978) *Biochim.Biophys.Acta* 505, 1-44.
- 35.- Williams, R.J.P. (1974) *FEBS Lett.* 53, 123-125.
- 36.- Mitchell, P. (1974) *FEBS Lett.* 43, 189-194.
- 37.- Mitchell, P. (1979) en "Membrane Bioenergetics" (Lee, C.P., Schatz, G. y Ernster, L., eds.) pp. 361-372, Addison-Wesley Publishing Co., Massachusetts.

- 38.- Boyer, P.D. (1975) FEBS Lett. 58, 1-6.
- 39.- Kayalar, C., Rosing, J. y Boyer, P.D. (1976) Fed. Proc. 35, 1601.
- 40.- Boyer, P.D. (1979) en "Membrane Bioenergetics" (Lee, C.P., Schatz, G. y Ernster, L., eds.) pp. 461-479, Addison-Wesley Publishing Co., Massachusetts.
- 41.- Ernster, L. (1977) en "Living Systems as Energy Converters" (Buvet, R., Allen, M.J. y Massué, J.-P., eds.) pp. 115-118, North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
- 42.- Dickerson, R.E., Timkovich, R. y Almassy, R.J. (1976) J.Mol.Biol. 100, 473-491.
- 43.- Dickerson, R.E. (1980) Sci.Am. 242, 137-153.
- 44.- Vignais, P.M. (1977) en "Living Systems as Energy Converters" (Buvet, R., Allen, M.J. y Massué, J.-P., eds.) pp. 135-151, North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
- 45.- Riebeling, V. y Jungermann, K. (1976) Biochim.Biophys. Acta 430, 434-444.
- 46.- Riebeling, V., Thauer, R.K. y Jungermann, K. (1975) Eur.J.Biochem. 55, 445-453.
- 47.- Gray, B.H., Fowler, C.F., Nugent, N.A. y Fuller, R.C. (1972) Biochem.Biophys.Res.Comm. 47, 322-327.
- 48.- Evans, M.C.W., Buchanan, B.B. y Arnon, D.I. (1966) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 55, 928-934.
- 49.- John, P. y Whatley, F.R. (1975) Nature 254, 495-498.
- 50.- Kagawa, Y. (1972) Biochim.Bophys.Acta 265, 297-338.
- 51.- Racker, E. (1976) TIBS, November, 244-247.
- 52.- Kagawa, Y., Sone, N., Hirata, H. y Yoshida, M. (1979) J.Bioenerg.Biomem. 11, 39-78.
- 53.- Ryrle, I.J. y Blackmore, P.F. (1976) Arch.Biochem. Biophys. 176, 127-135.

- 54.- Harold, F.M. (1977) *Ann.Rev.Microbiol.* 31, 181-203.
- 55.- Kozlov, I.A. y Skulachev, V.P. (1977) *Biochim.Biophys.Acta* 463, 29-89.
- 56.- Nelson, N. (1976) *Biochim.Biophys.Acta* 456, 314-338.
- 57.- Kagawa, Y., Sone, N., Yoshida, M, Hirata, H. y Okamoto, H. (1976) *J.Biochem.* 80, 141-151.
- 58.- Kagawa, Y. y Racker, E. (1966) *J.Biol.Chem.* 241, 2467-2474.
- 59.- Tzagoloff, A., Byington, H. y MacLennar, D.H. (1968) *J.Biol.Chem.* 243, 2405-2412.
- 60.- Kagawa, Y. y Racker, E. (1966) *J.Biol.Chem.* 241, 2461-2466.
- 61.- Sone, N., Yoshida, M., Hirata, H. y Kagawa, Y. (1975) *J.Biol.Chem.* 250, 7917-7923.
- 62.- Pedersen, P.L. (1975) *J.Bioenerg.* 6, 243-275.
- 63.- McCarty, R.E. (1978) *Curr. Top. Bioenerg.* 7, 245-278.
- 64.- Shavit, N. (1980) *Ann.Rev.Biochem.* 49, 111-138.
- 65.- Stiggall, D.L., Galante, Y.M. y Hatefi, Y. (1978) *J.Biol. Chem.* 253, 956-964.
- 66.- Pedersen, P.L., Amzel, L.M., Soper, J.W., Cintrón, N. y Hüllihen, J. (1978) en "Energy Conservation in Biological Membranes" (Schäfer, G. y Klingenberg, M., eds.) pp. 159-194, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- 67.- Senior, A.E. (1973) *Biochim.Biophys.Acta* 301, 249-277.
- 68.- Penefsky, H.S. (1979) *Adv. Enzymol.* 49, 223-280.
- 69.- Downie, J.A., Gibson, F. y Cox, G.B. (1979) *Ann.Rev. Biochem.* 48, 103-131.
- 70.- Harold, F.M., Baarda, J.R., Baron, C. y Abrams, A. (1969) *J.Biol.Chem.* 244, 2261-2268.
- 71.- Hinkle, P.C. y McCarty, R.E. (1978) *Sci. Am.* 238, 104-

123.

- 72.- Kaback, H.R. (1976) J.Cell.Physiol. 89, 575-594.
- 73.- Futai, M. y Kanazawa, H. (1980) Curr. Top. Bioenerg. 10, 181-215.
- 74.- Penefsky, H.S., Pullman, M.E., Datta, A. y Racker, E. (1960) J.Biol.Chem. 235, 3330-3336.
- 75.- Hinkle, P. y Horstman, L.L. (1971) J.Biol.Chem. 246, 6024-6028.
- 76.- Racker, E. y Horstman, L.L. (1967) J.Biol.Chem. 242, 2547-2551.
- 77.- Horstman, L.L. y Racker, E. (1970) J.Biol.Chem. 245, 1336-1344.
- 78.- Pedersen, P.L. y Hüllihen, J. (1978) J.Biol.Chem. 253, 2176-2183.
- 79.- Pedersen, P.L. y Hüllihen, J. (1979) en "Methods in Enzymology" (Fleischer, S. y Packer, L., eds.) vol. 55, pp. 736-741, Academic Press, New York.
- 80.- Pedersen, P.L. (1976) J.Biol.Chem. 251, 934-940.
- 81.- Brooks, J.C. y Senior, A.E. (1971) Arch.Biochem.Biophys. 147, 467-470.
- 82.- Senior, A.E. y Brooks, J.C. (1970) Arch.Biochem.Biophys. 140, 257-266.
- 83.- Knowles, A.F. y Penefsky, H.S. (1972) J.Biol.Chem. 247, 6617-6623.
- 84.- Pullman, M.E., Penefsky, H.S., Datta, A. y Racker, E. (1960) J.Biol.Chem. 235, 3322-3329.
- 85.- Andreoli, T.E., Lam, K.-W. y Sanadi, D.R. (1965) J.Biol.Chem. 240, 2644-2653.
- 86.- Datta, A. y Penefsky, H.S. (1970) J.Biol.Chem. 245, 1537-

- 1544.
- 87.- Kozlov, I.A. y Mikelsaar, H.N. (1974) FEBS Lett. 43, 212-214.
- 88.- Toson, G., Contessa, A.R. y Bruni, A. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 341-347.
- 89.- Beechey, R.B., Hubbard, S.A., Linnett, P.E., Mitchell, A.D. y Munn, E.A. (1975) Biochem. J. 148, 533-537.
- 90.- Lambeth, D.O. y Lardy, H.A. (1971) Eur. J. Biochem. 22, 355-363.
- 91.- Catterall, W.A. y Pedersen, P.L. (1971) J. Biol. Chem. 246, 4987-4994.
- 92.- Apps, D.K. y Reid, G.A. (1977) Biochem. J. 167, 297-300.
- 93.- Apps, D.K. y Glover, L.A. (1978) FEBS Lett. 85, 254-258.
- 94.- Shoshan, V., Shavit, N. y Chipman, D.M. (1978) Biochim. Biophys. Acta 504, 108-122.
- 95.- Farron, F. (1970) Biochemistry 9, 3823-3828.
- 96.- Lien, S. y Racker, E. (1971) en "Methods in Enzymology" (San Pietro, A., ed.) vol. 23, pp. 547-555, Academic Press, New York.
- 97.- McEvoy, F.A. y Lynn, W.S. (1973) Arch. Biochem. Biophys. 156, 335-341.
- 98.- Sirofman, H., Hesse, H. y Edelman, K. (1973) Biochim. Biophys. Acta 314, 202-210.
- 99.- Schatz, G., Penefsky, H.S. y Racker, E. (1967) J. Biol. Chem. 242, 2552-2560.
- 100.- Tzagoloff, A. (1969) J. Biol. Chem. 244, 5020-5026.
- 101.- Tzagoloff, A. y Meagher, P. (1971) J. Biol. Chem. 246, 7328-7336.

- 102.- Rynie, I.J. (1977) Arch.Biochem.Biophys. 184, 464-475.
- 103.- Goffeau, A., Landry, Y., Foury, F., Briquet, M. y Colson, A.-M. (1973) J.Biol.Chem. 248, 7097-7105.
- 104.- Johansson, B.C. (1972) FEBS Lett. 20, 339-340.
- 105.- Johansson, B.C., Baltscheffsky, M., Baltscheffsky, H., Baccarini-Melandri, A. y Melandri, B.A. (1973) Eur.J. Biochem. 40, 109-117.
- 106.- Johansson, B.C. y Baltscheffsky, M. (1975) FEBS Lett. 53, 221-224.
- 107.- Reed, D.W. y Raveed, D. (1972) Biochim.Biophys.Acta 283, 79-91.
- 108.- Baccarini-Melandri, A., Gest, H. y San Pietro, A. (1970) J.Biol.Chem. 245, 1224-1226.
- 109.- Baccarini-Melandri, A. y Melandri, B.A. (1971) en "Methods in Enzymology" (San Pietro, A., ed.) vol. 23, pp. 556-561, Academic Press, New York.
- 110.- Binder, A. y Bachofen, R. (1979) FEBS Lett. 104, 66-70.
- 111.- Kobayashi, H. y Anraku, Y. (1972) J.Biochem. 71, 387-399.
- 112.- Bragg, P.D. y Hou, C. (1972) FEBS Lett. 28, 309-312.
- 113.- Davies, P.L. y Bragg, P.D. (1972) Biochim.Biophys.Acta 266, 273-284.
- 114.- Monteil, H., Roussel, G. y Boulouis, D. (1975) Biochim. Biophys.Acta 382, 465-478.
- 115.- Bragg, P.D. y Hou, C. (1975) Arch.Biochem.Biophys. 167, 311-321.
- 116.- Harris, D.A., John, P. y Radda, G.K. (1977) Biochim. Biophys.Acta 459, 546-559.

- 117.- Mirsky, R. y Barlow, V. (1971) *Biochim.Biophys.Acta* 241, 835-845.
- 118.- Mirsky, R. y Barlow, V. (1973) *Biochim.Biophys.Acta* 291, 480-488.
- 119.- Serrahima-Zieger, M. y Montell, H. (1978) *Biochim.Biophys. Acta* 502, 445-457.
- 120.- Pandit-Hovenkamp, H.G. (1967) en "Methods in Enzymology" (Estabrook, R.W. y Pullman, M.E., eds.) vol. 10, pp. 152-157, Academic Press, New York.
- 121.- Adolfsen, R. y Moudrianakis, E.N. (1971) *Biochemistry* 10, 440-446.
- 122.- Adolfsen, R. y Moudrianakis, E.N. (1971) *Biochemistry* 10, 2247-2253.
- 123.- Muñoz, E., Freer, J.H., Ellar, D.J. y Salton, M.R.J. (1968) *Biochim.Biophys. Acta* 150, 531-533.
- 124.- Muñoz, E., Nachbar, M.S., Schor, M.T. y Salton, M.R. J. (1968) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 32, 539-546.
- 125.- Schmitt, M., Rittinghaus, K., Scheurich, P., Schwulera, U. y Dose, K. (1978) *Biochim.Biophys.Acta* 509, 410-418.
- 126.- Higashi, T., Kalra, V.K., Lee, S.-H., Bogin, E. y Brodie, A.F. (1975) *J.Biol.Chem.* 250, 6541-6548.
- 127.- Abrams, A. (1965) *J.Biol.Chem.* 240, 3675-3681.
- 128.- Schnebli, H.P. y Abrams, A. (1970) *J.Biol.Chem.* 245, 1115-1121.
- 129.- Hochman, A. y Carmell, C. (1971) *FEBS Lett.* 13, 36-40.
- 130.- Hachimori, A., Muramatsu, N. y Nosch, Y. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 206, 426-437.
- 131.- Yoshida, M., Sone, N., Hirata, H. y Kagawa, Y. (1975) *J.Biol.Chem.* 250, 7910-7916.

- 132.- Ishikawa, S. y Lehninger, A.L. (1962) *J.Biol.Chem.* 237, 2401-2408.
- 133.- Neéman, Z., Kahane, I. y Razin, S. (1971) *Biochim.Biophys. Acta* 249, 169-176.
- 134.- Salton, M.R.J. y Schor, M.T. (1972) *Biochem.Biophys. Res.Comm.* 49, 350-357.
- 135.- Konings, A.W.T. y Guillory, R.J. (1973) *J.Biol.Chem.* 248, 1045-1050.
- 136.- Abrams, A. y Smith, J.B. (1974) en "The Enzymes" (Boyer, P.D., ed.) vol. X, pp. 395-429, Academic Press, New York.
- 137.- Cox, G.B., Downie, J.A., Fayle, D.R.H., Gibson, F. y Radik, J. (1978) *J.Bacteriol.* 133, 287-292.
- 138.- Mares-Guia, M. y Shaw, E. (1965) *J.Biol.Chem.* 240, 1579-1585.
- 139.- Mäntsälä, P. y Zalkin, H. (1980) *J.Bacteriol.* 141, 493-501.
- 140.- Regnier, Ph. y Thang, M.N. (1973) *FEBS Lett.* 36, 31-33.
- 141.- Futai, M., Sternweis, P.C. y Heppel, L.A. (1974) *Proc. Natl.Acad.Sci. USA* 71, 2725-2729.
- 142.- Vogel, G. y Steinhart, R. (1976) *Biochemistry* 15, 208-216.
- 143.- Andreu, J.M. y Muñoz, E. (1975) *Biochim.Biophys. Acta* 387, 228-233.
- 144.- Kagawa, Y. y Racker, E. (1966) *J.Biol.Chem.* 241, 2475-2482.
- 145.- Lien, S. y Racker, E. (1971) *J.Biol.Chem.* 246, 4298-4307.

- 146.- Garber, M.P. y Steponkus, P.L. (1974) *J.Cell.Biol.* 63, 24-34.
- 147.- Fernandez-Morán, H., Oda, T., Blair, P.V. y Green, D. E. (1964) *J.Cell.Biol.* 22, 63-100.
- 148.- Howell, S.H. y Moudrianakis, E.M. (1967) *Proc.Natl.Acad. Sci. USA* 58, 1261-1268.
- 149.- Forrest, G. y Edelstein, S.J. (1970) *J.Biol.Chem.* 245, 6468-6470.
- 150.- Lien, S., Berzborn, R.J. y Racker, E. (1972) *J.Biol. Chem.* 247, 3520-3524.
- 151.- Berzborn, R.J., Johansson, B.C. y Baltscheffsky, M. (1975) *Biochim.Biophys.Acta* 396, 360-370.
- 152.- Muñoz, E., Salton, M.R.J., Ng, M.H. y Schor, M.T. (1969) *Eur.J.Biochem.* 7, 490-501.
- 153.- Yoshida, M., Sone, N., Hirata, H., Kagawa, Y. y Ui, N. (1979) *J.Biol.Chem.* 254, 9525-9533.
- 154.- Muller, J.L.M., Rosing, J. y Slater, E.C. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 462, 422-437.
- 155.- Andreu, J.M., Larraga, V. y Muñoz, E. (1977) en "Bioenergetics of membranes" (Packer, L., Papageorgiou, C. y Trebst, A., eds.) pp. 527-536, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- 156.- Andreu, J.M., Warth, R. y Muñoz, E. (1978) *FEBS Lett.* 96, 1-5.
- 157.- Guerrero, A., Muñoz, E. y Andreu, J.M. (1978) *Curr. Microbiol.* 1, 129-133.
- 158.- Smith, J.B., Sternweis, P.C., Larson, R.J. y Heppel, L. A. (1976) *J.Cell.Physiol.* 89, 567-568.
- 159.- Pullman, M.E. y Monroy, G.C. (1963) *J.Biol.Chem.* 238, 3762-3769.

- 160.- Nalin, C.M., Cross, R.L., Lucas, J.J. y Kohlbrenner, W.E. (1979) FEBS Lett. 104, 209-214.
- 161.- Penefsky, H.S. y Warner, R.C. (1965) J.Biol.Chem. 240, 4694-4702.
- 162.- Ackers, G.K. (1970) en "Advances in Protein Chemistry" (Anfinsen, C.B., Edsall, J.T. y Richards, F.M., eds.) vol. 24, pp. 343, Academic Press, New York.
- 163.- Adolfsen, R., McClung, J.A. y Moudrianakis, E.N. (1975) Biochemistry 14, 1727-1735.
- 164.- Nieto, M., Muñoz, E., Carreira, J. y Andreu, J.M. (1975) Biochim.Biophys.Acta 413, 394-414.
- 165.- Senior, A.E. y Brooks, J.C. (1971) FEBS Lett. 17, 327-329.
- 166.- Knowles, A.F. y Penefsky, H.S. (1972) J.Biol.Chem. 247, 6624-6630.
- 167.- Lambeth, D.O., Lardy, H.A., Senior, A.E. y Brooks, J.C. (1971) FEBS Lett. 17, 330-332.
- 168.- Caterall, W.A., Coty, W.A. y Pedersen, P.L. (1973) J.Biol.Chem. 248, 7427-7431.
- 169.- Cintrón, N.M. y Pedersen, P.L. (1979) J.Biol.Chem. 254, 3439-3443.
- 170.- Nelson, N., Deters, D.W., Nelson, H. y Racker, E. (1973) J.Biol.Chem. 248, 2049-2055.
- 171.- Nelson, N., Nelson, H. y Racker, E. (1972) J.Biol.Chem. 247, 7657-7662.
- 172.- Höckel, M., Hulla, F.W., Risi, S. y Dose, K. (1976) Biochim.Biophys.Acta 429, 1020-1028.
- 173.- Schnebli, H.P., Vatter, A.E. y Abrams, A. (1970) J.Biol.Chem. 245, 1122-1127.
- 174.- Postma, P.W. y Van Dam, K. (1976) TIBS 1, 16-17.

- 175.- Asami, K., Juntti, K. y Ernster, L. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 205, 307-311.
- 176.- Yoshida, M., Sone, N., Hirata, H. y Kagawa, Y. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 3480-3485.
- 177.- Banker, C.A. y Colman, C.W. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 5856-5861.
- 178.- Mickelson, K.E., Teller, D.C. y Petrá, P.H. (1978) *Biochemistry* 17, 1409-1415.
- 179.- Takeshige, K., Hess, B., Böhm, M. y Zimmermann, H. (1976) *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 357, 1605-1622.
- 180.- Senior, A.E. (1975) *Biochemistry* 14, 660-664.
- 181.- Yoshida, M., Sone, N., Hirata, H. y Kagawa, Y. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 84, 117-122.
- 182.- Verschoor, G.J., Van der Sluis, P.R. y Slater, E.C. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 462, 438-449.
- 183.- Douglas, M.G., Koh, Y., Dockter, M.E. y Schatz, G. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 8333-8335.
- 184.- Esch, F.S. y Allison, W.S. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 10740-10746.
- 185.- Baird, B.A. y Hammes, G.G. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 4743-4748.
- 186.- Baird, B.A. y Hammes, G.G. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 6953-6962.
- 187.- Enns, R.K. y Criddle, R.S. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 182, 587-600.
- 188.- Wakabayashi, T., Kubota, M., Yoshida, M. y Kagawa, Y. *J. Mol. Biol.* 117, 515-519.
- 189.- Nelson, N. y Karny, O. (1976) *FEBS Lett.* 70, 249-253.
- 190.- Binder, A., Jagendorf, A. y Ngo, E. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 3094-3100.

- 191.- Paradies, H.H., Zimmermann, J. y Schmidt, U.D. (1978) *J.Biol.Chem.* 253, 8972-8979.
- 192.- Voellmy, R.W. y Goldberg, A.L. (1981) *Nature* 290, 419-421.
- 193.- Kagawa, Y. (1978) *Biochim.Biophys.Acta* 505, 45-93.
- 194.- Perutz, M.F. y Raidt, H. (1975) *Nature* 255, 256-259.
- 195.- Biesecker, G., Harris, J.I., Thierry, J.C., Walker, J.E. y Wonacott, A.J. (1977) *Nature* 266, 328-333.
- 196.- Nelson, N., Deters, D.W., Nelson, H. y Racker, E. (1973) *J.Biol.Chem.* 248, 2049-2055.
- 197.- Kanner, B.I., Nelson, N. y Gutnick, D.L. (1975) *Biochim. Biophys.Acta* 396, 347-359.
- 198.- Deters, D.W., Racker, E., Nelson, N. y Nelson, H. (1975) *J.Biol.Chem.* 250, 1041-1047.
- 199.- Futai, M. (1977) *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 79, 1231-1237.
- 200.- Nelson, N., Kanner, B.I. y Gutnick, D.L. (1974) *Proc. Natl.Acad.Sci. USA* 71, 2720-2724.
- 201.- Kozlov, I.A., Kondrashin, A.A., Kononenko, V.A. y Melitsky, S.T. (1976) *J.Bioenerg.* 8, 1-7.
- 202.- Smith, J.B. y Sternweis, P.C. (1975) *Biochem.Biophys. Res.Comm.* 62, 764-771.
- 203.- Younis, H.M., Winget, G.D. y Racker, E. (1977) *J.Biol. Chem.* 252, 1814-1818.
- 204.- Abrams, A., Jensen, C. y Morris, D. (1976) *Biochem. Biophys.Res.Comm.* 69, 804-811.
- 205.- Abrams, A., Morris, D. y Jensen, C. (1976) *Biochemis-try* 15, 5560-5566.
- 206.- Gomez-Fernandez, J.C. y Harris, D.A. (1978) *Biochem. J.* 176, 967-975.

- 207.- Sternweis, P.C. (1978) J.Biol.Chem. 253, 3123-3128.
- 208.- Yoshida, M., Okamoto, H., Sone, N., Hirata, H. y Kagawa, Y. (1977) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 74, 936-940.
- 209.- Senior, A.E. (1973) Biochemistry 12, 3622-3627.
- 210.- Farron, F. y Racker, E. (1970) Biochemistry 9, 3829-3836.
- 211.- Azocar, O. y Muñoz, E. (1978) J.Gen.Microbiol. 108, 239-246.
- 212.- Brooks, J.C. y Senior, A.E. (1972) Biochemistry 11, 4675-4678.
- 213.- Vambutas, V.K. y Racker, E. (1965) J.Biol.Chem. 240, 2660-2667.
- 214.- McCarty, R.E. y Racker, E. (1968) J.Biol.Chem. 243, 129-137.
- 215.- Chan, S.H.P. y Barbour, R.L. (1976) Biochim.Biophys. Acta 430, 426-433.
- 216.- Landry, Y. y Goffeau, A. (1975) Biochim.Biophys.Acta 376, 470-484.
- 217.- Satre, M., de Jerphanion, M.B., Huet, J. y Vignais, P. V. (1975) Biochim.Biophys.Acta 387, 241-255.
- 218.- Ebner, E. y Maier, K.L. (1977) J.Biol.Chem. 252, 671-676.
- 219.- Nieuwenhuis, F.J.R.M., Van de Drift, J.A.M., Voet, A. B. y Van Dam, K. (1974) Biochim.Biophys.Acta 368, 461-463.
- 220.- Nieuwenhuis, F.J.R.M. y Bakkenist, A.R.J. (1977) Biochim. Biophys.Acta 459, 596-604.
- 221.- Yamazaki, S., Takisawa, H., Tamaura, Y., Hirose, S. e Inada, Y. (1975) FEBS Lett. 56, 248-251.
- 222.- Van de Stadt, R.J., De Boer, B.L. y Van Dam, K. (1973)

- Biochim.Biophys.Acta 292, 338-349.
- 223.- Mileykovskaya, E.I., Tikhonova, G.V., Kondrashin, A.A. y Kozlov, I.A. (1976) Eur.J.Biochem. 62, 613-617.
- 224.- Selwyn, M.J. (1967) Biochem.J. 105, 279-288.
- 225.- Hilborn, D.A. y Hammes, G.G. (1973) Biochemistry 12, 983-990.
- 226.- Hammes, G.G. y Hilborn, D.A. (1971) Biochim.Biophys. Acta 233, 580-590.
- 227.- Hanson, R.L. y Kennedy, E.P. (1973) J.Bacteriol. 114, 772-781.
- 228.- Ebel, R.E. (1974) Fed.Proc.Abs. 33, 1399.
- 229.- Tzagoloff, A., McLennan, D.H. y Byington, K.H. (1968) Biochemistry 7, 1596-1602.
- 230.- Penefsky, H.S. (1974) en "The Enzymes" (Foyer, P.D., ed.) vol. X, pp. 375-394, Academic Press, New York.
- 231.- Russell, J., Jeng, S.J. y Guillory, R.J. (1976) Biochem. Biophys.Res.Commun. 70, 1225-1234.
- 232.- Catterall, W.A. y Pedersen, P.L. (1972) J.Biol.Chem. 247, 7969-7976.
- 233.- Penefsky, H.S. (1974) J.Biol.Chem. 249, 3579-3585.
- 234.- Yeates, R.A. (1974) Biochim.Biophys.Acta 333, 173-179.
- 235.- Abrams, A., Nolan, E.A., Jensen, C. y Smith, J.B. (1973) Biochem.Biophys.Res.Commun. 55, 22-29.
- 236.- Adolfsen, R. y Moudrianakis, E.N. (1973) Biochemistry 12, 2926-2933.
- 237.- Ferguson, S.J., Lloyd, W.J., Lyons, M.H. y Radda, G. K. (1975) Eur.J.Biochem. 54, 117-126.
- 238.- Marcus, F., Schuster, S.M. y Lardy, H.A. (1976) J.Biol.Chem. 251, 1775-1780.

- 239.- Frigeri, L., Galante, Y.M., Hanstein, W.G. y Hatofi, Y. (1977) J.Biol.Chem. 252, 3147-3152.
- 240.- Frigeri, L., Galante, Y.M. y Hatofi, Y. (1978) J.Biol. Chem. 253, 8935-8940.
- 241.- Kohlbrenner, W.E. y Cross, R.L. (1978) J.Biol.Chem. 253, 7609-7611.
- 242.- Pougeois, R., Satre, M. y Vignais, P.V. (1978) Biochemistry 17, 3018-3023.
- 243.- Penefsky, H.S. (1967) J.Biol.Chem. 242, 5789-5795.
- 244.- Ting, L.P. y Wang, J.H. (1980) J.Bioenerg.Biomembr. 12, 79-93.
- 245.- Ting, L.P. y Wang, J.H. (1980) Biochemistry 19, 5665-5670.
- 246.- Mitchell, P. y Moyle, J. (1971) Bioenerg. 2, 1.
- 247.- Schuster, S.M., Ebel, R.E. y Lardy, H.A. (1975) J.Biol.Chem. 250, 7848-7853.
- 248.- Yount, R.G. (1975) en "Advances in Enzymology" (Meister, A., ed.) vol. 43, pp. 1-56, John Wiley & Sons, New York.
- 249.- Pedersen, P.L. (1975) Biochem.Biophys.Res.Commun. 64, 610-616.
- 250.- Lang, D.R. y Racker, E. (1974) Biochim.Biophys.Acta 333, 180-186.
- 251.- Robertson, A.M., Beechey, R.B., Holloway, C.T. y Knight, I.G. (1967) Biochem.J. 104, 54c.
- 252.- Douglas, M.G., Koh, Y., Ebner, E., Agsteribbe, E. y Schatz, G. (1979) J.Biol.Chem. 254, 1335-1339.
- 253.- Dunn, S.D. y Futai, M. (1978) Fed.Proc. 37, 1518.
- 254.- Roveri, O.A. y Vallejos, R.H. (1974) Biochim.Biophys. Acta 333, 187-194.
- 255.- Ebel, R.E. y Lardy, H.A. (1975) J.Biol.Chem. 250, 191-

- 196.
- 256.- Moyle, J. y Mitchell, P. (1975) FEBS Lett. 56, 55-61.
- 257.- Cantley, L.C. y Hammes, G.G. (1973) Biochemistry 12, 4900-4904.
- 258.- Shoshan, V. y Shavit, N. (1979) Eur.J.Biochem. 94, 87-92.
- 259.- Harris, D.A., Gomez-Fernandez, J.C., Klungsøyr, L. y Radda, G.K. (1978) Biochim.Biophys.Acta 504, 364-383.
- 260.- Harris, D.A., Rosing, J., Van de Stadt, R.J. y Slater, E.C. (1973) Biochim.Biophys.Acta 314, 149-153.
- 261.- Rosing, J., Harris, D.A., Kemp, A., Jr. y Slater, E. C. (1975) Biochim.Biophys.Acta 376, 13-26.
- 262.- Harris, D.A., Radda, G.K. y Slater, E.C. (1977) Biochim. Biophys.Acta 459, 560-572.
- 263.- Garret, N.E. y Penefsky, H.S. (1975) J.Biol.Chem. 250, 6640-6647.
- 264.- Harris, D.A. (1978) Biochim.Biophys.Acta 463, 245-273.
- 265.- Penefsky, H.S. (1977) J.Biol.Chem. 252, 2891-2899.
- 266.- Kasahara, M. y Penefsky, H.S. (1978) J.Biol.Chem. 253, 4180-4187.
- 267.- Lardy, H.A., Connelly, J.L. y Johnson, D. (1964) Biochemistry 3, 1961-1968.
- 268.- Chang, T.M. y Penefsky, H.S. (1973) J.Biol.Chem. 248, 2746-2754.
- 269.- Hanstein, W.G. (1976) Biochim.Biophys.Acta 456, 129-148.
- 270.- Ferguson, S.J., Lloyd, W.J. y Radda, G.K. (1975) Eur. J.Biochem. 54, 127-133.
- 271.- Cantley, L.C. y Hammes, G.G. (1975) Biochemistry 14, 2968-2975.

- 272.- Adolfsen, R. y Moudrianakis, E.N. (1976) Arch.Biochem. Biophys. 172, 425-433.
- 273.- Godinot, C., Di Pietro, A. y Gautheron, D.C. (1975) FEBS Lett. 60, 250-255.
- 274.- Schuster, S.M., Reinhart, G.D. y Lardy, H.A. (1977) J.Biol.Chem. 252, 427-432.
- 275.- Kayalar, C., Rosing, J. y Boyer, P.D. (1977) J.Biol.Chem. 252, 2486-2491.
- 276.- Ryrie, I.J. y Jagendorf, A.T. (1971) J.Biol.Chem. 246, 3771-3774.
- 277.- McCarty, R.E., Pittman, P.R. y Tsuchiya, Y. (1972) J.Biol.Chem. 247, 3048-3051.
- 278.- McCarty, R.E. y Fagan, J. (1973) Biochemistry 12, 1503-1507.
- 279.- Smith, D.J. y Boyer, P.D. (1976) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 73, 4314-4318.
- 280.- Strotzman, H., Bickel, S. y Huchzermeyer, B. (1976) FEBS Lett. 61, 194-198.
- 281.- Magnusson, R.P. y McCarty, R.E. (1976) J.Biol.Chem. 251, 7417-7422.
- 282.- Cattell, K.J., Lindop, C.R., Knight, I.C. y Beechey, R. B. (1971) Biochem.J. 125, 169-177.
- 283.- Stekhoven, F.S., Waitkus, R.F. y Van Moerkerk, H.Th. B. (1972) Biochemistry 11, 1144-1150.
- 284.- Ryrie, I.J. y Gallagher, A. (1979) Biochim.Biophys.Acta 545, 1-14.
- 285.- Tsujita, Y. y Endo, A. (1977) Biochem.Biophys.Res. Commun. 74, 242-247.
- 286.- Ross, E. y Schatz, G. (1976) J.Biol.Chem. 251, 1997-2004.

- 287.- Wang, K. y Richards, F.M. (1974) *J.Biol.Chem.* 249, 8005-8018.
- 288.- Bragg, P.D. y Hou, C. (1980) *Eur.J.Biochem.* 106, 495-503.
- 289.- Rossi, C.R., Alexandre, A., Carignani, G. y Rossi, C.S. (1974) en "Membrane Proteins in Transport and Phosphorylation" (Azzone, G.F., Klingenberg, M., Quagliariello, E. y Siliprandi, N., eds.) pp. 171, Elsevier, North Holland, Amsterdam.
- 290.- Sugiyama, Y. y Mukohata, Y. (1978) *FEBS Lett.* 85, 211-214.
- 291.- Sugiyama, Y. y Mukohata, Y. (1978) *FEBS Lett.* 98, 276-280.
- 292.- Godinot, C., Penin, F. y Gautheron, D.C. (1979) *Arch. Biochem.Biophys.* 192, 225-234.
- 293.- Peters, H., Risi, S. y Dose, K. (1980) *Biochem.Biophys. Res.Comm.* 97, 1215-1219.
- 294.- Riordan, J.F., McElvany, K.D. y Borders, C.L., Jr. (1977) *Science* 195, 884-886.
- 295.- Serrano, R., Kanner, B. y Racker, E. (1976) *J.Biol. Chem.* 251, 2453-2461.
- 296.- Sadler, M.H., Hunter, D.R. y Haworth, R.A. (1974) *Biochem.Biophys. Res. Commun.* 59, 804-812.
- 297.- Soper, J.W., Decker, G.L. y Pedersen, P.L. (1979) *J.Biol.Chem.* 254, 11170-11176.
- 298.- Pick, U. y Racker, E. (1979) *J.Biol.Chem.* 254, 2793-2799.
- 299.- Foster, D.L. y Fillingame, R.H. (1979) *J.Biol.Chem.* 254, 8230-8236.
- 300.- Bengis-Garber, C. y Gromet-Elhanan, Z. (1979) *Biochem-*

- istry 18, 3577-3581.
- 301.- Müller, H.W., Scmitt, M., Schneider, E. y Dose, K. (1979) *Biochim.Biophys.Acta* 545, 77-85.
- 302.- Lee, S.H., Cohen, N.S. y Brodie, A.F. (1976) *Proc. Natl.Acad.Sci. USA* 73, 3050-3053.
- 303.- Friedl, P., Friedl, C. y Schirer, H.U. (1979) *Eur.J. Biochem.* 100, 175-180.
- 304.- Sebald, W., Graf, Th. y Lukins, H.B. (1979) *Eur.J. Biochem.* 93, 587-599.
- 305.- Fillingame, R.H. (1980) *Ann.Rev.Biochem.* 49, 1079-1113.
- 306.- Nelson, N., Eytan, E., Notsani, B., Sigrist, H., Sigrist-Nelson, K. y Gitler, C. (1977) *Proc.Natl.Acad.Sci USA* 74, 2375-2378.
- 307.- Criddle, R.S., Packer, L. y Shieh, P. (1977) *Proc. Natl.Acad.Sci. USA* 74, 4306-4310.
- 308.- Fillingame, R.H. (1975) *J.Bacteriol.* 124, 870-883.
- 309.- Sebald, W. y Wachter, E. (1978) en "Energy Conservation in Biological Membranes" (Schäfer, G. y Klingenberg, M., eds.) pp. 228-236, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- 310.- Hoppe, J. y Sebald, W. (1980) *Eur.J.Biochem.* 107, 57-65.
- 311.- Hoppe, J., Schairer, H.U. y Sebald, W. (1980) *Eur.J. Biochem.* 112, 17-24.
- 312.- Sebald, W., Machleidt, W. y Wachter, E. (1980) *Proc. Natl.Acad.Sci. USA* 77, 785-789.
- 313.- Hoppe, J., Schairer, H.U. y Sebald, W. (1980) *FEBS Lett.* 109, 107-111.
- 314.- Sebald, W. (1977) *Biochim.Biophys.Acta* 463, 1-27

- 315.- Okamoto, H., Sone, N., Hirata, H., Yoshida, K. y Kagawa, Y. (1977) *J.Biol.Chem.* 252, 6125-6131.
- 316.- Bullin, J.D., Cox, G.B. y Gibson, F. (1971) *Biochem. J.* 124, 75-81.
- 317.- Ishikawa, S. (1966) *J.Biochem.* 60, 598.
- 318.- Andreu, J.M. (1976) Tesis Doctoral "Estructura molecular del factor de acoplamiento de fosforilación oxidativa (ATPasa) de *Micrococcus lysodeikticus*". Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense. Madrid.
- 319.- Andreu, J.M., Albendea, J.A. y Muñoz, E. (1973) *Eur.J. Biochem.* 37, 505-515.
- 320.- Andreu, J.M., Carreira, J. y Muñoz, E. (1976) *FEBS Lett.* 65, 198-203.
- 321.- Carreira, J., Andreu, J.M., Nieto, M. y Muñoz, E. (1976) *Mol.Cell.Biochem.* 10, 67-76.
- 322.- Ayala, J., Nieto, M., Carreira, J. y Muñoz, E. (1976) *Eur.J.Biochem.* 66, 43-47.
- 323.- Carreira, J., Andreu, J.M. y Muñoz, E. (1977) *Biochim. Biophys.Acta* 492, 387-398.
- 324.- Ayala, J., Carreira, J., Nieto, M. y Muñoz, E. (1977) *Mol.Cell.Biochem.* 17, 17-23.
- 325.- Huberman, M. y Salton, M.R.J. (1979) *Biochim.Biophys. Acta* 547, 230-240.
- 326.- Lastras, M. y Muñoz, E. (1971) *FEBS Lett.* 14, 69-72.
- 327.- Lastras, M. y Muñoz, E. (1972) *FEBS Lett.* 21, 109-112.
- 328.- Lastras, M. y Muñoz, E. (1974) *J.Bacteriol.* 119, 593-601.
- 329.- Muñoz, C., Palacios, P. y Muñoz, E. (1977) *J.Bioenerg. Biomembr.* 9, 303-320.
- 330.- Carreira, J., Muñoz, E., Andreu, J.M. y Nieto, M. (1976) *Biochim.Biophys.Acta* 436, 183-189.

- 331.- Mollinedo, F. (1977) Tesina. "Sensibilidad a tripsina y comportamiento inmunológico de la adenosín-trifosfatasa de Micrococcus lysodeikticus". Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense. Madrid.
- 332.- Larraga, V., Mollinedo, F. y Muñoz, E. (1980) Curr. Microbiol. 3, 237-241.
- 333.- Salton, M.R.J., Schor, M.T. y Ng, M.H. (1972) Biochim. Biophys. Acta 290, 408-413.
- 334.- Oppenheim, J.D. y Salton, M.R.J. (1973) Biochim. Biophys. Acta 298, 297-322.
- 335.- Fukui, Y., Nachbar, M.S. y Salton, M.R.J. (1971) J. Bacteriol. 105, 86-92.
- 336.- Whiteside, T.L. y Salton, M.R.J. (1970) Biochemistry 9, 3034-3040.
- 337.- Salton, M.R.J. y Freer, J.H. (1965) Biochim. Biophys. Acta 107, 531-538.
- 338.- Fisher, L. (1971) en "An Introduction to Gel Chromatography" (Work, T.S. y Work, E., eds.) North Holland Publishing Co., Amsterdam.
- 339.- Andreu, J.M. y Muñoz, E. (1979) Biochemistry 18, 1836-1844.
- 340.- Davis, B.J. (1964) Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404-427.
- 341.- Ornstein, L. (1964) Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 321-349.
- 342.- Stark, G.R., Stein, W.H. y Moore, S. (1960) J. Biol. Chem. 235, 3177-3181.
- 343.- Weber, K. y Osborn, M. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4406-4412.
- 344.- Saphiro, A.L., Viñuela, E. y Malzel, J.V., Jr. (1967) Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 815-820.
- 345.- Dunker, A.K. y Rueckert, R.R. (1969) J. Biol. Chem. 244,

5074-5080.

- 346.- Fairbanks, G., Steck, T.L. y Wallach, D.F.H. (1971) *Biochemistry* 10, 2606-2617.
- 347.- Dietzel, W., Kopperschlager, C. y Hoffman, E. (1972) *Anal.Biochem.* 48, 617-620.
- 348.- Weinbaum, G. y Markman, R. (1966) *Biochim.Biophys. Acta* 124, 207-209.
- 349.- Dyson, J.E.D. y Noltman, E.A. (1968) *J.Biol.Chem.* 243, 1401-1414.
- 350.- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951), *J.Biol.Chem.* 193, 265-275.
- 351.- Murphy, J.B. y Kies, M.W. (1960) *Biochim.Biophys. Acta* 45, 382-384.
- 352.- Bates, R.J. (1973) en "Determination of pH Theory and Practics" p. 73, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- 353.- Clausen, J. (1969) en "Immunochemical Techniques for the Identification and Estimation of Macromolecules" (Work, T. S. y Work, E., eds.) North Holland/American Elsevier, Amsterdam, Oxford y New York.
- 354.- Brody, S. y Carlstrom, E. (1961) *Nature* 189, 841-842.
- 355.- Kessler, S.W. (1975) *J.Immunol.* 115, 1617-1624.
- 356.- Abraham, G.E. (1974) *Acta Endrocrinol.* 75, Suppl. 183, 1-41.
- 357.- Campbell, D.H., Garvey, J.S., Cremer, N.E. y Sussdorf, D.H. (1964) en "Methods in Immunology", pp. 118-149, W.A. Benjamin Inc., New York.
- 358.- Hunter, W.M. y Greenwood, F.C. (1962) *Nature* 194, 495-496.
- 359.- Greenwood, F.C. y Hunter, W.M. y Glover, J.S. (1963) *Biochem.J.* 89, 114-123.

- 360.- Glazer, A.N., DeLange, R.J. y Sigman, D.S. (1975) en "Chemical Modification of Proteins" (Work, T.S. y Work, E., eds.) pp. 99-101, North-Holland/American Elsevier, Amsterdam, Oxford y New York.
- 361.- Covelli, I. y Wolff, J. (1966) *J.Biol.Chem.* 241, 4444-4451.
- 362.- Thiers, R.E. (1957) en "Methods of Biochemical Analysis" (Glick, D., ed.) vol. 5, pp. 273-335, Interscience Pub. Inc., New York.
- 363.- Pande, S.V. (1976) *Anal.Biochem.* 74, 25-34.
- 364.- Cleland, W.W. (1964) *Biochemistry* 3, 480-482.
- 365.- Muñoz, E., Palacios, P., Marquet, A. y Andreu, J.M. (1980) *Mol.Cell.Biochem.* 33, 3-12.
- 366.- Abrams, A., Jensen, C. y Morris, D. (1975) *J.Supramol. Struct.* 3, 261-274.
- 367.- Reynolds, J.A. y Tanford, Ch. (1970) *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 66, 1002-1007.
- 368.- Reynolds, J.A. y Tanford, Ch. (1970) *J.Biol.Chem.* 245, 5161-5165.
- 369.- Visser, L. y Blout, E.R. (1971) *Biochemistry* 10, 743-752.
- 370.- Turzynski, G.P. y Warren, L. (1975) *Anal.Biochem.* 67, 55-65.
- 371.- Lenard, J. (1971) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 45, 662-668.
- 372.- Weber, K. y Kuter, D.J. (1971) *J.Biol.Chem.* 246, 4504-4509.
- 373.- Kapp, O.H. y Vinogradov, S.N. (1978) *Anal.Biochem.* 91, 230-235.
- 374.- Adelstein, S.J. y Vallee, B.L. (1959) *J.Biol.Chem.* 234, 824-828.

- 375.- Plocke, D.J. y Vallee, B.L. (1962) *Biochemistry* 1, 1039-1043.
- 376.- Kadner, R.J. y Nyc, J.F. (1969) *J.Biol.Chem.* 244, 5125-5130.
- 377.- Vallee, B.L. y Wacker, W.E.C. (1970) en "The Proteins" (Neurath, H., ed.) vol. 5, pp. 129-146, Academic Press, New York & London.
- 378.- Coombs, T.L., Felber, J.-P. y Vallee, B.L. (1962) *Biochemistry* 1, 899-905.
- 379.- Scatchard, G. (1949) *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 51, 660-672.
- 380.- Verheijen, J.S. (1980) Tesis Doctoral. "The H⁺-ATPase complex of *Escherichia coli*". Universidad de Amsterdam.
- 381.- Zacharius, R.M., Zell, T.E., Morrison, J.M. y Woodlock, J.J. (1969) *Anal.Biochem.* 30, 148.
- 382.- Leach, B.S., Collawn, J.F., Jr. y Fish, W.W. (1980) *Biochemistry* 19, 5734-5741.
- 383.- Carreira, J., Leal, J.A., Rojas, M. y Muñoz, E. (1973) *Biochim.Biophys.Acta* 307, 541-556.
- 384.- Mollinedo, F., Larraga, V., Coll, F.J. y Muñoz, E. (1980) *Biochem.J.* 186, 713-723.
- 385.- Larraga, V., Mollinedo, F., Rubio, N. y Muñoz, E. (1981) *Biochem.J.* 193, 729-735.
- 386.- Mollinedo, F. y Larraga, V. (1981) II Congreso de la Federación Española de Biología Experimental, P 46, p. 51, Universidad Autónoma de Madrid.
- 387.- Muñoz, C. y Muñoz, E. (1980) *Arch.Biochem.Biophys.* 204, 371-378.
- 388.- Rivas, L., Marquet, A. y Muñoz, E. (1981) Sometido para publ.
- 389.- Risi, S., Höckel, M., Hulla, F.W. y Dose, K. (1977)

- Eur.J.Biochem. 81, 103-109.
- 390.- Andreu, J.M. (1978) Fundación Juan March. Serie Universitaria, nº 65, Madrid.
- 391.- Satav, J.G., Johnston, R.F., Monk, B. y Criddle, R.S. (1980) Arch.Biochem.Biophys. 199, 110-116.
- 392.- Muñoz, E. (1981) Ciên.Biol. 6, 39-66.
- 393.- Larraga, V., Mollinedo, F. y Muñoz, E. (1981) Curr. Microbiol. (en prensa).
- 394.- Chard, T. (1978) en "Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques" (Work, T.S. & Work, E., eds.) pp. 440-445, North-Holland, Amsterdam, New York & Oxford.
- 395.- Dunn, S.D. y Futal, M. (1980) J.Biol.Chem. 255, 113-118.
- 396.- Ohta, S., Nakanishi, M., Tuboi, M., Yoshida, M. y Kagawa, Y. (1978) Biochem.Biophys.Res.Commun. 80, 929-935.
- 397.- Maeda, M., Kobayashi, H., Futal, M. y Anraku, Y. (1976) Biochem.Biophys.Res.Commun. 70, 228-234.
- 398.- Smith, J.B. y Wilkowski, C. (1978) Fed.Proc., Fed.Am. Soc.Exp.Biol. 37, 1521.
- 399.- Futal, M., Kanazawa, H., Takeda, K. y Kagawa, Y. (1980) Biochem.Biophys.Res.Commun. 96, 227-234.
- 400.- Dunn, S.D. y Heppel, L.A. (1979) Fed.Proc., Fed.Am. Soc.Exp.Biol. 38, 455.
- 401.- Mukohata, Y., Nakabayashi, S. y Higashida, M. (1978) FEBS Lett. 85, 215-218.
- 402.- Satre, M., Lunardi, J., Pougeois, R. y Vignais, P.V. (1979) Biochemistry 18, 3134-3140.
- 403.- Pougeois, R., Satre, M. y Vignais, P.V. (1979) Biochemistry 18, 1408-1413.

- 404.- Verheijen, J.H., Postma, P.W. y Van Dam, K. (1978)
Biochim.Biophys.Acta 502, 345-353.
- 405.- Scheurich, P., Schafer, H.-J. y Dose, K. (1978) Eur.
J.Biochem. 88, 253-257.
- 406.- Wagenwoord, R.J., van der Kraan, I. y Kemp, A. (1977)
Biochim.Biophys.Acta 460, 17-24.
- 407.- Wagenwoord, R.J., van der Kraan, I. y Kemp, A. (1979)
Biochim.Biophys.Acta 548, 85-95.
- 408.- Lunardi, J., Lauquin, G.J.M. y Vignais, P.V. (1977)
FEBS Lett. 80, 317-323.
- 409.- Budker, V.G., Kozlov, I.A., Kurbatov, V.A. y Milgrom,
Y.M. (1977) FEBS Lett. 83, 11-14.
- 410.- Esch, F.S. y Allison, W.S. (1978) J.Biol.Chem. 253,
6100-6106.
- 411.- Dunn, S.D. y Futai, M. (1980) J.Biol.Chem. 255, 113-
118.
- 412.- Dunn, S.D. (1980) J.Biol.Chem. 255, 11857-11860.
- 413.- Kanazawa, H., Saito, S. y Futai, M. (1978) J.Biochem.
84, 1513-1517.
- 414.- Ohta, S., Tsuboi, M., Yoshida, M. y Kagawa, Y. (1980)
Biochemistry 19, 2160-2165.
- 415.- Nieto, M. y Ayala, J.A. (1977) Biochem.J. 161, 321-331.
- 416.- Pivel, J.P., Muñoz, E. y Marquet, A. (1980) Biochem.
Int. 1, 377-385.
- 417.- Muñoz, E., Andreu, J.M., Carreira, J., Larraga, V.,
Marquet, A., Mollinedo, F., Nieto, M. y Pivel, J.P.
(1980) en "First Eur. Bioenerg. Conference", pp. 163-
164., Patron editore, Bologna.
- 418.- Lunardi, J., Satre, M. y Vignais, P.V. (1981) Biochemis-
try 20, 473-480.

- 419.- Lägel, P.P. (1979) Arch.Biochem.Biophys. 192, 474-481.
- 420.- Santiago, E., López-Moratalla, N., López-Zabalza, M.J., Iriarte, A.J. y Huamán, J. (1979) Rev.Esp.Fisiol. 35, 201-208.
- 421.- Rosen, G., Gresser, M., Vinkler, C. y Boyer, P.D. (1979) J.Biol.Chem. 254, 10654-10661.
- 422.- Gresser, M., Rosen, G. y Boyer, P.D. (1980) en "First Eur. Bioenerg. Conference", pp. 203-204, Patron editore, Bologna.
- 423.- Lazdunski, M. (1972) Curr.Top.Cell.Regul. 6, 267-310.
- 424.- López-Moratalla, N., Santiago, E., Iriarte, A.J. y López-Zabalza, M.J. (1978) Rev.Esp.Fisiol. 34, 473-476.
- 425.- Druza, V.L., Kozlov, I.A., Milgrom, Y.M., Shabarova, Z.A. y Sokolova, N.I. (1979) Biochem.J. 182, 617-619.
- 426.- Abrams, A. y Baron, C. (1968) Biochemistry 7, 501-507.
- 427.- Bragg, P.D. y Hou, C. (1978) Can.J.Biochem. 56, 559-564.
- 428.- Bragg, P.D. y Hou, C. (1979) FEBS Lett. 103, 12-16.
- 429.- Leimgruber, R.M., Jensen, C. y Abrams, A. (1978) Biochem.Biophys.Res.Commun. 81, 439-447.
- 430.- Ritz-Gold, C.J., Gold, C.M. y Brodie, A.F. (1979) Biochim.Biophys.Acta 547, 1-17.
- 431.- Dunn, S.D., Heppel, L.A. y Fullmer, C.S. (1980) J.Biol.Chem. 255, 6891-6896.
- 432.- Smith, J.B. y Sternweis, P.C. (1977) Biochemistry 16, 306-311.
- 433.- Bragg, P.D. y Hou, C. (1976) Biochem.Biophys.Res. Commun. 72, 1042-1048.
- 434.- Mollinedo, F., López-Moratalla, N., Pivel, J.P., Larraga, V., Santiago, E. y Muñoz, E. (1981) Eur.J.Biochem. (en

prensa).

- 435.- Sun, I.L. y Crane, F.L. (1975) *Biochem.Biophys.Res. Commun.* 65, 1334-1342.
- 436.- Senior, A.E., Richardson, L.V., Baker, K. y Wise, J. G. (1980) *J.Biol.Chem.* 255, 7211-7217.
- 437.- Senior, A.E. (1979) *J.Biol.Chem.* 254, 11319-11322.
- 438.- Phelps, D.C., Nordenbrand, K., Hundall, T., Carlsson, C., Nelson, B.D. y Ernster, L. (1975) en "Electron Transfer Chains and Oxidative Phosphorylation" (Quagliariello, E., Papa, S., Palmeri, F., Slater, E.C. y Siliprandi, N., eds.) pp. 385-400, North-Holland Publishing, Amsterdam.
- 439.- Santiago, E., López-Moratalla, N., Huamán, J., López-Zabalza, M.J. e Iriarte, A.J. (1978) *Rev.Esp.Fisiol.* 34, 477-480.
- 440.- Santiago, E. y López-Moratalla, N. (1978) *Rev.Esp.Fisiol.* 34, 481-490.
- 441.- Phelps, D.C. y Crane, F.L. (1974) *Biochem.Biophys.Res. Commun.* 61, 671-676.
- 442.- Bering, C.L., Jr., Ditley, R.A. y Crane, F.L. (1975) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 63, 736-741.
- 443.- Sun, I.L., Phelps, D.C. y Crane, F.L. (1975) *FEBS Lett.* 54, 253-258.
- 444.- Plocke, D.J. y Vallee, B.L. (1962) *Biochemistry* 1, 1039-1043.
- 445.- Simpson, R.T. y Vallee, B.L. (1968) *Biochemistry* 7, 4343-4350.
- 446.- Anderson, R.A., Bosron, W.F., Kennedy, F.S. y Vallee, B.L. (1975) *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 72, 2989-2993.
- 447.- Valentine, J.S., Pantoliano, M.W., McDonnell, P.J., Bur-

- ger, A.R. y Lippard, S.J. (1979) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 76, 4245-4249.
- 448.- Mollinedo, F., Larraga, V. y Muñoz, E. (1980) I Congreso Luso-Espanhol de Bioquímica, P 7, p. 108, Universidade de Coimbra.
- 449.- Hackney, D.D. (1979) Biochem.Biophys.Res.Comm. 91, 233-238.
- 450.- Penin, F., Godinot, C. y Gautheron, D.C. (1979) Biochim. Biophys.Acta 548, 63-71.
- 451.- Amzel, L.M. y Pedersen, P.L. (1978) J.Biol.Chem. 253, 2067-2069.
- 452.- Satre, M. y Zaccal (1979) FEBS Lett. 102, 244-248.
- 453.- Bagshaw, C.R. y Trentham, D.R. (1974) Biochem.J. 141, 331-349.
- 454.- Mollinedo, F. y Muñoz, E. (1981) II Congreso de la Federación Española de Biología Experimental, P 277, p. 199, Universidad Autónoma. Madrid.
- 455.- Ratanabanangkoon, K., Dixon, J.F. y Hokin, L.E. (1973) Arch.Biochem.Biophys. 156, 342-349.
- 456.- Skou, J.Chr. (1975) Q.Rev.Biophys. 7, 401-434.
- 457.- Giotta, G.J. (1976) Biochem.Biophys.Res.Comm. 71, 776-782.
- 458.- Jean, D.H. y Albers, R.W. (1977) J.Biol.Chem. 252, 2450-2451.
- 459.- Ahmed, K. (1981) en "Advanced Cell Biology" (Schwartz, L.M. y Azar, M.M., eds.) pp. 433-440, Van Nostrand Reinhold Co., New York.
- 460.- Dahl, J.L. y Hokin, L.E. (1974) Ann.Rev.Biochem. 43, 327-356.
- 461.- Martonosi, A. y Halpin, R.A. (1971) Arch.Biochem.Biophys.

144, 66-77.

- 462.- Shamo, A.E. y MacLennan, D.H. (1974) Proc.Natl.Acad. Sci.USA 71, 3522-3526.
- 463.- MacLennan, D.H., Seeman, P., Iles, G.H. y Yip, C.C. (1971) J.Biol.Chem. 246, 2702-2710.
- 464.- Racker, E. y Eytan, E. (1975) J.Biol.Chem. 250, 7533-7534.
- 465.- Stewart, P.S., MacLennan, D.H. y Shamo, A.E. (1976) J.Biol.Chem. 251, 712-719.
- 466.- Racker, E. y Stoeckenius, W. (1974) J.Biol.Chem. 249, 662-663.
- 467.- Carvalho, A.P. (1980) Ciên.Biol. 5, 211-240.
- 468.- de Meis, L. y Vianna, A.L. (1979) Ann.Rev.Biochem. 48, 275-292.
- 469.- Celada, F. y Strom, R. (1972) Q.Rev.Biophys. 5, 395-425.
- 470.- Bernheimer, A.W. (1974) Biochim.Biophys.Acta 344, 27-50.
- 471.- Gregory, R. y Hess, B. (1981) FEBS Lett. 129, 210-214.
- 472.- Madeira, V.M.C. (1980) Ciên. Biol. 5, 245-272.
- 473.- Chappell, J.B. (1977) Carolina Biology Readers (Head, J.J., ed.) nº 50, Supply Company, Burlington, North Carolina.
- 474.- Panet, R., Pick, U. y Selinger, Z. (1971) J.Biol.Chem. 246, 7349-7356.
- 475.- Lowey, S. y Risby, D. (1971) Nature 191, 81.
- 476.- Rosing, J., Kayalar, C. y Boyer, P.D. (1977) J.Biol. Chem. 252, 2478-2485.
- 477.- Criddle, R.S., Johnston, R.F. y Stack, R.J. (1979) Curr.Top.Bioenerg. 9, 89-145.

- 478.- Hackney, D.D. y Boyer, P.D. (1978) J.Biol.Chem. 253,
3164-3170.
- 479.- Schneider, D.L. (1977) J.Membrane Biol. 34, 247-261.
- 480.- De Renzis, G. y Bornancin, M. (1977) Biochim.Biophys.
Acta 467, 192-207.
- 481.- Wicbelhaus, V.D., Sung, C.P., Helander, H.F., Shah, G.,
Blum, A. y Sachs, G. (1971) Biochim.Biophys.Acta 241,
49-56.

