

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Estudio sobre la biosíntesis y propiedades alotópicas del
factor de acoplamiento de fosforilación oxidativa (ATPasa)
de *Micrococcus Lysodeikticus***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Carmen Muñoz Sanz

Madrid, 2015

T 576.314
MUÑ
est



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE BIOLOGIA

ESTUDIO SOBRE LA BIOSINTESIS Y PROPIEDADES ALOTOPICAS DEL
FACTOR DE ACOPLAMIENTO DE FOSFORILACION OXIDATIVA (ATPasa)
DE MICROCOCCUS LYSODEIKTICUS

MEMORIA

que para optar al grado de
Doctor en Ciencias Biológicas
presenta

CARMEN MUÑOZ SANZ

MADRID, 1977



R. 23.060



Al término de mi tesis doctoral quiero expresar mi agradecimiento al Dr. D. Emilio Muñoz por su dirección, al Instituto de Inmunología y Biología Microbiana y a la Formación del Personal Investigador por su ayuda económica. Deseo asimismo agradecer al Profesor D. Angel M. Municio el haber aceptado amablemente la ponencia de esta tesis

ABREVIATURAS

- ADN = ácido desoxirribonucleico
- ADP = adenosíndifosfato
- AMP = adenosínmonofosfato
- ARN = ácido ribonucleico
- ATP = adenosítrifosfato
- ATPasa = adenosítrifosfatasa
- BF₁ = factor de acoplamiento de fosforilación (ATPasa)
bacteriano
- CAP = cloranfenicol
- CF₁ = factor de acoplamiento de fosforilación de cloroplastos
- CL = cardiolipina
- DCCD= diciclohexilcarbodiimida
- DSS = dodecilsulfato sódico
- DTT = ditiotreitól
- EDTA= etilendiamina tetraacetato sódico
- F₁ = factor de acoplamiento de fosforilación de mitocondrias
- OSCP= proteína que confiere sensibilidad a oligomicina
- PAGE= electroforesis en gel de poliacrilamida

PC = fosfatidilcolina

PE = fosfatidiletanolamina

PG = fosfatidilglicerol

P_i = fosfato inorgánico, PO₄H⁼

Tris= trishidroximetilaminometano

INDICE

Pág.

1. <u>INTRODUCCION</u>	1
1.1 <u>Organización de las membranas y biogénesis</u>	1
1.1.1 Organización de las proteínas y lípidos en las membranas	4
- Características de las proteínas de membrana..	4
- Componentes lipídicos. Fluidez y movilidad....	7
1.1.2 Biogénesis de las membranas.....	8
- Integración de las proteínas hidrofóbicas y complejos enzimáticos.....	8
- Sitios de integración de las membranas.....	12
- Integración de los lípidos.....	15
1.2 <u>Estudio de los factores de acoplamiento de la fosforilación (ATPasas)</u>	17
1.2.1 Estructura. Métodos de solubilización y puri- ficación.....	18
1.2.2 Propiedades moleculares: microscopía elec- trónica, peso molecular, subunidades, este- quiometría y composición química.....	20
1.2.3 Propiedades catalíticas. Inhibidores.....	24
1.2.4 Papel de los fosfolípidos en relación a los factores de acoplamiento.....	30

	<u>Pág.</u>
1.2.5 Reconstitución del complejo enzima-membrana.	34
1.2.6 Fijación de adeninnucleotidos.....	36
1.2.7 ATPasa de <u>Micrococcus lysodeikticus</u>	43
1.3 <u>Biosíntesis de ATPasas en mitocondrias, cloroplastos y bacterias</u>	48
2. <u>MATERIALES Y METODOS</u>	58
2.1 <u>Reactivos</u>	58
2.2 <u>Microorganismo</u>	58
2.3 <u>Medios de cultivo</u>	59
2.3.1 Medio complejo (PWYE).....	59
2.3.2 Medio definido de sales.....	59
2.4 <u>Crecimiento</u>	60
2.5 <u>Preparación de membranas y obtención del enzima crudo</u>	61
2.6 <u>Valoración de la actividad ATPasa</u>	63
2.7 <u>Determinación de proteína</u>	65
2.8 <u>Electroforesis en gel de poliacrilamida</u>	65
2.8.1 PAGE analítica en condiciones nativas.....	65
2.8.2 PAGE analítica en condiciones de disociación	66
2.8.3 Reacción histoquímica de la ATPasa.....	67

	<u>Pág.</u>
2.9 <u>Purificación del enzima soluble</u>	68
2.9.1 Cromatografía en columna.....	68
2.9.2 Electroforesis preparativa.....	69
2.10 <u>Localización de isótopos en los geles</u>	70
2.11 <u>Extracción de nucleotidos</u>	71
2.11.1 Fraccionamiento inicial con ácido tricloroa cético.....	71
2.11.2 Adsorción en carbón activo.....	72
2.12 <u>Identificación de nucleotidos</u>	72
2.13 <u>Cuantificación del ATP</u>	73
2.13.1 Intercambio del ATP endógeno de la ATPasa por nucleotidos externos.....	76
2.14 <u>Extracción de lípidos</u>	77
2.15 <u>Identificación de fosfolípidos</u>	78
2.15.1 Identificación específica del fosfatidilgli- cerol.....	79
2.16 <u>Reconstitución del complejo enzima-membrana</u> ..	80
3. <u>RESULTADOS</u>	82
3.1 <u>Caracterización enzimática de la ATPasa soluble de <u>M. lysodeikticus</u></u>	82

	<u>Pág.</u>
3.1.1 Efecto de la tripsina sobre la ATPasa soluble.....	83
3.1.2 Efecto del Ca^{2+} sobre la ATPasa soluble. Influencia de la tripsina y/o calcio en los <u>pa</u> <u>rámetros</u> cinéticos del enzima.....	86
3.1.3 Efecto de la diciclohexilcarbodiimida y atebri brina como posibles inhibidores de la ATPasa soluble de <u>M. lysodeikticus</u>	90
3.2 <u>Reconstitución del complejo enzima-membrana...</u>	94
3.3 <u>Estudio de los componentes no peptídicos aso-</u> <u>ciados a BF_1 de <u>M. lysodeikticus</u>. Detección e</u> <u>identificación de adeninnucleotidos</u>	95
3.3.1 Aislamiento de la ATPasa de <u>M. lysodeikticus</u> crecida en ^{32}P ortofosfato.....	95
3.3.2 Identificación de los nucleotidos marcados con ^{32}P asociados con BF_1	97
3.3.3 Determinación enzimática del ATP fuertemente unido a las preparaciones de BF_1	98
3.3.4 Intercambio del ATP endógeno unido a la ATPasa con nucleotidos externos.....	100

3.4	<u>Estudio de los componentes no peptídicos asociados a BF₁ de <u>M. lysodeikticus</u>. Confirmación de la ausencia de fosfolípidos firmemente unidos a la molécula de ATPasa.....</u>	101
3.4.1	Identificación de fosfolípidos asociados con la ATPasa soluble y con las membranas residuales.....	103
3.4.2	Efecto de los fosfolípidos en la actividad hidrolítica de BF ₁	104
3.5	<u>Biosíntesis de BF₁ de <u>M. lysodeikticus</u>.....</u>	104
3.5.1	Síntesis de BF ₁ en relación con la síntesis de proteínas citoplásmicas y de las membranas.....	106
3.5.2	Biosíntesis de las subunidades de BF ₁	107
3.5.3	Efecto de la cerulenina sobre la síntesis de la ATPasa de <u>M. lysodeikticus</u>	111
4.	<u>DISCUSION</u>	114
4.1	<u>Propiedades alotópicas de la ATPasa soluble de <u>M. lysodeikticus</u>.....</u>	114
4.2	<u>Reconstitución del complejo enzima-membrana....</u>	124

	<u>Pág.</u>
4.3 <u>Nucleotidos fijados a BF₇ de <u>M. lysodeikticus</u>.</u>	127
4.4 <u>Papel de los fosfolípidos en la ATPasa de <u>M.</u></u> <u>lysodeikticus</u>	132
4.5 <u>Estudio molecular de la biosíntesis de BF₇ de</u> <u>M. lysodeikticus. Efecto de la cerulenina</u>	135
5. <u>CONCLUSIONES</u>	146
6. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	149

1 INTRODUCCION

1.1 Organización de las membranas y biogénesis.

La existencia de la membrana plasmática quedó definitivamente fuera de duda a principios de siglo gracias a los experimentos de Chambers (1) y Plowe (2). Esta existencia, junto con la de los sistemas membranosos internos es un fundamento básico de la biología celular.

El concepto de la organización de la membrana ha pasado por muy diversas vicisitudes. Ya Overton había indicado a finales del siglo pasado que las moléculas lipídicas y el colesterol debían ser partes integrantes de la envoltura celular (3), pero la primera aportación interesante no llegó hasta 1925 en que Gorter y Grendel (4) extrajeron los lípidos de eritrocitos y los extendieron sobre una superficie acuosa formando una monocapa. Al comparar la superficie de la monocapa con la del eritrocito dedujeron que los lípidos extraídos debían formar una bicapa en la membrana celular. Esta idea fue corroborada por Danielli y Davson, que en 1935 (5) propusieron un modelo consistente en dos capas lipídicas enfrentadas por sus cadenas hidrocarbonadas, dejando así una zona interna con interacciones

hidrofóbicas y permitiendo a la parte polar de los lípidos interacciones electrostáticas con dos capas de proteínas: una interior en contacto con el citoplasma y otra exterior. Una posterior revisión de este modelo (6) admitió la existencia de poros de naturaleza proteica que atravesarían la membrana, dando así una solución a las dificultades del transporte.

A raíz de la aparición de las técnicas de microscopía electrónica, Robertson (7, 8, 9, 10) propuso el concepto de membrana unidad que presentaba gran analogía con el modelo de Danielli; la principal aportación consistía en considerar asimétrica a la membrana, con glucoproteínas en la cara externa, y proteínas no conjugadas en la interna.

Hasta aquí todos los modelos implicaban serias dificultades termodinámicas y tenían el defecto de no considerar a la membrana como sitio de reacciones enzimáticas integradas, aparte de los problemas del control celular de la biosíntesis.

Los estudios de solubilización y purificación de enzimas y su posterior recombinación con la membrana, así como los resultados obtenidos con la microscopía electrónica

(tinción negativa, criocorrosión), marcaje específico, cinética de actividades enzimáticas asociadas, tensión superficial, calorimetría diferencial, espectroscopía (infrarrojos, dicroísmo circular), estudio de interacciones no covalentes (hidrofilicas e hidrofóbicas) entre los componentes de la membrana y la búsqueda de estructuras termodinámicamente favorables condujeron en principio al modelo de Benson (11) y más tarde al modelo de mosaico fluido de Singer (12, 13) que presenta los siguientes puntos fundamentales:

- las estructuras de los lípidos y proteínas son anfipáticas, es decir, poseen una zona polar (hidrofilica) y una apolar (hidrofóbica).
- la distribución es asimétrica, con las glucoproteínas en la cara externa de la membrana.
- los lípidos forman la base del mosaico, presentando una estructura de bicapa con las cadenas parafínicas enfrentadas, lo que origina una zona hidrofóbica a lo largo de la membrana.
- la interacción proteína-proteína tiene gran importancia en la estructura del mosaico.

- la penetración de las proteínas en el interior de la bicapa depende de la secuencia de aminoácidos y de su conformación, siendo tanto mayor cuanto mayor sea su región hidrofóbica.
- las proteínas estarían como "flotando en un mar de lípidos".

Este modelo ha sido ampliado y revisado extensamente (cabe destacar la revisión de Capaldi y Green (14)) pero en general se han mantenido sus puntos básicos y actualmente es el que más se aproxima a la organización de la membrana "in vivo".

1.1.1 Organización de las proteínas y lípidos en las membranas.

Las membranas celulares difieren ampliamente en su morfología, funciones específicas e incluso en sus componentes moleculares. No obstante, hay ciertos principios generales que pertenecen a todas las membranas ya sean de origen eucariótico o procariótico.

- Características de las proteínas de membrana.

Las proteínas constituyen la mayor fracción en peso de la mayoría de las membranas funcionales (15). A pesar de la gran heterogeneidad proteica que existe en las membranas individuales, dichas proteínas pueden clasificarse dentro de dos tipos generales: intrínsecas y extrínsecas (16), o según otra denominación, integrales y periféricas (13). Los criterios experimentales para esta clasificación vienen resumidos en la Tabla I. Aunque la distinción entre ambos tipos de proteínas es empírica y sujeta a críticas, es interesante ya que nos suministra información sobre la arquitectura de la membrana. Más significativas que las diferencias en extractibilidad lo son las propiedades que se derivan de su solubilidad en agua y su capacidad de combinación con lípidos. Cuando las proteínas extrínsecas se liberan de su entorno membranoso se comportan como típicas proteínas citosólicas solubles en agua, lo que no les confiere capacidad de unión con lípidos. Las proteínas intrínsecas son extremadamente hidrofóbicas formando soluciones estables con el agua únicamente en presencia de detergentes y poseen la importante propiedad de combinarse con fosfolípidos dando origen a estructuras membranosas. Estas observaciones demuestran, aunque indirectamente, que solo

TABLA I: Criterios que distinguen las proteínas integrales de las periféricas.

Propiedad	Proteínas periféricas o extrínsecas	Proteínas integrales o intrínsecas
Requerimientos para su disociación de la membrana	Tratamientos suaves: alta fuerza iónica, agentes quelantes	Agentes que rompan los enlaces hidrofóbicos: detergentes, solventes orgánicos, agentes caotrópicos
Asociación con lípidos en su estado soluble	Generalmente libre de lípidos	Generalmente asociada a lípidos
Solubilidad después de la disociación de la membrana	Soluble y dispersa molecularmente en tampones acuosos neutros	Insoluble o agregada en tampones acuosos neutros

las proteínas intrínsecas interaccionan con la bicapa lipídica mientras que las extrínsecas están probablemente unidas a las membranas mediante enlaces proteína-proteína. De acuerdo con esto se ha supuesto que para la integridad estructural de la membrana son necesarias únicamente las proteínas intrínsecas.

Alrededor del 70-80% de las proteínas de membranas son intrínsecas o integrales. Ejemplo de ellas son la rodopsina que penetra profundamente en la bicapa lipídica (17, 18, 19, 20), tres de los siete polipéptidos del complejo citocromo oxidasa mitocondrial (21), la glucoproteína mayoritaria del eritrocito humano (glucoforina) que puede ser marcada por ambos lados de la membrana (22, 23), la proteína de la membrana plasmática de Halobacterium halobium (24) y los polipéptidos que constituyen la pieza basal del complejo ATPasa sensible a oligomicina de la membrana mitocondrial interna (25). Entre las proteínas extrínsecas conocidas podemos citar los componentes F_1 y OSCP del complejo ATPasa mitocondrial (26), el citocromo c de la membrana interna de la mitocondria (27), la espectrina de eritrocitos (28) y la proteína básica de la mielina (29).

- Componentes lipídicos. Fluidez y movilidad.

Una de las características comunes de las membranas biológicas es la presencia de una serie anfipática de moléculas llamadas fosfolípidos, pero que en casos especiales pueden ser sulfolípidos o lipopolisacáridos. Interaccionando por sus extremos apolares forman la capa bidimensional que ocupa el plano de la membrana. Los estudios físicos recientes han ampliado la información que se poseía acerca del estado de los fosfolípidos en la bicapa. De especial interés en lo que a la biogénesis se refiere es el hecho de que los fosfolípidos mantengan una considerable movilidad en la bicapa y por tanto la membrana, lejos de ser una estructura estática, es altamente dinámica (30). Esto significa en primer lugar que la bicapa está sujeta a perturbaciones locales, lo que puede proporcionar un mecanismo mediante el cual se introduzca nuevo material dentro de la estructura preexistente. En segundo lugar, las moléculas individuales de lípidos no sólo tienen libertad de movimiento respecto a las moléculas inmediatas, sino que pueden también difundirse lateralmente a través de la bicapa. Finalmente, la noción de una fase lipídica móvil implica un cierto grado de latitud en la membrana con respecto a la rela-

ción cuantitativa de los componentes lípidicos y proteicos.

Estudiando proteínas de membrana se ha demostrado que no todos los lípidos son igualmente fluidos. Cuando la citocromo oxidasa se titula con concentraciones crecientes de fosfolípidos, los lípidos inicialmente unidos (0,2 mg/mg proteína) presentan poco movimiento en sus cadenas laterales de ácidos grasos (31). Aquellos que exceden esta concentración empiezan a mostrar las características de una bicapa fluida. A la porción inmóvil de fosfolípidos se la denomina "lípidos limítrofes" y representan un componente que está directamente unido a las proteínas hidrofóbicas formando una fase intermedia entre las proteínas y la bicapa lipídica.

1.1.2 Biogénesis de las membranas.

Las membranas celulares se forman por procesos de agregación de nuevo material en una estructura preexistente. Por lo tanto simplificaremos el problema de la biogénesis considerando sólo cómo las proteínas y lípidos sintetizados se integran en las membranas.

- Integración de las proteínas hidrofóbicas y complejos enzimáticos.

La mayor parte de las proteínas de membrana se forman en los ribosomas citoplásmicos, que también sintetizan las proteínas citosólicas de la célula. La excepción la constituye un número limitado de proteínas mitocondriales y de cloroplastos que se sintetizan mediante un tipo especial de ribosomas presentes en sus respectivos orgánulos. Estos ribosomas difieren de los citoplásmicos en el tamaño y composición del ARN, pero no hay razón para creer que el mecanismo de síntesis sea fundamentalmente diferente.

El problema inmediato que se presenta es cómo las proteínas hidrofóbicas, que tienden a agregarse en el agua, se integran ordenadamente en el ambiente acuoso de la célula. Aunque no existe por el momento ninguna evidencia directa que lo resuelva, pueden postularse varios mecanismos basados en los estudios llevados a cabo en diferentes sistemas de membranas. Una respuesta obvia sería que la síntesis tiene lugar cerca o en la membrana, lo que supondría que los ribosomas estarían unidos a la misma en los sitios de inserción de las proteínas hidrofóbicas, como se ha sugerido para los ribosomas mitocondriales (32, 33). En Escherichia coli los efectos diferenciales de los inhibidores de síntesis proteica en la síntesis de la membrana ex-

terna y en la de las proteínas celulares solubles pueden deberse a la presencia de diferentes tipos de ribosomas o a la compartimentalización producida por su unión a la membrana (34). Los ribosomas pueden interaccionar con la membrana bien porque tengan sitios específicos de fijación en la misma (como ocurre en los orgánulos) o mediante un puente formado por los péptidos que van sintetizándose, en el caso de que estos péptidos posean alguna secuencia de aminoácidos que se fije a los fosfolípidos de la membrana. Hay un gran número de proteínas de membrana que contienen porciones de aminoácidos apolares que podrían constituir los sitios de fijación de fosfolípidos (35, 36, 37).

Se han postulado otros posibles mecanismos de integración como por ejemplo la existencia de proteínas o lípidos adaptadores que actuarían de detergentes naturales confiriendo solubilidad en agua a las proteínas hidrofóbicas. Por lo tanto les proporcionarían un medio de transporte desde la fase acuosa donde se sintetizan hasta las zonas de inserción en la membrana. Las proteínas hidrofóbicas podrían también sintetizarse a partir de precursores solubles en agua. Desgraciadamente, la evidencia que existe actualmente es bastante escasa y no excluye ningún mecanismo de los expuestos.

El problema de la integración en la membrana de los enzimas oligoméricos resulta más complicado aún, ya que hay que considerar como se forma la estructura cuaternaria del complejo. ¿Se integra el enzima como una unidad prefabricada o bien son las subunidades las que van integrándose secuencialmente en la membrana?. ¿Se forma la estructura cuaternaria del complejo por afinidades naturales o hay implicado un mecanismo de ensamblaje más directo?. Una aportación importante en el esclarecimiento de estas cuestiones la constituye el estudio de la biosíntesis de los complejos enzimáticos ATPasa (38) y citocromo oxidasa (39, 40) en mitocondrias. No nos vamos a detener demasiado en ello puesto que la biosíntesis y ensamblaje de la ATPasa mitocondrial se explicará en detalle en el último apartado de esta Introducción. Ambos complejos constan de proteínas extrínsecas, que se sintetizan en el citoplasma, e intrínsecas que lo hacen en la mitocondria. Las subunidades intrínsecas se integran en ausencia del ensamblaje enzimático funcional; sin embargo la integración de las subunidades extrínsecas requiere la presencia de las hidrofóbicas. La formación del complejo, al menos en el caso de la ATPasa, puede explicarse por una asociación espontánea de

los subcomponentes mediante interacciones proteína-proteína.

Se ha propuesto, aunque basado en evidencias indirectas, el siguiente modelo de ensamblaje de los enzimas de membrana:

- 1.- La síntesis de las subunidades hidrofóbicas se lleva a cabo en los ribosomas unidos a la membrana.
- 2.- Las subunidades hidrofóbicas se fijan a la membrana en sus sitios de síntesis, mediante la interacción de las cadenas que se van formando con la bicapa de fosfolípidos.
- 3.- La síntesis de las subunidades extrínsecas tiene lugar en los ribosomas libres o unidos a la membrana y su asociación con los péptidos hidrofóbicos en la misma se realiza a través de interacciones específicas proteína-proteína. El ensamblaje puede implicar una secuencia temporal de incorporación de subunidades, determinada por nuevos sitios de asociación formados durante el proceso de construcción.

- Sitios de integración de las membranas.

Un gran número de procesos celulares y rutas biosintéticas de las células eucarióticas están restringidos a

membranas específicas (por ejemplo, mitocondrias y cloroplastos). En las células procarióticas muchas de las mismas funciones se llevan a cabo en una única membrana (transporte de iones y metabolitos, fosforilación oxidativa, biosíntesis de fosfolípidos, etc...). Aunque todos los enzimas que las catalizan estén localizados en la misma membrana desde el punto de vista topológico, existe una diferenciación funcional dentro de la membrana bacteriana. Por ejemplo, las membranas mesosómicas tienen una composición diferente a la de la membrana plasmática (41). En ciertos microorganismos el aparato fotosintético está localizado en membranas especializadas que están unidas a la plasmática y lo mismo ocurre con la proteína fotorreceptora de Halobacterium halobium (24). Las zonas de adhesión entre la membrana externa e interna de Escherichia coli pueden representar otro ejemplo de diferenciación (42).

Un problema importante en la biogénesis y que no está resuelto todavía, concierne a los factores que determinan la distribución de nuevas proteínas en las diferentes membranas celulares, o en el caso de organismos procarióticos, su integración en los sitios específicos de la membrana plasmática. La evidencia de que no sólo los lípidos sino también las proteínas pueden sufrir difusión lateral (43) se

ha utilizado como argumento en contra de la necesidad de zonas específicas de integración en una membrana dada, pero entonces si las proteínas se integran al azar ¿qué es lo que hace que permanezcan en un área particular de la membrana una vez que han llegado allí por difusión lateral?. Los factores que influyen en la estabilización de los dominios de función en la membrana con una dotación especial de enzimas, pueden proporcionar la base para un mecanismo de inserción de proteínas en sitios específicos.

Ya hemos indicado que la integración de las proteínas intrínsecas puede estar facilitada por la interacción de regiones hidrofóbicas de los péptidos que se van formando con los fosfolípidos de la bicapa. Aunque se supone que la estructura básica de la bicapa es única, la composición lipídica de diversas membranas muestra diferencias significativas en lo que respecta tanto a las proporciones relativas de sus fosfolípidos como a la de sus ácidos grasos sustituyentes. Además, algunas membranas contienen tipos especiales de lípidos (esteroles, sulfolípidos, cardiolipina, etc.) que están ausentes en otras, e incluso dentro de una misma membrana pueden existir diferencias regionales en cuanto a composición lipídica se refiere. Estas diferencias pueden

jugar un papel muy importante en la determinación de las zonas de integración de proteínas si sus sitios de unión con los lípidos son específicos para determinados tipos de éstos. El modelo de ensamblaje podría explicar también como las subunidades extrínsecas de los enzimas pueden integrarse en sitios específicos, ya que su inserción sería dependiente de compañeras hidrofóbicas apropiadas en la membrana.

- Integración de los lípidos.

En las células eucarióticas los enzimas responsables de la síntesis de los principales fosfolípidos están localizados en el retículo endoplásmico, aunque la mitocondria puede también sintetizar ácido fosfatídico y cardiolipina. En las bacterias, la mayor parte de los enzimas que catalizan la síntesis de fosfolípidos están en la membrana plasmática (44).

El conocimiento que se posee acerca de la integración y transporte de los fosfolípidos en las membranas celulares es muy escaso. Se ha sugerido un posible mecanismo basado en un cierto tipo de proteínas que facilitan el intercambio de fosfolípidos entre membranas y que "in vivo" podrían actuar como transferasas de fosfolípidos (45, 46) pero esto último no está definitivamente demostrado. Los experimentos

realizados con mutante auxótrofos para lípidos específicos han supuesto un considerable avance en el esclarecimiento del papel de los lípidos en la biogénesis de la membrana. De los resultados obtenidos con auxótrofos de glicerol (47) se deduce que la síntesis e integración de las proteínas de membrana se lleva a cabo en ausencia de síntesis neta de fosfolípidos pudiendo aumentar hasta el doble la proporción relativa proteína:lípido en la membrana bacteriana. Este hecho implica que las proteínas pueden integrarse sin síntesis e inserción concomitante de nuevos lípidos. Por lo tanto, la cantidad de bicapa lipídica presente en la membrana es capaz de acomodar una proporción de proteína mayor que la que existe en condiciones normales de crecimiento. Aunque estos resultados sugieren un grado considerable de flexibilidad en el mecanismo de crecimiento de la membrana, en condiciones normales la integración de los lípidos y proteínas está coordinada.

1.2 Estudio de los factores de acoplamiento de la fosforilación (ATPasas).

Las adenosíntrifosfatasa son una familia de proteínas extrínsecas asociadas a las membranas fosforilantes. Constituyen el último paso en el proceso de síntesis de ATP en la fosforilación oxidativa y actuando en dirección hidrolítica permiten la utilización de este nucleótido para dirigir las funciones de transhidrogenación y la incorporación de solutos (transporte activo). Se han estudiado, tanto estructural como funcionalmente, en mitocondrias de levaduras, corazón de buey e hígado de rata y cerdo (revisiones 48, 49, 50 y 51), en cloroplastos de espinaca y algas (51), retículo sarcoplásmico (revisión 52), Dictyostelium discoideum (53) y en bastantes especies bacterianas entre ellas E. coli (54, 55, 56), Streptococcus faecalis (57, 58, 59, 60), Bacillus megaterium (61, 62, 63, 64), Bacillus stearothermophilus (65), Alcaligenes faecalis (66), Rhodopseudomonas spheroides (67), formas L de Proteus (68), Mycobacterium phlei (69), el microorganismo fotosintético Rhodospirillum rubrum (70), la bacteria PS 3 (71) y Micrococcus lysodeikticus (72, 73), cuyas características ampliaremos en detalle por ser el microorganismo objeto de nuestro estudio.

1.2.1 Estructura. Métodos de solubilización y purificación.

De todas las ATPasas conocidas y estudiadas hasta ahora, la ATPasa mitocondrial es quizá el sistema enzimático más complejo y podemos extender la información que poseemos sobre su organización a las demás ATPasas. Cuando está unida a la membrana interna de la mitocondria, su estructura viene representada en la Fig. 1.

Consta básicamente de 4 componentes funcionales:

- a) el Factor 1 ó F_1 (denominado CF_1 en cloroplastos y BF_1 en bacterias) que cataliza la actividad ATPasa.
- b) una porción de membrana interna llamada pieza basal, compuesta de proteínas y fosfolípidos, que se cree que dirige el flujo de protones hacia F_1 durante la fosforilación oxidativa.
- c) un péptido, OSCP, que une F_1 a la pieza basal y confiere al complejo la sensibilidad a oligomicina, y
- d) un péptido inhibidor de la actividad ATPasa durante la fosforilación oxidativa.

Al complejo se le llama "ATPasa sensible a oligomicina" para distinguirlo del componente F_1 que no es afectado

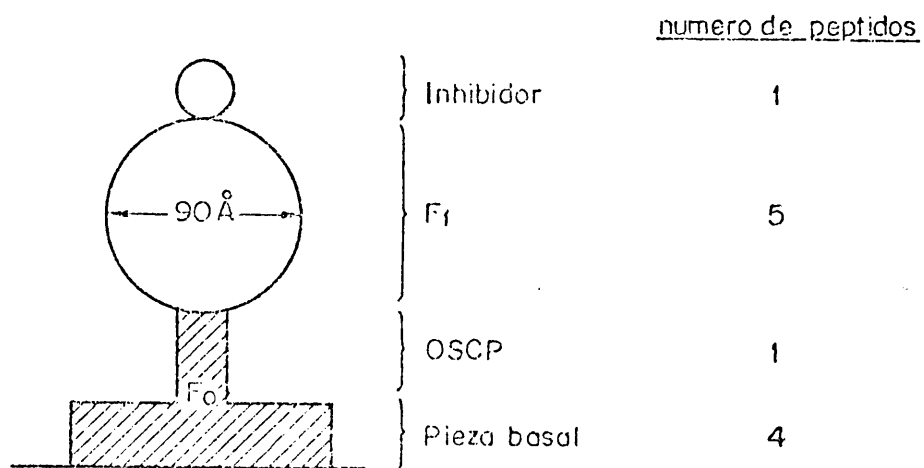


FIGURA 1.- Disposición de los componentes del complejo ATPasa sensible a oligomicina de la membrana interna de la mitocondria.

por el antibiótico. Su solubilización implica la liberación de la membrana y se lleva a cabo mediante tratamientos con detergentes.

La preparación más homogénea se ha conseguido tratando partículas submitocondriales de levadura, con Tritón X-100, que muestra gran selectividad por el complejo ATPasa mitocondrial (74). En mitocondrias de mamíferos (por ej. corazón de buey) se ha utilizado colato y deoxicolato (75) pero el grado de pureza de las preparaciones es inferior al obtenido con mitocondrias de levaduras.

La solubilización de la ATPasa bacteriana (que al igual que la de cloroplastos es insensible a oligomicina) se realiza empleando diversos métodos dependiendo del microorganismo en cuestión. Entre ellos podemos destacar la suspensión de membranas en soluciones de EDTA (B. stearothermophilus), lavados sucesivos de membranas con tampones de baja fuerza iónica (S. faecalis y B. megaterium), choque osmótico (M. lysodeikticus) y los empleados en E. coli: tratamiento con DSS, diálisis de membranas contra soluciones diluidas de EDTA y sonicación (revisión 76). El complejo ATPasa de cloroplastos se solubiliza mediante lavados con agua y EDTA (77).

Aunque hay notables diferencias en los diversos esquemas de purificación de F_1 (o "ATPasa insensible a oligomicina"), la mayoría incluyen sonicación para liberarla de los fragmentos de membrana seguida de cromatografía de filtración en gel y de intercambio aniónico. Algunos tratamientos implican incubaciones a pH alcalino o utilización de tampones que contienen ATP durante todas las etapas de purificación (50). CF_1 y BF_1 también pueden purificarse a homogeneidad mediante cromatografía de filtración en gel, electroforesis en gel de poliacrilamida, centrifugación en gradientes de sacarosa, etc... (51, 76).

1.2.2 Propiedades moleculares: microscopía electrónica, peso molecular, subunidades, estequiometría y composición química.

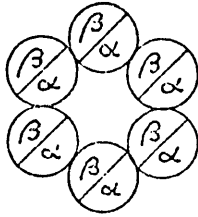
La observación al microscopio electrónico de las preparaciones de F_1 y CF_1 muestra partículas de apariencia hexamérica de unos 90 Å de diámetro (25). En bacterias se mantiene el aspecto hexamérico, aunque el tamaño de las partículas de BF_1 parece ligeramente mayor: 100-120 Å de diámetro en S. faecalis (59) y B. megaterium (62) y 100 Å en E. coli y M. lysodeikticus (72, 78).

Los pesos moleculares han sido estimados por procedimientos de equilibrio de sedimentación o cromatografía en gel. Unas primeras aproximaciones en mitocondrias y bacterias dieron valores incorrectos (58). Los aceptados en la actualidad señalan un peso molecular 347.000 ± 2.400 para F_1 (79), 325.000 ± 600 para CF_1 (51) y diferentes valores para BF_1 : 385.000 ± 9.000 en S. faecalis, 400.000 en E. coli y 379.000 en B. megaterium (como revisión véase referencia 76).

El componente F_1 del complejo ATPasa mitocondrial sensible a oligomicina consta de 5 cadenas polipeptídicas diferentes (74, 79). Para conferir la sensibilidad a oligomicina son necesarios 5 polipéptidos más: OSCP y los 4 que forman la pieza basal. Un péptido adicional, el inhibidor de la actividad ATPasa, constituye el undécimo componente. Cuando F_1 se aísla omitiendo el pretratamiento de las membranas con Sephadex G-50, lleva firmemente unido al péptido inhibidor, dando lugar a que en la electroforesis con DSS F_1 muestre estar formada por 6 péptidos en lugar de 5 (80).

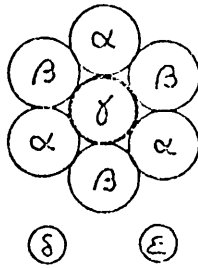
Las dos subunidades mayoritarias de F_1 , designadas

I



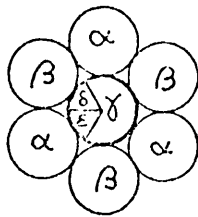
Modelo hexagonal propuesto por Schnebli y Col. (155) para F_1 de S. faecalis

II



Modelo hexagonal propuesto por Catterall y Pedersen (para F_1 de hígado de rata. Las subunidades pequeñas, δ y ϵ , son demasiado pequeñas para ser observadas al microscopio electrónico. Estructuras similares fueron observadas para M. lysodeikticus por Muñoz y col. (72)

III



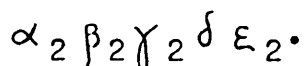
Modelo hexagonal propuesto por Kozlov y Mikelsaer (87) para F_1 de corazón de buey. Las subunidades δ , δ y ϵ constituyen ahora una única unidad central

FIGURA 2.- Estructuras de las subunidades propuestas para las preparaciones de F_1 y BF_1 .

α y β ó A y B, tienen pesos moleculares entre 50.000 y 62.000. Comprenden el 88% de la proteína del oligómero (dato basado en la intensidad de tinción de varias preparaciones). Un tercer péptido denominado γ ó C constituye el 10% de la proteína total, y su peso molecular determinado por varios laboratorios varía desde 25.000 a 36.000. Los péptidos más pequeños δ y ϵ (ó D y E) comprenden menos del 3-7% de la proteína y sus pesos moleculares son inferiores a 20.000 Dalton (50). La estequiometría de estos péptidos ha sido descrita como $\alpha_3 \beta_3 \gamma \delta_3$ en el hígado de rata (81) y en el corazón de buey (49). Más recientemente se han observado preparaciones de F_1 de mitocondria de corazón de buey que carecen de las subunidades γ y δ pero mantienen la actividad (82). Como la suma de los pesos moleculares de γ , δ y ϵ es aproximadamente igual al peso molecular de α y β , es posible que las tres subunidades menores observadas en la mayor parte de las preparaciones de F_1 correspondan a una única subunidad "in vivo". La estequiometría alternativa que surge de esta observación sería $\alpha_3 \beta_3 \gamma$, donde γ tiene un peso molecular aproximado de 50.000-60.000 Dalton. Los otros seis péptidos que completan el complejo ATPasa sensible a oligomicina tienen pesos moleculares comprendidos entre

7.500 y 30.000 Dalton.

La estructura de CF_1 es muy similar a F_1 mitocondrial. Está compuesta de 5 polipéptidos como se observa al analizarla en gel de poliacrilamida en condiciones disociantes (77). La mayor fracción proteica del oligómero la constituyen dos subunidades α y β , de poca movilidad electroforética, y otras tres, γ , δ y ϵ , que poseen una movilidad electroforética mayor. Los pesos moleculares respectivos son 59.000, 56.000, 37.000, 17.500 y 13.000 (51). La fórmula estequiométrica sugerida por Berzborn (83) es:



A pesar de que en F_1 Senior y Brooks consideran que el péptido inhibidor es la sexta subunidad, Knowles y Penefsky(79) mantienen que el inhibidor de la ATPasa es la 5ª y más pequeña subunidad (ϵ). Un apoyo a esta última observación lo constituye el hecho de que en CF_1 ϵ es un potente inhibidor de la actividad hidrolítica (84), aunque su composición química difiere de la de ϵ de F_1 .

Las preparaciones de BF_1 muestran variaciones respecto al número y estequiometría de sus subunidades. Los primeros estudios en BF_1 de S. faecalis dieron una fórmula

estequiométrica de $\alpha_6 \beta_6$, siendo 33.000 el peso molecular de cada una de ellas (59). Los últimos análisis evidencian la existencia de 5 subunidades cuyos pesos moleculares son: $\alpha = 60.000$, $\beta = 55.000$, $\gamma = 37.000$, $\delta = 20.000$, y $\epsilon = 12.000$ Dalton, siendo la estequiometría: $\alpha_3 \beta_3 \gamma \delta \epsilon$ (85). Las preparaciones de BF_1 de A. faecalis muestran 4 subunidades ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) (77) y las de E. coli contienen 4 ó 5 subunidades dependiendo del método de purificación (86, 87). En la Fig. 2 se representa un esquema de los modelos de disposición de subunidades propuestos para F_1 y BF_1 .

La composición en aminoácidos de los factores de acoplamiento que estamos considerando es bastante similar. Su composición química, así como la de sus respectivas subunidades viene detallada en las revisiones 50, 51 y 76. En general, las subunidades mayoritarias son predominantemente ácidas, mientras que γ y ϵ son básicas. Un rasgo notable a señalar es que ni F_1 ni CF_1 poseen triptófano.

1.2.3 Propiedades catalíticas. Inhibidores.

La especificidad de los nucleotidos de la ATPasa unida a la membrana de mitocondrias de hígado y corazón sigue el

orden $ATP > ITP > GTP > UTP > CTP$. F_1 hidroliza ATP, ITP y GTP a velocidades muy comparables, hidrolizando UTP y CTP a menor velocidad (50). La actividad enzimática de CF_1 es bastante más específica para el ATP, siendo su velocidad de hidrólisis seis veces más rápida que la de ITP o GTP y no se observa actividad con CTP como sustrato (51). Las ATPasas bacterianas hidrolizan principalmente ATP y GTP (87).

Aunque algunas preparaciones de ATPasa mitocondrial y bacteriana mantienen una pequeña actividad enzimática en ausencia de cationes, en la mayoría de los casos la presencia de iones metálicos es absolutamente necesaria para la hidrólisis del ATP. La dependencia catiónica puede variar según el estado en que se encuentre el enzima (solu-ble, unido a la membrana o puro) y las condiciones de ensayo. La ATPasa mitocondrial unida a la membrana y las preparaciones de F_1 catalizan la hidrólisis de ATP a altas velocidades en presencia de Mg^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} y Fe^{2+} . En lo que respecta al Ca^{2+} se han encontrado diferencias: en F_1 su efectividad es aproximadamente la mitad de la del Mg^{2+} , mientras que en la ATPasa sensible a oligomicina no produce ningún efecto (88). En cloroplastos se ha observado una

actividad ATPasa dependiente de Mg^{2+} en el enzima unido a la membrana, y otra dependiente de Ca^{2+} e inducida por tripsina en el enzima soluble (51). En las ATPasas bacterianas hay diferencias según sea el microorganismo del que proceden: BF_1 de A. faecalis se activa preferentemente por Ca^{2+} en ausencia de cationes monovalentes, y por Mg^{2+} en su presencia (89). En E. coli, BF_1 se activa tanto por Ca^{2+} como por Mg^{2+} (90), mientras que en la ATPasa de S. faecalis el Ca^{2+} es completamente ineficaz a pH fisiológico, actuando el Mg^{2+} como catión activador (57).

Las preparaciones de F_1 de mitocondrias de corazón de buey e hígado de rata tienen unos valores de K_m para el ATP comprendidos entre 0,79 y 1,25 mM (determinados siguiendo la liberación de ADP o considerando las velocidades iniciales de liberación de protones) (50). La K_m de BF_1 de S. faecalis determinada midiendo el fosfato inorgánico liberado, es 2,5 mM (59) mientras que el mismo enzima de E. coli tiene una K_m entre 0,29 y 0,60 mM ATP (87, 91). En las preparaciones del enzima unido a la membrana de mitocondrias, la K_m es considerablemente menor, lo que sugiere que la unión de la ATPasa a la membrana hace aumentar su afinidad por el ATP. En E. coli por el contrario,

los valores de K_m de la ATPasa purificada y unida a la membrana son muy similares (87).

Los parámetros cinéticos de la actividad ATPasa de CF_1 se han determinado recientemente. La K_m para el ATP arroja un valor de 0,8 mM en presencia de Ca^{2+} y a pH 8. Para la ATPasa activada por Mg^{2+} , a pH 6, el valor de la K_m es de 0,1 mM y el de V_m 0,45 moles de ATP hidrolizado por minuto y mg de proteína aunque la inclusión en el medio de reacción de maleato aumenta la K_m hasta 1,1 mM y la V_m hasta 14 (156).

El ADP es un potente inhibidor por producto de la reacción de hidrólisis del ATP catalizada por las distintas preparaciones de ATPasas mitocondriales, de cloroplastos y de bacterias. La inhibición parece ser competitiva con ATP aunque hay un considerable desacuerdo en los valores de K_i (50).

Los inhibidores de la fosforilación oxidativa, oligomicina, rutamicina, aurovertina, DCCD, cloruro de butilo de estaño, venturicidina y azida son inhibidores de la ATPasa mitocondrial soluble y unida a la membrana, mientras que de todos ellos solo aurovertina y azida inhiben la actividad hidrolítica de F_1 . La quercetina (3, 3', 4'

5, 7 - pentahidroxi~~flavona~~) tiene un efecto similar al del péptido inhibidor de la ATPasa, inhibiendo a bajas concentraciones. La espegacina actúa como la aurovertina (50). Algunos oxianiones como el bicarbonato, bisulfito, borato, maleato, tereftalato, dicromato, y pirofosfato, activan la ATPasa mitocondrial modificando las características cinéticas; es posible que actúen como simples catalizadores o induciendo cambios conformacionales en el enzima (50). Los inhibidores de la fosforilación (floricina, DCCD y Dio-9) inhiben la actividad hidrolítica de la ATPasa unida a la membrana de cloroplastos y Dio-9 inhibe también la actividad de CF_1 .

En bacterias al igual que en cloroplastos, ni la oligomycin ni la rutamicina afectan la actividad ATPasa, pero el DCCD es un potente inhibidor del enzima unido a la membrana (se ha estudiado, entre otros, en E. coli y S. faecalis (92)). Ya que el DCCD puede reaccionar con el aparato de transducción de energía que acopla la actividad ATPasa al transporte activo, el esclarecimiento de su mecanismo de acción es de considerable interés, aunque la base molecular de su efecto inhibidor no se conoce en la actualidad. Una serie de evidencias indican que la inhibición de la

ATPasa es indirecta ya que el DCCD reaccionaría con un componente de la membrana al que el enzima estuviera estrechamente asociado; la mayor evidencia la constituye el hecho de que no afecte a la ATPasa soluble ni purificada tanto en mitocondrias como en cloroplastos y bacterias. La acción inhibidora indirecta sugiere la existencia en la membrana de un factor sensible a la carbodiimida. Los estudios realizados con mutantes de S. faecalis apoyan esta hipótesis (93).

La atebrina es un desacoplador de la fotofosforilación y su efecto sobre la actividad ATPasa ha sido estudiado en cloroplastos (94) y bacterias (95, 96, 97). En cloroplastos, la atebrina estimula la actividad ATPasa dependiente de Mg^{2+} cuando la reacción tiene lugar en la luz, siendo esta estimulación mucho menor en la oscuridad. Por el contrario, la atebrina inhibe la actividad de la ATPasa soluble dependiente de Ca^{2+} .

Su efecto inhibitor sobre las ATPasas bacterianas ha demostrado ser dependientes del catión activador y del tipo de enzima. En E. coli inhibe las actividades ATPasa dependientes de Ca^{2+} y de Mg^{2+} y a una concentración de atebrina fija, la inhibición depende del tipo y concentración del catión divalente utilizado. En M. lysodeikticus, bajas

concentraciones de atebrina estimulan la actividad ATPasa dependiente de Mg^{2+} del enzima unido a la membrana a diferencia de lo que ocurre en E. coli, pero a elevadas concentraciones se inhibe esta actividad. BF_1 de M. lysodeikticus, que es dependiente de Ca^{2+} , es inhibida por atebrina variando el grado de inhibición según sea la proporción ATP/Ca^{2+} utilizada en el ensayo (97). En general, los resultados experimentales sugieren que la atebrina ejerce un efecto inhibitor preferente en las ATPasas dependientes de Ca^{2+} , aunque las bases moleculares de su acción se desconocen por el momento.

1.2.4 Papel de los fosfolípidos en relación a los factores de acoplamiento.

Hay numerosos ejemplos de enzimas de membrana cuya actividad enzimática depende de fosfolípidos. En mitocondrias el complejo ATPasa sensible a oligomicina ha sido muy estudiado a este respecto ya que los fosfolípidos han demostrado ser componentes esenciales del mismo. Sin embargo F_1 ni contiene fosfolípidos ni los necesita para su actividad, e igual sucede con la ATPasa de cloroplastos.

Hay varios valores publicados acerca del contenido

en fosfolípidos del sistema ATPasa mitocondrial. Las preparaciones de Kagawa y Racker (98) obtenidas de corazón de buey contienen un 10% y se alcanza un máximo de actividad adicionando fosfolípidos exógenos o ácidos grasos libres. La mayor estimulación la produce el ácido linoleico, que es el principal constituyente de los fosfolípidos mitocondriales, aunque la actividad ATPasa producida es prácticamente insensible a rutamicina.

El complejo ATPasa de mitocondrias de corazón de buey preparado por Tzagoloff contiene un 30% de fosfolípidos y no se activa por ulteriores adiciones (88). La preparación análoga de mitocondrias de levaduras contiene del 10-31% de fosfolípidos y se activa por una mezcla de fosfolípidos aislados de levadura y soja.

Posiblemente el análisis más detallado del efecto de los fosfolípidos sobre la ATPasa sensible a oligomicina sea el llevado a cabo por Swanljung y col. (99). Trabajando con una preparación desprovista de lípidos y de muy baja actividad específica, demostraron que la actividad se estimula hasta 20 veces con la adición de lisolecitina y también, aunque en menor proporción, con cardiolipina, fosfatidilinositol y fosfatidiletanolamina. Observaron a su

vez que el ADP y Mg^{2+} aumentan la activación producida por cantidades subóptimas de fosfolípidos y que la adición de éstos hace disminuir significativamente la K_m para el ATP (en presencia de cardiolipina la K_m disminuye de 0,71 mM a 0,14 mM).

Dado que los fosfolípidos no son necesarios para la actividad enzimática de F_1 y si lo son para las preparaciones de ATPasa sensible a oligomicina desprovistas de lípidos, se ha sugerido como posible mecanismo de acción que en ausencia de fosfolípidos, los péptidos que confieren la sensibilidad a oligomicina inducen a F_1 a adoptar un estado o conformación menos activo y que habitualmente es contrarrestado por los fosfolípidos. Toson y col. (100) han apuntado también la posibilidad de que los fosfolípidos actúen como puente de unión entre F_1 y los péptidos que confieren la sensibilidad a oligomicina.

Las distintas preparaciones de BF_1 no contienen por lo general fosfolípidos, ni su actividad enzimática se ve afectada por adición de los mismos (50). Sin embargo, Peter y Ahlers han demostrado la naturaleza lipoproteica de la ATPasa de E. coli incluso en su estado soluble (101). El fosfolípido principal es la fosfatidiletanolamina, aunque contiene también pequeñas cantidades de cardiolipina,

fosfatidilglicerol y trazos de fosfatidilserina y ácido fosfatídico. El tratamiento con fosfolipasas del enzima unido a la membrana no reduce su actividad específica ya que permanecen todavía unidos una considerable cantidad de fosfolípidos a la membrana. Sin embargo, al eliminar los fosfolípidos de la ATPasa soluble (cuya proporción para el máximo de actividad ha demostrado ser 80 μg de fosfolípido/ mg ATPasa) mediante centrifugación o cromatografía de intercambio iónico, la actividad desciende y para su parcial restauración necesita la adición de Mg^{2+} o Ca^{2+} más un extracto de fosfolípidos de E. coli. Las preparaciones de ATPasa que han recuperado su actividad no difieren de la ATPasa soluble en sus propiedades cinéticas.

Las ATPasas implicadas en el transporte activo de Na^+ y K^+ del cerebro y riñón de rata, son también lipoproteínas que dependen de fosfolípidos (especialmente fosfatidilserina) para desarrollar al máximo su actividad enzimática (102, 103) y lo mismo ocurre con la ATPasa transportadora de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (104, 105). La interpretación que Peters y Ahlers dan acerca de estos hechos es que el sistema ATPasa es una parte integral de la membrana aunque débilmente unido a la misma.

1.2.5 Reconstitución del complejo enzima-membrana.

La reconstitución del complejo enzima-membrana ha sido muy bien estudiada en partículas submitocondriales producidas por sonicación de las mitocondrias. Racker con siguió partículas desprovistas de F_1 mediante el tratamiento con urea, e incubándolas con exceso de F_1 reconstitúan partículas morfológica y funcionalmente análogas a las sin tratar (106). Posteriormente el problema ha si do abordado por un gran número de investigadores (para re visión véase 48). Señalaremos que para la unión de F_1 a la pieza basal es absolutamente necesaria la presencia de OSCP que sirve de enlace entre ambas, implicándose de ello que posee un sitio de fijación para cada uno de estos com ponentes. OSCP es capaz de unirse de nuevo a la pieza basal en ausencia de F_1 . Los experimentos de reconstitución en cloroplastos no han dado resultados definitivos, debido a que no se han conseguido partículas totalmente desprovistas de CF_1 . El método más utilizado para liberar CF_1 de las membranas es el tratamiento de las mismas con EDTA, y se consiguió una reconstitución de casi el 100% añadiendo CF_1 a partículas así tratadas (107). El grado de reconstitución, sin embargo, era dependiente de la acti

vidad específica original de los cloroplastos ya que los muy activos sólo alcanzaban una reconstitución del 20%, por lo que no se pueden sacar conclusiones claras por el momento.

En ATPasas bacterianas los más detallados y completos estudios de reconstitución son los llevados a cabo en S. faecalis por Abrams y col. (58, 60, 108) con membranas desprovistas de este enzima. El ensamblaje "in vitro" se ha estudiado añadiendo cantidades variables de ATPasa soluble a una cantidad fija de membranas, observándose que la reconstitución es función del enzima añadido. Se investigó el papel del Mg^{2+} (catión necesario para la actividad hidrolítica de la ATPasa) en la reconstitución del complejo, evidenciándose que si bien su presencia no es necesaria para que la ATPasa vuelva a fijarse a la membrana, si lo es para la estabilidad del complejo una vez ensamblado. Esta observación sugiere la existencia de dos tipos de interacciones entre el enzima y su sitio de fijación en la membrana, una de las cuales implica al Mg^{2+} . Posteriores estudios han demostrado la existencia de una proteína denominada "nectina", que se libera de la membrana en la fracción ATPasa soluble y que es indispensable para la re-

constitución del complejo (60). En B. megaterium, los cationes (Ca^{2+} y Mg^{2+}) son esenciales para que la ATPasa soluble se fije a la membrana (62, 63) y para ello es necesario que ésta esté totalmente desprovista de enzima, lo que sugiere que la ATPasa se fija en un número limitado de sitios en la membrana.

1.2.6 Fijación de adenínucleotidos.

El estudio de la interacción entre adenínucleotidos y las ATPasas es el primer paso para comprender la fijación nucleotídica a los factores de acoplamiento y como estos nucleotidos fijados están implicados en la fosforilación oxidativa y fotosintética y en los demás procesos de transducción de energía.

Harris y Slater (109) aislaron F_1 de mitocondrias de corazón de buey encontrando que contenía 5 moles de adenínucleotido fijado por mol de enzima, de los cuales 3 eran ATP y 2 ADP. Estos nucleotidos unidos se mantienen fijos después de precipitación repetida con $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ y filtrando a través de Sephadex se eliminan sólo parcialmente. Sin embargo la desnaturalización por el frío libera por completo los nucleotidos del enzima, lo que sugiere que la fijación

de los mismos es una propiedad de la estructura cuaternaria. Posteriores estudios realizados (110) llevaron a la conclusión de que la inactivación por frío producía también liberación de los nucleotidos y pérdida de actividad ATPasa. La reactivación era paralela a la nueva fijación de estos nucleotidos al enzima. El intercambio de nucleotidos libres con los fijados era muy pequeño en el enzima nativo (0,8 moles de ATP y 0,4 de ADP) mientras que en la ATPasa inactivada por el frío era mucho mayor (1,6 moles de ATP y 1 mol de ADP). La preparación análoga de Garret y Penefsky (111) concuerda con la de Harris y col. en la ausencia observada de AMP unido a la molécula, pero no en la cantidad de moles de ATP y ADP unidos al enzima. Mientras Harris encuentra 3 moles de ATP y 2 de ADP/mol F_1 , los resultados de Penefsky son de 2 moles ATP y 1 mol ADP/mol proteína. Ambos están de acuerdo sin embargo en que la fijación de estos nucleotidos es muy fuerte (aunque no covalente). Añadiendo al medio ADP, Penefsky encuentra que el enzima nativo contiene también dos sitios de fijación reversibles para el ADP, uno de ellos con afinidad muy alta, lo que concuerda con los estudios previos de Hilborn y Hammes (112), compitiendo por estos sitios el análogo del

ATP, AMP-P(NH)P. La fijación de ATP es difícil de estudiar debido a la acción hidrolítica del enzima, pero al haberse encontrado dos sitios de fijación para su análogo es lógico suponer que el ATP posee también dos sitios de fijación; sin embargo, cuando los nucleotidos se liberan del enzima, éste es capaz de fijar 4 moles de ADP y casi 5 moles de AMP-P(NH)P por mol, con lo que parece razonable concluir que F_1 contiene un límite inferior de 5 sitios de fijación de adeninnucleotidos, considerando que estos sitios pueden haberse dañado durante la manipulación experimental.

Las preparaciones de F_1 de hígado de rata (113) también demuestran contener dos sitios de fijación reversible para el ADP, uno de gran afinidad específica para el ADP y dADP y otro de menor afinidad que se sugiere que es el centro catalítico de la actividad hidrolítica ATPasa, ya que el ADP es un potente inhibidor de la misma como hemos indicado. En ninguna de las preparaciones mitocondriales, ya sean de hígado o corazón, se ha encontrado que el AMP se fije al enzima. Catterall y Pedersen han observado que F_1 de hígado de rata tiene también fijado ATP y ADP pero a niveles mucho menores que el enzima de corazón (<2 mol/mol F_1). Esto puede estar relacionado o bien con diferencias

básicas entre ambas ATPasas o con diferencias en los métodos de preparación (50).

Roy y Moudrianakis (114, 115) han encontrado en la ATPasa de cloroplastos dos sitios de fijación para el ADP, pero a diferencia de mitocondrias, la fijación del ADP va acompañada de un proceso estequiométrico de transfosforilación: el β -fosfato de una molécula de ADP es transferido a la otra molécula de ADP firmemente unida, dando como resultado una molécula de AMP y otra de ATP que no se liberan con facilidad. Sin embargo aunque el AMP permanezca unido a la molécula de enzima, CF_1 al igual que mitocondrias no fija AMP añadido externamente como hace con ADP, ATP o sus análogos.

Del mismo modo que en las mitocondrias (y en las especies bacterianas estudiadas como veremos a continuación), CF_1 contiene nucleótidos firmemente unidos. Harris y Slater (116) demostraron que el enzima unido a la membrana posee 1,9 moles de ATP y 1 mol de ADP por mol de proteína. Al solubilizar la ATPasa por procedimientos suaves, los nucleótidos se liberan también de la membrana pero en CF_1 purificado la cantidad ha disminuido: 0,8 moles de ATP y 0,7 moles de ADP por mol de proteína (tampoco en este caso se

observa AMP); la razón de esta disminución puede deberse a alguna desnaturalización de la ATPasa durante el proceso de purificación. El intercambio de los nucleótidos fijados al enzima unido a la membrana con ADP y ATP añadidos al medio, es prácticamente total cuando se iluminan las membranas en presencia de un mediador redox (piocianina); si no se suministra alguna de estas dos condiciones, el intercambio es prácticamente nulo, lo que sugiere que para que tenga lugar es necesario el transporte electrónico. Los parámetros que regulan el intercambio (pH, intensidad de luz, etc...) han sido objeto de un reciente estudio (117).

En bacterias, la fijación y posible papel de los adenínucleótidos a la ATPasa ha recibido menos atención que en mitocondrias o cloroplastos. Los primeros estudios llevados a cabo en S. faecalis por Abrams y col. (118) dieron como resultado una incorporación de ^{32}Pi en el enzima cuando las células del microorganismo se crecían en presencia de dicho isótopo. El ^{32}Pi permanecía unido a la ATPasa a lo largo de todos los procesos de purificación estimando una cantidad de 5-10 moles Pi/mol BF_1 . Una investigación posterior llevada a cabo por los mismos auto-

res (119) condujo a la identificación de la forma en que el Pi estaba unido a la molécula. Detectaron ATP, ADP y Pi pero no AMP. La fijación "in vitro" de estos compuestos al enzima purificado dió una estequiometría de 1 mol de ATP, 1 mol de ADP y 0,1 moles Pi por mol de BF_1 . Como esta fijación de nucleótidos "in vitro" se llevó a cabo a concentraciones de solo $50 \mu M$ y, ya que las concentraciones de ATP, ADP y Pi intracelulares son mucho mayores, es de suponer que "in vivo" ocurra una fijación similar. El complejo BF_1 -nucleotido que se forma "in vivo" (denominado endógeno) se comporta de un modo diferente del formado "in vitro" (complejo exógeno) (120): mientras el complejo endógeno no es desplazable por nucleótidos añadidos externamente, el exógeno sí que lo es, lo que sugiere que las formas desplazable y no desplazable del fuerte complejo ATPasa-nucleotido corresponden a dos estados conformacionales del enzima diferentes, no siendo por tanto equivalentes ambos complejos. La estequiometría de la fijación nucleotídica es análoga a la de Alcaligenes faecalis (1 mol ADP y 1 mol ATP/mol ATPasa) (121), aunque en este microorganismo no pudo utilizarse ATP como ligando a causa de la actividad hidrolítica del enzima que producía relaciones molares de

fijación de ATP que variaban entre 0,5 y 2 según las preparaciones; por este motivo se utilizó el AMP-P(NH)P. Se observó que, al igual que en mitocondrias, el ADP y el análogo del ATP compiten por el sitio de fijación. Con AMP el enzima no forma tampoco ningún complejo estable.

Los últimos estudios sobre fijación nucleotídica en BF_1 se han efectuado en el microorganismo E. coli (122), hallándose que el enzima puro contiene 2,2 moles ATP, 0,4 moles de ADP y 0,1 moles de P_i por mol de enzima. El complejo es bastante estable pero la inactivación de la ATPasa es paralela a la liberación de nucleótidos de la misma, como sucede en la ATPasa de corazón de buey.

Como resumen de lo anteriormente expuesto, podemos sacar las siguientes conclusiones generales:

- Las ATPasas mitocondriales, de cloroplastos y bacterias contienen, tanto en su estado unido a la membrana como purificado, adeninnucleótidos fijados a su molécula.
- Esta fijación es muy fuerte, pero no covalente, con lo que el complejo ATPasa-nucleótido es altamente estable.
- La identificación de los adeninnucleótidos ha llevado en todos los casos a la detección de ATP y ADP pero nunca AMP.

- La cantidad de moles de nucleotido por mol de enzima varía según sea la fuente biológica de la que proviene la ATPasa. La Tabla II puede proporcionarnos una visión cuantitativa global.

1.2.7 ATPasa de *Micrococcus lysodeikticus*.

Ishikawa y Lehninger estudiando la fosforilación oxidativa en esta bacteria gram positiva y estrictamente aerobiana, encontraron una actividad ATPasa en la membrana citoplásmica (123). Más tarde, Ishikawa identificó un factor de acoplamiento de la fosforilación sensible al calor (a diferencia de las ATPasas de mitocondrias y cloroplastos que son sensibles al frío) como ATPasa de membrana (124). Ambas actividades (ATPasa y factor de acoplamiento) se solubilizaban al lavar las membranas de *M. lysodeikticus* con agua y sedimentaban juntas en gradiente de densidad, siendo el coeficiente de sedimentación 13 S. Tanto el Ca^{2+} como el Mg^{2+} activaban la ATPasa. Aunque su actividad específica era muy baja aumentaba muchísimo después de tratar el complejo ATPasa- Ca^{2+} con tripsina. Salton, Muñoz y col. han estudiado los diversos aspectos de este enzima que es el componente principal de la membrana plasmática de *M. lysodeikticus*, ya que representa el 10% de su contenido proteico total. (72)

TABLA II: Nucleotidos y fósforo inorgánico fijado a las moléculas de F_1 , CF_1 y BF_1 .

Fuente de ATPasa	$\frac{\text{moles ATP}}{\text{mol ATPasa}}$	$\frac{\text{moles ADP}}{\text{mol ATPasa}}$	$\frac{\text{moles de Pi}}{\text{mol ATPasa}}$
Mitocondrias de corazón de buey (109 - 111)	3 (109)	2 (109)	--
	2 (111)	1 (111)	--
Cloroplastos (116)	0,8	0,7	--
<u>S. faecalis</u> (118, 119)	1*	1*	0,1*
<u>E. coli</u> (122)	2,2	0,4	0,1

* Fijación "in vitro".

Muñoz y col. (73) han estudiado su liberación selectiva de las membranas mediante lavados con tampón de baja fuerza iónica (para mayores detalles, véase Materiales y Métodos). Este procedimiento denominado "choque osmótico" es similar al utilizado para solubilizar la ATPasa de S. faecalis (58). La morfología de la ATPasa de M. lysodeikticus ha sido descrita por tinción negativa al microscopio electrónico como partículas circulares de 100 \AA de diámetro. Cada partícula parece constar de seis subunidades periféricas y una unidad central (72). Esta apariencia fue confirmada más tarde por Whiteside y Salton (78).

La ATPasa unida a la membrana presenta propiedades diferentes de la ATPasa soluble y purificada. En el estado unido a la membrana muestra considerable especificidad por el ATP y necesita la acción de la tripsina y Mg^{2+} para ser activa. Además presenta formas interconvertibles (por cationes) con diferentes características de activación por Ca^{2+} y latencia de posible significado regulatorio (125-127). El enzima soluble no necesita tripsina para su actividad, aunque ésta le estimula un 50% en los primeros estudios realizados al respecto, y se activa preferentemente por Ca^{2+} .

La purificación de la ATPasa ha sido llevada a cabo por filtración en gel (128) y por electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida (PAGE) (129). El enzima purificado tiene un coeficiente de sedimentación de 14-15 S y una actividad catalítica estimulada por Ca^{2+} . En electroforesis en gel en condiciones disociantes este BF_1 presenta un patrón de subunidades consistente en dos mayoritarias, α y β , de pesos moleculares de 55.000 y 50.000 Dalton, y dos minoritarias γ y δ de pesos moleculares 41.500 y 35.000 Dalton respectivamente (130). El peso molecular del enzima ha sido establecido en 350.000 Dalton y la fórmula propuesta es: $\alpha_3 \beta_3 \gamma \delta$. Recientemente en nuestro laboratorio se obtuvo una subcepa (que se llamó B) de M. lysodeikticus cambiando las condiciones de crecimiento (utilización repetida de caldo común en lugar de peptona y extracto de levadura para la resiembra) y la ATPasa obtenida presenta un componente de baja movilidad relativa denominado X (peso molecular: 90.000 Dalton) y carece de la subunidad de peso molecular 41.500 (131). Por lo tanto la subunidad γ de este BF_1 corresponde a la δ de la cepa original, con un peso molecular de 35.000 Dalton. BF_1 procedente de la cepa B puede presentar dos

formas: B_I (enzima inactivo) que no es estimulable por tripsina y su actividad específica es muy baja, y B_A (enzima activo) de elevada actividad específica, que en algunos casos no es estimulable por tripsina y en otros lo es hasta un 100% de su actividad basal. En este último caso el patrón de subunidades muestra la presencia de un componente, ξ , de peso molecular 25.000 Dalton que Carreira y col. han identificado como el inhibidor natural de la ATPasa (132).

Salton y Schor (133, 134) han utilizado otro procedimiento diferente del "choque osmótico" para solubilizar la ATPasa. Consiste en la extracción de membranas con n-butanol, con lo que se forma un sistema bifásico en cuya fase acuosa se libera el enzima que no es estimulable por tripsina y contiene exclusivamente las subunidades mayoritarias α y β . Salton sugiere que las proteínas adicionales de la ATPasa solubilizada por "choque osmótico" poseen un papel regulatorio de la actividad enzimática y de la asociación del enzima a la membrana.

La ATPasa está localizada exclusivamente en la superficie interna de la membrana plasmática de M. lysodeikticus, como se ha probado mediante observaciones inmunológicas,

cas (135), y es el componente antigénico principal de la membrana. Los anticuerpos contra la proteína no se eliminan del antisuero de la membrana mediante absorción con protoplastos intactos, lo que indica que los determinantes antigénicos que presenta el enzima puro o son inaccesibles o no están localizados en la cara externa de la membrana del protoplasto. La localización de la ATPasa se ha estudiado también con experimentos de marcaje con iodo, comparando la accesibilidad a la iodización del enzima en membranas aisladas y en protoplastos intactos (136). La ATPasa de los fragmentos de membrana se iodizaba, mientras que no sucedía así cuando los protoplastos intactos reaccionaban con ^{125}I , lo que sugiere una localización interna del enzima en la membrana.

La ATPasa purificada de M. lysodeikticus es antigénica en conejos. Whiteside y Salton han descrito la interacción de un suero anti-ATPasa con el enzima de M. lysodeikticus y de otras bacterias (78). El anticuerpo obtenido es específico para la proteína e inhibe por completo su actividad hidrolítica. Un análisis de la cinética de inhibición indicó que es no competitiva con respecto al sustrato incluso cuando éste y el anticuerpo se mezclan simultáneamente con la ATPasa. Por lo tanto parece ser que el anticuerpo no

se fija al centro catalítico sino en cualquier otro sitio del enzima.

La comparación de la reactividad cruzada y la sensibilidad de otras ATPasas bacterianas a la inhibición por el antisuero específico para la ATPasa de M. lysodeikticus es un método sensible para estudiar las relaciones entre los enzimas de diferentes especies. La continuidad de las bandas de precipitina para las ATPasas de Sarcina flava, Sarcina lutea y M. lysodeikticus indican que los enzimas de estas tres bacterias son estructuralmente similares mientras que las ATPasas de Micrococcus varians, Sporosarcina ureae y B. subtilis no reaccionan con el antisuero.

1.3 Biosíntesis de ATPasas en mitocondria, cloroplastos y bacterias.

Ya hemos indicado que gran cantidad de proteínas celulares se sintetizan en los ribosomas citoplásmicos, pero ciertos orgánulos, como son las mitocondrias y los cloroplastos, poseen su propio sistema para sintetizar proteínas. La utilización de inhibidores de síntesis proteica es un método muy útil y sencillo para distinguir si una determinada proteína es de origen citoplásmico o se ha sintetizado en el propio orgánulo: el cloranfenicol (CAP) es un an-

tibiótico que inhibe la síntesis de proteínas en mitocondrias, cloroplastos y bacterias, mientras que la cicloheximida inhibe la llevada a cabo en el citoplasma de las células eucarióticas.

La biosíntesis del complejo ATPasa mitocondrial ha sido estudiada en células de levadura reprimidas por glucosa durante la adaptación a un medio de bajo contenido en azúcar (desrepresión). Es preciso indicar que cuando el contenido en glucosa del medio es muy alto, la célula no necesita de la fosforilación oxidativa para su crecimiento y no sintetiza los enzimas necesarios para llevar a cabo el proceso. Por tanto, la ATPasa mitocondrial no aparece hasta que las células reprimidas no vuelvan a incubarse en un medio de desrepresión. Este sistema básico experimental ha sido utilizado para examinar el efecto de los inhibidores de síntesis proteica con objeto de determinar el origen biosintético de los componentes de la ATPasa mitocondrial.

I.- Biosíntesis de F_1

Schatz (137) y Kováč y Weissová (138) encontraron que los mutantes "petite" (deficientes en síntesis de proteínas mitocondriales) de levadura sintetizaban una ATPasa

insensible a oligomicina que era indistinguible de F_1 en base a sus propiedades catalíticas y físicas. Esta observación sugería un origen citoplásmico de F_1 y se comprobó más tarde con el estudio de inhibidores realizado por Tzagoloff y col. (139, 140).

Cuando la levadura reprimida por glucosa se incubó en un medio de desrepresión con cloranfenicol, se sintetizaba nueva ATPasa, cosa que no sucedía si la incubación se llevaba a cabo en presencia de cicloheximida. La ATPasa sintetizada en cloranfenicol era afectada por inhibidores específicos de F_1 y por antisuero para F_1 . Para determinar si todas las subunidades de F_1 eran sintetizadas por los ribosomas citoplásmicos, la incubación en CAP tuvo lugar en presencia de $[^{14}\text{C}]$ leucina. La subsiguiente purificación de la ATPasa marcada y el análisis de sus subunidades demostró que los 5 polipéptidos que componen F_1 se trasladan y ensamblan en una ATPasa funcional independientemente de la síntesis proteica mitocondrial.

II.- Biosíntesis de OSCP

El origen biosintético de OSCP se ha estudiado por el mismo método utilizado para F_1 . En ausencia de preparaciones puras de OSCP se ensayó la proteína por su capacidad

de estimular la fijación de F_1 a las membranas (ya hemos indicado en la sección 1.2.5 que OSCP es indispensable para esta fijación). F_1 procedente del sobrenadante post-ribosómico de células de levadura incubadas en un medio de desrepresión y tratadas con CAP, era capaz de fijarse a membranas mitocondriales sin OSCP exógeno y la ATPasa reconstituida era sensible a rutamicina. Esta observación, junto con el hecho de que en presencia de cicloheximida el sobrenadante postribosómico es incapaz de estimular la fijación de F_1 a las membranas, demuestra que OSCP es un producto de la síntesis proteica citoplásmica (141). Se ha obtenido evidencia de que F_1 y OSCP se sintetizan en cantidades estequiométricas durante la incubación en cloranfenicol pero están presentes en el sobrenadante como entidades separadas sin formar un complejo físico (141).

III.- Biosíntesis de la pieza basal.

El hecho de que F_1 y OSCP, sintetizados en presencia de cloranfenicol, no puedan incorporarse en la membrana para formar una ATPasa funcional sugiere que la pieza basal del complejo no se sintetiza bajo esas condiciones, por lo que debe ser un producto de la síntesis proteica mitocondrial. Para demostrar esta posibilidad se incubaron célu-

las de levadura reprimidas por glucosa en un medio de desrepresión con cloranfenicol, transfiriéndose después a otro medio con cicloheximida y $[^3\text{H}]$ leucina (142). Los resultados indicaron que las únicas proteínas radiactivas son las que componen la pieza basal del complejo, por lo que se puede afirmar sin lugar a dudas que este componente de la ATPasa se sintetiza en la mitocondria.

Los experimentos realizados por Stratman y col.(143) en la ATPasa mitocondrial de hígado de rata corroboran los resultados de Tzagoloff en levadura. Estudiaron la incorporación de L- $[^{35}\text{S}]$ metionina en la ATPasa y sus subunidades y su transferencia a la membrana mitocondrial interna. Controlaron la incorporación del aminoácido radiactivo al enzima mediante análisis en gel de poliacrilamida y encontraron que la cicloheximida inhibía en un 86% esta incorporación lo que implicaría una síntesis extramitocondrial de la mayoría de los componentes del complejo. La $[^{35}\text{S}]$ ATPasa, disociada por frío en sus subunidades, se transfería "in vitro" a la membrana mitocondrial interna en mayor cantidad que la $[^{35}\text{S}]$ ATPasa nativa. El cloranfenicol no inhibía esta transferencia de la $[^{35}\text{S}]$ ATPasa nativa, lo que no concuerda con lo postulado por Tzagoloff

(144), aunque al incorporar $[^{14}\text{C}]$ metionina al enzima "in vivo" algunas proteínas, que podrían corresponder a las de la pieza basal, no se sintetizaban en presencia de CAP.

Las primeras investigaciones de síntesis proteica en cloroplastos de espinaca demostraron que este orgánulo celular, al igual que las mitocondrias, es capaz de sintetizar algunas de sus propias proteínas (145). Mendiola - Morgenthaler y col. han estudiado recientemente la síntesis de CF_1 en cloroplastos aislados incubándolos en la luz con $[^{35}\text{S}]$ metionina ó $[^3\text{H}]$ leucina (146). La evidencia demuestra que aunque CF_1 aparece marcado, sólo sus dos subunidades mayoritarias, α y β , son sintetizadas por los ribosomas del cloroplasto, mientras que las minoritarias lo hacen posiblemente en el citoplasma, a diferencia de F_1 mitocondrial.

La biosíntesis de BF_1 no había sido abordada hasta el momento en ningún microorganismo. Los estudios de biosíntesis de proteínas de membrana llevados a cabo en E. coli (147, 148), B. subtilis (149, 150), B. cereus (151) y M. lysodeikticus (152, 153), han tenido como principal objetivo el observar el control de la síntesis de estas

proteínas variando las condiciones del medio de cultivo donde crecen las células y el efecto de inhibidores, especialmente cloranfenicol, con la esperanza de obtener información acerca de los procesos de biosíntesis de la membrana bacteriana. Se ha observado en general que mientras el cloranfenicol inhibe la síntesis de proteínas citoplásmicas, esta inhibición es sólo parcial en el caso de las proteínas de membrana, lo que implicaría que éstas poseen diferente sensibilidad a la acción inhibidora del antibiótico. En M. lysodeikticus se ha estudiado ya esta actitud selectiva en la ATPasa; los resultados han demostrado que la síntesis de este enzima no se inhibe con las cantidades de cloranfenicol que producen una inhibición del 74-78% en las demás proteínas (153). El porqué de este fenómeno no está suficientemente claro pero se ha sugerido (154) que podría deberse a la existencia de sitios de biosíntesis que serían específicos de algunas proteínas de membrana, y que no estarían igualmente afectados por el antibiótico.

Hemos intentado resumir los principales aspectos de las ATPasas más conocidas y estudiadas hasta ahora, así como los procesos de biosíntesis e integración de las mismas en sus membranas respectivas. Del mismo modo que en mitocondrias y cloroplastos son numerosos los estudios llevados a cabo en lo que a biosíntesis de factores de acoplamiento se refiere, no ocurre así en bacterias. Esta carencia de información en lo que respecta a la biosíntesis de BF_1 es lo que nos ha llevado a tratar de resolver el problema en nuestro presente trabajo, dada la importancia que este enzima posee en la membrana bacteriana.

Antes de abordar la biosíntesis de la ATPasa de M. lysodeikticus y después de completar el estudio de algunas de sus propiedades en el estado soluble, hemos detectado la presencia de ligandos no peptídicos en la molécula enzimática que se han intentado identificar y cuantificar. Una vez demostrada la existencia de adenínucleotidos fuertemente unidos a BF_1 de M. lysodeikticus, al igual que ocurre en otras ATPasas bacterianas, nos hemos detenido para considerar los distintos aspectos de su fijación, como un primer paso en la elucidación de los fenómenos.

nos de transducción de energía.

En el estudio de la biosíntesis de BF_1 nos planteamos dos objetivos principales:

- a) comparar la síntesis de BF_1 con la de las demás proteínas de membrana y del citoplasma, para averiguar si la ATPasa se sintetiza en estadios tempranos o tardíos del crecimiento del microorganismo utilizado.
- b) comparar la síntesis de sus distintas subunidades, in tentando demostrar si se sintetizan independientemente unas de otras.

Dado que la coordinación de la síntesis de proteínas y lípidos en las membranas celulares ha sido y es uno de los problemas de gran interés en el estudio del ensamblaje de las membranas biológicas, hemos intentado observar si existe alguna relación entre la inhibición de síntesis lipídica y la síntesis de la ATPasa, para lo cual hemos utilizado la cerulenina, un antibiótico que inhibe la síntesis de ácidos grasos.

El microorganismo empleado en todo nuestro trabajo ha sido Micrococcus lysodeikticus, cuya ATPasa ha sido caracterizada y estudiada en nuestro laboratorio, y el grado de homogeneidad obtenido en las preparaciones del enzima

purificado es tal, que permite abordar su estudio con gran confianza en los resultados obtenidos.

2 MATERIALES Y METODOS

2.1 Reactivos

Acilamida, bisacilamida y TEMED: Eastman Kodak.
Mezcla de [^3H]-aminoácidos, [$2\text{-}^3\text{H}$] glicerol (143 Ci/mol) y
ATP- $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ (2,8 Ci/nmol): The Radiochemical Centre, Amersham.
[^{32}P] ortofosfato: Junta de Energía Nuclear. DSS (especial-
mente puro): BDH Chemicals Ltd. Urea: Merck (para usos bio-
químicos). DTT: Calbiochem. Carbón activo: Merck. ATP, ADP,
AMP: PL Biochemichals. Placas de sílica gel: Merck. PE, PC,
PG, CL: Sigma Chem. Co. Colas desecadas de luciérnaga: Sigma.
Butil-PBD: Ciba. Colorantes: Coomassie R 250 (Schwarz/Mann),
Coomassie G-250 (Serva), fucsina (Merck). Dextrano azul:
Pharmacia. Azul de bromofenol: BDH. Proteínas: lisozima
(Calbiochem), inhibidor de la tripsina de soja (Boehringer),
tripsina (Calbiochem), seroalbúmina bovina (Sigma), DNAsa
(Calbiochem). Sephadex G-200 y G-100: Pharmacia. Cerulenina:
obsequio de S. Ōmura, Kitasato Institute, Tokio, Japón.
Atebrina: Sigma.

Todos los productos utilizados son de grado analítico.

2.2 Microorganismo.

El microorganismo utilizado ha sido Micrococcus lyso-

deikticus (NCTC 2665), bacteria gram +, mantenido en medio PNB varios años (cepa B).

2.3 Medios de cultivo.

2.3.1 Medio complejo (PWYE). (157)

Consta de Bactopeptona 5%, NaCl 0,5% y extracto de levadura 0,1%. Se ajusta a pH 7.5 con NaOH y se esteriliza a 120°C durante 20 min.

2.3.2 Medio definido de sales. (158)

Consta de K_2PO_4 0,2%, $Mg SO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01%, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0,0002%, NH_4Cl 0,1%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,0004%, glutamato sódico 1%, acetato amónico 1%.

Se lleva a pH 7.5-8 con tampón fosfato de modo que éste quede 0,050 M en el medio; se esteriliza a 1 atmósfera durante 20 min. y una vez frío se añade biotina (10 μg /20 ml de medio) y pirocatecol (10^{-5} M en el medio), esterilizados previamente por filtración en filtro Millipore. El medio de finido sólo se ha utilizado en los estudios de biosíntesis de la ATPasa.

Para medio sólido se emplea siempre el medio PWYE con agar al 2%.

2.4 Crecimiento.

Los microorganismos se cultivan en matraces de 2 l. que contienen 400 ml de medio manteniéndose en agitación en incubador New Brunswick a 250 rpm y a 30°C. Como inóculo se emplean 4 ml de un precultivo de 22-24 horas de incubación, a una densidad óptica a 700 nm de 5. Una vez el cultivo ha alcanzado la fase de crecimiento de interés (véase Fig. 3) las células se centrifugan en centrífuga Sorvall RC 2-B refrigerada durante 10 min., lavándose dos veces con tampón Tris-ClH 30 mM pH 7.5.

Cuando se marcan radiactivamente las células con $[^{32}\text{P}]$ -ortofosfato ó $[2\text{-}^3\text{H}]$ glicerol, estos compuestos se añaden al medio en el tiempo 0 de crecimiento celular, y en proporciones 0,5 mCi/l y 0,85 mCi/l respectivamente. Las células se recogen en fase estacionaria o en fase exponencial cuando se especifique.

En los experimentos de biosíntesis de ATPasa se dan a las células diversos pulsos de $[^3\text{H}]$ aminoácidos (0,38 mCi/l) que se añaden al medio al principio de la fase exponencial del crecimiento celular, recogándose aquéllas al finalizar el tiempo de pulso deseado. Se llevan a cabo también experimentos de pulso y caza. Al final de un determinado pulso, las células se recogen y centrifugan durante

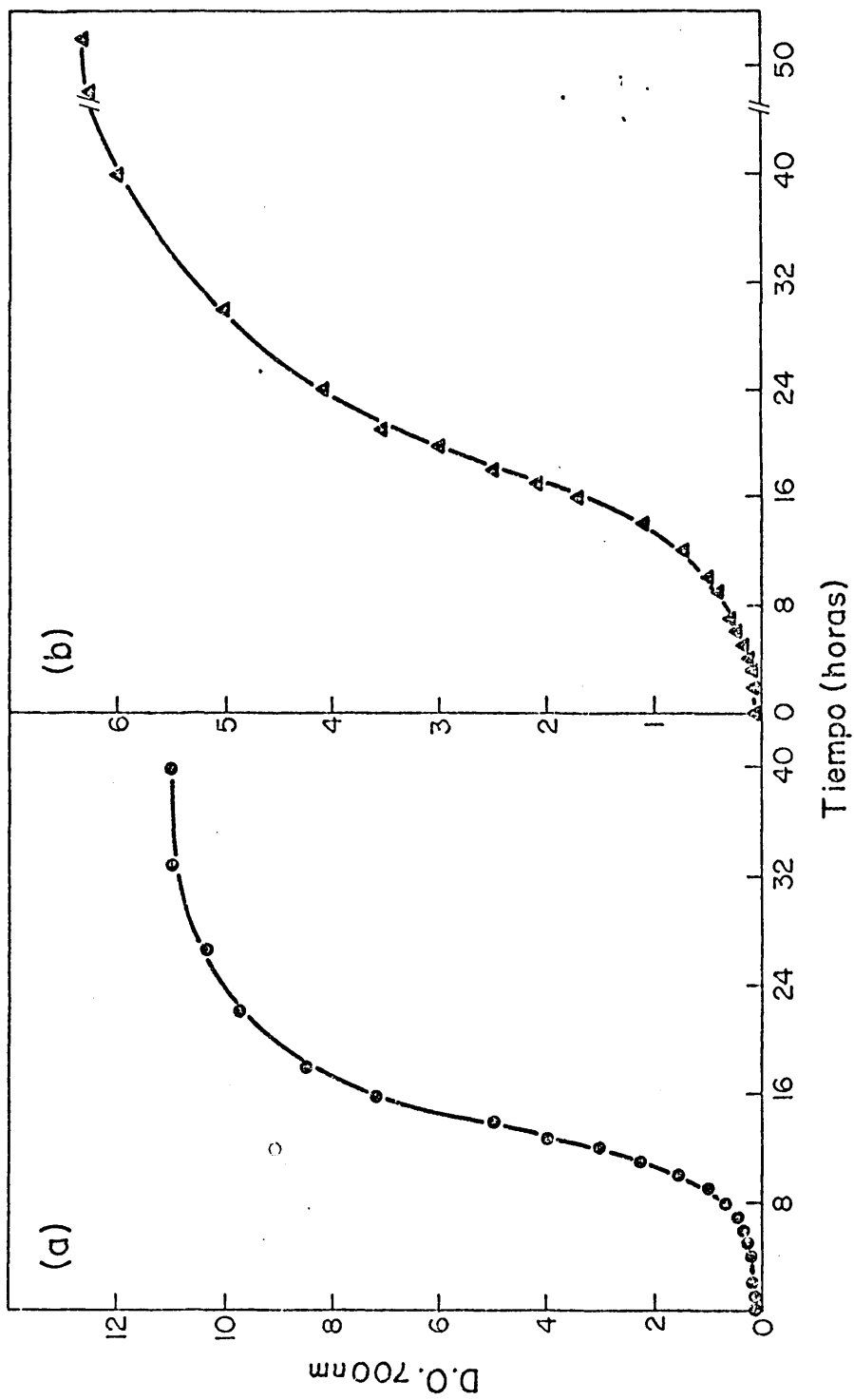


FIGURA 3.- Curvas de crecimiento de Micrococcus lysodeikticus NCTC 2665, en medio complejo (a) y en medio definido de sales (b). El tiempo de generación en el primer caso es de 110 min. (136) y en el segundo, 4 horas 30 minutos.

10 min. a $16.300 \times g$ y a una temperatura de $4^{\circ}C$, volviéndose a resuspender en medio libre de isótopos donde siguen creciendo hasta alcanzar las generaciones de interés.

Para observar la inhibición del crecimiento celular mediante el antibiótico cerulenina, se crece el microorganismo en 2 l. de medio definido hasta el principio de la fase exponencial, momento en que se añaden $[^3H]$ aminoácidos al medio (0,38 mCi/l). Se divide el cultivo en dos partes: una que permanecerá como control (0,8 l) y a los 1,2 l. restantes se añade la cerulenina disuelta en etanol en proporción $10 \mu g/ml$ medio. Se siguen incubando las células hasta que el control alcanza una $D_{0.700} = 6$ (fase estacionaria precoz).

2.5 Preparación de membranas y obtención del enzima crudo.

En ambos medios, las membranas celulares se obtienen a partir de protoplastos previamente formados.

Para la obtención de protoplastos se suspenden las células en tampón Tris-ClH 30 mM pH 7.5 - Cl_2Mg 5 mM llevado a sacarosa 0.8 M para que sea hipertónico con respecto a las células. A continuación se añade lisozima (0,075 mg/ml), y se deja agitando a temperatura ambiente durante 30 min., recogiendo los protoplastos por centri-

fugación a 30.900 x g durante 20 min. Los protoplastos se suspenden en Tris-ClH 30 mM pH 7.5 -Cl₂Mg 5 mM, con lo que disminuye la presión osmótica del medio y las células se rompen. Se añade DNasa (0,075 mg/ml) y se deja agitando durante 10 min a temperatura ambiente; a continuación se centrifuga a 43.500 x g durante 30 min (4°C), obteniéndose en el sobrenadante el citoplasma. Se lavan las membranas 4 veces con tampón Tris-ClH 30 mM pH 7.5 centrifugando 20 min a 43.500 x g. Las membranas ya lavadas se guardan a 4°C toda la noche.

El procedimiento de "choque osmótico" que sigue a continuación consiste en suspender las membranas en tampón Tris-ClH 3 mM, centrifugando a 43.500 x g durante 30 min. Se lavan las membranas una vez más con el mismo tampón y a igual velocidad y tiempo.

Cuando el microorganismo se ha crecido en medio complejo el enzima crudo se obtiene en el sobrenadante que resulta después del choque osmótico. Si el medio empleado es el medio definido, la ATPasa es más lábil y se obtiene a partir del segundo, tercer y cuarto lavado de las membranas, y el lavado que sigue al choque osmótico. La proteína cruda (0,4-0,8 mg/ml) se concentra hasta 10 mg/ml mediante el sistema de Amicón de ultrafiltración a través de una membrana

Diaflo XM 50 (aprox. 1,5 Kg/cm² de N₂), se libera de algunos componentes pesados mediante centrifugación en ultracentrifuga Beckman L-2 a 100.00 x g, 1 h, 0°C y se conserva a -20°C.

2.6 Valoración de la actividad ATPasa.

La actividad adenosíntrifosfatasa se mide valorando la liberación de fósforo inorgánico del ATP en una mezcla de reacción de 500 µl que contiene: 4 µmoles de ATP, 4 µmoles de CaCl₂, 120 µmol Tris-HCl pH 7.5 y una cantidad de ATPasa comprendida entre 40-60 µg si está en forma soluble y 5-10 µg si se trata de ATPasa pura; en los casos que se indica se añade tripsina en una cantidad de 6 µg. Se incuba a 37°C durante 5 min. La reacción es parada en baño de hielo, y el fósforo inorgánico liberado es valorado por el método de Fiske-Subbarow, modificado por Vambutas y Racker (159) que consiste en lo siguiente: a la mezcla de reacción se le añade directamente 1 ml de molibdato amónico al 2,5% en SO₄H₂ 5 N y 0,25 ml de un reactivo que contiene 0,5 g de ácido 1, 2, 4 aminonaftolsulfónico, 1 g de Na₂SO₃ y 20 g de NaSO₃H en 200 ml de H₂O destilada. Se incuba de nuevo a 37°C durante 5 min y se mide la absorción del complejo fofomolibdico reducido a 650 nm (0,7/mol Pi.cm).

Con el fin de eliminar los posibles errores introducidos por la hidrólisis espontánea del ATP, se hacen blancos apropiados para cada determinación que se tratan lo mismo que las restantes muestras.

Cuando los ensayos de actividad se efectúan con ATP- γ - 32 P, el medio de reacción es análogo al usado en el método colorimétrico. Después de incubar a 37°C 5 min se para la reacción añadiendo $500\ \mu\text{l}$ de carbón activo al 9% en ClK - ClH $0,2\ \text{M}$ $\text{pH}=2$. Las muestras se centrifugan a $4.080\ \text{xg}$ durante 20 min. El carbón activo adsorbe los nucleótidos, perteneciendo la radiactividad del sobrenadante al Pi liberado en la reacción. Se determina la radiactividad de alícuotas del sobrenadante en un contador de centelleo. Se hacen controles para todas las muestras con las concentraciones de ATP utilizadas en cada ensayo. Su objeto es corregir la hidrólisis espontánea del sustrato y la posible incapacidad del carbón activo para adsorber todo el ATP no hidrolizado.

Se ha definido la unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que libera $1\ \mu\text{mol}$ de Pi en 1 min a 37°C . La actividad específica se define como la cantidad de μmoles de Pi liberados en 1 min por mg de proteína.

2.7 Determinación de proteína.

La cantidad de proteína se determina por método de Lowry y col. (160) usando seroalbúmina bovina como estandar. Este método se basa en la reacción de la proteína con el reactivo de Folin-Cicolteau para fenoles. La reacción consiste en la oxidación, catalizada por cobre, de los aminoácidos aromáticos y otros grupos, por un reactivo de tipo heteropolifosfato.

2.8 Electroforesis en gel de poliacrilamida.

La electroforesis en gel de poliacrilamida provee de un método de alta resolución para fraccionamiento y caracterización físico-química de moléculas sobre la base de su tamaño, conformación y carga neta.

2.8.1 PAGE analítica en condiciones nativas.

Se realiza según el método descrito por Ornstein y Davis (161, 162) con algunas modificaciones. Los geles tienen 0,6 cm de diámetro por 4 u 11 cm de longitud, al 7% de acrilamida ó 10% cuando se especifica y al 0,183% de N,N'-metilenbisacrilamida. Como tampón se utiliza Tris 5 mM-Glicocola 37,5 mM pH 8.5[±]0.2. La cantidad de proteína no ha de ser superior a 200 µg.

2.8.2 PAGE analítica en condiciones de disociación.

DSS: El sistema es análogo al anterior, añadiendo 0,1% de DSS a la mezcla de polimerización, 0,1% de DSS al tampón y la mezcla se pretrata con DSS al 1% calentándose a 85°C durante 5 min. La proporción de acrilamida utilizada es del 7%.

UREA: Se añade urea 8M al tampón del tanque superior del aparato de electroforesis y también al gel. Se añade DTT 1 mM a todo el sistema. La muestra se pretrata con urea 10M y DTT 5 mM. La proporción de acrilamida en el gel es siempre del 5,5%.

Las cantidades de proteína no han de ser mayores de 100 µg.

Las muestras se hacen más densas con glicerina (exceptuando las pretratadas con urea 10M) y se colocan directamente sobre el gel espaciador. Se corren a 2 mA y 5 mA por gel el tiempo necesario para que el marcador (azul de bromofenol) llegue aproximadamente a 1 cm del final del gel.

Las proteínas se tiñen de acuerdo con el método de Fairbanks y col. (163).

2.8.3. Reacción_histoquímica_de_la_ATPasa.

Para la tinción enzimática de la ATPasa se utiliza el método de Saurge (164). Los geles se corren en la forma descrita para condiciones nativas, y siempre paralelamente con geles que se teñirán para proteínas. La tinción se efectúa siguiendo la técnica de Weinbaum y Markman (165).

Inmediatamente después de corridos se retiran de sus tubos de electroforesis y se incuban a 37°C introducidos en un medio que contiene: ATP 8 mM, Cl_2Ca 8 mM, 0,5 ml de acetato de plomo al 2%, completándose hasta un volumen de 5 ml con Tris-ClH 30 mM pH 7.5. Se hacen geles control de cada muestra, los cuáles se introducen en idéntica mezcla que contiene los mismos reactivos excepto el ATP. Después de incubar durante 20 min., se lavan con agua destilada para eliminar todo el precipitado de la superficie del gel y se revelan con una disolución de $S(NH_4)_2$ al 1% durante 1 min. Las bandas de ATPasa se visualizan con un color marrón oscuro de sulfuro de plomo, que se puede hacer permanente fijando los geles con acético al 7%.

2.9 Purificación del enzima soluble.

2.9.1 Cromatografía en columna.

La purificación de la ATPasa se lleva a cabo por cromatografía en gel de Sephadex G-200, en columna de 2,5 cm de diámetro por 90 cm de longitud (Pharmacia Fine Chemicals). Las columnas se empaquetan según el método descrito por Fisher (166) empleando una prolongación de la columna del mismo diámetro y suficiente longitud para introducir de una sola vez todo el gel necesario y evitar así las posibles roturas del gel impuestas por adición fraccionada. El Sephadex G-200 se equilibra y eluye con tampón Tris-ClH 30 mM pH 8.

El volumen de exclusión (V_0) determinado como volumen de elución del Dextrano azul 2000 es de 135 ml. El volumen de inclusión ($V_i + V_0$) se calcula por el perfil de elución del triptófano a 285 nm, obteniéndose un volumen de 440 ml.

La ATPasa soluble, después de ultrafiltrada y centrifugada a 100.000 x g, se aplica en un volumen no superior a 3 ml introduciendo un máximo de 20 mg en la columna. La elución se efectúa a un flujo constante de 20 ml por hora y a temperatura de 4°C. Se recogen en un colector de

fracciones LKB, midiendo el eluido a $A_{475\text{ nm}}$ (carotenoide contaminante), $A_{228\text{ nm}}$ (proteína, con más sensibilidad que a 280 nm) y ensayando actividad ATPasa.

La ATPasa resultante es de alta actividad específica ($10-15 \mu\text{moles Pi} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$) y no es estimulable por tripsina.

2.9.2 Electroforesis preparativa.

La purificación a homogeneidad (mayor del 96%) se lleva a cabo en electroforesis preparativa en gel de poli-acrilamida tal y como ha sido descrito por Andreu y col. (129). Se realiza en Poly-Prep termostaticado a $2 \pm 1^\circ\text{C}$, con geles de 80 ml (unos 6 cm de altura), determinando continuamente en el eluido (25 ml/h con bomba polistáltica en dos puntos del sistema de elución) la absorción a 278 y 206 nm con el Uvicord III. Se ensaya actividad ATPasa en las fracciones.

Este método dá una forma de ATPasa de menor actividad que la obtenida en columna de Sephadex ($2-4 \mu\text{moles Pi} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$). Para objetivos específicos, las preparaciones provenientes de Sephadex G-200 se repurifican mediante electroforesis semi-preparativa.

En ambos métodos de purificación, las fracciones enzimáticas se concentran por ultrafiltración en membrana Diaflo XM 50 (1,5 kg/cm² de N₂) hasta 2-5 mg/ml y se conservan a -20°C.

2.10 Localización de isótopos en los geles.

Se corren los geles con ATPasa marcada con ³²P ó ³H en condiciones nativa o disociantes según se especifique. A continuación, sin teñir, se cortan en rodajas de 1 mm de grosor en un cortador de geles Mickle (The Mickle Lab. Eng. Co., Gomshall, Surrey, England), introduciendo 1 rodaja en cada vial. Se añade 0,3 ml de DSS al 0,2% (peso/volumen) por vial y se congelan y descongelan en mezcla de nieve carbónica y acetona, unas 6-10 veces. Se incuban a temperatura ambiente con agitación a 100 rpm durante 10 horas. A continuación se añade 3 ml/vial de líquido de centelleo Bray (167) y se obtienen las cuentas por minuto en un espectrofotómetro de centelleo Packard Tri-Carb.

En todos los casos se corren controles paralelos de la misma muestra que se tiñen para proteínas.

Los perfiles densitométricos se obtienen a 575 nm en un espectrofotómetro Guilford 2400 equipado con transpor-

tador lineal mod. 2410-S.

Otro método para localizar el ^{32}P en los geles consiste en cortar longitudinalmente el gel, una vez corrido con muestra radiactiva, tiñendo una de las dos mitades para proteína y secando la otra mitad a vacío hasta la completa eliminación del agua. La zona donde hay radiactividad se localiza mediante el Radiocromatógrafo Scanner (Packard modelo 7201).

2.11 Extracción de nucleotidos.

Para extraer nucleotidos de la proteína pura se emplean dos métodos:

2.11.1 Fraccionamiento inicial con ácido tricloroacético.

Se trata la proteína deslipidizada con igual volumen de ácido tricloroacético al 10%, obteniéndose un precipitado que contiene moléculas de alto peso molecular. Luego de centrifugar (4000 x g a 4°C durante 30 min) se decanta el sobrenadante y se estiman los nucleotidos. El sedimento se extrae con alcohol al 70% conteniendo 0,1% de ácido perclórico y luego con alcohol etílico al 70%.

2.11.2 Adsorción en carbón activo.

Se desnaturaliza la proteína pura en urea 8 M y DTT 1 mM a temperatura ambiente agitando. A la ATPasa desnaturalizada se añade igual volumen de carbón activo (al 9% en ClK-ClH 0,2 M llevado a pH 2). Luego de centrifugar a 4000 x g durante 10 min., se separa el sobrenadante quedando el sedimento que contiene los nucleotidos adsorbidos en el carbón activo. Se liberan añadiendo un volumen de mezcla 50% etanol y NH₄OH 0,5 M. Se centrifuga a 4000 x g durante 30 min, obteniéndose los nucleotidos en el sobrenadante. Se repiten dos veces las extracciones.

En los casos en que ambos procesos se utilizaron para identificar y cuantificar los nucleotidos unidos a la ATPasa marcada con ³²P, se midió la radiactividad de las distintas extracciones.

2.12 Identificación de nucleotidos.

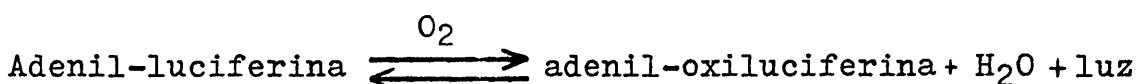
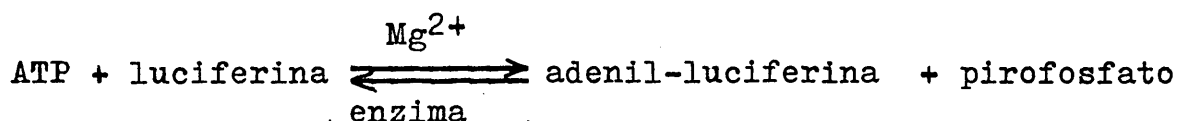
Los nucleotidos procedentes de las sucesivas extracciones se reducen a volumen deseado (50 µl) por el secado a vacío producido por Rotavapor, mod. Büchi, y se procede a su identificación mediante separación electroforética en papel Whatman 3 MM (168). El tampón utilizado se compone de ácido cítrico 0,035 M, citrato sódico 0,0448 M y acetato

de cinco 0,003 M, siendo 3,8 el pH que provee la mejor reparación del ATP, ADP, AMP y $\text{PO}_4^=$. Las tiras de papel son de 4 cm de ancho, colocándose las muestras a 12 cm del cátodo. Se corre la electroforesis a 400 V durante 5 h. Después de la migración, las tiras se secan a 60°C una noche. Al aplicar las muestras se añaden estándares de ATP, AMP, y ADP. Los nucleótidos se revelan por absorción de luz ultravioleta y se localizan las zonas de radiactividad por el Radiocromatógrafo Scanner.

2.13 Cuantificación del ATP.

El ATP se determina por la luminiscencia emitida por la muestra en presencia de extracto de colas de luciérnaga que poseen luciferina y luciferasa (169). El fundamento del método es el siguiente:

La luciferasa, presencia de luciferina, oxígeno, magnesio y ATP, cataliza la formación de adenil-luciferina a partir del ATP, y luciferina. La adenil-luciferina se oxida por el oxígeno atmosférico a adenil-oxiluciferina y este proceso viene acompañado por la emisión de luz.



La intensidad de la luz emitida en estas condiciones es proporcional a la concentración de ATP en la muestra.

Para preparar el extracto luciferina-luciferasa se trituran 20 mg de colas de luciérnaga desecadas en un homogeneizador Potter, en 5 ml de tampón de arsenato sódico - SO_4H_2 (0,05 M pH 4). La trituración y operaciones siguientes se realizan a 0°C. El extracto se centrifuga a 60000 x g durante 15 min y el sobrenadante se emplea para valorar el ATP.

La mezcla de reacción está formada por:

- a) muestra problema,
- b) 0,5 ml de preparación luciferina-luciferasa,
- c) 0,1 ml de SO_4Mg 0,15 M, y
- d) arsenato sódico- SO_4H_2 0,5 M pH 7.4 hasta completar un volumen de 2,5 ml.

Las muestras problemas utilizadas han sido las extracciones de nucleotidos de una cantidad conocida de distintas preparaciones de ATPasa pura y una cantidad conocida de ATPasa pura desnaturalizada con urea 8 M.

Se analiza siempre el ATP de un control de ATPasa pura perteneciente a la preparación correspondiente en cada caso, sin pretratar.

Para medir la luminiscencia emitida por el sistema luciferina-luciferasa en presencia de ATP, se emplea una cámara de cubetas, un fotomultiplicador, un amplificador de corriente, una fuente de alto voltaje y un registrador.

La cámara de cubetas es una caja de madera (19x16x12,5 cm) que está ligada al fotomultiplicador. En el interior de la cámara hay un soporte para la cubeta enfrente del multiplicador, de manera que el ángulo sólido es máximo. Entre el fotomultiplicador y el soporte para la cubeta hay un obturador fotográfico de modo que al cerrar la cámara de cubetas se abre el obturador y permite que la luz llegue al fotomultiplicador. La tapa de la cámara de cubetas es de madera también y cierra completamente.

El fotomultiplicador (EMI Electronics Ltd. Hayes, England, mod. 9659 B) se conecta a una fuente de alto voltaje (Keithley Instruments, Cleveland Ohio, mod. 244). El ánodo del fotomultiplicador se conecta a un amplificador de corriente con una ganancia de -10^7 volt./Amp. El registrador (Servograph REA 112, Radiometer-Copenhagen) registra la señal de salida del amplificador.

La luminiscencia se calibra añadiendo a cada muestra cantidades conocidas de ATP.

2.13.1 Intercambio del ATP endógeno de la ATPasa por nucleotidos externos.

El desplazamiento de ATP endógeno unido a la ATPasa por ADP exógeno se lleva a cabo como sigue:

La ATPasa purificada (350 μ g proteína en 150-200 μ l Tris-ClH 30 mM pH 7.5) se incubaba durante 20 min. a 40°C ó 20°C con concentraciones de ADP de 0,1-1 mM. Para eliminar el exceso de ADP que interferiría en la reacción de la luciferina, las mezclas de incubación se filtran por una columna pequeña ($V_0=1,8$ ml; $V_i=5$ ml) de Sephadex G-100 y el contenido en ATP del pico de ATPasa eluido en el volumen de vacío se determina por el ensayo luciferina-luciferasa.

El desplazamiento de los nucleotidos endógenos unidos por ATP externo se estudia con ATPasa marcada con 32 P. La proteína (50 μ g en 100 μ l Tris-ClH 30 mM pH 7.5) se incubaba a 40°C durante 20 min. con ATP ó ATP:Ca $^{2+}$ a concentraciones de 0,1-0,5-1 y 8 mM. Después de la incubación las muestras se someten a electroforesis en geles de poliacrilamida, y la cantidad de radiactividad intercambiada se determina por comparación con un control incubado sin nucleotido externo añadido.

2.14 Extracción de lípidos.

Se utilizan dos métodos para la extracción dependiendo de la naturaleza de la muestra:

- Las fracciones lipídicas que preceden a la ATPasa en su purificación por columna se someten a liofilización previa en Liofilizador New Brunswick y resuspenden en agua hasta un volumen de 50 μ l, se agitan con 3 volúmenes de cloroformo-metanol (2:1 v/v) y centrifugan a 4000 x g durante 10 min. Se extrae la fase orgánica, y la fase acuosa se re-extrae por dos veces con igual volumen de cloroformo-metanol. Los extractos orgánicos combinados se reducen a volumen mínimo mediante el secado a vacío producido por el Rotovapor para su subsiguiente identificación.

- Para extraer lípidos de las membranas residuales (170) se centrifugan a alta velocidad (40000 x g durante 5 h) con objeto de eliminar la mayor cantidad posible de agua. A continuación se resuspenden en metanol (1-2 ml/mg de peso seco de membrana) y se calienta la suspensión a 65°C durante 5 min. Una vez enfriado se añaden 2 volúmenes de cloroformo, permaneciendo 1-2 horas a temperatura ambiente. El residuo se elimina en filtro de fibra de vidrio y es reextraído agitando toda la noche en cloroformo-metanol (2:1 v/v). Los extractos combinados se secan a vacío.

2.15 Identificación de fosfolípidos.

La composición e identificación de fosfolípidos se lleva a cabo mediante cromatografía en capa fina. Las placas de 0,25 mm de grosor de silicagel se activan a 100°C durante 20 min, antes de su uso. Para la cromatografía en una sola dimensión se utiliza como solvente cloroformo:acetona:metanol:ácido acético: agua (5:2:1:1:0,5 v/v) y los estándares empleados son cardiolipina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y fosfatidilglicerol. Se corren 200 µg de cada uno y las muestras con 100 µg de estándar. El revelado se realiza exponiendo las placas secas a vapores de yodo, marcándose el área donde aparecen las manchas de color amarillo. Estas, más un generoso margen, se raspan directamente desde la placa y se introducen en viales, midiéndose la radiactividad en un espectrofotómetro de centelleo, Nuclear Chicago Mark II, previa adición a los viales de fluido de centelleo Bray.

En la cromatografía en dos dimensiones se usa como solvente en la primera dimensión cloroformo:metanol:agua (65:25:4 v/v) y como segundo solvente cloroformo:acetona:metanol:ácido acético:agua (5:2:1:1:0,5 v/v). En cada placa hay un sólo punto de aplicación de la muestra con los estándares (situado a 6 cm de uno de los vértices en la diagonal

de la placa). El método de revelado y detección de la radiactividad es análogo al caso de cromatografía unidimensional.

2.15.1 Identificación específica del fosfatidilglicerol. (171)

El fosfatidilglicerol, en oxidación con periodato, libera formaldehído que dá color púrpura con el reactivo de Schiff. Ya que el fosfatidilglicerol es el único fosfolípido que tiene un glicerol 1-sustituído, es fácilmente distinguible por estos reactivos.

La placa con la muestra una vez cromatografiada y seca, se pulveriza con una solución al 1% de periodato sódico hasta que el ácido silícico está completamente saturado. Los lípidos se manifiestan a menudo en este estado como manchas opacas en un fondo traslúcido. Después de que haya tenido lugar la oxidación durante 5-10 min., se elimina el exceso de periodato tratando la placa con una solución al 2% de tiosulfato. Durante este proceso la placa se colorea al principio de marrón debido al iodo liberado, y después se vuelve incolora. Finalmente se pulveriza ligeramente con el reactivo de Schiff (solución al 1% en agua de hidrocioruro de pararosnilina decolorada por saturación con anhídrido sulfuroso). El color púrpura producido por el fosfatidilglicerol aparece casi inmediatamente.

2.16 Reconstitución del complejo enzima-membrana.

Los experimentos se llevan a cabo con enzima soluble y una cantidad de membrana residual fija (0,5 mg) en un volumen final de 1 ml.

En distintos tubos se introducen: membranas, enzima soluble, catión (Ca^{2+} ó Mg^{2+}) y tampón Tris-ClH pH 7.5 hasta completar el volumen final. Se hacen controles correspondientes sin membranas y otros sin enzima. Se ensayan 4 procedimientos diferentes:

- 1) Variando la concentración de enzima soluble (0,2, 0,5 y 1 mg). La cantidad de calcio es 8 mM y el tampón Tris-ClH 30 mM pH 7.5.
- 2) Variando la concentración de enzima soluble a distinta fuerza iónica del medio. Análogo al anterior, con Tris-ClH 100 mM pH 7.5 como tampón.
- 3) Variando la concentración de iones Ca^{2+} . La cantidad de enzima es de 0,5 mg y las concentraciones de Ca^{2+} usadas son 1, 5, 10 y 50 mM. La fuerza iónica del medio es 30 mM.
- 4) Variando la concentración de iones Mg^{2+} . La cantidad de enzima y fuerza iónica son análogas al (3). Las concentraciones de Mg^{2+} son de 1, 5 y 10 mM.

Los tubos se agitan durante 5 min y se dejan 10 min a temperatura ambiente. A continuación se centrifugan a $43500 \times g$ durante 30 min a 0°C .

Para los ensayos de actividad enzimática de los sobrenadantes, se toman alícuotas de los mismos que correspondan a $60 \mu\text{g}$ de proteína soluble (igual volumen se toma del blanco que lleva solamente membranas residuales y tampón, para restar los niveles de ATPasa que hubieran podido quedar en las membranas teóricamente desprovistas de enzima). El Ca^{2+} ó Mg^{2+} (cuando se especifique) añadido al medio de reacción es el necesario para que la concentración final sea de $4 \mu\text{moles}$ de Ca^{2+} ó $2,5 \mu\text{moles}$ de Mg^{2+} . La cantidad de ATP es de $4 \mu\text{moles}$ y los ensayos se llevan a cabo en presencia de tripsina ($6 \mu\text{g}$).

La actividad se determina por método colorimétrico.

3. RESULTADOS.

3.1 Caracterización enzimática de la ATPasa soluble de M. lysodeikticus.

La "alotopía" o alteración de las propiedades funcionales de un enzima de membrana según sea su estado físico, hace que para su caracterización total sea absolutamente necesario estudiar todos y cada uno de los estados en que puede presentarse. La ATPasa de M. lysodeikticus, como ya indicamos en la Introducción (1.2.7), es un enzima que presenta variaciones alotópicas considerables, y dado la gran información que poseemos acerca de sus propiedades en el estado unido a la membrana y purificado (126 y 130 entre otros), nos parece indispensable completar estos estudios con la caracterización de la ATPasa soluble, dirigiendo nuestra atención a tres de las propiedades que varían más ostensiblemente al pasar de un estado a otro: acción de la tripsina y de los cationes divalentes en la estimulación de la actividad enzimática, y efecto de dos inhibidores, diciclohexilcarbodiimida y atebrina.

3.1.1 Efecto de la tripsina sobre la ATPasa soluble.

Los experimentos llevados a cabo con objeto de esclarecer este efecto, demuestran que la actividad hidrolítica de la ATPasa soluble se estimula en un 150-200 % sobre su actividad basal. Esta estimulación es independiente de que el catión añadido en el medio de reacción sea Ca^{2+} ó Mg^{2+} , e independiente también de que el enzima esté o no concentrado por filtración a través de un tamiz molecular.

En la Fig. 4 puede observarse la estimulación de la actividad hidrolítica a distintas concentraciones de tripsina. En el rango de concentración 4-10 μg tripsina se localiza la máxima estimulación. El descenso de actividad provocado por concentraciones más elevadas puede explicarse por la acción proteolítica de la tripsina.

Con objeto de estudiar los cambios inducidos en la molécula de ATPasa por acción del enzima proteolítico se emplearon geles de poliacrilamida al 7% de 4 cm de longitud, con y sin DSS. Los resultados obtenidos en ausencia de DSS se ilustran en la Fig. 5. La banda 1 (movilidad relativa=0,24), que corresponde a la ATPasa nativa, muestra una tendencia a desdoblarse cuando reacciona con el sustrato como se ve comparando los geles B y C, apareciendo una banda

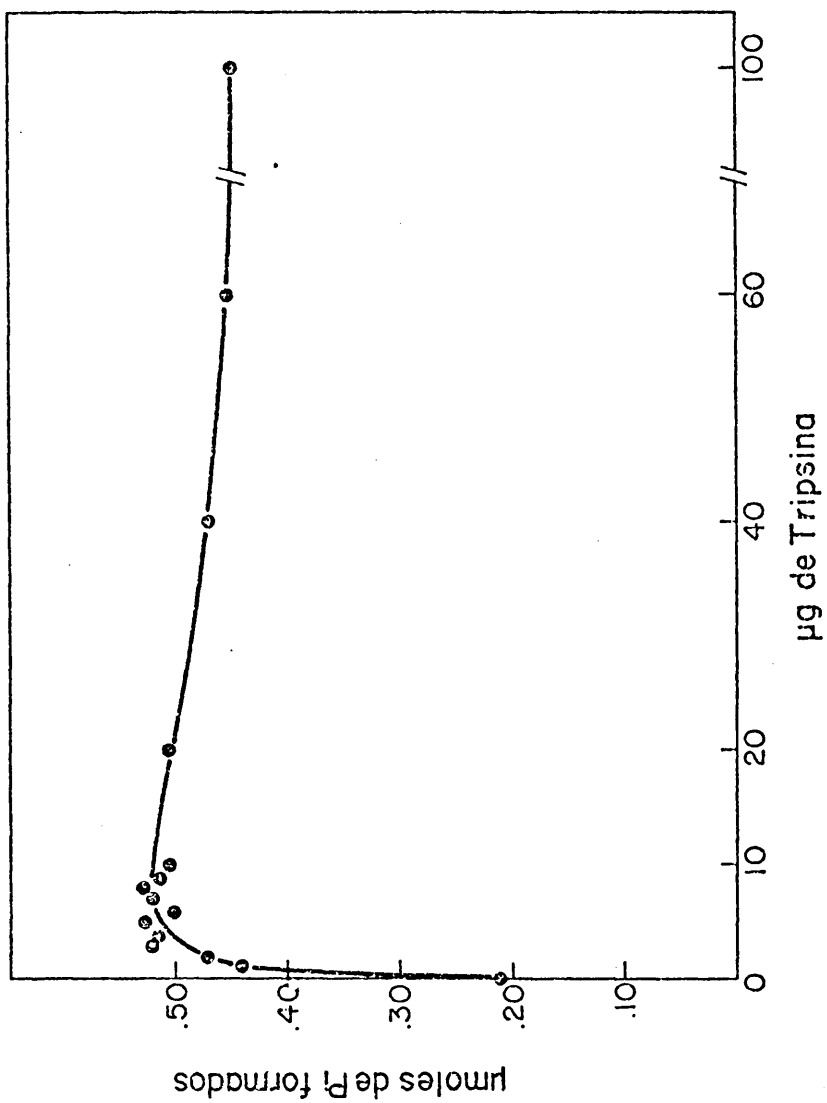


FIGURA 4.- Estimulación de la actividad hidrolítica de la ATPasa soluble de M. lysodeikticus por acción de la tripsina. En los ensayos la cantidad de enzima soluble permanece constante (60 µg), así como el ATP (4 µmoles) y Ca^{2+} (4 µmoles) añadidos en el medio de reacción.

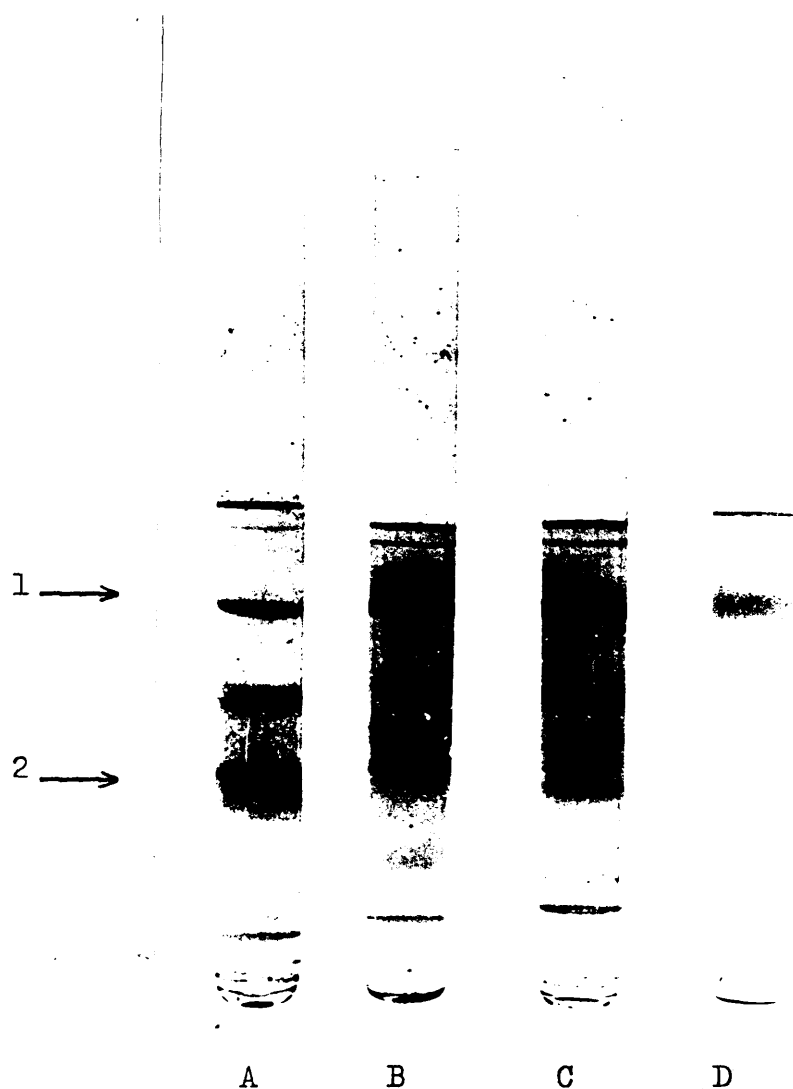


FIGURA 5.- Patrón electroforético en ausencia de DSS, de las siguientes muestras: gel A = tripsina, Ca^{2+} , ATP y enzima; gel B = Ca^{2+} , ATP y enzima; gel C = enzima; gel D = tripsina.

La reacción de ATPasa se llevó a cabo antes de correr los geles, como se describe en Materiales y Métodos. Las cantidades de los reactivos, por 60 μg de proteína son: 4 μmoles de ATP, 4 μmoles Ca^{2+} , 10 μg tripsina. En todos los casos se añade 10 μg de inhibidor de tripsina para detener la reacción.

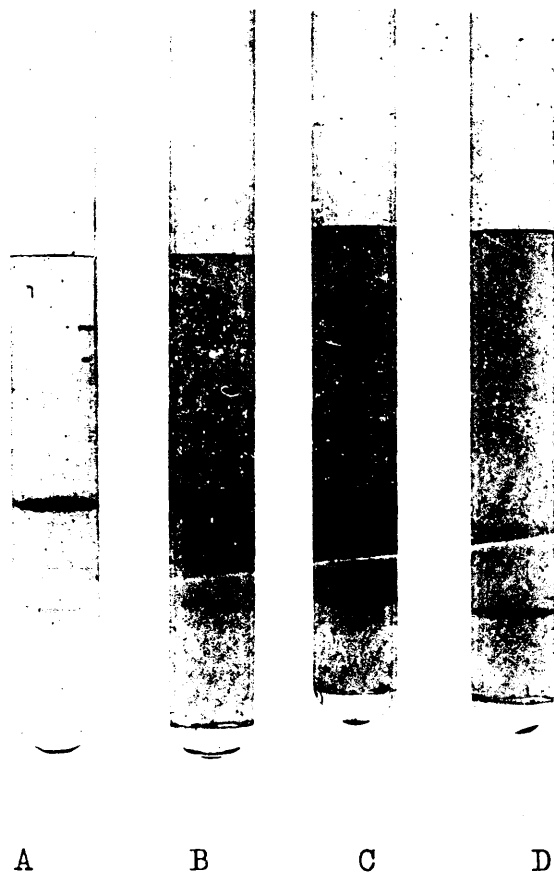


FIGURA 6.- Patrón electroforético con DSS de las muestras descritas en la Fig 5. Para detalles experimentales véase Fig 5.

en el B de movilidad relativa 0,63 (banda 2) que no posee el gel C. Este desdoblamiento es mucho más acusado cuando la reacción se lleva a cabo en presencia de tripsina (gel A), donde puede observarse la disminución de la banda de ATPasa nativa y el aumento experimentado por la banda 2, en comparación con los geles B y C. En el caso de los geles con DSS (Fig. 6) en el gel A hay un solapamiento total de las subunidades α y β . Este solapamiento es menos acentuado en el gel B pero sigue sin existir la nítida separación obtenida al analizar electroforéticamente la proteína sin tripsina ni ATP (gel C).

El desdoblamiento tan acusado (Fig. 5) de la banda de ATPasa nativa en presencia de sustrato y tripsina sugiere una relación entre la separación del enzima en dos bandas y la estimulación de la actividad enzimática, lo que plantea la posibilidad de que sea la banda 2 la que posea la propiedad de hidrolizar el ATP. Para comprobar esta hipótesis, el paso inmediato fue localizar la actividad enzimática mediante la reacción histoquímica de la ATPasa. Las muestras analizadas son las descritas en la leyenda de la Fig. 5. Una vez revelados los geles los resultados fueron:

- La única zona positiva para la reacción histoquímica de la ATPasa tenía una movilidad relativa de 0,24. Corresponde pues a la banda 1 de la Figura 6 (ATPasa nativa). Esta banda, al igual que en los geles teñidos para proteínas, era más estrecha cuando la reacción del enzima con ATP se llevaba a cabo en presencia de tripsina que en su ausencia.
- De los geles control, el que contenía la reacción enzimática en ausencia de tripsina presentaba una banda positiva de actividad de movilidad 0,24.

Estos resultados no concuerdan con la hipótesis planteada, pues confirmansin lugar a dudas que es la banda de ATPasa nativa la que posee la actividad hidrolítica. El hecho interesante de que el gel control dé reacción histoquímica de ATPasa positiva en la zona correspondiente a la ATPasa nativa sólo puede significar que cuando la reacción enzimática se lleva a cabo en ausencia de tripsina, el enzima tiene Pi ó ATP fijado a su molécula.

Para confirmar los resultados obtenidos por los diversos métodos de tinción, se incubó el enzima y sustrato (ATP- γ -³²P) en presencia y ausencia de tripsina en el medio de reacción, aplicándose seguidamente a sendos geles

con objeto de observar la distribución de la radiactividad. No consideramos necesario incluir la figura del perfil radiactivo de las distintas zonas de los geles. Bástenos saber que la zona correspondiente a la ATPasa nativa contiene una radiactividad que es aproximadamente doble cuando la reacción se ha llevado a cabo en ausencia de tripsina (9000 cpm frente a 5000 cpm). Este resultado confirma el hecho de que cuando la ATPasa reacciona con el sustrato en ausencia de tripsina hay más $^{32}\text{P}_i$ fijado a la molécula que cuando la reacción tiene lugar en presencia del enzima proteolítico.

3.1.2 Efecto del Ca^{2+} sobre la ATPasa soluble. Influencia de la tripsina y/o calcio en los parámetros cinéticos del enzima.

El efecto de los iones sobre la actividad de los enzimas es un tema que suscita interés y controversia. Son ampliamente conocidos los requerimientos de muchos enzimas para cationes monovalentes y sobre todo divalentes, y a este respecto nos ocupamos brevemente en la Introducción (1.2.3). La ATPasa de M. lysodeikticus es activada preferencialmente por Mg^{2+} en su estado unido a la membrana, mientras que en el estado soluble y puro lo es por Ca^{2+}

(128). A la vista de estos conocimientos consideramos indispensable para comprender la función del Ca^{2+} en el mecanismo de la reacción enzimática, un estudio de los requerimientos de la ATPasa soluble para el catión Ca^{2+} y cual es la relación óptima de este ión con la concentración de ATP en el medio.

La Fig. 7 representa la curva de saturación de Ca^{2+} para una concentración de ATP constante. De las gráficas se desprende que en ausencia de Ca^{2+} hay una pequeña actividad basal en la ATPasa; el máximo de actividad comienza a la concentración de 8 mM, lo que coincide con otros valores que existen en la literatura. Actividades óptimas en condiciones de equimolaridad entre el catión y el ATP han sido descritas para algunas ATPasas bacterianas, p. ej. la de S. faecalis (57). En la Fig. 8 se representa la saturación de Ca^{2+} de la ATPasa soluble a dos tiempos de incubación enzima-sustrato. Puede observarse que en ausencia de tripsina y a bajas concentraciones de Ca^{2+} (0-1 mM), el tiempo de incubación de 10 min. produce una actividad enzimática igual a la obtenida en presencia de la proteasa cuando el tiempo de incubación es de 5 min. (tramo de curva común). Sin embargo, a mayores concentraciones de Ca^{2+} la diferencia de actividad se muestra igualmente dependiente de trip

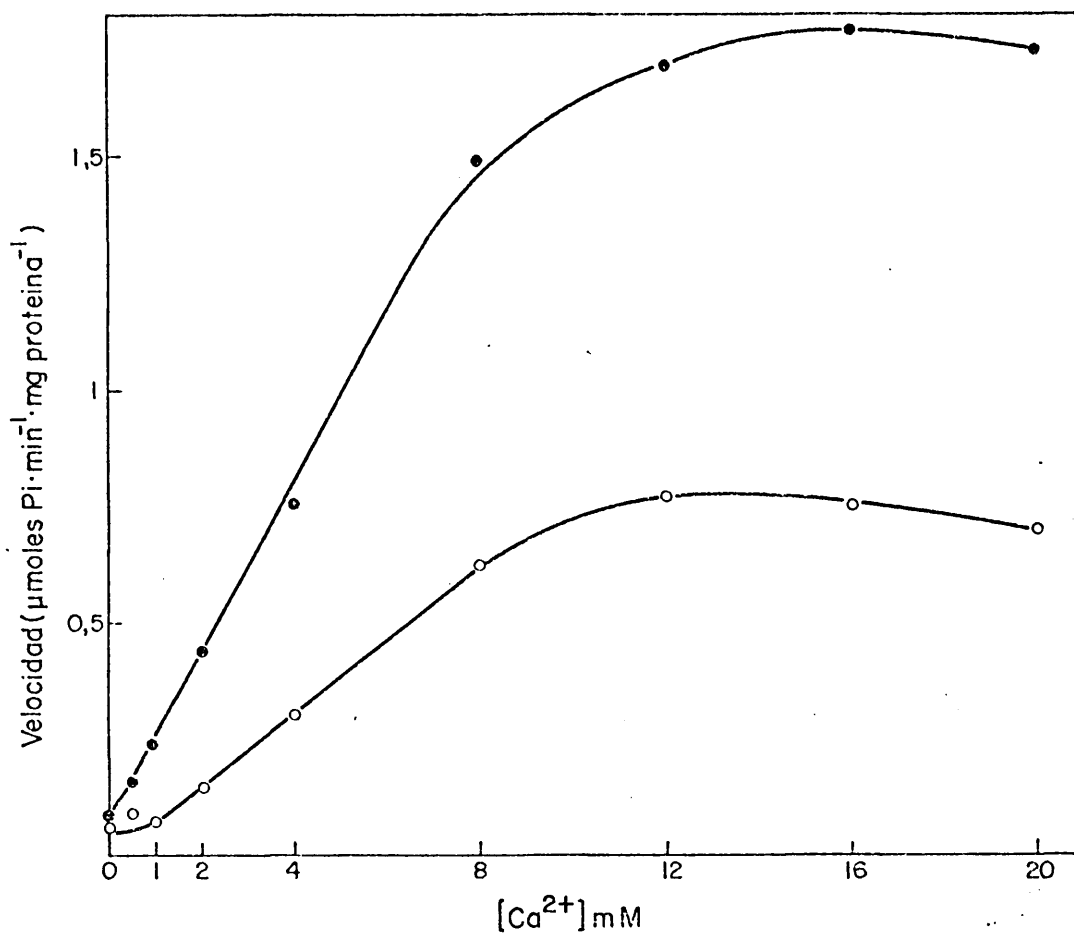


FIGURA 7.- Curva de saturación de Ca^{2+} para la ATPasa soluble de M. lysodeikticus. La concentración de ATP se conservó igual a 8 mM. El tiempo de incubación del enzima con ATP y Ca^{2+} fue de 5 min. ●—● Con tripsina. ○—○ Sin tripsina

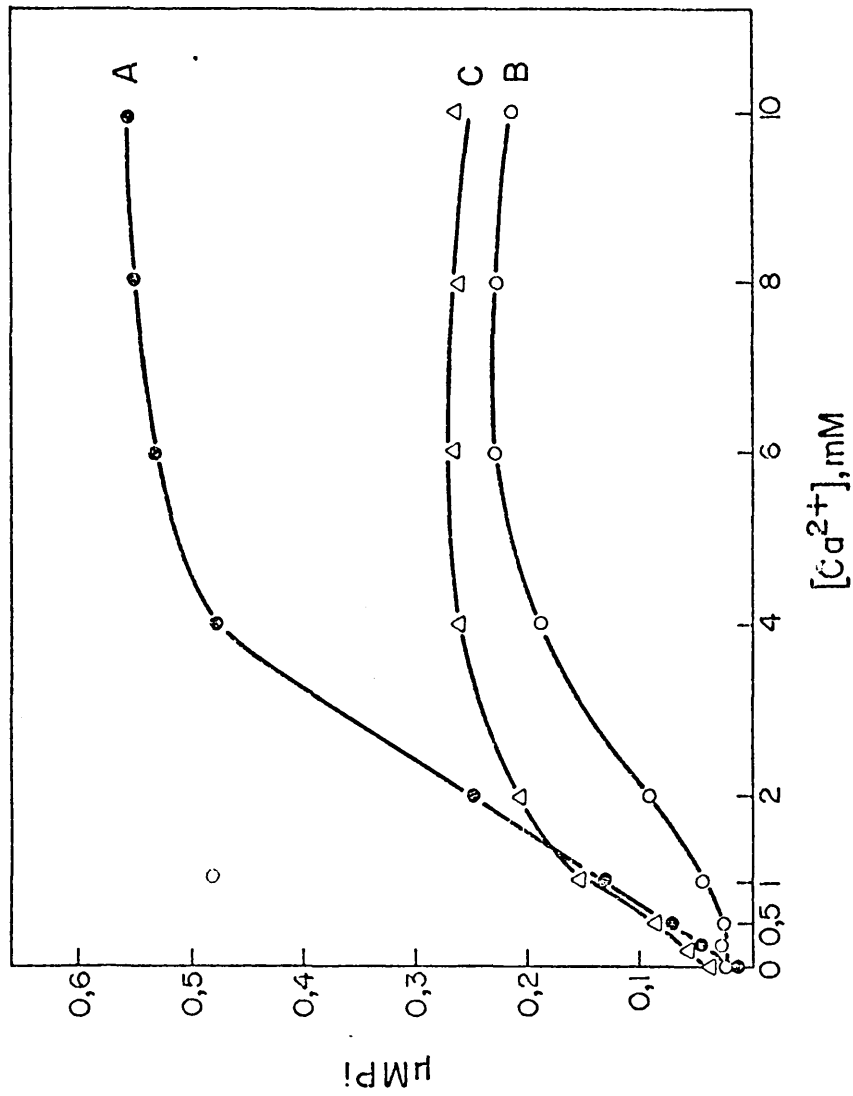


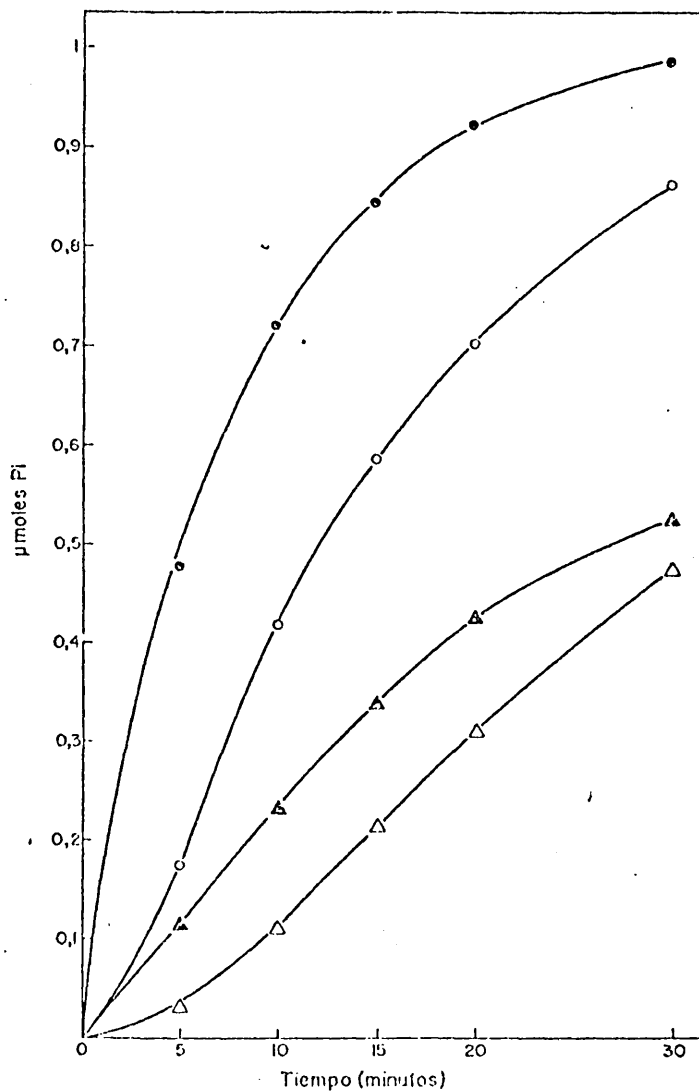
FIGURA 8.- Curvas de saturación de Ca^{2+} para la ATPasa soluble de M. lysodeikticus (a una concentración de ATP constante y a dos tiempos de incubación enzima-sustrato).

(A) con tripsina, 5 min. de incubación. (B) sin tripsina, 5 min. de incubación. (C) sin tripsina, 10 min. de incubación.

sina, aunque los tiempos de incubación sean diferentes. La comparación entre las curvas B y C nos permite afirmar que a bajas concentraciones de Ca^{2+} la dependencia del tiempo de incubación afecta bastante la actividad enzimática, mientras que a altas concentraciones de catión esta dependencia permanece prácticamente constante.

A la vista de estos resultados nos pareció interesante estudiar la variación de actividad sufrida por la ATPasa soluble a distintos tiempos de incubación y a dos concentraciones fijas de Ca^{2+} : 2mM y 12 mM. La concentración de ATP era de 8 mM en todos los ensayos. De los resultados, representados en la Fig. 9, se observa:

- a) La actividad enzimática es siempre mayor en presencia de tripsina que en su ausencia. Por lo tanto, la tripsina estimula la actividad ya haya exceso o defecto de Ca^{2+} en relación a la concentración óptima del mismo. La estimulación es mayor cuando la relación:
 $\text{ATP}/\text{Ca}^{2+}$ es 4/6.
- b) A tiempos largos esta estimulación tiende a desaparecer, lo que puede interpretarse como resultado de la acción proteolítica de la tripsina.



URA 9.- Dependencia del tiempo de la actividad enzimática de la ATPasa soluble de M. lysodeikticus a dos concentraciones de Ca²⁺ en presencia y ausencia de tripsina. La concentración de ATP es de 8 mM.

●—● Con tripsina, [Ca²⁺] = 6 mM. ○—○ Sin tripsina [Ca²⁺] = 6 mM.

▲—▲ Con tripsina [Ca²⁺] = 2 mM. △—△ Sin tripsina, [Ca²⁺] = 2 mM.

Basados en la interesante función que la ATPasa debe desempeñar en el microorganismo vivo, y con objeto de completar el estudio de la acción conjunta del Ca^{2+} y la tripsina obteniendo una expresión cuantitativa de esta acción, hemos llevado a cabo tres cinéticas de saturación de sustrato, prescindiendo de la verdadera naturaleza del mismo, a distintas relaciones $\text{ATP}/\text{Ca}^{2+}$ y en ausencia y presencia de tripsina.

La Fig. 10 representa la cinética de saturación de sustrato cuando la relación $\text{ATP}/\text{Ca}^{2+}$ es 1/1, es decir, la óptima observada. En las Figs. 11 y 12 se representan las gráficas de saturación a proporciones $\text{ATP}/\text{Ca}^{2+}$ de 4/1 y 4/6 respectivamente. Las curvas presentan, tanto en presencia de tripsina como en su ausencia, una forma típicamente Michaeliana que puede interpretarse como indicio de independencia de sitios.

Las representaciones directas de la velocidad frente a la concentración de sustrato ofrecen una valoración cuantitativa de los parámetros cinéticos muy escasa e insegura. Por esta razón preferimos la representación de Lineweaver-Burk (172) para calcular la K_m y V_m . En la parte superior de las Figs. 10, 11 y 12 se incluyen las correspondientes representaciones dobles recíprocas para cada relación

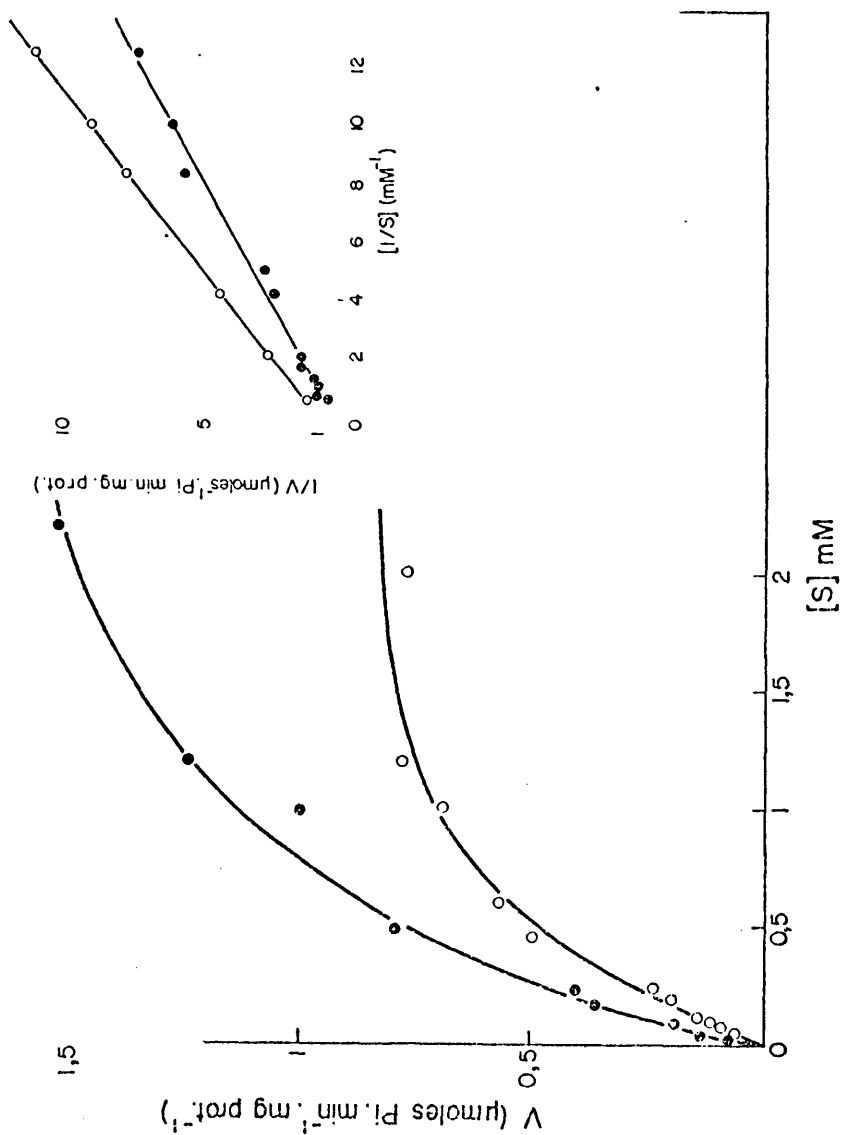


FIGURA 10.- Curva de saturación de sustrato para la ATPasa soluble de M. lysodeikticus. Bajo la denominación de sustrato se incluye ATP y Ca^{2+} en relación 1/1. La cantidad de enzima soluble es constante (60 μg) así como la de tripsina (6 μg). ●—● Con tripsina. ○—○ Sin tripsina. En la parte superior: representación de Lineweaver-Burk. ●—● Con tripsina; ○—○ sin tripsina.

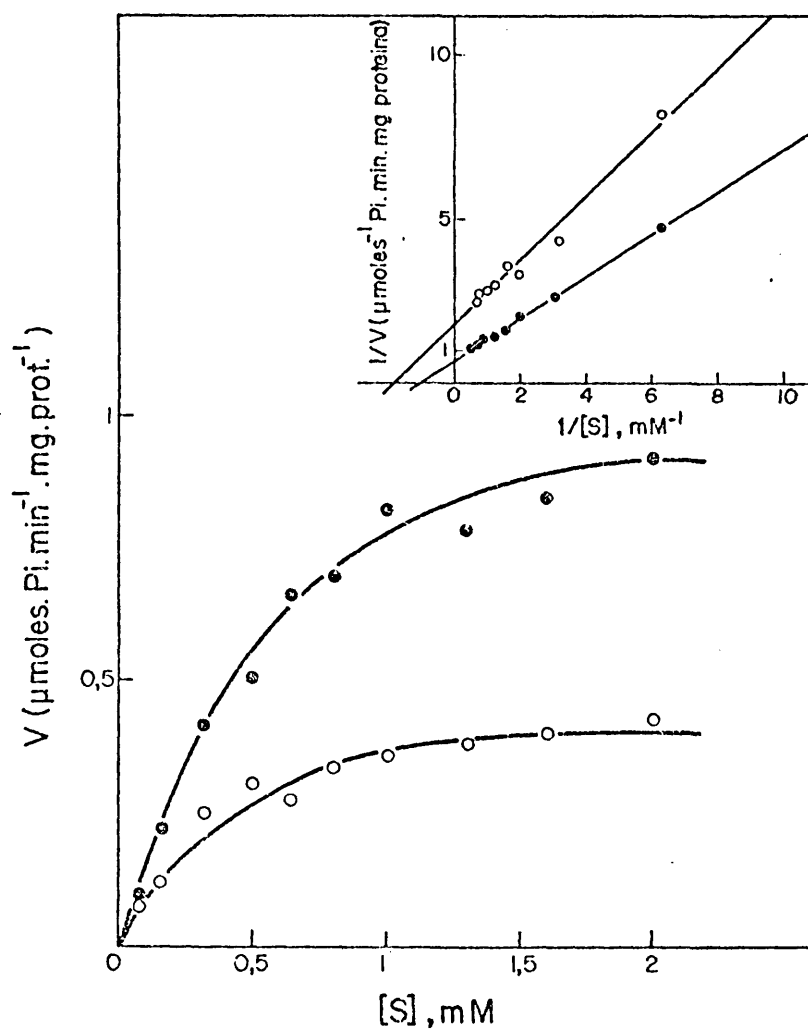


FIGURA 11.- Curva de saturación de sustrato para la ATPasa soluble de M. lysodeikticus. Las condiciones son análogas a las de la Fig. 10, exceptuando que la relación $\text{ATP}/\text{Ca}^{2+}$ es 4/1. ●● En presencia de tripsina. ○○ En ausencia de tripsina. Parte superior: Representación de Lineweaver-Burk ●● Con tripsina, ○○ sin tripsina.

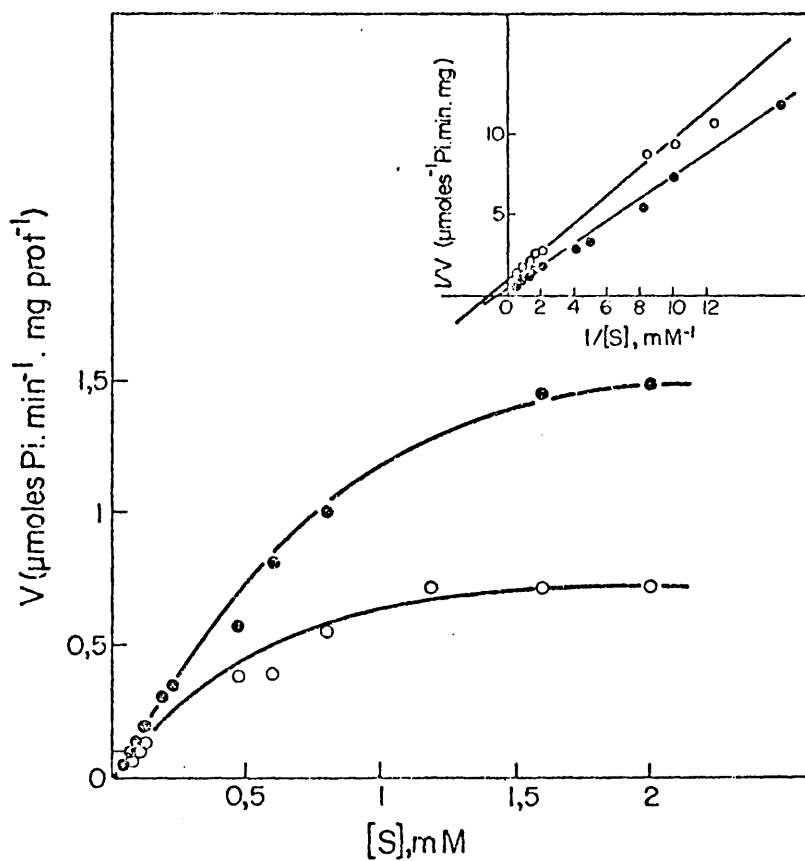


FIGURA 12.- Curva de saturación de sustrato para la ATPasa soluble de M. lysodeikticus. La relación $ATP/Ca^{2+} = 4/6$. Las demás condiciones son análogas a las de las Figs. 10 y 11. ●—● Con tripsina, ○—○ sin tripsina. Parte superior: representación de Lineweaver-Burk; ●—● Con tripsina, ○—○ sin tripsina.

ATP/Ca²⁺.

Los parámetros cinéticos así calculados se resumen en la Tabla III. Podemos observar que en presencia de tripsina aumenta tanto la K_m como V_m por lo que este resultado no nos proporciona un conocimiento definitivo acerca del mecanismo de acción de la tripsina sobre la actividad ATPasa.

En cuanto al efecto del Ca²⁺ sobre estos parámetros, vemos que la K_m aumenta a medida que lo hace la concentración de Ca²⁺ en relación a la de ATP. La V_m sin embargo permanece constante a relaciones 1/1 y 4/6 siendo superior a la obtenida cuando la relación ATP/Ca²⁺ es 4/1. Lo único que podemos decir es que cuando la concentración de Ca²⁺ respecto a la de ATP supera la óptima, disminuye la afinidad del enzima por el sustrato.

3.1.3 Efecto de la diciclohexilcarbodiimida y atebrina como posibles inhibidores de la ATPasa soluble de *M. lysodeikticus*.

Holloway y col. (173) demostraron que el DCCD era un potente inhibidor de la ATPasa de la membrana mitocondrial, en tanto que no alteraba la actividad de la forma soluble. Publicaciones posteriores han venido a demostrar que se fija a una proteína de la membrana mitocondrial interna de peso

TABLA III: Parámetros cinéticos de la ATPasa soluble de M. lyso-
deikticus, calculados en ausencia y presencia de
Tripsina, a tres relaciones ATP/Ca²⁺.

Relación ATP/Ca ²⁺ (mM)	Km (mM)	V _m (μ moles Pi·min ⁻¹ ·mgproteína ⁻¹)
4/1	+ Tripsina 0,9	1,4
	- Tripsina 0,5	0,55
1/1	+ Tripsina 1,11	2
	- Tripsina 0,7	0,9
4/6	+ Tripsina 1,6	2
	- Tripsina 0,8	1,1

El cálculo de estos parámetros se llevó a cabo a partir de las representaciones de Lineweaver-Burk (veáanse Fig. 10, 11 y 12)

molecular 10.000 (174) y que inhibe irreversiblemente la fosforilación oxidativa.

Igualmente sucede en el caso de los microorganismos en los que se ha estudiado su efecto inhibitor (S. faecalis, E. coli) (76). Nuestros resultados obtenidos con la ATPasa de M. lysodeikticus en su forma soluble coinciden con las aportaciones anteriores. La Fig. 13 muestra el ensayo realizado a distintas concentraciones de DCCD en presencia y ausencia de tripsina. Como puede observarse, el DCCD no inhibe la actividad ATPasa del extracto soluble, mientras que sí lo hace en el caso del enzima unido a la membrana (J. Carreira, comunicación personal).

La atebrina está descrita como inhibidor para la ATPasa de cloroplastos (94) y bacterias (95, 96). Para estudiar su efecto en la ATPasa soluble de M. lysodeikticus, se llevó a cabo una cinética de saturación de esta acridina en presencia y ausencia de tripsina (Fig. 14). En ambas curvas puede observarse que a bajas concentraciones la atebrina estimula la actividad enzimática. Esta estimulación es mayor en ausencia de tripsina que en presencia del enzima proteolítico. La estimulación va seguida de inhibición que se hace patente ya a concentraciones de atebrina de 0,5 mM

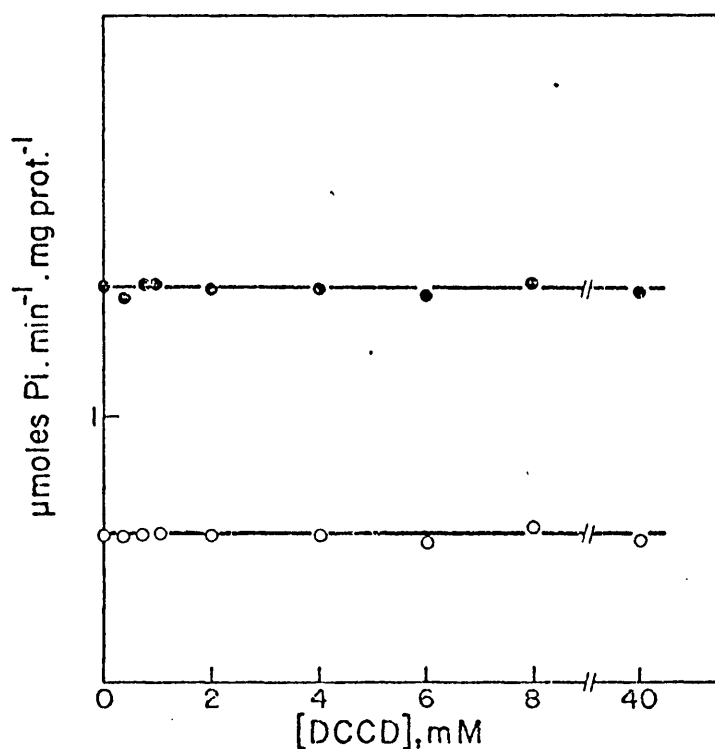


FIGURA 13.- Efecto de la diciclohexilcarbodiimida sobre la ATPasa soluble de M. lysodeikticus. La reacción se llevó a cabo en presencia (●—●) y ausencia de tripsina (○—○). El inhibidor fue aña dido al medio de reacción disuelto en 5 µl de Meta nol. El metanol en estas cantidades no tenía efecto alguno sobre la actividad enzimática.

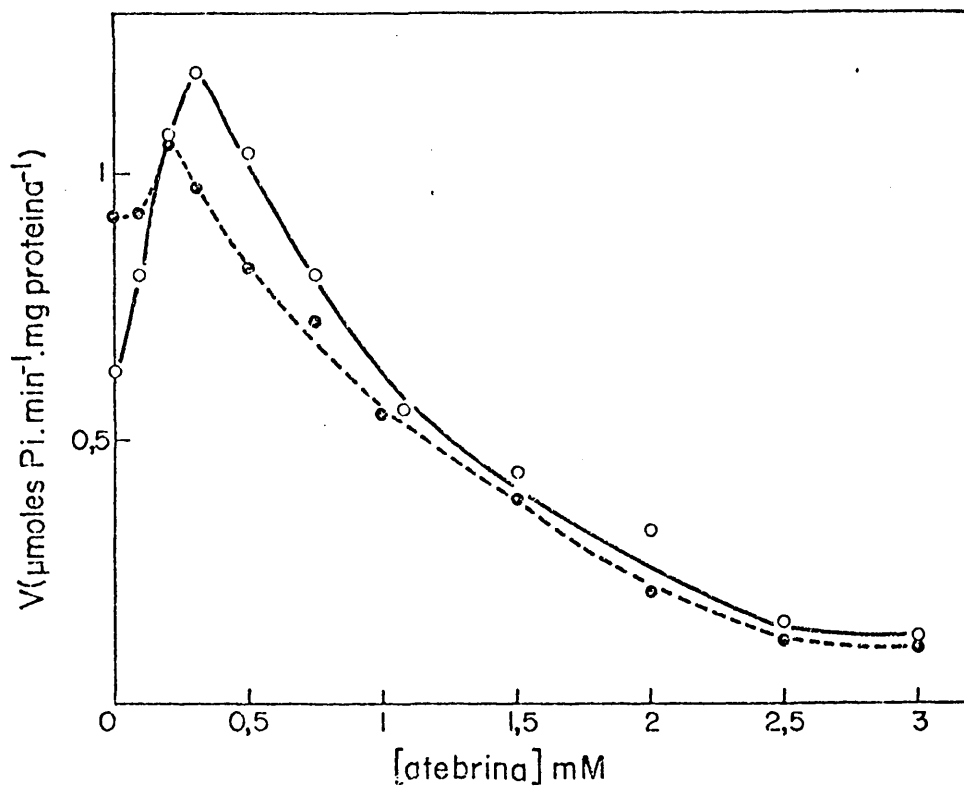


FIGURA 14.- Cinética de saturación de la atebriina para la ATPasa soluble de M. lysodeikticus. La concentración de ATP y Ca^{2+} es de 8 mM.

●—● en presencia de tripsina, ○—○ en ausencia de tripsina.

en presencia de tripsina y 1 mM en su ausencia. Para obtener información acerca del proceso de unión del inhibidor con el enzima, una de las técnicas más útiles y empleadas se debe a Hill (175) que la aplicó por primera vez a la curva de fijación de oxígeno a la hemoglobina. De acuerdo con la ecuación de Hill una función de la fracción de sitios ocupados representada frente a la concentración de sustrato u otro ligando puede dar una curva sigmoide, pero el logaritmo de esa función frente al logaritmo de la concentración de sustrato o de otro ligando dá lugar a una línea recta. La pendiente de esta recta tiene un notable valor informativo para conocer el mecanismo por el cual el ligando se fija al enzima. Esta pendiente, denominada coeficiente de Hill, representa una combinación del número de sitios y de la fuerza de interacción entre ellos por lo que su valor debe interpretarse como el mínimo número de sitios ocupados. Un coeficiente próximo a la unidad es indicativo de una total independencia de sitios pero no significa que exista un solo sitio. La comparación del coeficiente de Hill con el número total de sitios, cuando se conoce, nos ofrece una medida de la cooperatividad que será tanto mayor cuanto más próximos estén estos dos valores.

La Fig. 15 nos muestra la representación de Hill para la atebrina como ligando. El coeficiente de Hill para la cinética de inhibición es igual a 2 tanto en presencia como en ausencia de tripsina lo que significa, como acabamos de indicar, que la atebrina se une al menos en dos sitios a la molécula de ATPasa. El alto valor de este coeficiente nos sugiere a su vez que la unión de la primera molécula de inhibidor al enzima facilita su unión para una segunda y así sucesivamente, dando lugar a una cooperatividad positiva.

A bajas concentraciones de atebrina la representación de Hill de la cinética de estimulación en ausencia de tripsina nos dá un coeficiente de -1 , lo que es un claro indicio de cooperatividad negativa entre las moléculas del ligando.

Para obtener una expresión cuantitativa de la acción inhibidora de la atebrina, asimismo como para averiguar de qué tipo de inhibidor se trata, se llevó a cabo una cinética de saturación de sustrato a dos concentraciones fijas de atebrina (1,5 y 2,5 mM) en ausencia de tripsina. Tanto los valores de K_m (0,58 y 0,55) como de V_m (0,5 y 0,4) disminuyen a medida que aumenta la concentración de inhibidor. Recordando los valores de K_m y V_m (0,7 y 0,9 respectivamente) de la cinética de saturación de sustrato en

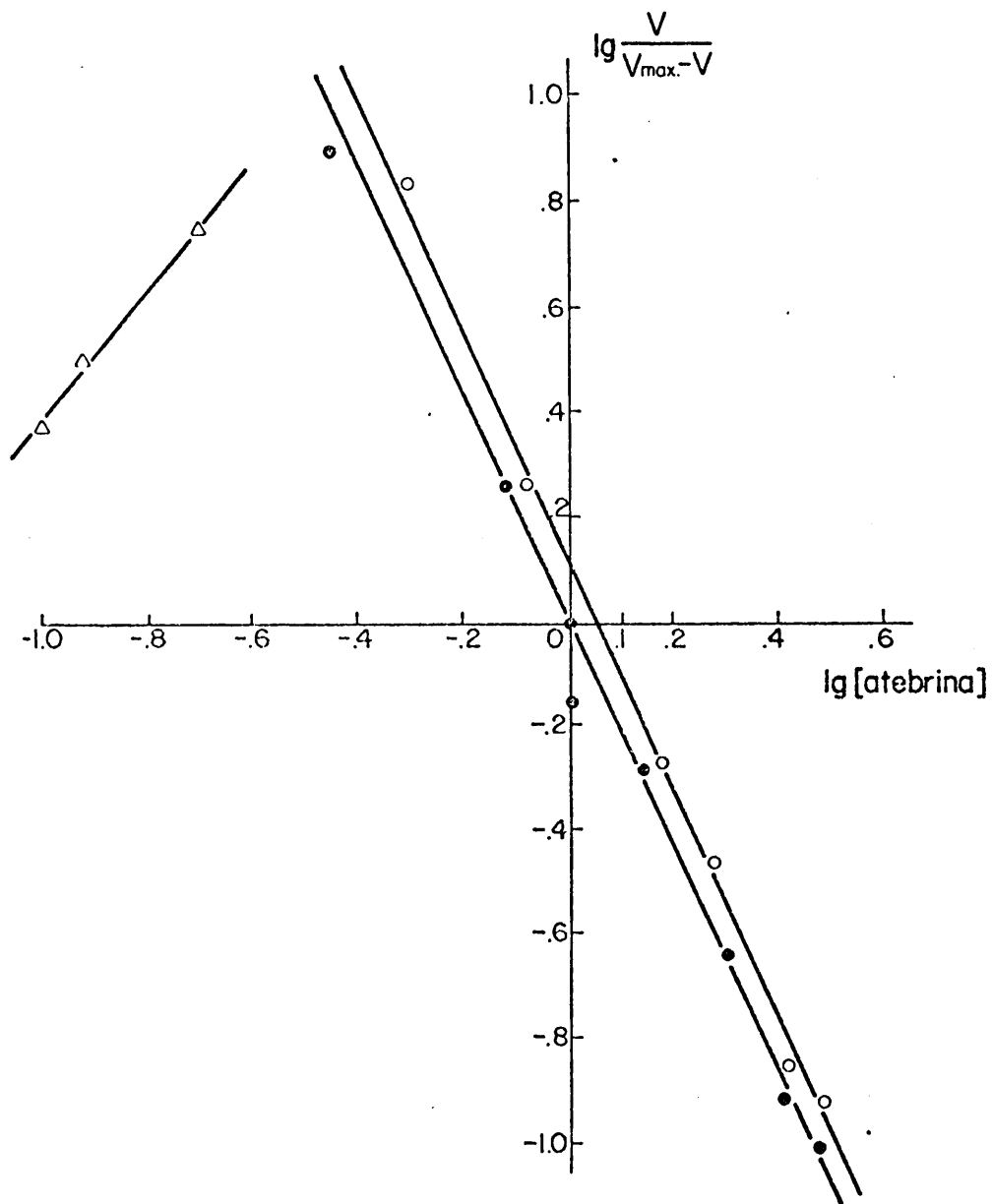


FIGURA 15.- Representación de Hill de la acción de la atebriina sobre la actividad enzimática de la ATPasa soluble. Inhibición de la actividad ATPasa por atebriina en presencia de tripsina (●—●) y en su ausencia (○—○).
 Δ—Δ Estimulación de la actividad enzimática a bajas concentraciones de atebriina en ausencia de tripsina.

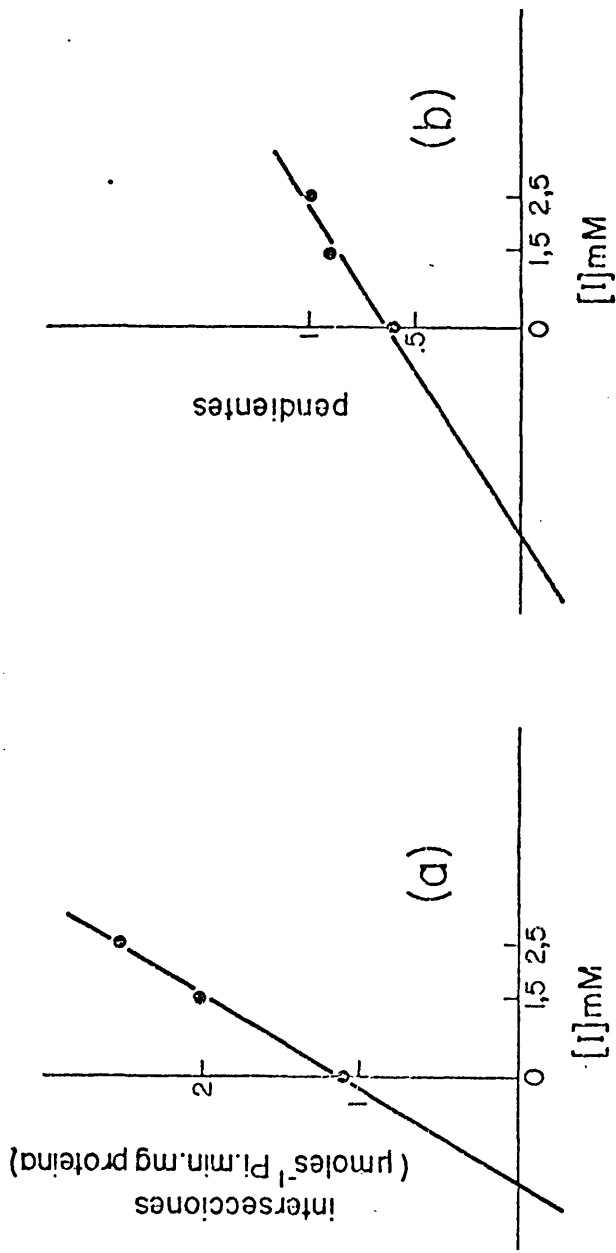


FIGURA 16.- Método de Cleland para el cálculo de las constantes de inhibición de la atebra. En (a) se representan las intersecciones de las rectas de Lineweaver-Burk con el eje de ordenadas (velocidades) para cada concentración del inhibidor. En (b), las pendientes hacen referencia a las obtenidas para cada recta de Lineweaver-Burk. No es necesario incluir las representaciones dobles recíprocas de la cinética de saturación de sustrato en presencia de atebra, a partir de los valores obtenidos.

las mismas condiciones experimentales pero en ausencia de atebrina, está claro que ambos parámetros varían en presencia del inhibidor, por lo que éste no puede considerarse competitivo o acompetitivo mixto. El hecho adicional de que la relación K_m/V_m se altere en presencia de atebrina nos hace clasificarla como inhibidor no competitivo mixto de la ATPasa

soluble de M. lysodeikticus. La determinación de las constantes de inhibición (Fig. 16) por el método de Cleland (176) nos da dos valores de K_i : 2 y 3,9 mM. La primera de ellas afecta a la velocidad de hidrólisis del sustrato y la segunda nos da la expresión cuantitativa de la afinidad del sustrato y la ATPasa soluble en presencia de atebrina.

3.2 Reconstitución del complejo enzima-membrana.

Los intentos de volver a fijar la ATPasa soluble de M. lysodeikticus a las membranas desprovistas de enzima se llevó a cabo en las condiciones descritas en Materiales y Métodos. De todos los procedimientos ensayados sólo se observa reconstitución del complejo cuando se añade Mg^{2+} a la mezcla ATPasa soluble-membrana. Por lo tanto podemos decir que la fijación de la ATPasa a las membranas de M. lysodeikticus depende de la presencia del catión Mg^{2+} y es independiente del Ca^{2+} y de la fuerza iónica del medio. La expresión cuan-

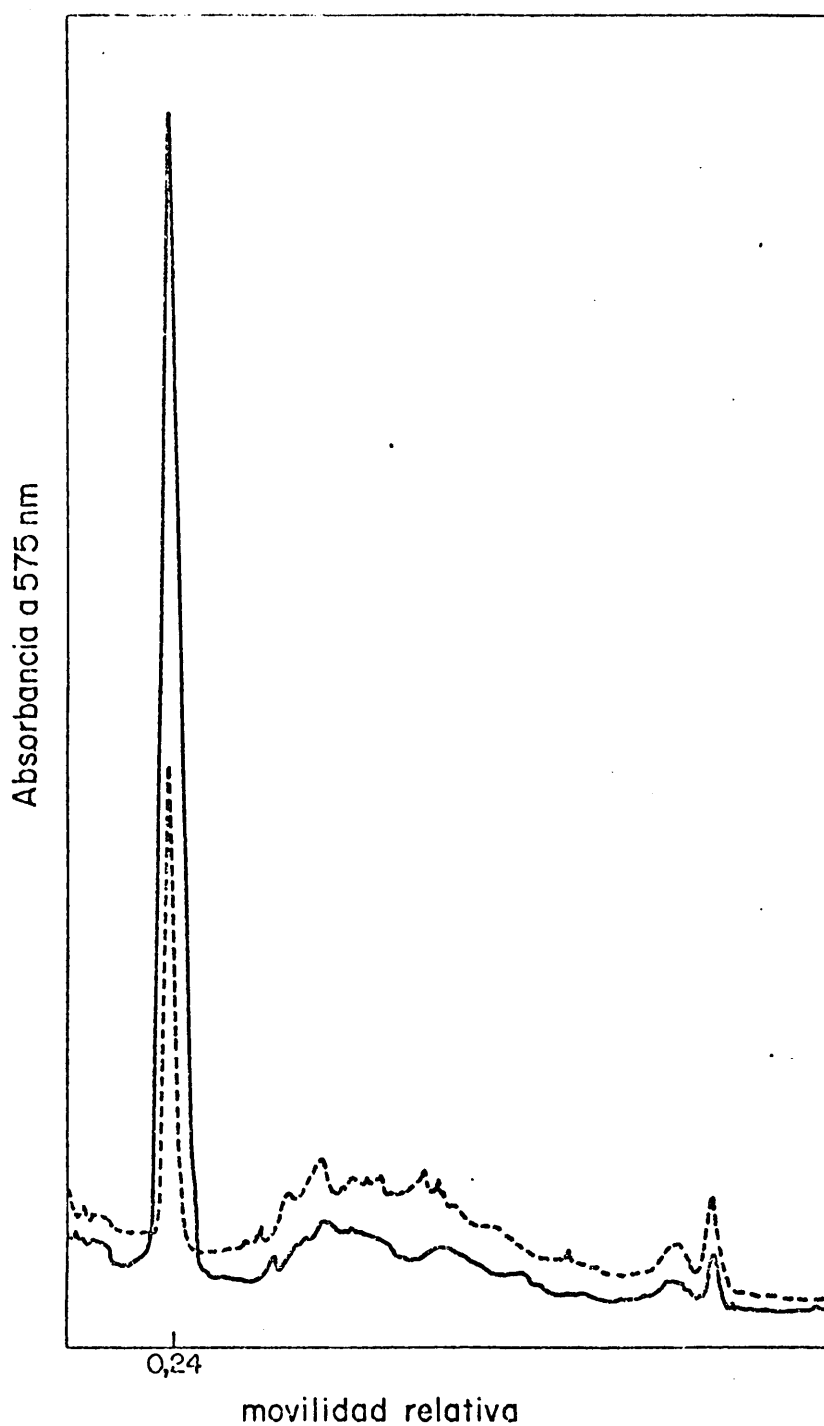


FIGURA 17.- Reconstitución del complejo ATPasa-membrana de M. lysodeikticus. La curva de trazo continuo representa el perfil densitométrico del gel control que contiene membranas y $[Mg^{2+}]$ 10 mM y la de trazo discontinuo corresponde al gel que contiene la mezcla de reacción: membranas + ATPasa soluble + $[Mg^{2+}]$ 10 mM. Para detalles experimentales veáanse Materiales y Métodos y Tabla IV.

TABLA IV: Reconstitución del complejo ATPasa - membrana variando la concentración de Mg^{2+} .

[Mg^{2+}] mM	% de reconstitución	
	Ensayo de actividad ATPasa con Ca^{2+}	Ensayo de actividad ATPasa con Mg^{2+}
1	32,5	28,6
5	44	35,2
10	65	57

La cantidad de membranas (0,5 mg) y ATPasa soluble (0,5 mg) permaneció constante, así como la fuerza iónica (30 mM). La concentración de Mg^{2+} añadido varió de 1 - 10 mM. La actividad ATPasa de los sobrenadante después de procesar las mezclas se valoró por el procedimiento habitual, empleando Ca^{2+} y Mg^{2+} como cationes activadores. (Veáse Materiales y Métodos)

titativa de esta fijación viene resumida en la Tabla IV. El grado de reconstitución más elevado que hemos obtenido ha sido del 65% al adicionar una concentración de Mg^{2+} de 10 mM y ensayando la actividad ATPasa del sobrenadante con Ca^{2+} . Estos resultados fueron comprobados por electroforesis en gel de poliacrilamida de los sobrenadantes obtenidos en los distintos procedimientos de reconstitución. En la Fig. 17 puede observarse la disminución de la banda de ATPasa nativa cuando se hace reaccionar el enzima soluble con la membrana en presencia de Mg^{2+} a una concentración de 10 mM.

3.3 Estudio de los componentes no peptídicos asociados a BF_1 de M. lysodeikticus. Detección e identificación de adenínnucleotidos.

3.3.1 Aislamiento de la ATPasa de M. lysodeikticus crecido en ^{32}P ortofosfato.

La Fig. 18 ilustra el perfil de elución de la actividad ATPasa y la radiactividad después de la filtración en Sephadex G-200 de BF_1 cruda aislada de células crecidas en un medio marcado con ^{32}P (las células, que se recogen en fase estacionaria de crecimiento, han incorporado un 50% del ^{32}P total añadido al medio). La mayor parte de la radiactividad se eluye en el volumen de vacío en un pico corres-

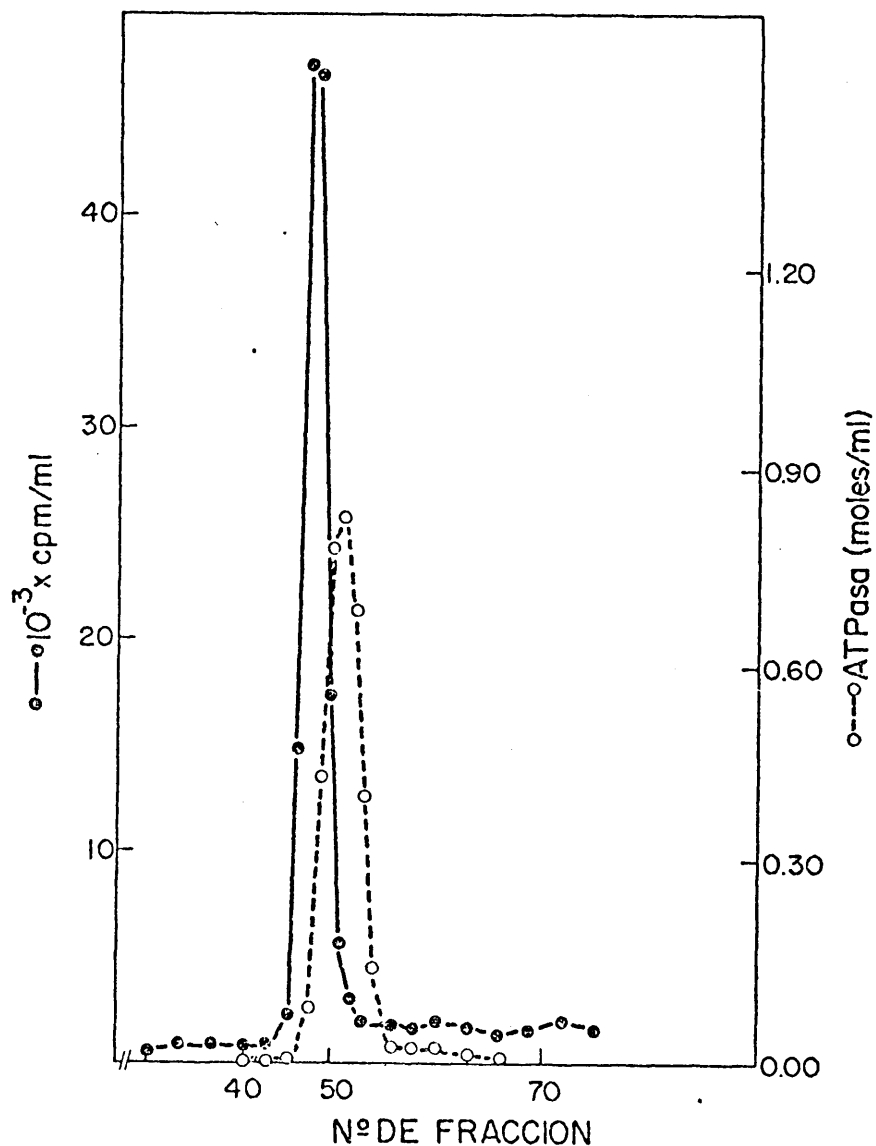


FIGURA 18.- Purificación de la ATPasa de M. lysodeikticus marcada con ^{32}P . La ATPasa soluble (700.000 cpm/mg proteína) se aisló de M. lysodeikticus crecido en presencia de ^{32}P ortofosfato y purificó por columna de Sephadex G-200. Las fracciones 48-54 se mezclaron y concentraron para dar la ATPasa purificada.

pondiente al que contiene la mayoría del material carotenóide presente en el enzima crudo, revelado por absorbancia a 475 nm (128, 130). De este resultado era difícil concluir que cierta cantidad de ^{32}P estaba asociado específicamente con la ATPasa. La asociación del ^{32}P firmemente unido al enzima activo ($13 \mu\text{moles Pi}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}$) se demostró mediante la electroforesis analítica en gel de poliacrilamida de las fracciones del eluido de la columna que presentaban actividad ATPasa. La Fig. 19 muestra el perfil de radiactividad del gel analizado en el Radiocromatógrafo Scanner. El perfil muestra la existencia de dos picos de radiactividad, uno de los cuales posee la misma movilidad relativa que la banda de ATPasa y el otro permanece al principio del gel. Este último pico se comporta como un lípido, pues corre por delante de la posición del marcador si se añade deoxicolato sódico a la muestra (177). Del perfil de radiactividad puede calcularse que el 40% del ^{32}P que posee la fracción de ATPasa procedente de la filtración en Sephadex permanece unido a la molécula enzimática. Este hecho se confirmó por la repurificación de BF_1 por cromatografía en gel o electroforesis semipreparativa. Los geles que se tiñeron para proteínas antes de determinar el perfil de radiactividad, no presentaban ningún pico radiactivo. La Tabla V muestra la

TABLA V: Distribución del marcaje con ^{32}P en la ATPasa de M. lyso-
deikticus en las diferentes etapas de purificación.

Preparación enzimática	Actividad ATPasa ($\mu\text{noles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgproteína}^{-1}$)		Radioactividad ^{32}P (cpm/mg prot.)
	- Tripsina	+ Tripsina	
Soluble	0,4	1,4	700.000
Sephadex G 200	13,0	13,0	90.000
Repurificada	13,0	12,5	35.000

Para detalles experimentales veáse Materiales y Métodos y Fig. 18. La radiactividad de todas las preparaciones de proteína se normalizaron al día 0, corrigiendo por la vida media del fósforo.

distribución de la radiactividad y actividad ATPasa a lo largo de las diferentes etapas de purificación del enzima solubilizado a partir de las membranas de M. lysodeikticus.

3.3.2 Identificación de los nucleótidos marcados con ^{32}P asociados con BF_1 .

Cuando la ATPasa de M. lysodeikticus purificada por filtración en Sephadex (95.000 cpm/mg proteína, Tabla V) se extrajo con cloroformo-metanol, cerca del 60% de la radiactividad fue a la fase orgánica. Esto confirma los resultados ilustrados en la Fig. 19. Sin embargo, si el enzima purificado (35.000 cpm/mg proteína, Tabla V) se sujeta al mismo procedimiento de extracción, prácticamente toda la radiactividad permanece asociada con la proteína en la fase acuosa. Cuando se extrajeron nucleótidos de la proteína desprovista de lípidos, se obtuvieron los resultados que muestra la Tabla VI. Alrededor del 25% de la radiactividad pertenece a los nucleótidos, aunque es posible que el 25% que permanece en el carbón corresponda también a este tipo de compuestos. El 50% de la radiactividad no adsorbida por el carbón activo puede representar el fosfato inorgánico asociado con la proteína, como sugiere la mancha radiactiva que corre de un modo similar en una electroforesis de esta fracción.

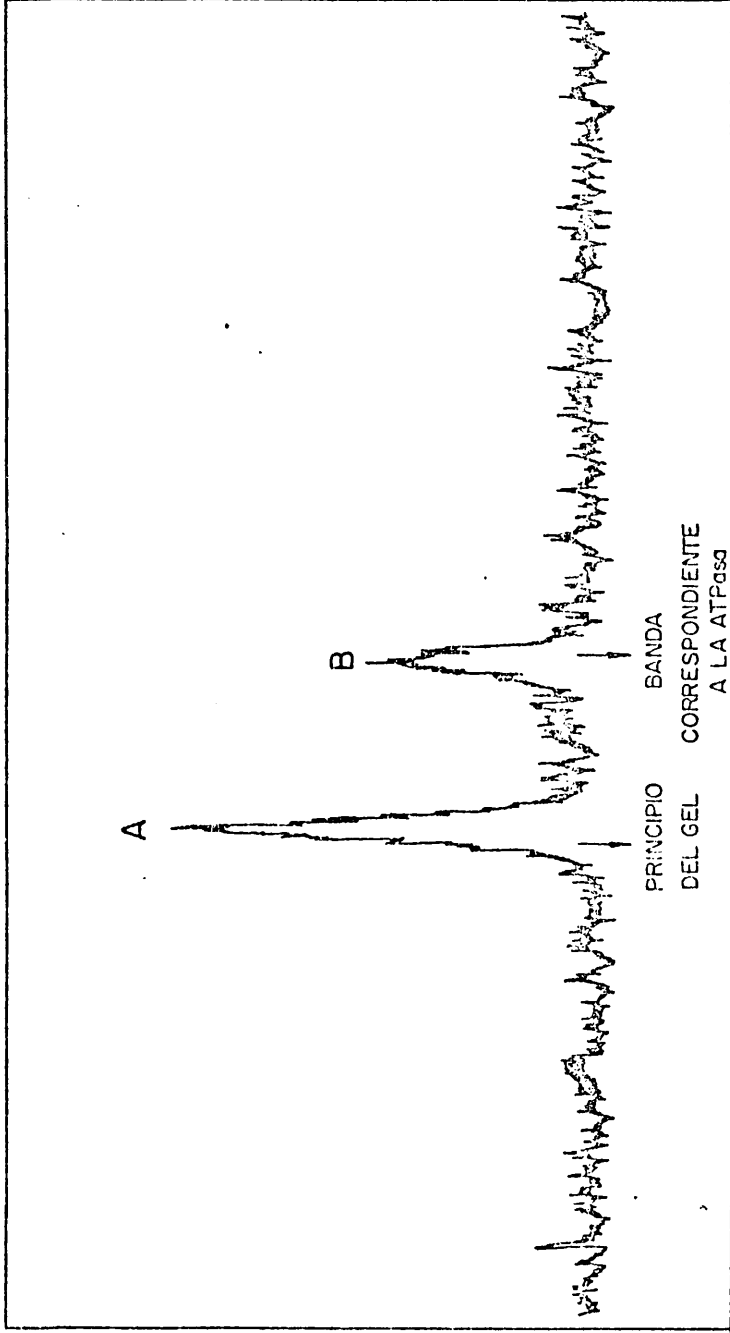


FIGURA 19.- Perfil de radiactividad e identificación de la ATPasa después de la electroforesis en gel de la ATPasa purificada marcada con ^{32}P . El gel se cortó longitudinalmente en dos mitades para detectar la banda de ATPasa y la radiactividad.

TABLA VI: Distribución del marcaje con ^{32}P después de extraer los nucleotidos de la ATPasa altamente purificada de M. lyso deikticus.

	Radiactividad ^{32}P		Compuestos ^{32}P
	cpm totales	%	identificados
ATPasa desnaturalizada	17.632	100	ATP, ADP, Pi
Sobrenadante de la ATPasa tratada con carbón activo	8.700	49,3	Pi
1º Extracto de etanol del carbón	4.100	23,3	ATP, ADP
2º Extracto de etanol del carbón	4.800	27,2	--

La ATPasa marcada con ^{32}P repurificada (500 μg /300 μl 30mM Tris - ClH pH 7,5) se extrajo con cloroformo: metanol y luego se procedió a la extracción de nucleotidos siguiendo el procedimiento de adsorción en carbón activo descrito en Materiales y Métodos.

El análisis electroforético del extracto de nucleotidos representado en la Fig. 20, nos permite identificar el ATP y ADP en cantidades aproximadamente equimolares. Resultados similares se obtienen cuando la extracción de nucleotidos se lleva a cabo por el procedimiento de extracción con ácido tricloracético descrito en Materiales y Métodos. No se detectó AMP en ningún caso.

3.3.3 Determinación enzimática del ATP fuertemente unido a las preparaciones de BF₁.

Una vez demostrada la presencia de adeninnucleotidos en BF₁ purificada estimamos interesante extender este estudio y determinar el contenido en ATP de las diferentes preparaciones, habiendo considerado como mejor método el ensayo de la luciferina-luciferasa. La Tabla VII muestra que el mejor rendimiento lo produce la desnaturalización con urea 8 M en comparación con los procedimientos convencionales de extracción de nucleotidos. Estos métodos dan valores 10-20% más bajos que la desnaturalización por urea. Sin embargo, las diferencias son demasiado pequeñas para ser las responsables del bajo rendimiento en la extracción de los componentes marcados con ³²P de la ATPasa (Tabla VI). Por otro lado, el bajo valor estimado en BF₁ nativa confirma que

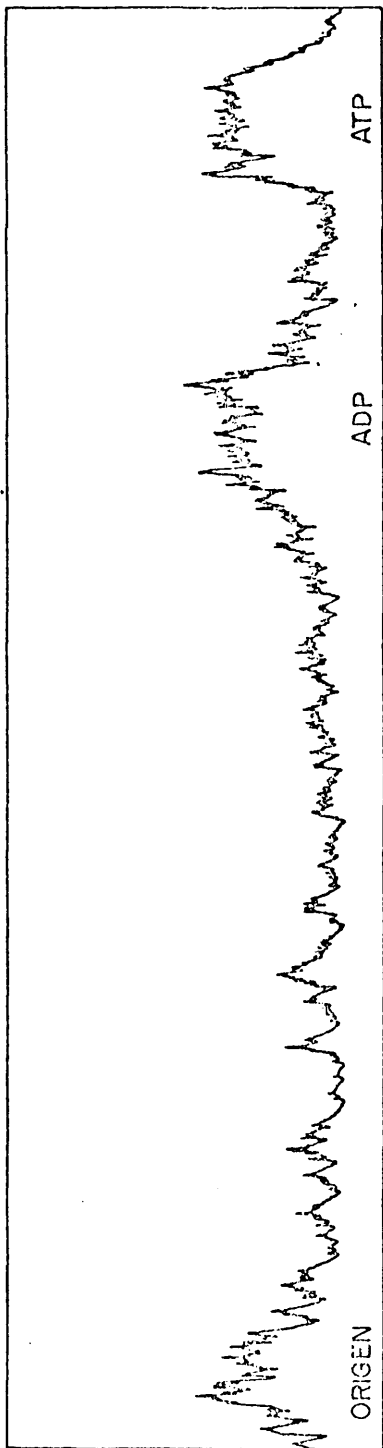


FIGURA 20.- Análisis electroforético del extracto de nucleotidos de BF_1 , con objeto de identificarlos y observar su relación cuantitativa. Para detalles experimentales véase Materiales y Métodos.

TABLA VII: Influencia del tratamiento de la ATPasa previo a la determinación del ATP ligado a la molécula mediante el ensayo luciferina - luciferasa.

Tratamiento de la ATPasa	moles ATP/mol ATPasa
Ninguno (BF ₁ nativa)	0,15
Desnaturalización por urea 8M	1,5
Extracción con ácido tricloroacético al 10% (p/V)	1,3
Adsorción en carbón activo	1,17

Alicuotas de una preparación de ATPasa purificada por Sephadex G 200 se sometieron a diferentes tratamientos y se midió el contenido en ATP. Para detalles experimentales, véase Materiales y Métodos. La concentración molar de ATPasa se calculó en base a un peso molecular de 350.000 Dalton.

el ATP está fuertemente ligado a la molécula de ATPasa y que esta unión depende la subestructura de la proteína. Intentamos pues correlacionar el nivel de ATP unido y la actividad ATPasa. La Tabla VIII resume los resultados de la variación del nivel del ATP unido y la actividad, mostrando la existencia de una cierta correlación aunque no totalmente lineal. Estos resultados señalan también (las bajas relaciones ATP/ATPasa de todos los controles) que la disminución del ATP no es una simple consecuencia de su liberación en el medio. Tiene que haber una degradación concomitante del ATP libre que responda de la disminución de la cantidad total de ATP. En nuestro laboratorio se ha demostrado (Carreira, J. y Muñoz, E., observaciones no publicadas) la existencia de una actividad ATPasa intrínseca del enzima purificado (es decir, una actividad independiente de los cationes divalentes añadidos externamente) que es capaz de hidrolizar lentamente ATP en ADP y P_i .

TABLA VIII: Variaciones en el nivel de la actividad ATPasa y ATP fuertemente ligado a la molécula enzimática de las preparaciones de ATPasa de M. lysodeikticus purificadas y conservadas en distintas condiciones.

Preparación	Método de purificación.	Edad y condiciones de almacenamiento	Actividad ATPasa ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	ATP/ATPasa mol/mol	
				Nativa	Desnaturalizada
I	Sephadex G-200	Fresca	12-14	0,18	2,07
"	"	Dos semanas, -20°C	9-10	0,10	1,33
"	"	Dos meses. Congelada y descongelada, varias veces	2,5-3	--	0,3
II	Sephadex G-200	Una semana, -20°C	8-9	0,2	1,5
"	"	Seis meses, -20°C	6	--	0,83
III	Electroforesis en Gel pH 7,2	Fresca	7	0,10	1,3
"	"	Seis meses, -20°C	4	--	0,72
IV	Electroforesis en Gel pH 8,5	Fresca	2,5-3	--	0,55

3.3.4 Intercambio del ATP endógeno unido a la ATPasa con nucleótidos externos.

Para determinar si el ATP endógeno de la ATPasa ocupa sitios de fijación intercambiables, se incubó BF₁ con ADP exógeno y se midió su contenido residual en ATP después de filtración por Sephadex G-100. También examinamos el efecto de este desplazamiento sobre el nivel de actividad ATPasa. La Tabla IX muestra los resultados obtenidos. Como puede observarse, el ADP es capaz de reemplazar el ATP firmemente unido a concentraciones tan bajas como 0,1 mM, y este desplazamiento parece ser independiente de la temperatura y del tipo de la preparación de ATPasa. Este intercambio del ATP por ADP no afecta aparentemente a la actividad hidrolítica del enzima. Es interesante señalar que por simple dilución y/o incubación de la ATPasa, se libera cierta cantidad del ATP firmemente unido. Esta liberación nos permite su determinación sin desnaturalizar la proteína (valores obtenidos para las proteínas nativas en los experimentos resumidos en la Tabla IX). Por tanto, la filtración subsiguiente en Sephadex de una proteína así tratada resulta en una disminución del nivel de ATP fijado pero sin cambio notable en su actividad ATPasa. Este mecanismo puede por tanto ser di-

TABLA IX: Intercambio de ATP fuertemente unido a la ATPasa de M. lyso-
deikticus con ADP externo.

Preparación	Condiciones experimentales	Actividad ATPasa ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}$)	ATP/ATPasa mol/mol	
			Nativa	Desnatural.
I, dos semanas - 20°C	---	9,5	0,1	1,33
"	Incubada 20 min, 40°C	9,2	0,6	1,3
"	Incubada filtrada por Sephadex	9	0,10	0,8
"	Incubada, ADP (1 mM) filtrada por Sephadex	9,1	0,01	0,1
"	Incubada, ADP (0.1mM) filtrada por Sephadex	9,2	0,01	0,1
IV, fresca	---	3,10	--	0,55
"	Incubada 20 min., 40°C	2,86	0,39	0,25
"	Incubada, filtrada por Sephadex	2,70	--	0,25
"	Incubada, ADP (0.1mM) filtrada por Sephadex	2,80	0,01	0,01

Para identificar las preparaciones, veáse Tabla VIII. Los demás detalles experimentales vienen en Materiales y Métodos y Tabla VII.

ferente del que acompaña a la inactivación de la proteína.

El intercambio de nucleótidos endógenos con ATP exógeno se llevó a cabo con ATPasa marcada con ^{32}P . La Fig. 21 a y b, es una representación de los experimentos llevados a cabo a distintas concentraciones de ATP externo en presencia y ausencia de Ca^{2+} . Alrededor del 50% del marcaje era desplazado por ATP 1 mM no excediendo el ATP 8 mM este porcentaje, mientras que el ATP 0,1 mM intercambiaba sólo un 10% de la radiactividad.

El grado de intercambio obtenido es independiente en todos los casos de la presencia de Ca^{2+} en el medio de reacción. La complejidad de estos resultados posiblemente implica una combinación de hidrólisis y fijación de ATP.

3.4 Estudio de componentes no peptídicos asociados a BF_1 de M. lysodeikticus. Confirmación de la ausencia de fosfolípidos firmemente unidos a la molécula de ATPasa.

Los fosfolípidos se marcan selectivamente añadiendo $[2-^3\text{H}]$ glicerol al medio de cultivo donde crecen las células de M. lysodeikticus. La radiactividad incorporada por las células fue el 50% del total introducido. La Tabla X ilustra la distribución del glicerol radiactivo y el conte

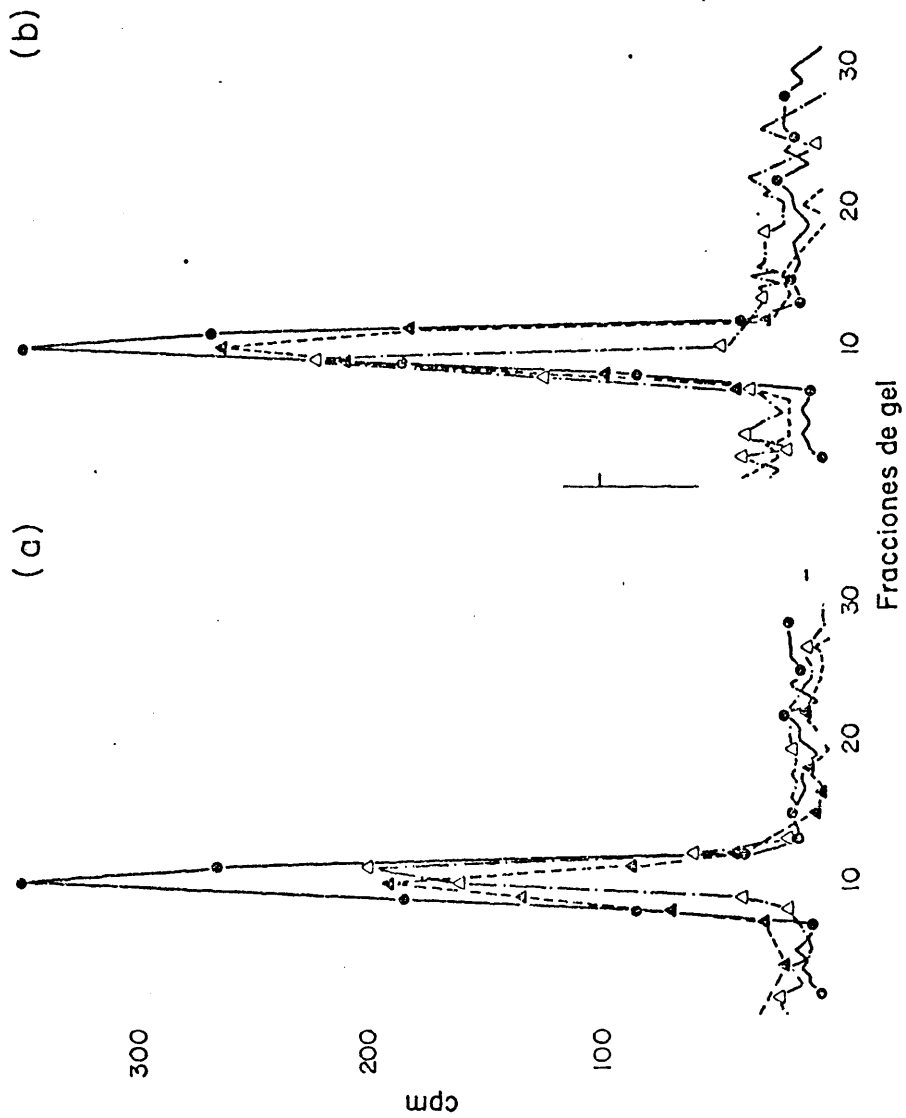


FIGURA 21.- Intercambio de nucleotidos endógenos de BF_1 con ATP exógeno. La reacción y detección de radiactividad en los geles se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos. (a) ●—●, control sin ATP exógeno añadido. Δ---Δ, ATP exógeno, 8 mM. ▲—▲, ATP exógeno 1 mM. (b) ●—● Control. Δ---Δ ATP exógeno 0,5 mM. ▲---▲ ATP exógeno 0,1 mM.

TABLA X: Distribución de proteína y fosfolípidos marcados con $[2-^3\text{H}]$ glicerol en las fracciones subcelulares aisladas de células de M. lysodeikticus recogidas en fase estacionaria de crecimiento.

Fracción	Proteína (mg/ml)	$[2-^3\text{H}]$ glicerol incorporado			Contenido en fosfolípidos nmol/mg prot.
		cpm/ml	%	cpm/mg proteína	
Citoplasma	13,2	190.490	10,8	14.431	0,12
1 ^{er} lavado	1,52	56.080	3,2	36.894	0,3
2 ^o lavado	0,36	46.510	2,6	129.194	1,07
3 ^{er} lavado	0,26	57.910	3,3	222.130	1,85
4 ^o lavado	0,21	52.110	3,0	248.142	2,06
1 ^{er} lavado después del choque osmótico (5 ^o lavado)	0,7	143.480	6,5	204.971	1,7
2 ^o lavado después del choque osmótico (6 ^o lavado)	0,23	91.900	5,2	400.565	3,3
Membranas residuales	1,24	1149.000	65,4	926.613	7,72

Las membranas se aislaron y lavaron para liberar la ATPasa de las células de M. lysodeikticus crecidas en $[2-^3\text{H}]$ glicerol por los procedimientos habituales descritos en Materiales y Métodos.

TABLA XI: Distribución de proteína y fosfolípidos marcados con $[2-^3H]$ glicerol, en las fracciones subcelulares aisladas de células de *M. lysodeikticus* recogidas en fase exponencial de crecimiento.

Fracción	Proteína (mg / ml)	$[2-^3H]$ glicerol incorporado			Contenido en fosfolípidos nmol/mg prot.
		cpm/ml	%	cpm/mg proteína	
Citoplasma	9,8	150.000	10,7	15.306	0,127
1 ^{er} lavado	1,53	64.500	4,6	42.156	0,35
2 ^o lavado	0,43	40.200	2,8	93.487	0,78
3 ^{er} lavado	0,25	45.000	3,2	180.000	1,5
4 ^o lavado	0,2	35.250	2,5	176.250	1,46
1 ^{er} lavado después del choque osmótico (5 ^o lavado)	0,5	138.000	9,8	276.000	2,3
2 ^o lavado después del choque osmótico (6 ^o lavado)	0,18	87.000	6,2	483.333	4,02
Membranas residuales	1,02	836.250	59,8	819.852	6,8

Para detalles experimentales, véase Tabla X y Materiales y Métodos.

nido en fosfolípidos de las fracciones obtenidas en un experimento típico de obtención de ATPasa de células recogidas en fase estacionaria de crecimiento. Como era de esperar, las membranas presentan la mayor incorporación específica de $[2-^3\text{H}]$ glicerol, aunque los lavados que siguen al "choque osmótico" tienen también proporciones relativamente elevadas. Con células recogidas en fase de crecimiento exponencial se obtuvieron similares resultados (Tabla XI).

Sin embargo, el perfil de elución de radiactividad y actividad ATPasa que resulta de la filtración en Sephadex G-200 sugiere (Fig. 22) que el enzima activo (obtenido de células tanto en fase de crecimiento estacionario como exponencial), tiene muy pocos o ningún fosfolípido asociado. Este hecho se confirma por el análisis cuantitativo que muestra la Tabla XII (obsérvese que hay menos de 3 moles de fosfolípidos asociados a 100 moles de ATPasa) y también por electroforesis analítica en gel de poliacrilamida que, en contraste con los resultados del marcaje de las células con ^{32}P , muestra una total ausencia de tritio en la banda de ATPasa. De estos resultados parece razonable concluir que no hay fosfolípidos fuertemente unidos a BF_1 de M. lysodeikticus. No obstante es muy probable que en las membranas

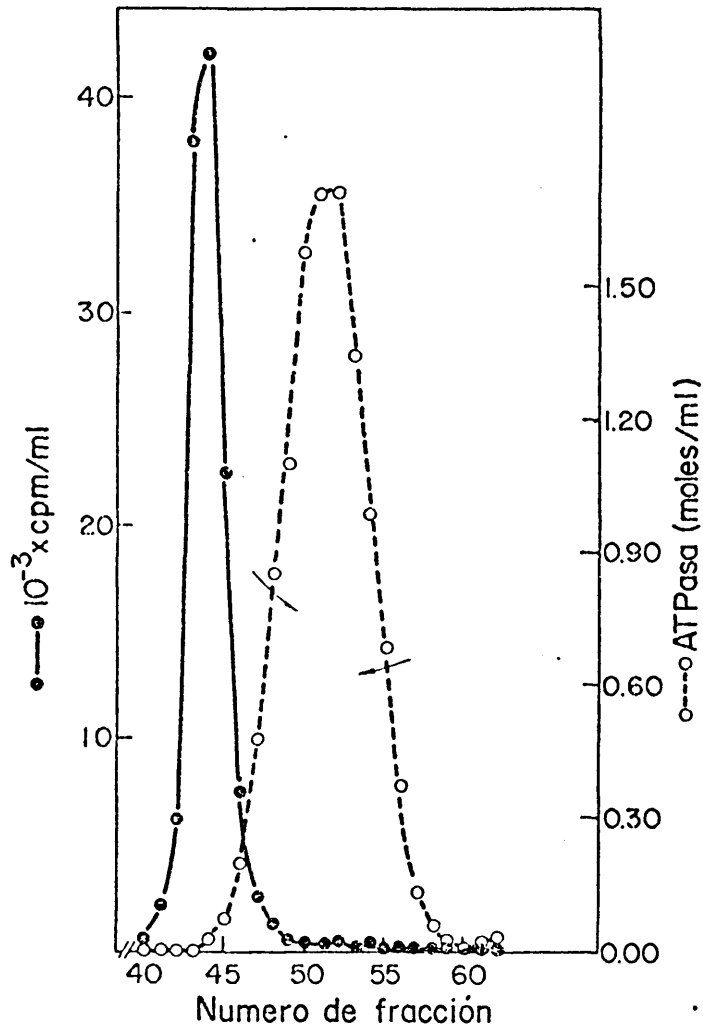


FIGURA 22.- Purificación de la ATPasa de M. lysodeikticus de células crecidas en $[2-^3\text{H}]$ glicerol. Las fracciones 48-55 se juntaron y concentraron para dar la ATPasa purificada.

TABLA XII: Contenido en fosfolípidos de las diferentes preparaciones de ATPasa de M. lysodeikticus.

Preparación	Células de	Células de
	<u>fase estacionaria</u>	<u>fase exponencial</u>
	Fosfolípidos	Fosfolípidos
	mol/mol ATPasa	mol/mol ATPasa
ATPasa soluble (lavados 5º y 6º)	200	254
ATPasa soluble después de concentrar por Amicon	165	210
ATPasa soluble concentrada centrifugada 100.000 x g	17	30
ATPasa purificada	0,015	0,028

La ATPasa se aisló de células de M. lysodeikticus crecidas en [2 - ³H] glicerol. La concentración molar de la ATPasa se calculó suponiendo que toda la proteína presente en la preparación es ATPasa en base a un peso molecular de 350.000 Dalton.

exista una asociación topográfica entre el enzima y ciertos fosfolípidos, que se liberarían de la membrana junto con la ATPasa.

3.4.1 Identificación de fosfolípidos asociados con la ATPasa soluble y con las membranas residuales.

Con objeto de identificar los fosfolípidos que se liberan junto con la ATPasa, es decir el pico que se eluye con el volumen de vacío en la Fig. 22, y ver si existe alguna selectividad con respecto a la composición fosfolipídica de las membranas residuales, se procedió al análisis cromatográfico de ambas fracciones. Los resultados, esquematizados en la Tabla XIII revelan que la especie predominante es el fosfatidilglicerol en todos los casos, detectándose cuando las células se recogen en fase exponencial de crecimiento ciertos trazos de cardiolipina en las membranas residuales que no se observan con células de fase estacionaria.

Esta composición por tanto, no representa ninguna selectividad de los fosfolípidos que lleva consigo la ATPasa soluble.

TABLA XIII: Composición de fosfolípidos que se liberan junto a la ATPasa de membrana de M. lysodeikticus y de las membranas residuales desprovistas del enzima.

Fracción	Células de fase estacionaria		Células de fase exponencial	
	Composición	Proporción	Composición	Proporción
Fracciones lipídicas que se eluyen con el volumen de vacío en el proceso de purificación de BF ₁ .	PG : PE	6 : 1	PG : PE	8 : 1
Membranas residuales	PG : PE	130 : 1	PG : PE : CL	400 : 1 : 1

TABLA XIV: Estimulación por fosfolípidos de la actividad enzimática de BF_1 de M. lysodeikticus.

Fosfolípido externo	Actividad específica BF_1 ($\mu\text{mPi} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína $^{-1}$)	% estimulación
Cardiolipina	4,5	2
Fosfatidilcolina	4,4	--
Fosfatidiletanolamina	4,3	--
Fosfolípidos que se liberan en la membrana junto con la ATPasa (fosfatidilglicerol)	5,72	30
---	4,4	--

La mezcla de reacción consta de 0,1 nm BF_1 , 4 μmoles Ca^{2+} , 4 μmoles ATP y 0,1 nmol de fosfolípido. Se incubaron controles respectivos que no contenían enzima en la mezcla de reacción y un control de la mezcla de reacción en ausencia de fosfolípido.

3.4.2 Efecto de los fosfolípidos en la actividad hidrolítica de BF_1 .

La Tabla XIV resume los experimentos realizados con objeto de averiguar si la actividad hidrolítica del enzima se estimula por fosfolípidos externos. Puede observarse que la única activación notable es la producida por el extracto de fracciones lipídicas que acompañan a la ATPasa soluble y que como hemos visto (3.4.1) están mayoritariamente constituidas por fosfatidilglicerol.

3.5 Biosíntesis de BF_1 de M. lysodeikticus.

La biosíntesis de BF_1 , una vez conocidos los componentes no peptídicos asociados a la molécula enzimática, se llevó a cabo creciendo las células de M. lysodeikticus en un medio definido al que se podían añadir precursores radiactivos. El primer estudio a realizar, antes de abordar la biosíntesis propiamente dicha, consistió en comprobar las condiciones en que la ATPasa se liberaba de la membrana. Los resultados obtenidos demuestran que esta liberación del enzima (cualquiera que sea la fase de crecimiento celular) tiene lugar en los tres lavados de la membrana que preceden al choque osmótico, a diferencia de las células crecidas en medio complejo (véase Materiales y Métodos). Las propiedades

de estimulación por tripsina y activación por cationes son idénticas y por tanto independientes del medio de cultivo en el que se haya crecido el microorganismo.

En el estudio de la biosíntesis de BF_1 nos hemos planteado dos consideraciones globales, como ya indicamos al justificar nuestra investigación. La primera de ellas hace referencia a BF_1 en relación con el resto de proteínas celulares (citoplásmicas y de membrana), que nos indica también si la ATPasa aparece en la membrana en fases tempranas o tardías del proceso celular de síntesis proteica. La segunda consideración implica la interrelación de las distintas subunidades de la molécula enzimática.

Para ello se han dado diferentes pulsos de $[^3H]$ aminoácidos al medio donde crecían las células de M. lysodeikticus y en algunos casos se ha cazado después del pulso.

En la Fig. 23 se representa el porcentaje de incorporación de radiactividad por parte de las células frente al tiempo durante el que han estado creciendo en presencia de $[^3H]$ aminoácidos precursores. Podemos observar que el porcentaje máximo de incorporación se obtiene entre 17 min ($\frac{1}{16}$ de generación) y 70 min ($\frac{1}{4}$ de generación), manteniéndose hasta que a las 14 h. (3 generaciones) se perfila ya un

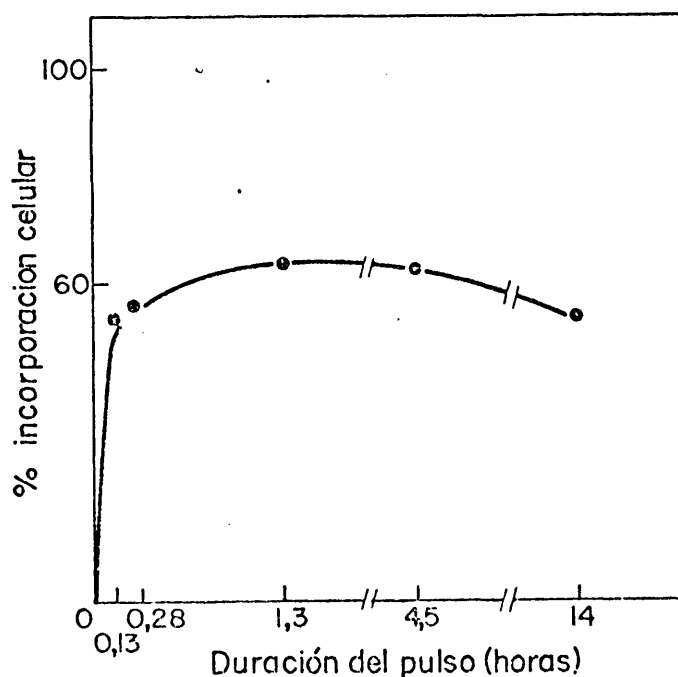


FIGURA 23.- Porcentaje de incorporación de $[^3\text{H}]$ aminoácidos en las células de M. lysodeikticus durante distintos pulsos radiactivos. Los $[^3\text{H}]$ aminoácidos se añaden al medio definido al principio de la fase exponencial de crecimiento celular, recogiendo las células a distintos tiempos, que representan generaciones o fracciones de generación: $0,13 \text{ h} = \frac{1}{32}$ de generación; $0,28 \text{ h} = \frac{1}{16}$ de generación; $1,3 \text{ h} = \frac{1}{4}$ de generación; $4,5 \text{ h} = 1$ generación; $14 \text{ h} = 3$ generaciones. Véase curva de crecimiento (Fig. 3b).

ligero descenso. En los experimentos de pulso y caza llevados a cabo (pulso de $\frac{1}{4}$ de generación, caza a las 3 generaciones y pulso de $\frac{1}{32}$ de generación, cazando durante una generación) la incorporación de radiactividad es del 53 y 50% respectivamente.

3.5.1 Síntesis de BF_1 en relación con la síntesis de proteínas citoplásmicas y de las membranas.

La Tabla XV resume los resultados de los distintos experimentos llevados a cabo. Vemos que la máxima incorporación por mg de proteína en las membranas tiene lugar entre $\frac{1}{16}$ y $\frac{1}{4}$ de generación, decayendo a tiempos de 1 generación. En el citoplasma, las proteínas tienen el máximo incorporado cuando se alimenta radiactivamente a las células durante $\frac{1}{16}$ de generación, disminuyendo esta incorporación a partir de esta fracción de generación. Para BF_1 el aumento en el porcentaje incorporado por mg de proteína es mucho mayor entre $\frac{1}{16}$ y $\frac{1}{4}$ de generación, permaneciendo después prácticamente constante. Estos resultados nos sugieren: a) que la ATPasa se sintetiza en fases tempranas de la síntesis proteica celular, dado que aparece notablemente marcada (192.105 cpm/mg proteína pura) cuando la célula incorpora $[^3H]$ aminoácidos durante $\frac{1}{32}$ de generación,

TABLA XV: Incorporación de aminoácidos tritiados en distintas proteínas celulares de *M. lysodeikticus* marcadas durante diferentes generaciones.

Duración del pulso (generaciones)	Membranas		Citoplasma		BF ₁ purificada	
	cpm/mg	% incorp./mg proteína	cpm/mg	% incorp./mg proteína	cpm/mg	% incorp./mg proteína
$\frac{1}{32}$	520.522	0,21	316.428	0,13	192.105	0,08
$\frac{1}{16}$	866.805	0,27	503.637	0,16	305.555	0,097
$\frac{1}{4}$	712.500	0,29	375.070	0,15	464.705	0,19
1	375.920	0,23	178.959	0,11	354.454	0,21
3	355.250	0,25	148.777	0,1	308.000	0,22
Duración del pulso:caza						
$\frac{1}{4}$: 3	90.975	0,068	45.576	0,03	96.520	0,072
$\frac{1}{32}$: 1	312.500	0,24	139.936	0,11	270.833	0,2

Para detalles experimentales véase Materiales y Métodos.

b) que la ATPasa es muy probable que se sintetice como precursor soluble en el citoplasma y se incorpore después en la membrana plasmática. Esto podría explicar el descenso observado en la incorporación radiactiva de las proteínas citoplasmáticas comprendido entre el pulso de $\frac{1}{16}$ y $\frac{1}{4}$ de generación, a la vez que el aumento sufrido por las proteínas de membrana entre esos mismos pulsos. Una confirmación de este hecho nos la darían los resultados del pulso de $\frac{1}{32}$ de generación y caza durante 1 generación. Si comparamos los porcentajes de incorporación por mg de proteína de este experimento con los porcentajes que resultan del pulso de $\frac{1}{32}$ de generación, observamos que la incorporación de BF_1 ha aumentado considerablemente, la del citoplasma ha disminuido y la de las membranas ha aumentado. De aquí se puede pensar que BF_1 haya aumentado su radiactividad a expensas del citoplasma, trasladándose más tarde a la membrana.

3.5.2 Biosíntesis de las subunidades de BF_1 .

Las preparaciones de BF_1 obtenidas en todos los casos fueron B activas no estimulables por tripsina. Por lo tanto, esta forma molecular de la ATPasa consta de las subunidades mayoritarias α y β (55.000 y 50.000 de peso molecular respectivamente), una minoritaria γ de peso molecular 35.000

y un componente X de mayor peso molecular que α y movilidad relativa 0,52 (131). Para el estudio de la interrelación en tre las dos primeras hemos analizado la proteína electrofo-réticamente con urea, agente disociante que provee una sepa-ración de α y β mayor que el DSS (129). Las Figs. 24^a, 25^a, 26^a, 27^a, 28^a, 29^a y 30^a muestran el perfil densitométrico y radiactivo de las mismas, marcadas durante los diferentes pulsos de [³H] aminoácidos. La relación entre las áreas de las bandas y la radiactividad correspondiente a dichas sub-unidades se resume en la Tabla XVI. De los resultados pode-mos concluir que así como hasta el pulso de 1 generación la relación de áreas y cpm es prácticamente igual en las dos subunidades, en el pulso de 3 generaciones se observa una incorporación de radiactividad por parte de β que es aproximadamente el doble de la de α . Este resultado está de acuerdo con los que se obtienen en los experimentos de pul-so y caza, en donde vemos que al dar un pulso de $\frac{1}{4}$ de generación y cazando durante 3 generaciones, la radiactivi-dad incorporada por β es más de tres veces la de α . La con-clusión obvia que se desprende de este hecho es que el re-cambio de α es más rápido que el de β , siendo esta última por tanto más estable metabólicamente.

TABLA XVI: Relación de radiactividad y área de las bandas correspondientes a las dos subunidades mayoritarias, α y β , de BF_1 de M. lysodeikticus, analizadas electroforéticamente en geles con urea.

Duración del pulso (generaciones)	cpm α	cpm β	Area banda α mm ²	Area banda β mm ²	$\frac{\alpha}{\beta}$ (cpm)	$\frac{\alpha}{\beta}$ (mm ²)
$\frac{1}{32}$	460	434	1398	1315	1,06	1,1
$\frac{1}{16}$	1140	1311	746	877	0,87	0,85
$\frac{1}{4}$	4027	4475	346	398	0,9	0,87
1	523	832	659	1063	0,62	0,62
3	851	1555	355	388	0,54	0,91
Duración del pulso : caza						
$\frac{1}{32}$: 1	789	953	1196	1132	0,82	1,05
$\frac{1}{4}$: 3	437	903	752	463	0,48	1,62

Las cantidades de proteína introducidas en el gel se indican en las Figs. 24^a, 25^a, 26^a, 27^a, 28^a, y 29^a. El área de la banda se calculó de los respectivos perfiles densitométricos por la fórmula $h \cdot \frac{b}{2}$ (h= altura total del pico; $\frac{b}{2}$ = base correspondiente a la mitad de la altura total).

El estudio de la subunidad γ , componente X y componentes de movilidad relativa ≈ 1 , lo hemos llevado a cabo en electroforesis en gel utilizando DSS como agente disociante. Las Figs. 24^b, 25^b, 26^b, 27^b, 28^b, 29^b, y 30^b ilustran el perfil densitométrico y radiactivo de las subunidades, y la Tabla XVII nos da la expresión cuantitativa de las mismas. Hay que recordar que en DSS la separación de α y β no es tan neta como en urea por lo que la cuantificación de las mismas la hemos realizado en conjunto. En la tabla XVIII podemos ver los porcentajes de radiactividad y áreas, distribuidos entre las distintas subunidades y componentes de BF₁. Fijándonos solamente en las áreas, tanto γ como los componentes de movilidad relativa ≈ 1 , aparecen en fases muy tempranas del crecimiento celular, disminuyendo a medida que las células van acercándose a la fase estacionaria. El componente X sólo se manifiesta claramente cuando ha transcurrido $\frac{1}{4}$ de generación.

La incorporación de radiactividad en las subunidades presenta resultados más complejos. De $\frac{1}{32}$ a $\frac{1}{16}$ de generación se observa una caída en la incorporación de $(\alpha + \beta)$ y de γ así como un aumento brusco de la radiactividad de los componentes de $Rf \approx 1$. De $\frac{1}{16}$ a $\frac{1}{4}$ de generación, disminuye la incorporación de γ y de los componentes de $Rf \approx 1$

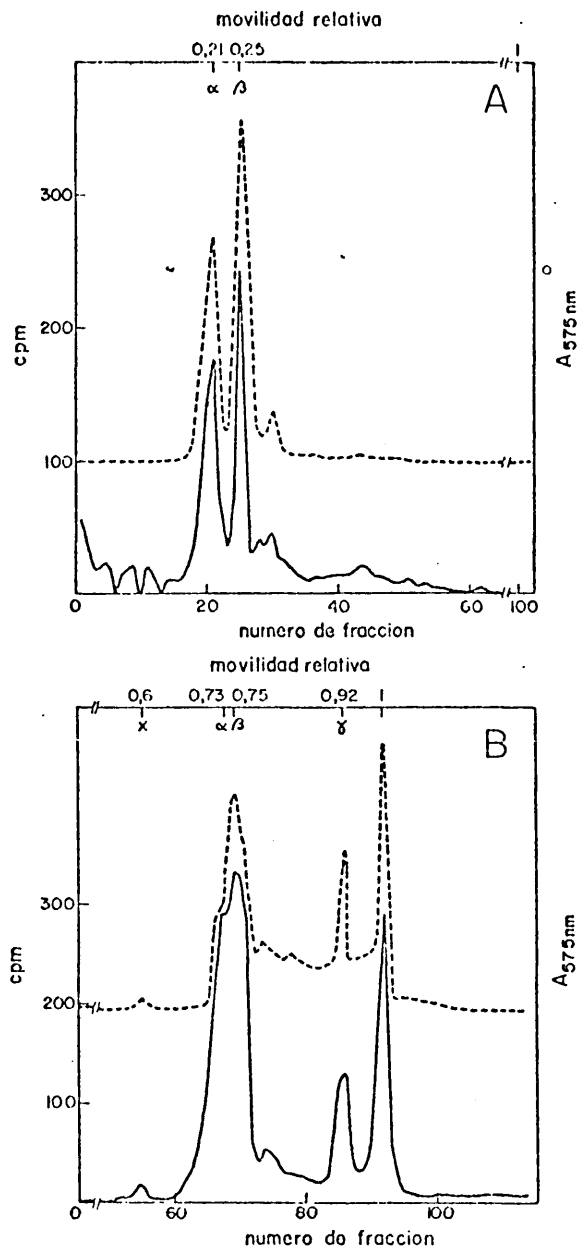


FIGURA 24.- Electroforesis analítica de BF_1 marcada con un pulso de $[^3H]$ aminoácidos durante $\frac{1}{32}$ de generación. A, PAGE urea 8 M (34 μ g de proteína). B, PAGE DSS en proporción 8/1 (p/p) con BF_1 (48 μ g de proteína). Línea discontinua = perfil densitométrico. Continua = distribución de la radiactividad en las distintas subunidades.

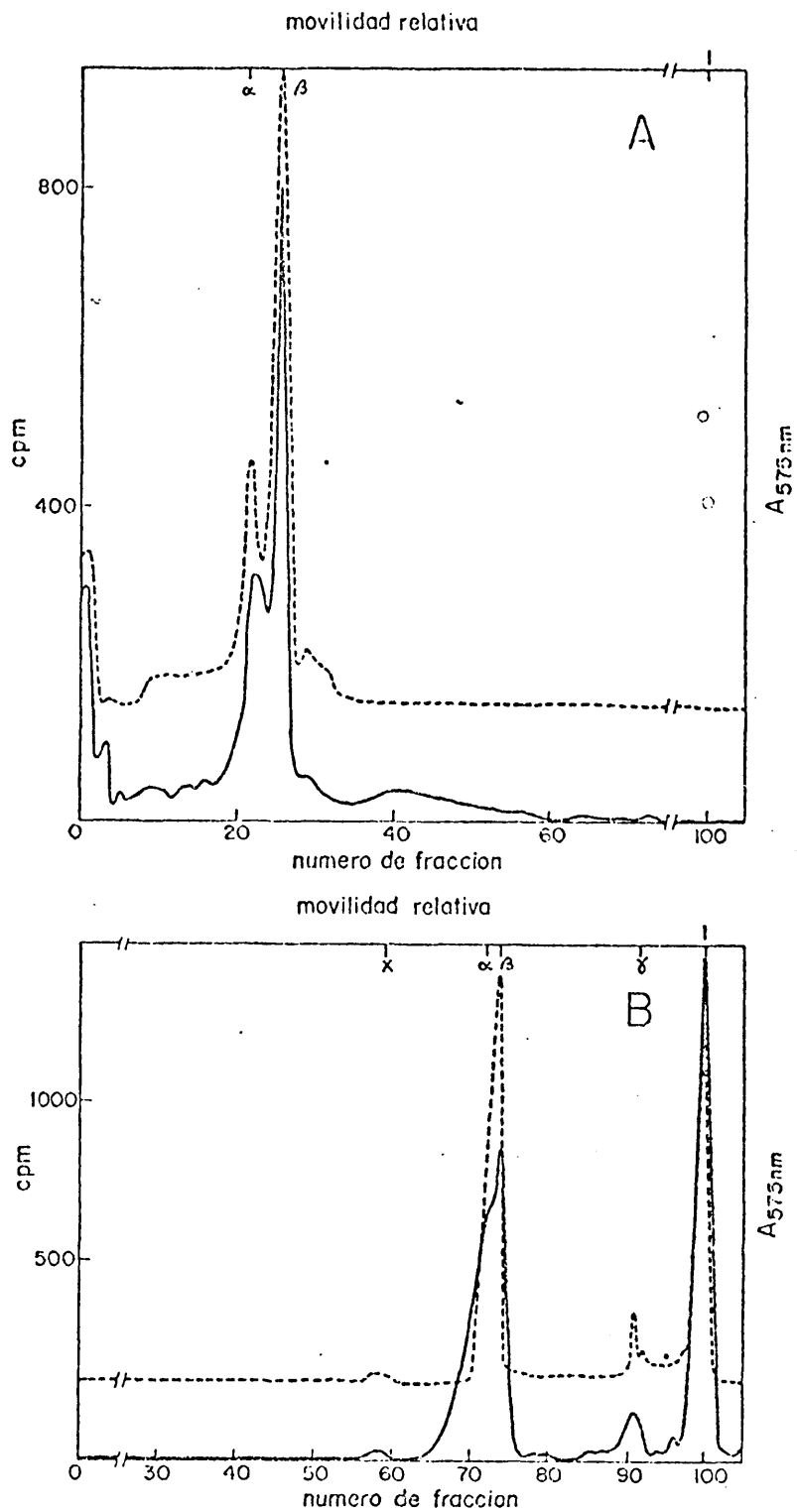


FIGURA 25.- PAGE de BF_1 ($34 \mu\text{g}$ proteína) marcada con un pulso de $[^3\text{H}]$ aminoácidos durante $\frac{1}{16}$ de generación. A, PAGE urea 8 M. B, PAGE DSS (8/1). Las demás condiciones y símbolos análogos a los de la Fig.

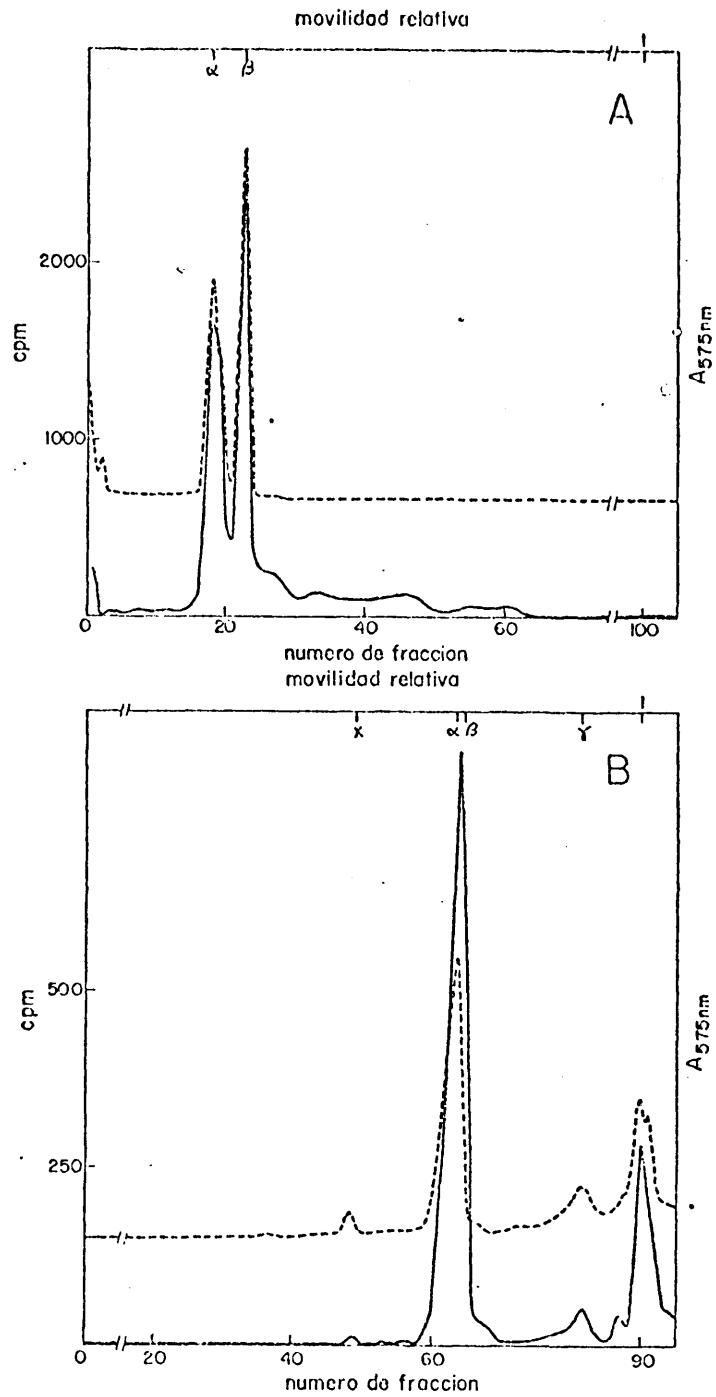


FIGURA 26.- PAGE de BF_1 ($40 \mu g$ de proteína) marcada con un pulso de $[^3H]$ aminoácidos durante $\frac{1}{4}$ de generación. A, PAGE urea 8 M. B, PAGE DSS (8/1). Los demás símbolos análogos a los de la Fig 24.

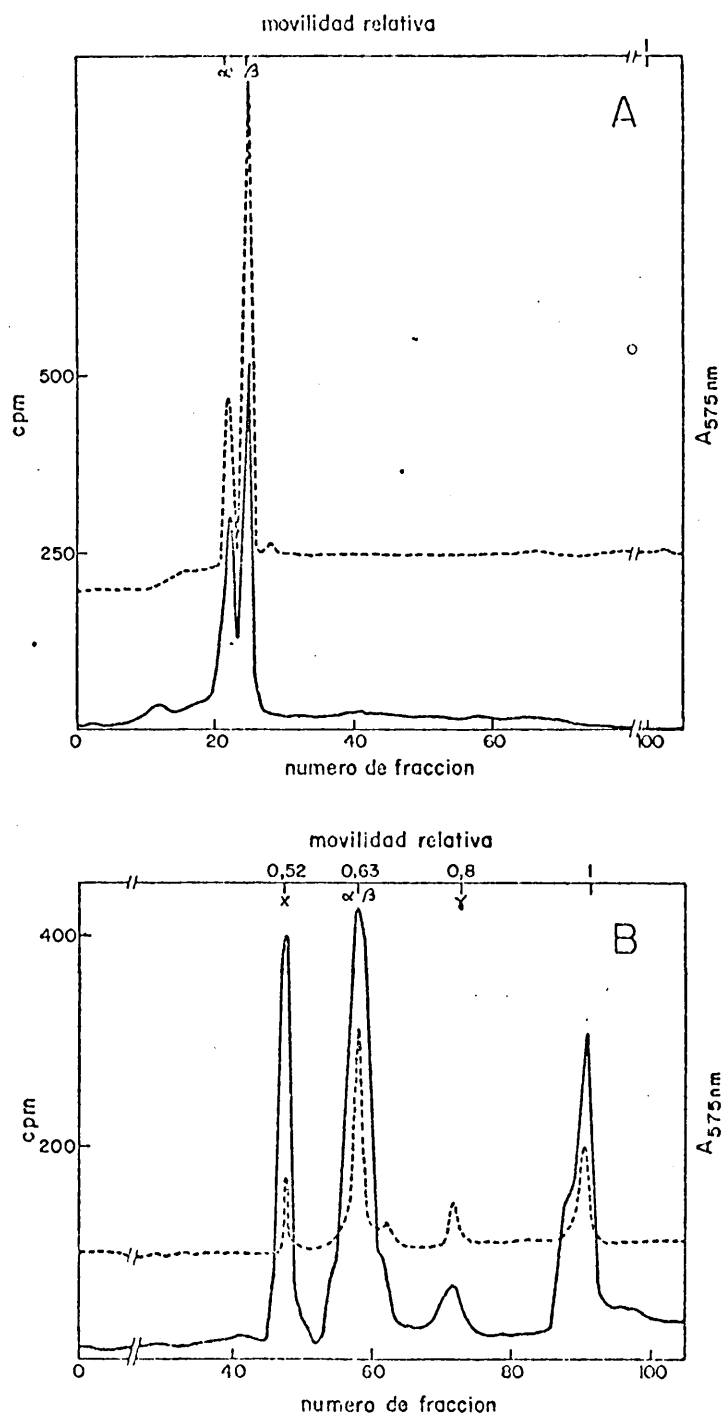


FIGURA 27.- PAGE de BF_1 marcada con un pulso de $[^3H]$ aminoácidos durante 1 generación. A, PAGE urea 8 M ($34 \mu g BF_1$). B, PAGE DSS (4/1) ($100 \mu g BF_1$). Los símbolos análogos a los de la Fig 24.

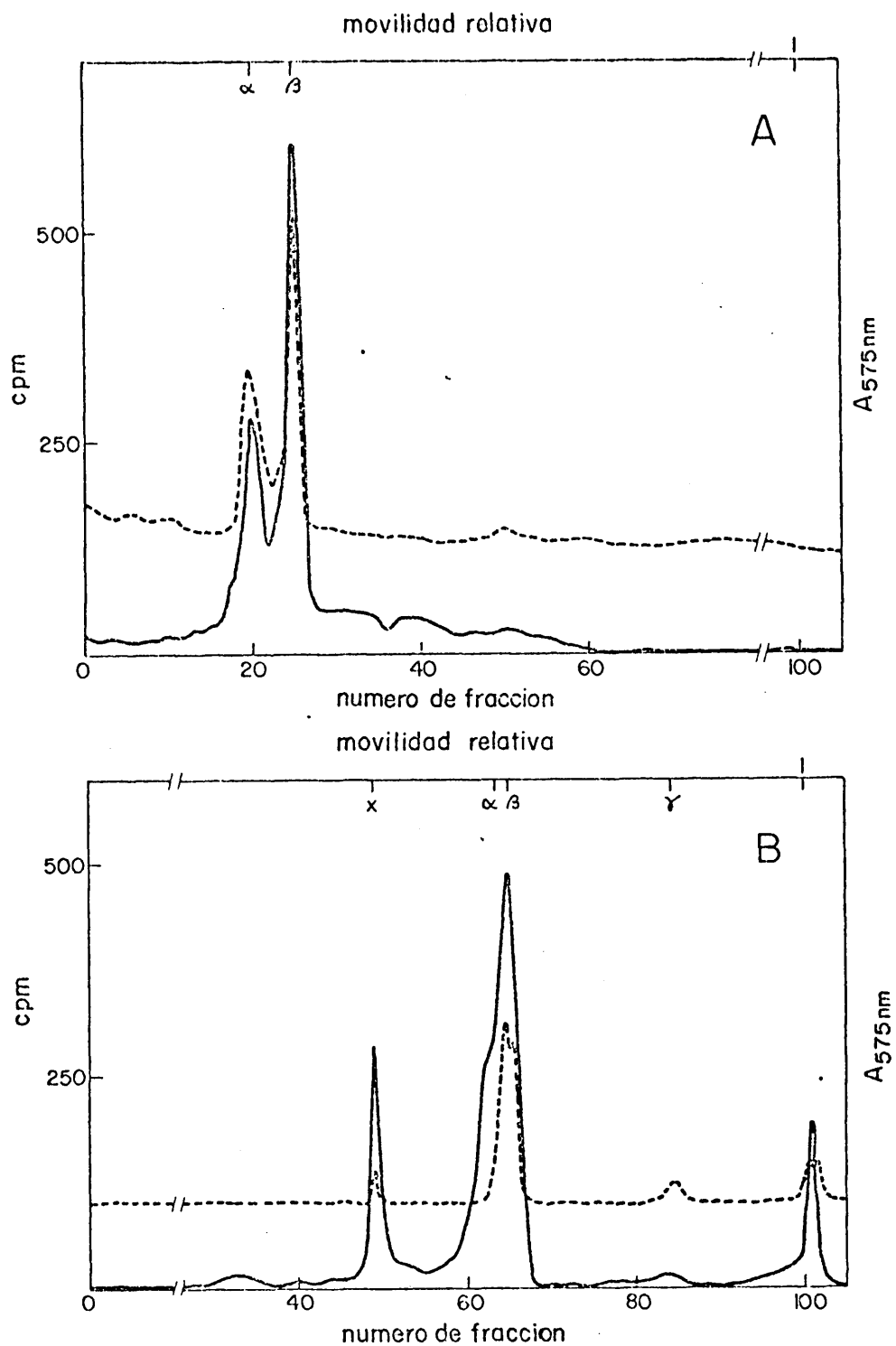


FIGURA 28.- PAGE de BF_1 ($34 \mu g$) marcada con un pulso de $[^3H]$ aminoácidos durante 3 generaciones. A, PAGE urea 8 M. B, PAGE DSS (4/1). Los símbolos análogos a los de la Fig 24.

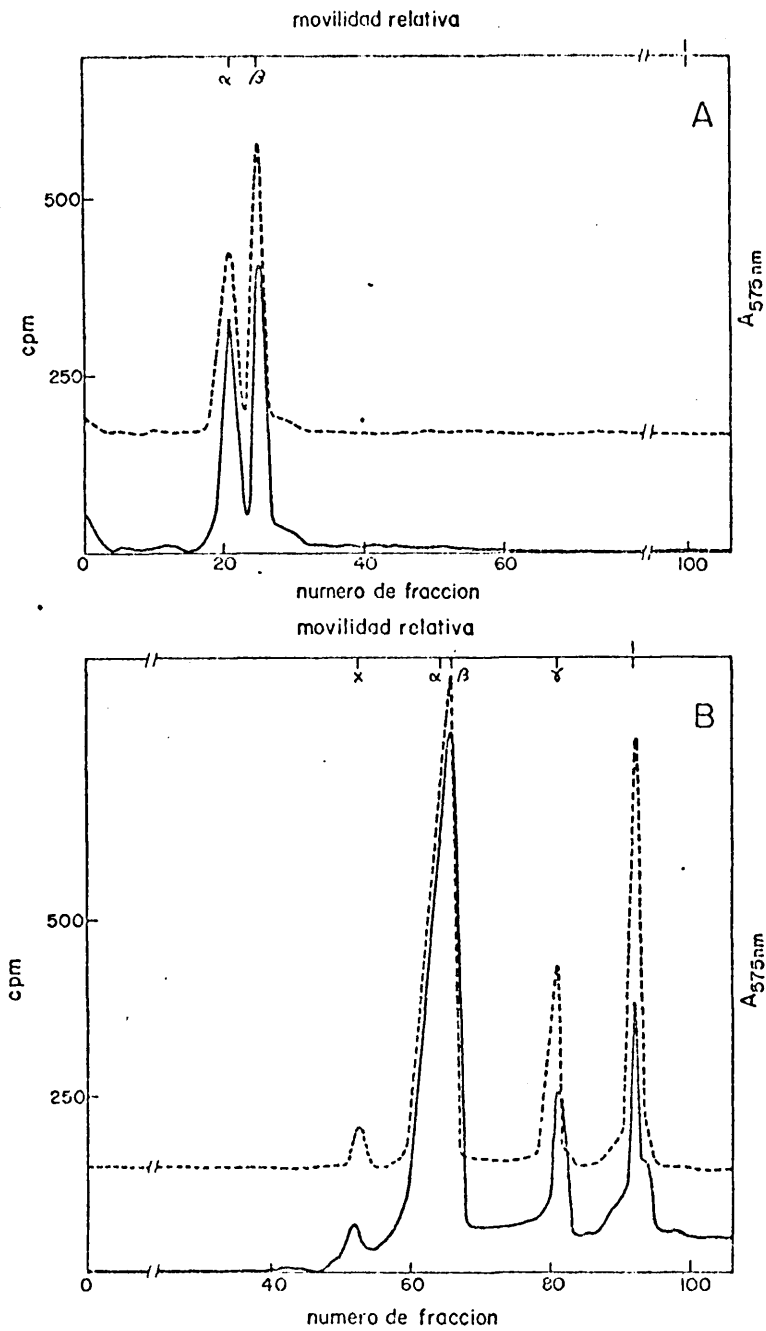


FIGURA 29.- PAGE de BF_1 marcada con un pulso de $[^3H]$ aminoácidos durante $\frac{1}{32}$ de generación seguido de caza durante 1 generación. A, PAGE urea 8 M ($36 \mu g BF_1$). B, PAGE DSS (8/1) ($48 \mu g BF_1$). Los símbolos análogos a los de la Fig 24.

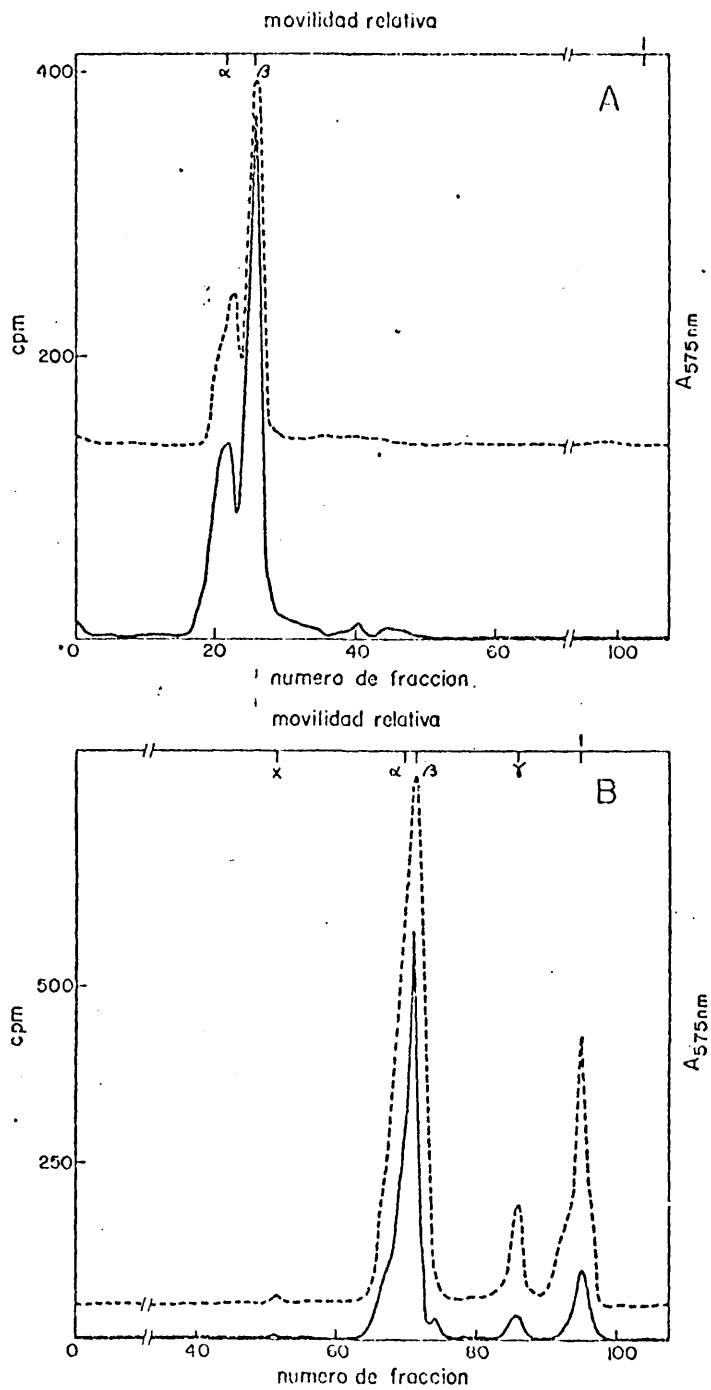


FIGURA 30.- PAGE de BF_1 ($57,5 \mu g$) marcada con un pulso de $[^3H]$ aminoácidos durante $\frac{1}{4}$ de generación seguido de caza durante 3 generaciones. A, PAGE urea 8 M. B, PAGE DSS (8/1). Los símbolos análogos a los de la Fig 24.

TABLA XVII: Radiactividad y área de las bandas de las subunidades de BF_1 de M. lysodeikticus analizadas en gel de poliacrilamida con DSS.

Duración del pulso (generaciones)	κ		$\alpha + \beta$		γ		$Rf \approx 1$	
	Area	cpm	Area	cpm	Area	cpm	Area	cpm
$\frac{1}{32}$	50,5	35	2864	2005	850	306	1462	645
$\frac{1}{16}$	22,3	29	2258	3556	225,8	345	1141	2194
$\frac{1}{4}$	50,5	24	976	2593	91,7	110	349,4	742
1	105,8	963	1396	1950	109	306	235	967
3	55,3	471	1020	2115	64	60	124	385
Duración del pulso : caza								
$\frac{1}{32} : 1$	87	155	2511	3908	483	547	877	1049
$\frac{1}{4} : 3$	45,8	14	2568	1592	235	94	515	203

Las cantidades de proteína introducidas en el gel se indican en las Figs. 24^b, 25^b, 26^b, 27^b, 28^b, 29^b y 30^b. Las áreas se calcularon a partir de los pesos correspondientes.

TABLA XVIII: Porcentajes totales de incorporación de radiactividad y área de las bandas de las subunidades de BFl de M. lysodeikticus.

Duración del pulso (Generaciones)	$\alpha + \beta$		γ		Comp. Rf \approx 1		X	
	% cpm	% área	% cpm	% área	% cpm	% área	% cpm	% área
$\frac{1}{32}$	67	54,8	10,23	16,26	21,5	27,97	1,17	0,96
$\frac{1}{16}$	54,1	62	5,25	6,19	40	31,2	0,44	0,61
$\frac{1}{4}$	74,7	66,5	3,17	6,25	21,3	23,8	0,69	3,44
1	44,2	75,6	6,94	5,92	26,95	12,7	21,8	5,73
3	69,7	80,65	1,97	5,11	12,7	9,86	15,5	4,37
Duración del pulso : caza								
$\frac{1}{32}$: 1	69	63,42	9,66	12,21	18,5	22,16	2,73	2,2
$\frac{1}{4}$: 3	83	72,52	4,93	7	10,66	15,3	0,73	1,36

Estos porcentajes corresponden a los resultados presentados en la Tabla XVII.

aumentando la de $(\alpha + \beta)$. El componente X que ya se manifiesta, incorpora sólo un 0,69% de la radiactividad total, aumentando esta incorporación transcurrida 1 generación. Este aumento de X, así como de γ y componentes de $Rf \approx 1$ coincide con un brusco descenso de la incorporación por parte de $(\alpha + \beta)$. Al cabo de 3 generaciones la incorporación de $(\alpha + \beta)$ ha aumentado, la de γ disminuido bruscamente y la de X ha disminuido también ligeramente.

Los experimentos de pulso y caza nos proporcionan la mayor información en lo que a interrelación de subunidades se refiere.

El hecho de que el marcaje tan acusado que presenta X en los pulsos de 1 y 3 generaciones desaparezca en las cazas y al mismo tiempo la radiactividad de $(\alpha + \beta)$ aumente en relación a sus correspondientes pulsos permaneciendo el área prácticamente igual, sugiere que las subunidades mayoritarias incorporan los $[^3\text{H}]$ aminoácidos de X. La subunidad γ y componentes de $Rf \approx 1$ no parecen guardar relación ni entre sí ni entre el resto de las subunidades.

3.5.3 Efecto de la cerulenina sobre la síntesis de la ATPasa de *M. lysodeikticus*.

La cerulenina es un antibiótico aislado de Cephalosporium caerulens (178) que ha resultado ser un potente inhibidor del alargamiento de la cadena de los ácidos grasos, ya que bloquea específicamente el enzima condensante y por tanto inhibe la biosíntesis de lípidos en bacterias y levaduras (179-182). Para completar los estudios de biosíntesis de BF_1 hemos utilizado la cerulenina con objeto de observar una posible relación entre la inhibición de la síntesis lipídica y la síntesis de la molécula de ATPasa. A su vez hemos estudiado en que medida el antibiótico afecta al crecimiento de las células de *M. lysodeikticus*.

En la Fig. 31 se representan las curvas de crecimiento obtenidas con las células control y las células a las que se añadió la cerulenina en el medio de cultivo. Con la concentración de antibiótico que utilizamos (10 $\mu\text{g/ml}$ medio), la inhibición del crecimiento es de un 30%; Sin embargo, la incorporación de radiactividad por parte de las células es prácticamente igual: 58% en el cultivo control y 57,4% en el cultivo tratado con el antibiótico.

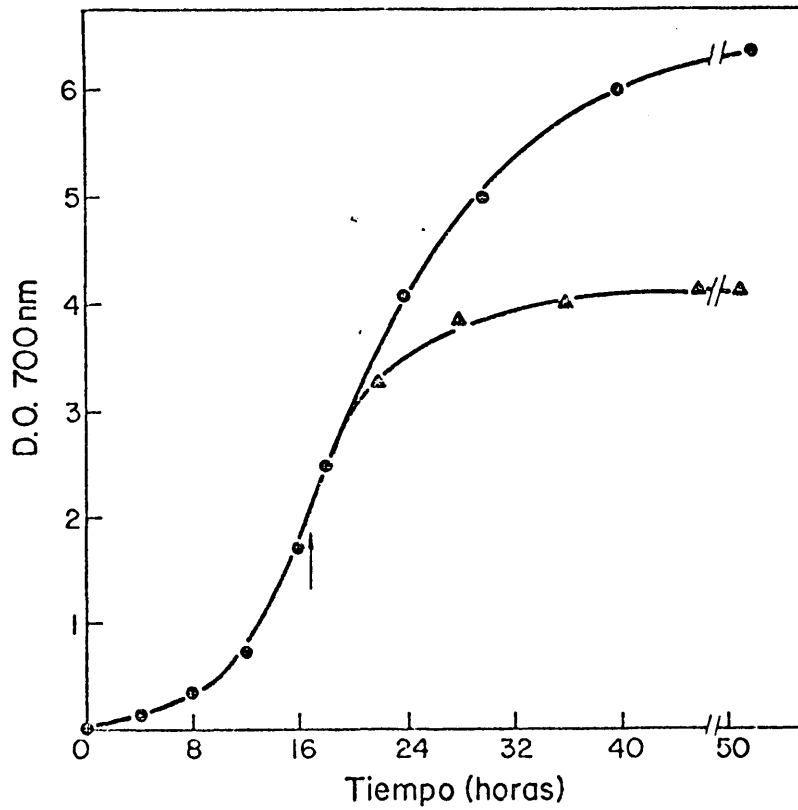


FIGURA 31.- Curvas de crecimiento de las células de M. lysodeikticus tratadas con cerulenina (10 µg/ml medio)(▲—▲) y sin tratar (●—●). La flecha indica el momento en que se añadió el antibiótico.

En el citoplasma y en las membranas residuales, la cerulenina no parece afectar al contenido total en proteínas ni a su incorporación de radiactividad (Tabla XIX). En las Figs. 32 y 33, se muestra el perfil densitométrico y radiactivo de las proteínas de ambas fracciones celulares.

El efecto de la cerulenina sobre la ATPasa soluble viene resumido en la Tabla XX. Podemos observar que la cantidad de proteína y actividad ATPasa han disminuido en las células tratadas con el antibiótico. Sin embargo la cerulenina no inhibe la incorporación de radiactividad sino que la aumenta ligeramente en relación a la ATPasa soluble de las células control.

El análisis electroforético de la ATPasa procedente de ambos cultivos viene ilustrado en las Figs. 34 y 35. Hay dos hechos notables a señalar. El primero de ellos es que para una misma cantidad de proteína soluble, el área de la banda de BF_1 (CERULENINA) es la mitad de la de BF_1 (CONTROL) (Tabla XXI). El segundo es la aparición de una banda de movilidad 0,5 (a la que denominaremos Z) en geles de poliacrilamida al 7% que no aparece en la ATPasa soluble del cultivo control. Vemos aquí también que la cerulenina hace aumentar la incorporación en términos de radiactividad específica en BF_1 . La reacción histoquímica negativa para ATPasa de la

TABLA XIX: Contenido en proteínas e incorporación de radiactividad en el citoplasma y membranas residuales de células de M. lysodeikticus tratadas con cerulenina y sin tratar.

	Proteína mg/ml	% incorporación total/mgproteína
Citoplasma (CONTROL)	3,75	0,1
Citoplasma (CERULENINA)	3,6	0,11
Membranas residuales (CONTROL)	0,78	0,25
Membranas residuales (CERULENINA)	0,78	0,25

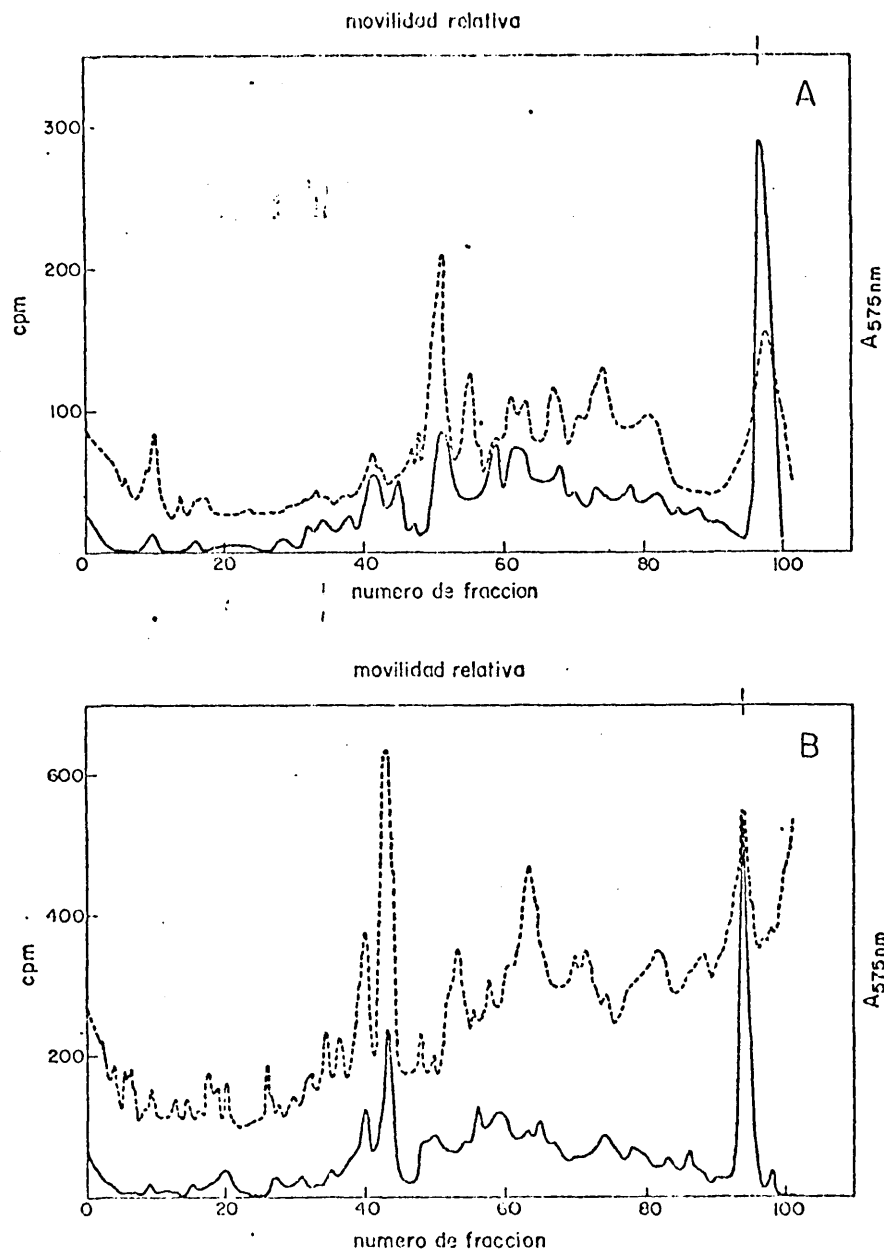


FIGURA 32.- Electroforesis analítica (acrilamida al 7%) de las proteínas citoplásmicas ($\approx 41 \mu\text{g}$) de (A) células control, (B) células tratadas con cerulenina. La línea discontinua representa la distribución de proteínas y la continua el perfil radiactivo de las mismas.

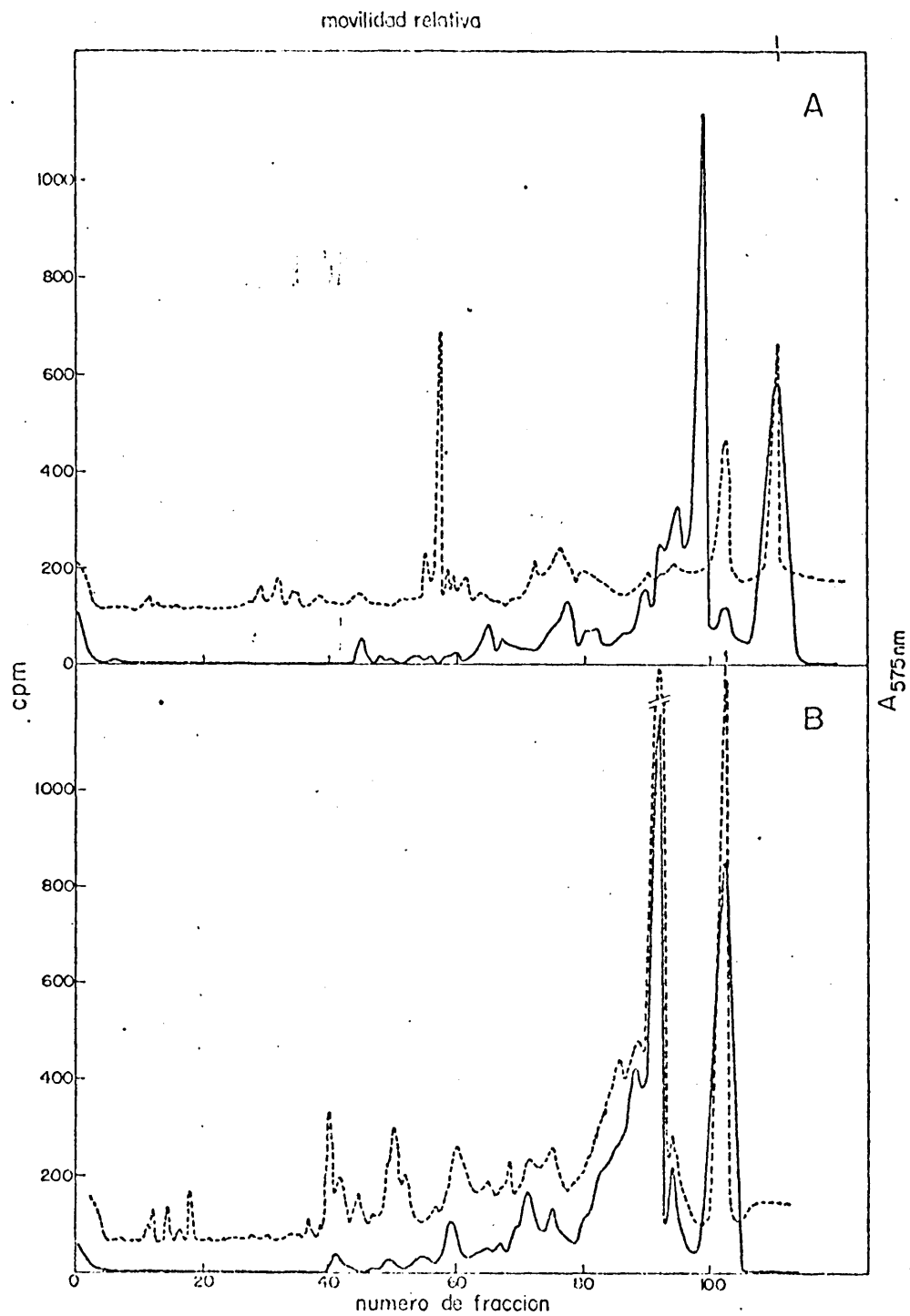


FIGURA 33.- Electroforesis analítica (acrilamida al 7%, DSS . proporción 8/1) de las membranas residuales (50 μ g) de (A) células control, (B) células tratadas con cerulenina. Línea discontinua = perfil densitométrico de proteínas. Continua = distribución de radiactividad en el gel.

TABLA XX: Efecto de la cerulenina sobre la ATPasa soluble de M. lysodeikticus.

	Proteína (mg/ml)	Actividad específica ($\mu\text{moles Pi} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot.}^{-1}$)		Radiactividad ^3H (cpm/mg proteína)
		+Tripsina	-Tripsina	
ATPasa (CONTROL)	3,6	1,43	1,15	206.944
ATPasa (CERULENINA)	2,37	1,08	0,87	288.945

Para detalles experimentales véase Materiales y Métodos.

TABLA XXI: Electroforesis analítica de 104 μg de ATPasa soluble de M. lysodeikticus procedente de células control y células tratadas con cerulenina. Relación de áreas y radiactividad en la banda de BF_1 y en la banda Z.

Acrilamida 7%					
	Area (mm^2)	cpm	$\frac{\text{BF}_1 \text{ (CONTROL)}}{\text{BF}_1 \text{ (CERUL.)}}$ (mm^2)	$\frac{\text{BF}_1 \text{ (CONTROL)}}{\text{BF}_1 \text{ (CERUL.)}}$ (cpm)	
BF_1 (CONTROL)	258,6	3251			
			2,01	1,72	
BF_1 (CERULENINA)	128,5	1881			
Z	82,5	506			
Acrilamida 10%					
BF_1 (CONTROL)	854	2439			
			1,72	1.67	
BF_1 (CERULENINA)	494	1453			
Z	358	1196			

Las áreas se calcularon a partir de los pesos correspondientes.

Para detalles experimentales veáse Figs. 34 y 35.

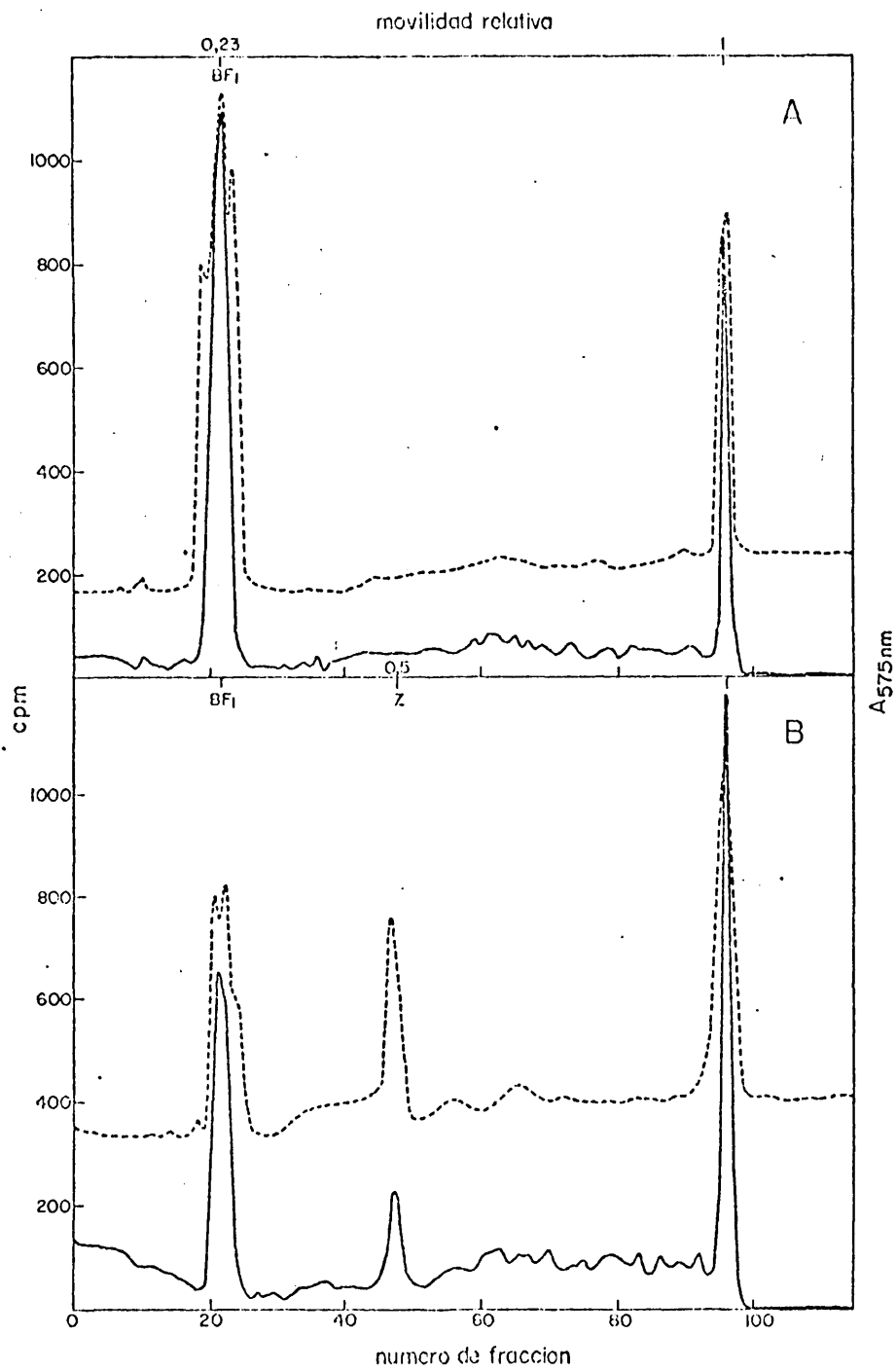


FIGURA 34.- Electroforesis analítica (acrilamida al 7%) de 104 μg de ATPasa soluble de (A) células control, (B) células tratadas con cerulenina. Línea discontinua = perfil densitométrico de proteínas. Continua = distribución de radiactividad en el gel.

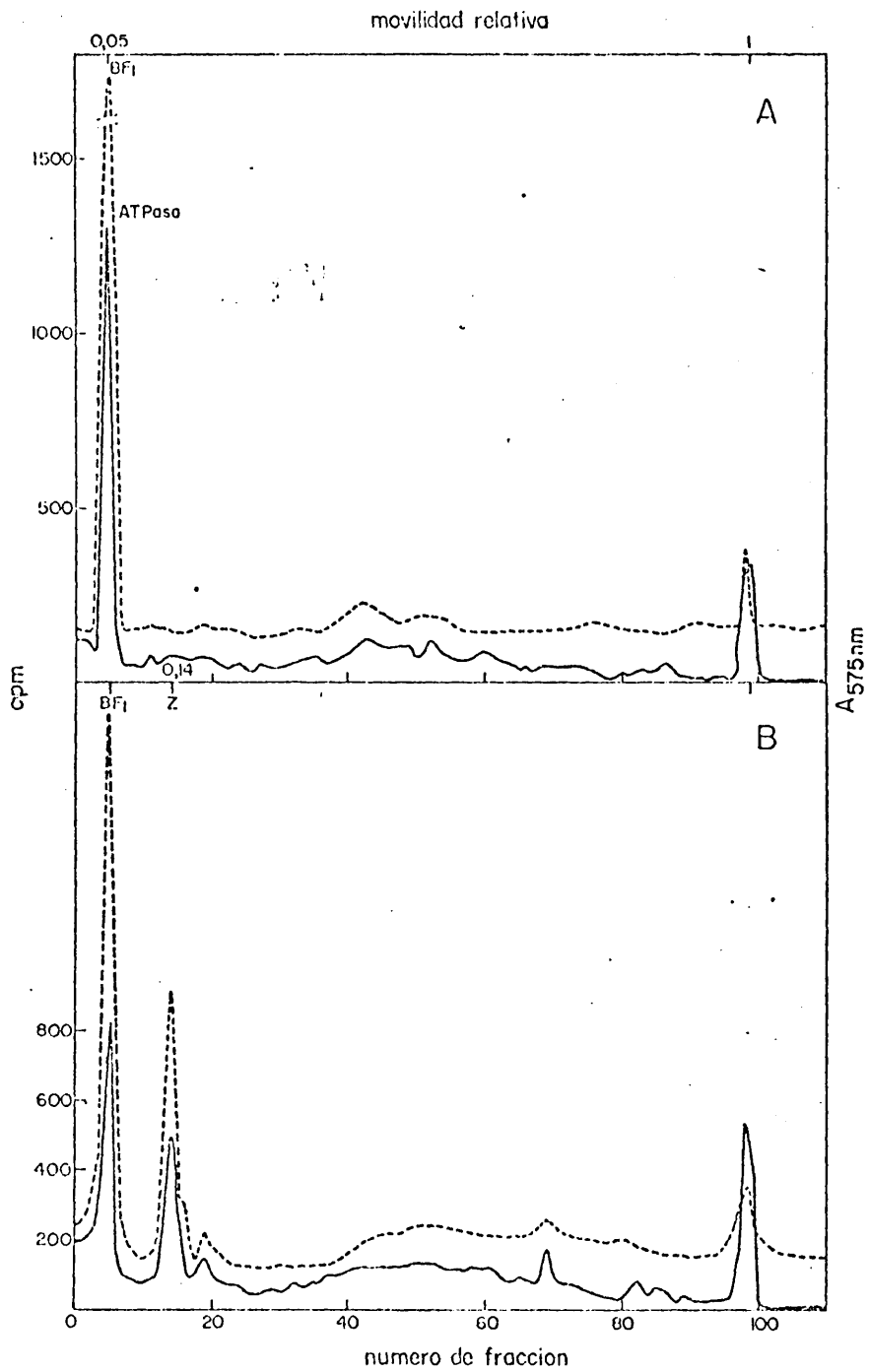


FIGURA 35.- PAGE analítica (acrilamida al 10%) de 104 μg de ATPasa soluble. Las demás condiciones y símbolos como en la Fig 34.

banda Z confirmó que no tenía capacidad para hidrolizar el ATP.

4. DISCUSION

4.1 Propiedades alotópicas de la ATPasa soluble de M. lysodeikticus.

La estimulación de la ATPasa por tripsina y el mecanismo molecular por el que tiene lugar esta estimulación, ha sido un tema muy discutido y sujeto a numerosos estudios. Nuestros resultados han ayudado a esclarecer hasta cierto punto este mecanismo en la ATPasa soluble de M. lysodeikticus.

Hemos confirmado la existencia de una actividad basal que se estimula un 150-200% por la acción de la tripsina y se puede decir que esta acción es sin duda proteolítica ya que, basándonos en la relación tripsina/ATPasa soluble que hemos encontrado óptima, pequeñas cantidades de tripsina bastan para estimular una cantidad de ATPasa mucho mayor. Esta suposición nos la confirma la disminución de la banda de ATPasa nativa en los geles de poliacrilamida (Fig. 5). La ATPasa de E. coli también presenta una actividad basal que se estimula un 70% por tripsina en cualquiera de sus tres estados físicos (183), mientras que la ATPasa soluble de cloroplastos no presenta actividad enzimática a menos que

se trate con tripsina (159). La actividad basal de la ATPasa unida a la membrana de M. lysodeikticus es mucho menor que la del enzima soluble, aumentando hasta 10 veces por acción de la proteasa. (127)

Nuestros resultados de estimulación por tripsina en la ATPasa soluble difieren de los encontrados por Salton y col. (133, 134) en la forma soluble de la ATPasa de M. lysodeikticus extraída de las membranas con n-butanol y que no presenta estimulación por tripsina. Estos investigadores asociaron esta falta de estimulación a la pérdida de las subunidades minoritarias que posee la ATPasa solubilizada por choque osmótico y de las que carece la extraída con n-butanol.

Ya en 1963, Pullman y col. (184) purificaron un componente proteico que acompañaba a la ATPasa mitocondrial y que era inhibidor de su actividad. Tenía 15.000 Dalton de peso molecular y confería la estabilidad en frío al enzima cuando se asociaba con él. Lo mismo sucede con la ATPasa de cloroplastos (84): una subunidad de peso molecular 13.000 acompaña al enzima actuando como inhibidor de la actividad hidrolítica.

Con estos precedentes y con los resultados obtenidos, aventuramos dos hipótesis no excluyentes del mecanismo de acción de la tripsina:

- a) la tripsina eliminaría un inhibidor que disminuyera la actividad del enzima por el sustrato. Este inhibidor podría ser un polipéptido que acompañara a la ATPasa como en mitocondrias y cloroplastos, o bien una o más subunidades de la propia molécula enzimática.
- b) que en la reacción enzima-sustrato se formara un paso intermedio, $ATPasa \sim P_i$, y para la ruptura de este enlace se necesitara la acción directa de la tripsina.

Los recientes trabajos en nuestro laboratorio (132) con BF_1 purificado han demostrado la existencia del inhibidor natural de la ATPasa de M. lysodeikticus. Se trata de una subunidad, denominada ξ , de peso molecular 25.000 Dalton que se encuentra en la forma B_{ATP} (B activa, estimulable por tripsina) y que no está presente en las demás formas purificadas no estimulables por la proteasa. Esta subunidad es sobre la que recae la acción proteolítica de la tripsina y es la responsable de la latencia del enzima unido a la membrana.

La ATPasa soluble de M. lysodeikticus requiere para su actividad Ca^{2+} o Mg^{2+} , siendo muy pequeña su actividad basal en ausencia de cationes (128). Sin embargo, a pesar de ser el Mg^{2+} el catión que se necesita para la fosforilación oxidativa (123, 185) y que el microorganismo acumula en su interior grandes cantidades de magnesio (125), es el Ca^{2+} el catión que produce la mayor activación del sistema al igual que sucede con muchas de las ATPasas estudiadas (1. 2. 3).

Hemos demostrado que la relación óptima $\text{ATP}/\text{Ca}^{2+}$ es 1/1 como ya había sido previamente descrito por Muñoz y col. (128). Un resultado análogo se ha observado para la ATPasa de S. faecalis (57) pero no sucede así en la ATPasa mitocondrial ni en la de E. coli, ambas activadas por Mg^{2+} y cuyas relaciones óptimas $\text{ATP}/\text{Mg}^{2+}$ son respectivamente 1/0,67 (186) y 1/0,5 (90, 187).

Esta condición de equimolaridad entre el ATP y el metal requerido por la ATPasa de M. lysodeikticus nos hizo suponer que el sustrato no era sólo el ATP sino el complejo ATP-catión como había sido sugerido para otras ATPasas, entre ellas la de S. faecalis (59). Sin embargo, los resultados obtenidos al representar las velocidades a distintos

tiempos de incubación y a dos concentraciones constantes de $\text{ATP}/\text{Ca}^{2+}$ (Fig. 9) nos hicieron dudar de la naturaleza del verdadero sustrato, ya que si fuera $\text{ATP}-\text{Ca}^{2+}$, la velocidad vendría limitada por la concentración del catión puesto que la de ATP permanece constante en los dos experimentos y hemos visto que no sucede así. Suponemos por lo tanto que el calcio funciona como activador o modulador del sistema, cooperando la tripsina en esta acción.

Las cinéticas de saturación de sustrato en presencia de tripsina y en su ausencia no son nada fáciles de interpretar. El aumento de los parámetros cinéticos en presencia del enzima proteolítico no nos indica nada acerca de la afinidad de la ATPasa por su sustrato, como ya expresamos en Resultados.

Admitiendo el papel del Ca^{2+} como activador del sistema y basándonos en los datos experimentales que poseemos, podemos proponer la hipótesis de que el Ca^{2+} se fija a la molécula de ATPasa en un sitio diferente del centro activo y esta fijación activaría al enzima para hidrolizar el ATP. Ahora bien, si la acción proteolítica de la tripsina recayera sobre ese sitio se impediría la hidrólisis del ATP. Por lo tanto podemos suponer la existencia de dos sitios, diferentes del centro catalítico, que admiten el Ca^{2+} .

Si nos fijamos en las gráficas representadas en la Fig. 7, se puede observar que a altas concentraciones de Ca^{2+} en el medio de reacción, la actividad ATPasa no sólo no aumenta sino que más bien tiende a disminuir y esta tendencia es ligeramente más acusada cuando la reacción se lleva a cabo en ausencia de tripsina. Entonces, continuando el razonamiento del párrafo anterior, en uno de los sitios que admiten el calcio, éste actuaría como activador del sistema y en el otro como inhibidor. Sobre este segundo sitio recaería la acción de la tripsina evitando la inhibición de la hidrólisis del ATP. Si además tenemos en cuenta que el Ca^{2+} confiere a la ATPasa mayor sensibilidad a la digestión tripsinica, esta segunda interpretación adquiere mayor probabilidad. El hecho de que no hayamos observado una clara inhibición a concentraciones de Ca^{2+} elevadas, no excluye la posibilidad de que esta inhibición se produzca a concentraciones de catión mayores de las ensayadas.

Los experimentos realizados con atebrina han demostrado una estimulación a bajas concentraciones del supuesto inhibidor, y una inhibición prácticamente del 100% a concentraciones elevadas. Estos resultados coinciden con los obtenidos para la ATPasa de M. lysodeikticus unida a la membrana (188).

En las ATPasas fotosintéticas de cloroplastos (94) y R. rubrum (189) la acción de la atebrina ha recibido gran atención, pero no ha sucedido así en bacterias. Los primeros estudios se deben a Greenwalt y col. (95) en la ATPasa de B. megaterium y Gross y Coles (96) en la de S. aureus. Ambas ATPasas se inhiben por la acción de la atebrina tanto en estado soluble como unido a la membrana. Un hecho interesante al respecto fue la diferencia en el grado de inhibición encontrada por Greenwalt dependiendo del uso del Ca^{2+} o Mg^{2+} como catión activador del enzima.

De los resultados de estas investigaciones se desprende de que la atebrina afecta principalmente a los factores de acoplamiento que se comportan como ATPasas dependientes de Ca^{2+} . Esta dependencia del catión ha sido corroborada por los recientes estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio con BF_1 de M. lysodeikticus y E. coli (97).

La interrelación Ca^{2+} -atebrina, y los datos cinéticos que poseemos, nos ha inducido a pensar que la única hipótesis posible del mecanismo de acción de la atebrina es que ésta, al igual que el calcio, actúe como efector o modulador de la reacción enzimática. Dicha reacción se llevaría a cabo mediante un mecanismo de transición lenta (190) que

es un tipo de modelo cinético que produce cooperatividad (de ahí el alto coeficiente de cooperatividad encontrado para la atebrina) y que ha sido descrito para varios enzimas tanto monoméricos como oligoméricos (190-192). Ambos efectos (calcio y atebrina) inducirían los cambios conformacionales en el enzima que posibilitarían e inhibirían la hidrólisis del ATP.

La dicitclohexilcarbodiimida es un inhibidor potente de la ATPasa unida a la membrana de M. lysodeikticus (J. Carreira, comunicación personal) pero no ejerce ningún efecto sobre el enzima en la forma soluble. Este hecho sucede en otros sistemas ATPasa bacterianos, como S. faecalis (92, 93) y E. coli (187, 193, 194) en los que se comprueba la absoluta ineficacia del DCCD como inhibidor del enzima soluble. Weiner y col. (195) demostraron que el DCCD no sólo es inhibidor de la ATPasa ligada a la membrana sino también del transporte activo, por lo que el DCCD resulta útil en estudios de la función fisiológica del enzima, aunque su mecanismo de inhibición es todavía desconocido.

Berger (196) y Simoni y col. (197) propusieron que el acoplamiento de la energía metabólica al transporte activo se efectuaba a través de la ATPasa y la evidencia que une al

enzima con el transporte activo lo demuestra el hecho de que el DCCD inhibe en S. faecalis la acumulación celular de K^+ y aminoácidos (92, 93). Los estudios llevados a cabo con mutantes nos dan una información más completa y precisa. El aislamiento de mutantes de S. faecalis con una ATPasa resistente al DCCD demostró que tanto la actividad ATPasa como la incorporación de K^+ y cicloleucina eran resistentes a la acción inhibidora de la dicitclohexilcarbodiimida (93). Rosen (198), utilizando un mutante de E. coli que carecía de actividad ATPasa y transporte activo, restauró parcialmente la capacidad de transporte en presencia de DCCD. En la misma línea de experimentos, Bragg y col. (199) pudieron restaurar la actividad transhidrogenasa de un mutante por adición de DCCD. Esto les llevó a suponer que la ATPasa tenía un papel como proteína acoplante de energía y otro como enzima catalizador de la hidrólisis del ATP. De todos estos resultados puede deducirse la función de la ATPasa como factor de acoplamiento de energía al transporte activo y que el DCCD puede desempeñar en parte esa función de la ATPasa como proteína. Esta posibilidad ya había sido sugerida a propósito de la fosforilación oxidativa en mitocondrias (200).

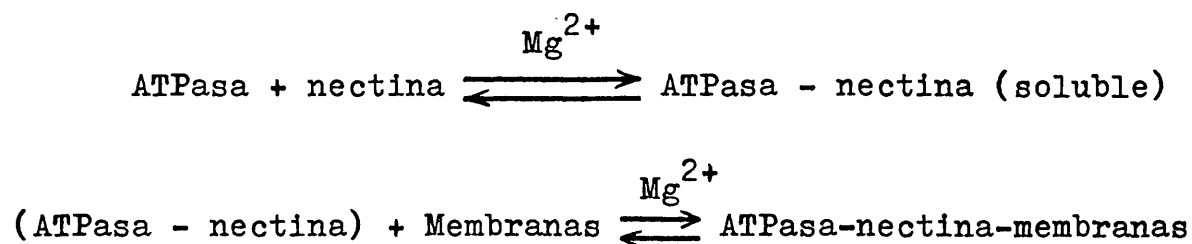
Estas conclusiones, aunque demuestran que el DCCD reacciona con el aparato de transducción de energía que acopla la actividad ATPasa al transporte activo, no dan una explicación definitiva acerca de su mecanismo inhibitor. Harold y col. (193) propusieron que el DCCD se unía a una proteína de membrana que de alguna manera impedía la actividad enzimática de la ATPasa. Aunque podría pensarse la existencia de una interacción más directa ATPasa-inhibidor, el hecho de que en la proteína soluble no se produzca inhibición prueba que debe haber algún componente de la membrana implicado en el efecto del DCCD sobre la ATPasa. Una evidencia adicional la constituye el que el enzima inhibido por DCCD recupere su actividad cuando se solubiliza de la membrana. Además, si se vuelve a fijar la ATPasa soluble a las membranas desprovistas de enzima, éste se vuelve sensible otra vez al DCCD (92). Por último, la ATPasa soluble se inactiva cuando se fija a las membranas previamente tratadas con diclohexilcarbodiimida.

En consecuencia creemos que el DCCD inhibe a la ATPasa de membrana por un acoplamiento entre alguna o algunas subunidades del enzima con otra u otras proteínas adyacentes en la membrana, lo que conduce a una pérdida de actividad. Se ha comprobado que la acción inhibitora es irreversible.

ble mientras el enzima permanezca unido a la membrana y que el grado de inhibición depende del tiempo y de la concentración del DCCD (92), lo que sugiere una unión covalente entre el inhibidor y las proteínas de membrana. El hecho de que otros compuestos del tipo carbodiimida sean también inhibidores de la actividad ATPasa unida a la membrana, demuestra que el grupo funcional carbodiimida es el factor común responsable de la inhibición (201).

4.2 Reconstitución del complejo enzima-membrana.

La necesidad de cationes, y en especial de Mg^{2+} , para la restauración y estabilización del complejo ATPasa-membrana ya había sido señalada por Abrams y col. en S. faecalis (58, 108). Estos investigadores demostraron la existencia de una proteína denominada nectina (pm= 37.500 Dalton) que parecía estar unida al enzima por uniones de Mg^{2+} y era indispensable para la reconstitución del complejo (60). Se propuso el siguiente esquema de ensamblaje "in vitro":



Nuestros resultados muestran una fijación de la ATPasa a la membrana de M. lysodeikticus del 65% en presencia del Mg^{2+} , lo que confirma los previos hallazgos de Salton y col. (133) obtenidos en este microorganismo. La inmediata interpretación es que la ATPasa estaría asociada a la membrana por uniones que implican al Mg^{2+} , como en el caso de S. faecalis.

Estudios posteriores llevados a cabo en E. coli y S. faecalis han corroborado la importancia del Mg^{2+} y han tratado de esclarecer la naturaleza de estas uniones enzimáticas. Recientemente Abrams y col. (85) informaron que los iones Mg^{2+} actúan como enlaces entre la subunidad δ (peso molecular 20.000 Dalton de BF_1 de S. faecalis y el resto de la molécula enzimática. Las preparaciones de ATPasa obtenidas por electroforesis en gel en ausencia de Mg^{2+} carecen de dicha subunidad y son incapaces de volver a fijarse a la membrana. Por lo tanto todo indica que el Mg^{2+} une la subunidad δ a BF_1 y esta subunidad enlaza de nuevo al enzima con la membrana. Estos hechos experimentales sugieren además que la nectina era funcionalmente equivalente a δ (85). En la ATPasa de E. coli también ha sido identificada la subunidad δ como factor de unión (202 - 204) aunque en este caso no se ha demostrado aún su asociación con

BF_1 a través de puentes de Mg^{2+} .

Las últimas investigaciones realizadas al respecto implican a la subunidad α de S. faecalis (205). La modificación sufrida en esta subunidad por acción de la quimotripsina impide la fijación de la ATPasa a la membrana aunque esté presente δ . Una modificación similar en la subunidad α de BF_1 de M. lysodeikticus ha sido observada en nuestro laboratorio de tratar el enzima con tripsina (132). Dado que ya Salton y col. (133) habían demostrado que la ATPasa de M. lysodeikticus solubilizada con n-butanol, independiente de tripsina y carente de subunidades minoritarias no vuelve a fijarse de nuevo a la membrana plasmática, creemos que poseemos los suficientes datos para afirmar que la integridad de la subunidad α , así como la presencia de γ (análoga a δ de S. faecalis y E. coli) son absolutamente indispensables para la reconstitución del complejo ATPasa-membrana. No se ha estudiado el papel de esta última subunidad pero no es demasiado aventurado extrapolar a la ATPasa de M. lysodeikticus la función que representa en las ATPasas de los dos microorganismos anteriormente mencionados (S. faecalis y E. coli). Nuestro estudio con la ATPasa soluble dependiente de tripsina no dispone de suficientes resul

tados experimentales para averiguar el mecanismo molecular de la interacción del Mg^{2+} con las subunidades y el enzima, pero dada la necesidad de este catión en la reconstitución, es muy probable que, al igual que en BF_1 de S. faecalis, forme puentes de unión entre α y/o γ y el resto de la molécula de ATPasa.

4.3 Nucleotidos fijados a BF_1 de M. lysodeikticus.

Actualmente existe una gran evidencia de que las moléculas de los factores de acoplamiento contienen adenínucleotidos fuertemente unidos, aunque esta unión no es covalente. Además de los encontrados en F_1 (109 - 111), CF_1 (116) y BF_1 de S. faecalis (118, 119) y E. coli (122) existen también en varias membranas como partículas submitocondriales (206), membranas de tilakoides de cloroplastos (116) y en los cromatóforos de R. rubrum (207).

El significado de los nucleotidos unidos a F_1 y CF_1 en los mecanismo de la fosforilación oxidativa ha sido tema de recientes formulaciones (206, 208, 209) aunque estas funciones no están claramente demostradas. Sin embargo en bacterias, donde las investigaciones llevadas a cabo sobre el papel de estos nucleotidos han sido comparativamente es-

casas, Abrams y col. (119) consideran remota la posibilidad de que estén relacionados con la fosforilación oxidativa ya que su microorganismo estudiado, S. faecalis, es un fermentador homoláctico que carece de citocromos por lo que sólo realiza fosforilación oxidativa en circunstancias extraordinarias (210). Su interpretación es que pueden representar un papel importante en la fase de acoplamiento de energía del transporte activo, influyendo en la actividad catalítica o en el estado conformacional de la ATPasa unida a la membrana.

En el presente trabajo hemos demostrado que la ATPasa purificada de M. lysodeikticus contiene nucleotidos firmemente unidos. La naturaleza del enlace no está definida pero el hecho de que se liberen del enzima al lavar los geles con ácido acético al 10% y su intercambio con nucleotidos exógenos, nos permite afirmar sin lugar a dudas que no es covalente. Estos resultados representan un nuevo ejemplo de esta propiedad que comparten todas las proteínas transductoras de energía estudiadas hasta el momento. Sin embargo existen diferencias entre ellas en cuanto al número de los nucleotidos unidos como ya informamos en la Introducción (1.2.6). Los datos que aportamos a este respecto también difieren de los resumidos en la Tabla II.

Del estudio que hemos realizado podemos concluir que una forma activa de BF_1 de M. lysodeikticus contiene 2 moles de ATP fuertemente unidos por mol de enzima. Extrapolando los resultados obtenidos con células crecidas en $[^{32}P]$ -ortofosfato, parece razonable concluir que el ADP está unido a BF_1 en la misma cantidad que el ATP. Aunque no hayamos encontrado AMP ni P_i no podemos descartar que formen parte de la ATPasa, pero su exacta identificación y cuantificación necesitaría una experimentación ulterior. La carencia de AMP es general en todas las ATPasas estudiadas, pero no así la del P_i que se observa en BF_1 de E. coli (122) y en los experimentos de fijación "in vitro" realizados en S. faecalis (119).

El rápido intercambio de los nucleótidos endógenos de la ATPasa de M. lysodeikticus es una propiedad única de este enzima comparado con otras ATPasas transductoras de energía. En F_1 de mitocondrias de corazón de buey (109) y BF_1 de E. coli (122) y de S. faecalis (120), el complejo ATPasa-nucleótido endógeno es muy estable y no intercambia con nucleótidos exógenos añadidos, o si lo hace el proceso es muy lento. Por lo tanto la interpretación de Abrams y Nolan (119) de que los nucleótidos unidos a la ATPasa son

diferentes del ATP y ADP que se asocia transitoriamente al enzima durante la hidrólisis del ATP, no podemos hacerla extensiva a BF_1 de M. lysodeikticus, aunque no excluyamos la posibilidad. Por otra parte el intercambio ATP endógeno-ATP exógeno no depende de la presencia del Ca^{2+} . En consecuencia creemos que la fijación del ATP a la ATPasa de M. lysodeikticus es un proceso independiente del Ca^{2+} , lo que abogaría por atribuirle al catión una función en la hidrólisis del ATP y no en su fijación, como ya sugerimos al discutir el efecto del Ca^{2+} en la ATPasa soluble (4.1). Es interesante también el hecho de que los sitios de fijación parezcan ser equivalentes para el ATP y el ADP aunque este último nucleótido muestre una mayor afinidad por ellos.

De particular interés en estos estudios es el haber encontrado una correlación entre el nivel de la actividad ATPasa y la cantidad de nucleótido unido. La saturación de los sitios parece ser un requisito para que el enzima posea la máxima actividad independientemente del tipo de nucleótido que los ocupen (ATP o ADP). El descenso de la cantidad de nucleótido unido tiene como resultado una pérdida de la actividad hidrolítica de ATP. Es difícil en estos momentos decir si la disminución de los nucleótidos fijados

es la causa o el efecto de la inactivación de la ATPasa, aunque la primera posibilidad parece más probable. Un mecanismo que explicara la pérdida de actividad podría ser:

- 1.- La liberación lenta de una parte del ATP fijado mediante un proceso de equilibrio con el medio.
- 2.- La hidrólisis del ATP libre induce cambios conformacionales en el enzima y/o un cambio en su capacidad de fijar nucleotidos.
- 3.- El proceso es irreversible a causa de que en el medio no hay una concentración de ATP y/o ADP suficiente para rellenar los sitios.
- 4.- El almacenamiento de la proteína bajo estas condiciones produciría la inactivación de la ATPasa.

No hay todavía bastante evidencia que corrobore este mecanismo, aunque se ha demostrado la existencia de diferencias conformacionales entre formas del enzima que son catalíticamente diferentes (131, 211) y la inducción de cambios moleculares por hidrólisis del sustrato (Carreira, J y Muñoz, E., comunicación personal). Las propiedades específicas de los nucleotidos fuertemente unidos a la ATPasa de M. lysodeikticus constituyen un nuevo ejemplo de que a

pesar de las similitudes que existen entre las proteínas transductoras de energía, hay también diferencias entre ellas. Estas peculiaridades pueden ayudar a comprender el papel fisiológico de cada una de estas proteínas.

4.4 Papel de los fosfolípidos en la ATPasa de M. lysodeik- ticus.

Hemos demostrado que los fosfolípidos no forman parte de la molécula de ATPasa de M. lysodeikticus. Este resultado es una confirmación de los estudios previos que se habían llevado a cabo utilizando diferentes métodos (128, 212). Por esta carencia de fosfolípidos el factor de acoplamiento (BF_1) de M. lysodeikticus es similar al de mitocondrias (50) y cloroplastos (51). En bacterias sin embargo, aparece una controversia a este respecto. Mientras que BF_1 de S. faecalis no contiene fosfolípidos, aunque interacciona con capas lipídicas cambiando sus propiedades conductoras (213, 214), Peter y Ahlers han informado que la ATPasa de E. coli es una lipoproteína que contiene 40 nmoles de fosfolípido por nmol de enzima (101). Nuestros métodos experimentales nos han permitido detectar menos de 3 nmoles de fosfolípido por 100 nmoles de BF_1 de M. lysodeikticus lo que nos permite afirmar que no es una lipoproteína. Posteriores estu-

dios realizados en nuestro laboratorio han demostrado su naturaleza glucoproteica (215).

Hemos encontrado que el fosfatidilglicerol es el fosfolípido mayoritario que se libera de la membrana junto con la ATPasa al solubilizarla. Al obtener el mismo resultado en las membranas desprovistas de enzima podemos excluir la existencia de una selectividad en los fosfolípidos que acompañan a la ATPasa cruda, selectividad que sugeriría una asociación del enzima en la membrana con una determinada clase de fosfolípidos.

El análisis de la composición fosfolipídica de las membranas residuales no concuerda con los resultados expuestos previamente por Thomas y Ellar (216) y Mc Farlane (217). Estos investigadores, dando pulsos radiactivos de muy corta duración a las células de M. lysodeikticus, encontraron que la composición en fosfolípidos de sus membranas constaba de cardiolipina (difosfatidilglicerol) (67%), fosfatidilglicerol (27%) y fosfatidilinositol (7%). Dado que nosotros hemos utilizado los mismo métodos de extracción y detección lipídica sólo podemos explicarnos esta discrepancia si consideramos que tanto la cardiolipina como el fosfatidilinositol tienen un recambio mucho más rápido que el fosfatidilgli

cerol, lo que haría que el [2-³H]glicerol se almacenara finalmente en este último fosfolípido. De hecho, en los experimentos con células crecidas hasta fase exponencial encontramos trazas de cardiolipina que no se manifiestan en las membranas de células procedentes de fase estacionaria. El recambio del fosfatidilglicerol no es bien conocido todavía pero estudios llevados a cabo en E. coli (218, 219) muestran la complejidad del metabolismo de este fosfolípido, siendo diferente el grado de recambio del glicerol no acilado y el acilado dentro de la misma molécula. Por tanto no excluimos la posibilidad de que exista gran cantidad de cardiolipina o fosfatidilinosinol en las membranas de M. lysodeikticus que no hayamos podido detectar por métodos radiactivos.

La estimulación del 30% de la actividad hidrolítica de BF_1 de M. lysodeikticus producida por el extracto de fosfolípidos del enzima soluble nos ha sorprendido, ya que al no ser una lipoproteína ni proteína intrínseca de membrana no se le pueden aplicar los razonamientos que se han desarrollado para explicar la estimulación observada en la ATPasas intrínsecas del retículo sarcoplásmico (104) o en otros enzimas intrínsecos de membrana como la citocromo oxidasa (220). La única especulación que se puede hacer al

respecto es que a pesar de ser la ATPasa de M. lysodeikticus una proteína extrínseca, es posible que alguna parte de la molécula esté incluida en la bicapa lipídica.

4.5 Estudio molecular de la biosíntesis de BF₁ de M. lysodeikticus. Efecto de la cerulenina.

El estudio que hemos llevado a cabo de la biosíntesis de BF₁ "in vivo" nos ha permitido seguir hasta cierto punto la síntesis y recambio de las distintas subunidades de la molécula, lo que representa una novedad en lo que a factores de acoplamiento bacterianos se refiere. Ya que no se ha podido disponer de cultivos sincronizados, las técnicas empleadas de pulso y pulso y caza han proporcionado información de gran interés.

Hemos seguido la incorporación de [³H]aminoácidos en las distintas fracciones celulares de M. lysodeikticus, y conseguido purificar BF₁ marcada radiactivamente al igual que otros autores han hecho con F₁ de distintas fuentes mitocondriales (140, 143) y CF₁ (146). La alta radiactividad específica del enzima obtenida con sólo 7 min de pulso nos demuestra que la ATPasa se sintetiza en fases tempranas del crecimiento celular, habida cuenta de que el tiempo de generación es de 4 horas 30 min. Este resultado no nos sor

prende si consideramos que M. lysodeikticus es una bacteria aerobia estricta que posee un potente sistema para la fosforilación oxidativa situado en un muy bien desarrollado sistema membranoso. Por tanto es lógico suponer que los enzimas implicados en este proceso se sintetizan rápidamente en la célula. Otro rasgo importante a señalar es que la radiactividad específica de las membranas es siempre mayor que la de las fracciones citoplásmicas. Tani y Hendler (221) encontraron que también los esferoplastos de E. coli eran más activos que el citoplasma en incorporación de aminoácidos y esta observación se ha ido repitiendo en los estudios de incorporación de membranas celulares (222).

La existencia en bacterias de un único tipo de ribosomas no plantea los problemas que surgen en las células eucarióticas, donde las proteínas de membrana de mitocondrias y cloroplastos pueden ser sintetizadas por los ribosomas citoplásmicos o por los propios del orgánulo (1.3). A pesar de ello se sabe que en la membrana bacteriana hay algunos ribosomas unidos a la misma o a un complejo ADN-membrana (223), lo que ha suscitado numerosos estudios encaminados a averiguar el origen de las proteínas y enzimas de membrana de los microorganismos. Un ejemplo de enzima sintetizado

por los polirribosomas unidos a la membrana plasmática de E. coli es la fosfatasa alcalina, que se traslada en forma inactiva hasta la región periplásmica (224). Nosotros hemos sugerido sin embargo que la ATPasa de M. lysodeikticus se sintetiza en el citoplasma a partir de precursores y se incorpora más tarde a la membrana celular. El mismo proceso de síntesis ha sido descrito entre otros, para la succínico deshidrogenasa, enzima de membrana de B. subtilis (149, 150).

Esta síntesis en el citoplasma puede ser parcial, como ocurre en CF_1 dónde sólo las subunidades mayoritarias se sintetizan en el citoplasma (146), o total, en cuyo caso existen dos posibilidades:

- a) Que las subunidades se sinteticen por los ribosomas citoplásmicos y se trasladen a la membrana ensamblándose allí para dar lugar al enzima funcional.
- b) Que el ensamblaje de las subunidades ocurra en el mismo citoplasma y sea BF_1 la que se traslade a la membrana una vez constituida su estructura cuaternaria (al igual que F_1 y OSCP en la mitocondria (30)).

Los datos que hemos presentado apuntan más hacia la segunda posibilidad, pero al no poder utilizar inhibidores como prueba concluyente (como se ha hecho al estudiar la

biosíntesis de la ATPasa mitocondrial y de cloroplastos) no podemos darnos por totalmente satisfechos. De todos modos, el descenso de radiactividad observado en el citoplasma y aumento en la membrana es de suficiente magnitud para que sea responsable del mismo una proteína mayoritaria de la membrana plasmática como es la ATPasa. El proceso mediante el cual los enzimas sintetizados en el citoplasma se incorporan a sus membranas respectivas es desconocido por el momento, y las posibles hipótesis a este respecto se han comentado en la Introducción (1.1.2).

En la mayor parte de las células, los constituyentes proteicos del citoplasma y membranas están continuamente degradándose y sintetizándose. Esta propiedad ha sido empleada para examinar las interconversiones de unas proteínas en otras dentro de las células u orgánulos de las mismas. Como ejemplo podemos citar los estudios llevados a cabo en proteínas mitocondriales de Neurospora crassa (225, 226) e hígado de rata (227, 228), donde se ha demostrado la dependencia del tiempo en el marcaje de proteínas y la conversión de las de menor peso molecular en otras de peso molecular más elevado. Esta última observación nos ha inducido a pensar en la existencia de una posible interrelación entre las distintas subunidades y componentes de BF₁

de M. lysodeikticus, que nos ayudaría a comprender el mecanismo molecular de formación del enzima.

Los resultados que presentamos concernientes a las dos subunidades mayoritarias, α y β , nos demuestran que ambos polipéptidos son especies moleculares diferentes, lo que corrobora lo ya descrito a este respecto para la ATPasa de M. lysodeikticus (129) y en general para los demás factores de acoplamiento estudiados. La disminución tan acusada de radiactividad de α en relación a β a medida que el cultivo va envejeciendo no nos permite ninguna duda al respecto tanto más cuando al adicionar medio fresco en la caza se observa un aumento en el perfil de absorbancia de α y no así de su radiactividad.

La posibilidad de que β incorpore los aminoácidos de α sólo podría demostrarse haciendo un análisis del recambio de las demás proteínas celulares, tal y como hicieron Kuzêla y col. (227) y Hofmann y col. (228) al estudiar las relaciones entre proteínas mitocondriales. Lo más probable es que cada subunidad lleve una vida independiente de la otra.

El estudio comparativo con el resto de subunidades y componentes de BF_1 nos dá resultados muy complejos y difí-

ciles de interpretar, pero podemos sacar algunas conclusiones interesantes. El componente X ha sido observado únicamente en las preparaciones de BF_1 procedentes de la cepa B (131) y no tiene análogo en los demás factores de acoplamiento conocidos. Se sabe muy poco acerca de él y se ha cuestionado su naturaleza como verdadera subunidad (131). Por los datos que aportamos, este componente aparece tardíamente en la ATPasa, ya que su presencia es casi imperceptible en las fases tempranas de crecimiento celular. La relación observada entre $(\alpha + \beta)$ y X nos sugiere que es muy posible que se trate de un agregado de péptidos o polipéptidos de alto peso molecular difícil de disociar o que va formándose lentamente adhiriéndose a la molécula proteica y es el precursor inmediato de las subunidades mayoritarias.

El perfil de absorbancia de la subunidad γ va disminuyendo conforme las células se acercan a la fase estacionaria, como consecuencia del agotamiento del medio. En este sentido el aumento observado en las cazas puede ser probablemente debido a la adición de medio fresco, al igual que sucede con los componentes de menor peso molecular y alta movilidad relativa. La naturaleza de estos componentes

es también dudosa pero se ha especulado que puedan ser péptidos procedentes de la degradación de α y β , o bien péptidos pequeños que se encuentren entre las subunidades.

Los resultados obtenidos parecen descartar la primera posibilidad ya que no hemos evidenciado ninguna correlación entre estos componentes y las subunidades mayoritarias. Del mismo modo la subunidad γ también parece ser independiente sin guardar relación alguna con el resto de las subunidades. Esta subunidad γ es la que posee el recambio más rápido de todas y lo más probable es que se sintetice a partir de péptidos precursores ya formados en el citoplasma.

En mitocondrias y cloroplastos, donde más extensos han sido los estudios sobre biosíntesis de ATPasa, se ha seguido también la incorporación de aminoácidos en las distintas subunidades del enzima (140, 143, 146) como ya hemos indicado, pero estas investigaciones han ido encaminadas principalmente a la búsqueda del sitio de síntesis de las mismas y no con objeto de encontrar posibles interrelaciones como ha sido nuestro propósito.

Ya que las membranas biológicas constan principalmente de lípidos y proteínas, es interesante determinar si en la célula viva hay una regulación común de la biosíntesis de estos componentes en la membrana. El método más utilizado para intentar resolver el problema ha consistido en el bloqueo experimental de la biosíntesis de lípidos en las células bacterianas. Dado que casi todos ellos están localizados en la membrana plasmática es de esperar que la interrupción genética (estudio con mutantes auxótrofos para determinados ácidos grasos o para el glicerol) o bioquímica (empleo de inhibidores de síntesis lipídica) de su biosíntesis tenga un efecto directo sobre la de la membrana.

Nuestro interés se ha centrado en comprobar en qué medida la falta de síntesis de lípidos afecta a la biosíntesis de la ATPasa de M. lysodeikticus observando al mismo tiempo las consecuencias que el cese de nueva síntesis de fosfolípidos puede tener en las células de este microorganismo.

Hemos demostrado que la cerulenina, que bloquea rápidamente la síntesis de ácidos grasos, inhibe el crecimiento de M. lysodeikticus en un 30% a la concentración de an-

tibiótico ensayada. Similar resultado había sido observado en B. subtilis (182) y E. coli(181). La explicación más probable es que esta inhibición del crecimiento por carencia de síntesis de ácidos grasos sea debida a una pérdida de eficacia en la producción de energía de la fosforilación oxidativa a causa de la disminución del contenido de lípidos de la membrana, o bien a la reducción en las células de la capacidad para concentrar moléculas que sean esenciales para la biosíntesis o producción de energía debido a los defectos de permeabilidad en los sistemas. En los estudios llevados a cabo con mutantes de S. aureus auxótrofos para el glicerol se ha encontrado que la actividad específica del transporte de glicocola disminuye con el tiempo, lo que indica que el sistema de permeabilidad ya no se sintetiza o si lo hace ha perdido su eficacia (229).

Centrándonos en la acción de la cerulenina sobre la ATPasa, hemos observado que la cantidad de enzima se ve afectada por la presencia del antibiótico. Sin embargo, aunque la actividad específica de la ATPasa soluble procedente de células tratadas con cerulenina sea menor que la de las células control, esta disminución es probablemente debida al descenso de la cantidad de enzima y no a la pérdida de actividad para hidrolizar el ATP. Por ello creemos

poder afirmar que la carencia de nueva síntesis de ácidos grasos no afecta a la actividad ATPasa. Lo mismo sucede con otras actividades enzimáticas en algunos microorganismos, por ejemplo, en S. aureus las actividades fosfotransferasa, β -galactosidasa y permeasa no sólo no disminuyen sino que aumentan en ausencia de nueva síntesis de lípidos (47) al igual que el sistema de transporte de citrato en B. subtilis (230). La incorporación de aminoácidos por parte de BF_1 de M. lysodeikticus tampoco disminuye por la adición de cerulenina al medio de cultivo, sino que experimenta también un ligero aumento. En consecuencia sugerimos que la carencia de síntesis de lípidos en las células de M. lysodeikticus no afecta a la síntesis de ATPasa pero sí a la integración de este enzima en la membrana plasmática.

La aparición de una nueva banda en geles de poliacrilamida es un dato a considerar pues aunque no posea actividad hidrolítica de ATP podría ser consecuencia de un desdoblamiento en alguna subunidad de BF_1 , no necesaria para la actividad catalítica pero sí para el ensamblaje del enzima en la membrana, y cuya integridad necesitaría la presencia de ácidos grasos o fosfolípidos. Por lo tanto sería

necesario un estudio más detallado con proteína purificada de los efectos de la cerulenina en BF_1 , que aunque no ha sido el objetivo inicial de la investigación, ha revelado ser un tema interesante que ayudará junto con los demás datos que hemos presentado, a una comprensión más completa de la formación de la estructura cuaternaria del factor de acoplamiento de M. lysodeikticus.

5. CONCLUSIONES

- 1.- La ATPasa de M. lysodeikticus en su estado soluble es estimulable por tripsina hasta un 150-200% de su actividad basal.
- 2.- La relación tripsina:ATPasa que produce la mayor estimulación es 1/15 (peso/peso).
- 3.- El Ca^{2+} estimula la actividad de la ATPasa soluble, siendo la relación óptima $\text{ATP}/\text{Ca}^{2+} = 1$. Creemos que el $\text{ATP}-\text{Ca}^{2+}$ no es el verdadero sustrato de la ATPasa.
- 4.- Los parámetros cinéticos de la ATPasa soluble, K_m y V_m aumentan siempre en presencia de tripsina.
- 5.- La atebrina a bajas concentraciones (0,1-0,3 mM) es timula la actividad ATPasa soluble y a altas (2,5 mM) la inhibe. El tipo de inhibición es no competitiva mixta.
- 6.- La diciclohexilcarbodiimida no inhibe la actividad de la ATPasa soluble.
- 7.- Se ha conseguido una reconstitución ATPasa soluble-membrana de un 65% mediada por adición de Mg^{2+} .

- 8.- La ATPasa purificada de M. lysodeikticus contiene nucleotidos asociados a la molécula por medio de un enlace fuerte pero no covalente. Han sido identificados como ATP y ADP. La cantidad de ATP es de 2 moles/mol BF_1 y pensamos que el ADP está en condiciones de equimolaridad con el ATP. Estos nucleotidos endógenos se intercambian con ADP y ATP exógeno. El intercambio del ATP endógeno por ADP exógeno no afecta a la actividad enzimática.
- 9.- Hay correlación, aunque no totalmente lineal, entre el nivel de ATP endógeno y la actividad ATPasa. Pensamos que esta liberación del ATP endógeno, que se produce por conservación prolongada de la proteína, es la causante del descenso de actividad.
- 10.- BF_1 de M. lysodeikticus no es una lipoproteína. No obstante y a pesar de ser una proteína extrínseca de membrana, los fosfolípidos que la acompañan en la forma soluble (fosfatidilglicerol) estimulan un 30% su actividad.
- 11.- Los fosfolípidos detectados en las membranas residuales de M. lysodeikticus son fosfatidilglicerol y trazas de fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina,

no representando ninguna selectividad respecto a los que acompañan la ATPasa soluble.

- 12.- Hemos conseguido purificar BF_1 de M. lysodeikticus marcada radiativamente, con actividades específicas de 200.000-400.000 cpm/mg proteína. La ATPasa se sintetiza en fases tempranas del crecimiento celular y su sitio de síntesis parece ser el citoplasma.
- 13.- Las subunidades mayoritarias α y β , son independientes, siendo β metabólicamente más estable. Ambas guardan relación con un componente X en cuanto a síntesis se refiere. La subunidad γ es la que posee el mayor recambio de todas.
- 14.- La cerulenina inhibe el crecimiento de M. lysodeikticus un 30% y reduce a la mitad la cantidad de ATPasa del extracto soluble. Sin embargo no afecta a la incorporación radiactiva de BF_1 , ya que más bien la aumenta ligeramente.
- 15.- Pensamos que la inhibición de síntesis de ácidos grasos, debida a la cerulenina, no afecta a la síntesis de la ATPasa de M. lysodeikticus pero sí al ensamblaje del enzima en la membrana celular.

6 BIBLIOGRAFIA

- 1.- Chambers, R. (1924) Cowdry General Cytology. University of Chicago Press.
- 2.- Plowe, J.A. (1931) Protoplasma, 12, 196.
- 3.- Overton, E.(1899) Vischr. Naturf. Ges. Zurich, 44, 88.
- 4.- Gorter, E. y Grendel, F. (1925) J. Exp. Med., 41, 439.
- 5.- Danielli, J.F. y Davson, H. (1935) I. cell. comp. Physiol., 5, 495.
- 6.- Stein, W.D. y Danielli, J.F. (1956) Disc. Faraday Soc., 21, 238:
- 7.- Robertson, J.D. (1958) J. Biophys. Bioch. Cytol., 4, 349.
- 8.- Robertson, J.D. (1960) Prog. Biophys. Chem., 10, 343.
- 9.- Robertson, J.D. (1964) Cellular Membranes in Development (Ed. M. Locke) New York, Academic Press Inc.
- 10.- Robertson, J.D. (1964) Intracellular Membranes Structure (Ed. S. Seno y E.V. Cowdry) Okayama Japan Chugoku Press Ltd. p. 379.
- 11.- Benson, A.A. (1968) Membrane Models and the Formation of Biological Membranes (Ed. L. Bolis y B.A. Pethica) Amsterdam, North Holland.

- 12.- Singer, S.J. (1971) Structure and Function of Biological Membranes (Ed. L.I. Rothfield). Academic Press. New York.
- 13.- Singer, S.J. y Nicholson, G.L. (1972) Science, 171, 720.
- 14.- Capaldi, A. y Green, D.F. (1972) FEBS Lett., 25, 205.
- 15.- Guidotti, G. (1972) Ann. Rev. Biochem., 41, 731.
- 16.- Green, D.E. (1972) Ann. N. Y. Acad. Sci., 195, 150.
- 17.- Vanderkooi, G. y Sunderalingam, M. (1970) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 67, 233.
- 18.- Blasie, J.K., Worthington, E.R. y Dewey, M.M. (1969) J. Mol. Biol., 39, 407.
- 19.- Blasie, J.K. (1973) Biophys. J., 12, 191.
- 20.- Blaurock, A.E. y Wilkins, M.H.F. (1972) Nature, 236, 313.
- 21.- Vanderkooi, G., Senior, A.F., Capaldi, R.A. y Hayachi, H. (1972) Biochim. Biophys. Acta 274, 38.
- 22.- Bretscher, M.S. y Raff, M.C. (1975) Nature, 258, 43.
- 23.- Tomita, N. y Marchesi, V.T. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 2964.
- 24.- Blaurock, A.E. y Stoeckenius, W. (1971) Nat. New Biol., 233, 152.

- 25.- Kagawa, Y. y Racker, E. (1966) J. Biol. Chem. 241
2475.
- 26.- Mc Lennan, D.H. y Tzagoloff, A. (1968) Biochemistry
7, 1603.
- 27.- Green, D.F. y Mc Lennan, D.H. (1968) Bioscience 17,
213.
- 28.- Capaldi, R.A. (1972) Eur. J. Biochem. 29, 74.
- 29.- Eng, L.M., Chao, E.C., Gersti, B., Pratt, D. y Tavast-
jerna, M.S. (1968) Biochemistry 7, 4455.
- 30.- Mc Connell, H.M. y Mc Farland, B.G. (1970) Quart. Rev.
Biophys. 3, 91.
- 31.- Jost, P.C., Griffiths, O.H., Capaldi, R.A. y Vander-
kooi, G. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 70, 480.
- 32.- Groot, G.S.P. (1974) The Biogenesis of Mitochondria
(Eds. A. M. Kroon, y C. Saccone) Academic Press New
York, p. 443.
- 33.- Grivell, L.A., Reijnders, L. y Borst, P. (1971)
Biochim. Biophys. Acta 247, 91.
- 34.- Inouye, M. (1975) Membrane Biogenesis (Ed. A. Tzagoloff)
Plenum Press New York, p. 351.
- 35.- Strittmatter, P., Rogers, M.J. y Spatz, L. (1972)
J. Biol. Chem. 247, 7188.

- 36.- Spatz, L. y Strittmatter, P. (1973) J. Biol. Chem. 248, 793.
- 37.- Marchesi, V.T. y Andrews, E.P. (1971) Science 174, 1247.
- 38.- Tzagoloff, A., Rubin, M.S. y Sierra, M.F. (1973) Biochim. Biophys. Acta 301, 71.
- 39.- Schweyen, R. y Kandewitz, F. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 1351.
- 40.- Weiss, H., Von Jagow, G., Klingenberg, M. y Bücher, Th. (1970) Eur. J. Biochem. 14, 75.
- 41.- Reush, V.M. Jr. y Burger, M.M. (1973) Biochim. Biophys. Acta 300, 79.
- 42.- Cota-Robles, E. (1963) J. Bacteriol. 85, 499.
- 43.- Frye, L.D. y Edidin, M. (1970) J. Cell. Sci. 7, 319.
- 44.- Van den Bosch, H. (1974) Ann. Rev. Biochem. 43, 243.
- 45.- Wirtz, K.W.A. y Zilversmit, D.B. (1968) J. Biol. Chem. 243, 3596.
- 46.- Kamp, H.H., Wirtz, K.W.A. y Van Deenen, L.L. (1973) Biochim. Biophys. Acta 318, 313.
- 47.- Mindich, L. (1975) Membrane Biogenesis (Ed. A. Tzagoloff) Plenum. Press. New York, p. 429.

- 48.- Tzagoloff, A. (1971) Structure and Biosynthesis of the Membrane Adenosine Triphosphatase of Mitochondria. En Current Topics in Membranes and Transport. (E. F. Bronner y A. Kleinzeller) Academic Press. New York, London. Vol. 2, p. 157.
- 49.- Senior, A.E. (1973) Biochim. Biophys. Acta 301, 249.
- 50.- Pedersen, P.L. (1975) J. Bioenergetics 6, 243.
- 51.- Penefsky, H.S. (1974) Mitochondrial and Chloroplast ATPases. En The Enzymes (Ed. P.D. Boyer) Academic Press, New York, London. Vol. X, p. 375.
- 52.- Hasselbach, W. (1974) Sarcoplasmic Membrane ATPases. En The Enzymes (Ed. P.D. Boyer) Academic Press, New York, London. Vol X, p. 431.
- 53.- Stuchell, R.N., Weinsten, B.I. y Beattie, D.S. (1975) J. Biol. Chem. 250, 570.
- 54.- Salomon, A.K. (1962) Biophys. J. 2, 79.
- 55.- Kanner, B.I. y Gutnick, D.L. (1972) J. Bacteriol. 111, 287.
- 56.- Kanner, B.I. y Gutnick, D.L. (1972) FEBS Lett. 22 197.
- 57.- Abrams, A., Mc Namara, P. y Johnson, F.B. (1960) J. Biol. Chem. 235, 3659.

- 58.- Abrams, A. (1965) J.Biol. Chem. 240, 3675.
- 59.- Schnebli, H. y Abrams, A. (1970) J. Biol. Chem. 245, 1115.
- 60.- Baron, C. y Abrams, A. (1971) J. Biol. Chem. 246, 1542.
- 61.- Weibull, C., Greenawalt, J.W. y Low, H. (1962) J. Biol. Chem. 237, 847.
- 62.- Ishida, M. y Mizushima, S. (1969) J. Biochem (Tokio) 66, 33 y 133.
- 63.- Mirsky, R. y Barlow, V. (1972) Biochim. Biophys. Acta 274, 556.
- 64.- Mirsky, R. y Barlow, V. (1973) Biochim. Biophys. Acta 295, 480.
- 65.- Hachimori, A., Muramatsu, N. y Nosoh, Y. (1970) Biochim. Biophys. Acta 206, 426.
- 66.- Adolfsen, R. y Moudrianakis, E.N. (1971) Biochemistry 50, 2247.
- 67.- Reed, O.W., y Raveed, D. (1972) Biochim. Biophys. Acta 283, 79.
- 68.- Monteil, H., Roussel, G. y Boulouis, D. (1975) Biochim. Biophys. Acta 382, 465.

- 69.- Higashi, T., Kalra, V.K., Lee, S.H., Bogin, E. y Brodie, A.F. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 6541.
- 70.- Johansson, B.C. y Baltscheffsky, M. (1975) *FEBS Lett.* 53, 221.
- 71.- Yoshida, N., Sone, N., Hirata, H. y Kagawa, Y. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 7910.
- 72.- Muñoz, E., Freer, J.H., Ellar, D.J. y Salton, M.R.J. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 150, 531.
- 73.- Muñoz, E., Nachbar, M.S., Schor, M.T. y Salton, M.R.J. (1968) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 32, 539.
- 74.- Tzagoloff, A. y Meagher, P. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 7328.
- 75.- Capaldi, R.A. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 53, 1331.
- 76.- Abrams, A. y Smith, J.B. (1974) *Bacterial Membrane ATPase*. En *The Enzymes* (Ed. P.D. Boyer) Academic Press, New York, London. Vol X, p. 395.
- 77.- Adolfsen, R. y Moudrianakis, E.N. (1974) *Fed. Proc. Abs.* 33, 1330.
- 78.- Whiteside, T.L. y Salton, M.R.J. (1970) *Biochemistry* 9, 3034.
- 79.- Knowles, A.F. y Penefsky, H.S. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 6624.

- 80.- Brooks, J.C. y Senior, A.E. (1971) Arch. Biochem. Biophys. 147, 467.
- 81.- Catterall, W.A., Coty, W.A. y Pedersen, P.L. (1973) J. Biol. Chem. 248, 7427.
- 82.- Kozlov, I.A. y Mikelsaar, H.N. (1974) FEBS Lett 43, 212.
- 83.- Berzborn, R.J. y Hoppe-Seyler's, Z. (1972) Physiol. Chem. 353, 693.
- 84.- Nelson, N., Nelson, H. y Racker, E. (1972) J. Biol. Chem. 247, 7657.
- 85.- Abrams, A., Jensen, C. y Morris, D.H. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 69, 804.
- 86.- Bragg, P.D. y Hou, C. (1972) FEBS Lett 28, 309.
- 87.- Hanson, R.L. y Kennedy, E.P. (1973) J. Bacteriol. 114, 772.
- 88.- Tzagoloff, A., Mc Lennan, D.H. y Byington, K.H. (1968) Biochemistry 7, 1596.
- 89.- Adolfsen, R. y Moudrianakis, E.N. (1973) Biochemistry 12, 2926.
- 90.- Davies, P.E. y Bragg, P.D. (1972) Biochim. Biophys. Acta 266, 273,
- 91.- Kobayashi, H. y Ankaru, Y. (1972) J. Biochem. 71, 387.

- 92.- Harold, F.M., Baarda, J.R., Baron, C. y Abrams, A.
(1969) J. Biol. Chem. 244, 2261.
- 93.- Abrams, A., Smith, J.B. y Baron, C. (1972) J. Biol.
Chem. 247, 1484.
- 94.- Carmeli, C. (1969) Biochim. Biophys. Acta 189, 141.
- 95.- Greenawalt, J.W., Weibull, C. y Löw, H. (1962) J.
Biol. Chem. 237, 853.
- 96.- Gross, R. y Coles, N. W. (1968) J. Bacteriol. 95,
1322.
- 97.- Carreira, J. y Muñoz, E. (1977) Antimicrob. Agents
Chemother. 11, 38.
- 98.- Kagawa, Y. y Racker, E. (1966) J. Biol. Chem. 241
2467.
- 99.- Swanljung, P., Frigeri, L., Ohlson, K. y Ernster, L.
(1973) Biochim. Biophys. Acta 305, 519.
- 100.- Toson, G., Contessa, A.R. y Bruni, A. (1972) Biochem.
Biophys. Res. Commun. 48, 341.
- 101.- Peter, H.W. y Ahlers, J. (1975) Arch. Biochem.
Biophys. 170, 169.
- 102.- Wheeler, K.P. y Whittam, R. (1970) Nature 225, 449.
- 103.- Fenster, L.J. y Copenhaver, J.H. (1967) Biochim.
Biophys. Acta 137, 406.
- 104.- Mc Lennan, D.H. (1970) J. Biol. Chem. 245, 4508.

- 105.- Knowles, A.F., Eytan, E. y Racker, E. (1976) J. Biol. Chem. 251, 5161.
- 106.- Racker, E. y Horstman, L.L. (1967) J. Biol. Chem. 242, 2547.
- 107.- Shoshan, V. y Shavit, N. (1973) Eur. J. Biochem. 37, 355.
- 108.- Abrams, A. y Baron, C. (1968) Biochemistry 7, 501.
- 109.- Harris, D.A., Rosing, J., Van de Stadt, R.J. y Slater, E.C. (1973) Biochim. Biophys. Acta 314, 149.
- 110.- Rosing, J., Harris, D.A., Kemp, A. y Slater, E.C. (1975) Biochim. Biophys. Acta 376, 13.
- 111.- Garret, N.E. y Penefsky, H.S. (1975) J. Biol. Chem. 250, 6640.
- 112.- Hilborn, D.A. y Hammes, G.G. (1973) Biochemistry 12, 983.
- 113.- Pedersen, P. L. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 64, 610.
- 114.- Roy, H. y Moudrianakis, E.N. (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 464.
- 115.- Roy, H. y Moudrianakis, E.N. (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 2720.
- 116.- Harris, D.A. y Slater, E.C. (1975) Biochim. Biophys. Acta 387, 335.

- 117.- Bickel-Sandkötter, S. y Strotmann, H. (1976) FEBS Lett 65, 102.
- 118.- Abrams, A. y Nolan, E.A. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 982.
- 119.- Abrams, A., Nolan, E.A., Jensen, C. y Smith, J.B. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 55, 22.
- 120.- Abrams, A., Jensen, C. y Morris, D. (1975) J. Supramol. Structure 3, 261.
- 121.- Adolfsen, R. y Moudrianakis, E.N. (1976) Arch. Biochem. Biophys. 172, 425.
- 122.- Maeda, M., Kobayashi, H., Futai, M. y Ankaru, Y. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 70, 228.
- 123.- Ishikawa, S. y Lehninger, A.L. (1962) J. Biol. Chem. 237, 2401.
- 124.- Ishikawa, S. (1966) J. Biochem. (Tokio) 60, 598.
- 125.- Lastras, M. y Muñoz, E. (1971) FEBS Lett 14, 69.
- 126.- Lastras, M. y Muñoz, E. (1972) FEBS Lett 21, 109.
- 127.- Lastras, M. y Muñoz, E. (1974) J. Bacteriol. 119, 593.
- 128.- Muñoz, E., Salton, M.J.R., Ng, M.H. y Schor, M.T. (1969) Eur. J. Biochem. 7, 490.
- 129.- Andreu, J.M. y Muñoz, E. (1975) Biochim. Biophys. Acta 387, 228.

- 130.- Andreu, J.M., Albendea, J.A. y Muñoz, E. (1973)
Eur. J. Biochem. 37, 505.
- 131.- Carreira, J., Andreu, J.M., Nieto, M. y Muñoz, E.
(1976) Mol. Cell. Biochem. 10, 67.
- 132.- Carreira, J., Muñoz, E., Andreu, J.M. y Nieto, M.
(1976) Biochim. Biophys. Acta 436, 183.
- 133.- Salton, M.R.J. y Schor, M.T. (1972) Biochem. Biophys.
Res. Commun. 49, 350.
- 134.- Salton, M.R.J. y Schor, M.T. (1974) Biochim. Biophys.
Acta 345, 74.
- 135.- Fukui, Y., Nachbar, M.S. y Salton, M.R.J. (1971)
J. Bacteriol. 105, 86.
- 136.- Salton, M.R.J., Schor, M.T. y Ng, M.H. (1972) Biochim.
Biophys. Acta 290, 408.
- 137.- Schatz, G. (1968) J. Biol. Chem. 243, 2192.
- 138.- Kováč, L. y Weisssová, K. (1968) Biochim. Biophys.
Acta 153, 55.
- 139.- Tzagoloff, A. (1969) J. Biol. Chem. 244, 5027.
- 140.- Tzagoloff, A., Akai, A. y Sierra, M.F. (1972) J. Biol.
Chem. 247, 6511.
- 141.- Tzagoloff, A. (1970) J. Biol. Chem. 245, 1545.
- 142.- Tzagoloff, A. y Meagher, P. (1972) J. Biol. Chem.
247, 594.

- 143.- Stratman, F.W., Zahlten, R.N., Hochberg, A.A. y Lardy, H.A. (1972) *Biochemistry* 11 3154.
- 144.- Tzagoloff, A. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 3050.
- 145.- Blair, G.E. y Ellis, R.J. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 319, 223.
- 146.- Mendiola-Morgenthaler, L.R., Morgenthaler, J.J. y Price, C.A. (1976) *FEBS Lett* 62, 96
- 147.- Hirashima, A., Childs, G. y Inouye, M. (1973) *J. Mol. Biol.* 79, 373.
- 148.- Bacchus, A. y Javor, G.T. (1975) *Antimicrob. Agents Chemother.* 8, 387.
- 149.- Sargent, M.G. (1973) *J. Bacteriol.* 116, 397.
- 150.- Sargent, M.G. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 406, 564.
- 151.- Kusaka, I. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 345, 62.
- 152.- Vambutas, V.K. y Salton, M.R.J. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 203, 83.
- 153.- Vambutas, V.K. y Salton, M.R.J. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 203, 94.
- 154.- García Mendoza, C. y Novaes-Ledieu, M. (1975) *Canad. J. Biochem.* 53, 615.
- 155.- Schnebli, H.P., Vatter, A.E. y Abrams, A. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 1122.

- 156.- Nelson, N. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 456, 314.
- 157.- Salton, M.R.J. y Freer, J.M. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* 107, 531.
- 158.- Salton, M.R.J. (1964) *Biochim. Biophys. Acta* 86, 421.
- 159.- Vambutas, V.K. y Racker, E. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 2660.
- 160.- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farn, A.L. y Randall, R. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265.
- 161.- Davis, B.J. (1964) *Ann. New York Acad. Sci.* 121, 404.
- 162.- Ornstein, L. (1964) *Ann. New York Acad. Sci.* 121, 321.
- 163.- Fairbanks, G., Steck, T.L. y Wallach, D.F.H. (1971) *Biochemistry* 10, 2606.
- 164.- Saurge, N. (1957) *Biochem. J.* 67, 146.
- 165.- Weinbaum, G. y Markman, R. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* 124, 207.
- 166.- Fischer, L. (1971) *An Introduction to Gel Chromatography*. (Eds. T.S. Work y E. Work).
- 167.- Bray, G.A. (1960) *Anal. Biochem.* 1, 279.
- 168.- Sato, T.R., Thomson, J.F. y Danforth, W.F. (1963) *Anal. Biochem.* 5, 542.

- 169.- Strehler, B.L. (1974) *Methods of Enzymatic Analysis*.
(Ed. Bergmeyer) Verlag Chemie, Weinheim, Academic
Press Inc. New York, p. 2112.
- 170.- Ronser, G., Kritchevsky, G. y Yamamoto, A. (1967)
Lipid Chromatographic Analysis (Ed. G.V. Marinetti)
Dekker, New York, p. 99.
- 171.- Shaw, N. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 164, 435
- 172.- Lineweaver, H. y Burk, D. (1934) *J. Am. Chem. Soc.*
56, 658.
- 173.- Holloway, C.I., Roberton, A.M., Knight, I.G. y
Beechey, R.B. (1966) *Biochem. J.* 100, 79.
- 174.- Catell, K.J., Knight, I.G., Lindop, C.R. y Beechey,
R.B. (1971) *Biochem. J.* 125, 169.
- 175.- Hill, A.V. (1910) *J. Physiol.* 40, IV.
- 176.- Cleland, W.W. (1963) *Biochim. Biophys. Acta* 67,
173.
- 177.- Salton, M.R.J. y Schmitt, M.D. (1967) *Biochem.*
Biophys. Res. Commun. 27, 529.
- 178.- Sano, Y., Nomura, S., Kamio, Y., Ōmura, S. y Tata, T.
(1967) *J. Antibiotics, Ser. A* 20, 344.
- 179.- Nomura, S., Horiuchi, T., Ōmura, S. y Tata, T.
(1972) *J. Biochem.* 71, 783.

- 180.- Vance, D., Goldberg, I., Mitsushashi, O., Bloch, K.,
Ōmura, S. y Nomura, S. (1972) *Biochem. Biophys.*
Res. Commun. 48, 649.
- 181.- Goldberg, I., Walker, J.R. y Bloch, K. (1973)
Antimicrob. Agents Chemother. 3, 549.
- 182.- Wille, W., Eisenstadt, E.E. y Willecke, K. (1975)
Antimicrob. Agents Chemother. 8, 231.
- 183.- Carreira, J., Leal, J.A., Rojas, M. y Muñoz, E.
(1973) *Biochim. Biophys. Acta* 307, 541.
- 184.- Pullman, M.E. y Monroy, G.C. (1963) *J. Biol. Chem.*
238, 3762.
- 185.- Ishikawa, S. (1970) *J. Biochem. (Tokio)* 67, 297.
- 186.- Ulrich, F. (1964) *J. Biol. Chem.* 239, 3532.
- 187.- Roisin, M.P. y Kepes, A. (1972) *Biochim. Biophys.*
Acta 275, 333.
- 188.- Lastras, M. (1974) Tesis doctoral. Universidad de
Madrid.
- 189.- Baltscheffsky, H. y Baltscheffsky, M. (1958)
Acta Chem. Scand. 12, 1333.
- 190.- Ainslie, G.R. Jr., Shill, J.P. y Neet, K.E. (1972)
J. Biol. Chem. 247, 7088.

- 191.- RÜbsamen, H., Khandler, R. y Witzel, H. (1974)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 687.
- 192.- Ricard, J., Meunier, J-C y Buc, J. (1974) Eur. J.
Biochem. 49, 195.
- 193.- Harold, F.M. y Baarda, J.R. (1969) J. Biol. Chem.
244, 2261.
- 194.- Roisin, M.P. y Kepes, A. (1973) Biochim. Biophys.
Acta 305, 249.
- 195.- Weiner, J.H. y Heppel, L.A. (1971) J. Biol. Chem.
246, 6933.
- 196.- Berger, E.A. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA
70, 1514.
- 197.- Simoni, R.D. y Shallenberger, M.K. (1972) Proc.
Nat. Acad. Sci. USA 69, 729.
- 198.- Rosen, B.P. (1973) J. Bacteriol. 116, 1124.
- 199.- Bragg, P.D. y Hou, C. (1973) Biochem. Biophys.
Res. Commun. 50, 729.
- 200.- Fessiden-Raden, J.M. (1969) J. Biol. Chem.
244, 6662.
- 201.- Abrams, A. y Baron, C. (1970) Biochem. Biophys.
Res. Commun. 41, 858.
- 202.- Bragg, P.D., Davies, P.L. y Hou, C. (1973) Arch.
Biochem. Biophys. 159, 664.

- 203.- Futai, M., Sternweiss, P.C. y Heppel, L.A. (1974)
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 2725.
- 204.- Sternweiss, P.C. (1975) Biochem. Biophys. Res.
Commun. 62, 764.
- 205.- Abrams, A., Morris, D. y Jensen, C. (1976)
Biochemistry 15, 5560.
- 206.- Cross, R.L. y Boyer, P.D. (1975) Biochemistry
14, 392.
- 207.- Horio, T., Nishikawa, K. y Yamashita, J. (1966)
Biochem. J. 98, 321.
- 208.- Boyer, P.D. (1975) FEBS Lett 58, 1.
- 209.- Boyer, P.D., Cross, R.L. y Momsen, W. (1973)
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 2837.
- 210.- Faust, D. y Vandemark, P. (1970) Arch. Biochem.
Biophys. 137, 393.
- 211.- Carreira, J., Andreu, J.M. y Muñoz, E. (1977)
Biochim. Biophys. Acta 492, 387.
- 212.- Ayala, J., Nieto, M., Carreira, J. y Muñoz, E.
(1976) Eur. J. Biochem. 66, 43.
- 213.- Redwood, W.R., Gibbes, D.C. y Thompson, T.E.
(1973) Biochim. Biophys. Acta 318, 10.

- 214.- Redwood, W.R., Müldner, H. y Thompson, T.E. (1969)
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 64, 989.
- 215.- Andreu, J.M., Carreira, J. y Muñoz, E. (1976)
FEBS Lett 65, 198.
- 216.- Thomas, T.D. y Ellar, D.J. (1973) Biochim. Biophys.
Acta 316, 180.
- 217.- Mc Farlane, M.G. (1961) Biochem. J. 79, 4.
- 218.- Ballesta, J.P.G. y Schaechter, M. (1972) J.
Bacteriol. 110, 452.
- 219.- Ballesta, J.P.G., de García, C.L. y Schaechter, M.
(1973) J. Bacteriol 116, 210.
- 220.- Green, D.E. y Tzagoloff, A. (1966) J. Lipid. Res.
7, 587.
- 221.- Tani, J. y Hendler, R.W. (1964) Biochim. Biophys.
Acta 80, 279.
- 222.- Hendler, R.W. (1968) Protein Biosynthesis and
Membrane Biochemistry, John Wiley, New York.
- 223.- Schlessinger, D., Marchesi, V.T. y Kwan, B.C.K.
(1965) J. Bacteriol. 90, 456.
- 224.- Cancedda, R. y Schlesinger, M.J. (1974) J. Bacteriol.
117, 290.
- 225.- Michel, R. y Neupert, W. (1973) Eur. J. Biochem.
36, 53.

- 226.- Hawley, E.S. y Greenawalt, J.W. (1975) Eur. J. Biochem. 54, 585.
- 227.- Kuzêla, S., Krempaský, V., Kolarov, J. y Ujházy, V. (1975) Eur.. J. Biochem. 58, 483.
- 228.- Hofmann, H.D. y Kadenbach, B. (1976) FEBS Lett 66, 27.
- 229.- Ray, P.H., Lillich, T.T. y White, D.C. (1972) J. Bacteriol. 112, 413.
- 230.- Willecke, K. y Mindich, L. (1971) J. Bacteriol. 106, 514.