



Área Biofísica-Departamento de Química Biológica
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas
Universidad Nacional de Rosario

**“REGULACIÓN DE LA H⁺-ATPasa REVERSIBLE MITOCONDRIAL
POR ANIONES. MECANISMO DE ACCIÓN DE SULFITO”**

Bioquímica Mariángeles Rico

Tesis para optar al título de Doctora en Ciencias Biológicas

Director: Dr. Oscar A. Roveri

“Regulación de la H⁺-ATPasa reversible mitocondrial por aniones.

Mecanismo de acción de sulfito”

Mariángeles Rico
Bioquímica

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral.

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Área Biofísica, Departamento de Química Biológica, dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 8 de noviembre de 2007 y el 23 de setiembre de 2014, bajo la dirección del Dr. Oscar A. Roveri.

A mi Madre
A la Memoria de mi Padre

Agradecimientos

En primer lugar quiero expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a Oscar, mi director de Tesis, con quien he compartido estos años de crecimiento profesional y también personal. Agradezco su confianza en mí desde el primer momento dándome la posibilidad de realizar una formación Doctoral, una oportunidad que pocas personas tienen. Una persona con dedicación apasionada a la investigación y a la docencia que ha logrado plasmar en mí su formación académica y que también ha estado presente cuando fuese necesario. Gracias Oscar.

En segundo lugar, agradezco a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y a CONICET quienes brindaron las becas y subsidios para el desarrollo de este proyecto.

Mi agradecimiento al Área Biofísica de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la UNR por haberme brindado el espacio físico para desempeñar las tareas experimentales que fueran necesarias para la realización de esta Tesis de Doctorado.

Muchas Gracias al Frigorífico Sugarosa que ha donado los corazones de bovino.

Quiero agradecer a la Sociedad Argentina de Biofísica (SAB) y a la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB) la posibilidad de difusión de los resultados experimentales aquí presentados y también los subsidios otorgados para la asistencia y alojamiento para los distintos Congresos. Congresos de los que no solamente me llevé conocimiento si no a dos grandes amigas: Gaby y Sú, a quienes también agradezco su acompañamiento en este período.

Expreso mi agradecimiento a mi compañera Andrea, con quien compartí estos años de trabajo y a Nacho mi compañero de trabajo y amigo.

Muchas Gracias a mis amigos en general, en particular a Hebe, una fiel amiga que me llevo de la Facultad de Bioquímica de Rosario, quien ha sabido orientarme y acompañarme en

todo momento, no sólo como amiga sino también desde su experiencia como estudiante de doctorado.

También quisiera nombrar a Agus, Andreina, Celeste, Luz, Mariana, Marina, Naty, Pili y Sil por los momentos compartidos y su amistad incondicional.

Agradezco a los chicos del quiosco y de los bares, en especial a Normita, Mauri y Mari, por su buena onda.

Muchas gracias a mi amigo Hermann por confiar en mí como inquilina.

Un "gracias" enorme a *toda* mi familia, en especial a mi madrina Marcela, y a mis primos José y Carlos, siempre presentes a pesar de la distancia.

Por último quiero agradecer muchísimo a mi padres. A mi madre por darme su amor, su confianza y aliento para alcanzar este objetivo y a mi padre que me ha dejado su legado de autosuperación y enseñado con su ejemplo de vida que un sano equilibrio entre el esfuerzo, la constancia y el descanso es el camino para alcanzar objetivos grandes.

Parte de los resultados aquí presentados han sido dados a conocer previamente en las siguientes Publicaciones y Reuniones Científicas:

Publicaciones

Mariángeles Rico, Anabella F. Lodeyro, Oscar A. Roveri (2012) "Método cinético continuo, basado en un ciclo enzimático, para determinar concentraciones submicromolares de ATP/ADP" Ciencia y Tecnología de la UNR. Jornadas de Ciencia y Tecnología. Divulgación científica y tecnológica de la UNR, **5**, 375-377.

Mariángeles Rico, Oscar A. Roveri (2010) "Sulfite both stimulates and inhibits the ATPase activity of bovine submitochondrial particles" Ciencia y Tecnología de la UNR. Jornadas de Ciencia y Tecnología. Divulgación científica y tecnológica de la UNR, **3**, 271-273.

Presentación de trabajos en Congresos

Mariángeles Rico, Oscar A. Roveri "Diseño y optimización de un método cinético sencillo, basado en un ciclo catalítico de sustrato para determinar concentraciones submicromolares de AT(D)P" XXXVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica (SAB), 6-8 de diciembre de 2008, La Plata, Buenos Aires, ARGENTINA.

Mariángeles Rico, Oscar A. Roveri "Sulfite both stimulates and inhibits the ATPase activity of bovine submitochondrial particles" VII Congreso Iberoamericano de

Biofísica, 30 de septiembre al 3 de octubre de 2009, Buzios, Río de Janeiro, BRASIL.

Mariángeles Rico, Oscar A. Roveri “Kinetic analysis of the effect of sulfite on the ATPase activity of the mitochondrial soluble ATPase (F_1)” XLVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), 30 de noviembre al 3 de diciembre de 2010, Puerto Madryn, Chubut, ARGENTINA.

Mariángeles Rico, Oscar A. Roveri “Effect of sulfite on the mitochondrial ATP synthesis” XLI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica (SAB), 5-7 de diciembre de 2012, San Javier, Tucumán, ARGENTINA.

Oscar A. Roveri, Mariángeles Rico “Action mechanism of “activating” anions on the mitochondrial reversible H^+ -ATPase” XLII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica (SAB), 2-4 de diciembre 2013, Carlos Paz, Córdoba, ARGENTINA.

Índice

Agradecimientos	i
Publicaciones y presentaciones a Congresos	iii
Índice	v
Índice de Figuras	xi
Índice de Tablas	xv
Índice de Esquemas	xvi
Abreviaturas y símbolos	xvii
Lenguaje especial	xx
Resumen	xxi
1. Introducción	1
1.1. Introducción a la Bioenergética	1
1.2. Cadena de transporte de electrones	5
1.3. Estructura de la F_1F_0 -ATP sintasa	8
1.4. Mecanismo rotacional de la F_1F_0 -ATP sintasa	12
1.5. Mecanismo de translocación de protones a través de F_0	16
1.6. Mecanismo de la F_1F_0 -ATP sintasa	18
1.7. Sitios de unión de nucleótidos	24
1.8. Efecto de aniones sobre la síntesis e hidrólisis de ATP	25
1.8.1. Efecto de azida sobre la síntesis e hidrólisis de ATP	26
1.8.2. Efecto de sulfato y bicarbonato sobre la hidrólisis de ATP	26

1.8.3. Efecto de sulfato y bicarbonato sobre la síntesis de ATP	29
1.8.4. Efecto de sulfito sobre las F_1F_0 -ATPasas	30
1.8.5. Consideraciones finales	33
1.9. Objetivos de esta Tesis	34
1.9.1. Objetivo general	34
1.9.2. Objetivos específicos	34
1.9.3. Objetivo instrumental	35
2. Materiales y Métodos	36
2.1. Materiales	36
2.1.1. Preparación y determinación de la actividad de las enzimas utilizadas	36
2.1.2. Determinación de la concentración de nucleótidos de adenina	38
2.1.3. Determinación de la concentración y pureza de nucleótidos de nicotinamida	39
2.1.4. Determinación de la concentración de PEP y piruvato	40
2.2. Preparación de partículas submitocondriales Mg-ATP (SMP) a partir de mitocondrias de corazón bovino	40
2.3. Preparación de ATPasa soluble	42
2.4. Determinación de proteínas	44
2.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida	45
2.6. Eliminación de nucleótidos libres y débilmente unidos a F_1	45
2.7. Ensayos cinéticos	46
2.8. Medida de la actividad ATPásica	46

2.9. Activación de la ATPasa de partículas Mg-ATP	47
2.10. Medida de la velocidad de transporte de electrones	48
2.11. Medida de la velocidad de síntesis de ATP	48
2.12. General	50
3. Diseño y optimización de un método cinético continuo, simple y sensible para determinar ATP y ADP	51
3.1. Introducción	51
3.2. Resultados y Discusión	58
3.2.1. Determinación de las concentraciones óptimas de co-sustratos (glucosa y PEP), de Mg^{2+} y enzima monitora (LDH)	58
3.2.2. Estimación de k_{PK} y k_{HK}	62
3.2.3. Significado de f_{PK} y f_{HK}	65
3.2.4. Dependencia de la velocidad del ciclo con las concentraciones de ADP y NADH	66
3.2.5. Sensibilidad	71
3.2.6. Límite de detección	72
3.2.7. Eliminación de los nucleótidos presentes en el medio de reacción utilizando apirasa	73
3.2.8. Consideraciones generales	74
3.3. Perspectivas	76

4.	Efecto de sulfito sobre la actividad ATPásica de F₁ mitocondrial	78
4.1.	Introducción	78
4.2.	Resultados y Discusión	78
4.2.1.	Determinación de nucleótidos presentes en el medio de reacción utilizado para medir la actividad ATPásica de F ₁	78
4.2.2.	Análisis de las cinéticas de hidrólisis de ATP por F ₁	80
4.2.3.	Efecto de sulfito sobre la cinética de hidrólisis de ATP por F ₁	81
4.2.4.	Efecto de sulfito sobre la actividad ATPásica de F ₁	82
4.2.5.	Efecto de sulfito sobre los parámetros cinéticos de la actividad ATPásica de F ₁	87
4.2.6.	Efecto de mezcla de aniones	89
4.3.	Consideraciones finales	92
5.	Efecto de sulfito sobre la hidrólisis de ATP catalizada por partículas submitocondriales	94
5.1.	Introducción	94
5.2.	Resultados y Discusión	94
5.2.1.	Análisis de las cinéticas de hidrólisis de ATP	94
5.2.2.	Elección de una sal monobásica para mantener la fuerza iónica constante	95
5.2.3.	Efecto de bicarbonato y sulfito sobre la velocidad de hidrólisis de ATP	97
5.2.4.	Análisis cinético del efecto de sulfito sobre la actividad ATPásica	99
5.2.5.	Efecto de sulfito sobre los parámetros cinéticos de la actividad ATPásica de SMP	102

5.2.6. Determinación del sitio de unión de sulfito en la ATPasa mitocondrial	106
5.3. Consideraciones generales	108
6. Efecto de sulfito sobre la síntesis de ATP	109
6.1. Introducción	109
6.2. Resultados y Discusión	109
6.2.1. Efecto de sulfito sobre el transporte de electrones	109
6.2.2. Análisis cinético de la síntesis de ATP en presencia de sulfito	112
6.2.3. Estudio del efecto de mezclas de aniones efectores	123
6.3. Consideraciones generales	125
7. Conclusiones	128
7.1. Efecto de sulfito sobre la actividad ATPásica	131
7.2. Efecto de sulfito sobre la síntesis de ATP	138
7.3. Observaciones finales	149
7.3.1. Unión de aniones a sitios no catalíticos	149
7.3.2. Unión de aniones a sitios catalíticos	150
Bibliografía	152
Apéndice	169
1. Desarrollo de ecuaciones semiempíricas	169
1.1. Velocidad vs. $[\text{Na}_2\text{SO}_3]$	169

1.2.	$V_{\text{máx}}$ vs. $[\text{Na}_2\text{SO}_3]$	169
1.3.	K_m vs. $[\text{Na}_2\text{SO}_3]$	170
1.4.	$V_{\text{máx}}/K_m$ vs. $[\text{Na}_2\text{SO}_3]$	171
2.	Significado de constantes	171
2.1.	De inhibición	171
2.2.	De activación	173
3.	Sitios mutuamente excluyentes	174
4.	Sitios no mutuamente excluyentes	175
5.	Síntesis de ATP a P_i constante (modelo simplificado)	177
6.	Síntesis de ATP a ADP constante (modelo simplificado)	178

Índice de Figuras

Figura 1.1	Cadena respiratoria mitocondrial y ATP sintasa (complejo V)	8
Figura 1.2	Organización de las subunidades en la F_1F_0 -ATPasa mitocondrial	12
Figura 1.3	Rotación de γ en relación a las subunidades β durante la hidrólisis de ATP	15
Figura 1.4	Rotación del complejo c en relación al complejo $\alpha_3\beta_3$	16
Figura 1.5	Vista lateral de F_1F_0	18
Figura 1.6	Mecanismo de cambio de unión planteado por P. D. Boyer	19
Figura 1.7	Esquemas de reacción para el acoplamiento quimio-mecánico en F_1 bajo condiciones de hidrólisis de ATP	23
Figura 1.8	Sitios de unión de nucleótidos en F_1	25
Figura 2.1	Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en presencia de SDS	45
Figura 3.1	Efecto de glucosa y PEP sobre la velocidad de ciclo	59
Figura 3.2	Efecto del cofactor $MgCl_2$ sobre la velocidad del ciclo	60
Figura 3.3	Estimación de τ	61
Figura 3.4	Dependencia de la velocidad de reacción con la [HK]	63
Figura 3.5	Dependencia de la velocidad de reacción con la [PK] y [HK]	65
Figura 3.6	Dependencia de la velocidad del ciclo con [ADP] y [NADH]	68
Figura 3.7	Evaluación de la presencia de AT(D)P endógeno en las enzimas PK y HK	70

Figura 3.8	Dependencia de la sensibilidad con las enzimas PK y HK	72
Figura 3.9	Eliminación de nucleótidos endógenos por pretratamiento del medio de reacción con apirasa	74
Figura 4.1	[ADP+ATP] endógeno presente en el medio de reacción utilizado para medir actividad ATPásica de F_1	79
Figura 4.2	Progreso temporal de las reacciones de hidrólisis de ATP catalizadas por F_1	81
Figura 4.3	Efecto de sulfito sobre el progreso temporal de la reacción de hidrólisis de ATP catalizada por F_1	82
Figura 4.4	Efecto de sulfito sobre la actividad de F_1 a distintas concentraciones de ATP	83
Figura 4.5	Gráficas secundarias obtenidas a partir de la Figura 4.4	85
Figura 4.6	Efecto de sulfito sobre el comportamiento cinético de la actividad ATPásica de F_1	87
Figura 4.7	Dependencia de la velocidad de hidrólisis de F_1 con la concentración de bicarbonato a distintas concentraciones fijas de sulfito	89
Figura 4.8	Efecto de la mezcla de sulfato y sulfito sobre la actividad ATPásica de F_1	91
Figura 5.1	Progreso temporal de la hidrólisis de ATP por SMP	95
Figura 5.2	Dependencia de la velocidad de reacción con la [ATP] en presencia y en ausencia de sales monobásicas	96
Figura 5.3	Efecto de aniones sobre la actividad ATPásica de SMP	97
Figura 5.4	Dependencia de la velocidad de hidrólisis de ATP con la concentración de bicarbonato y sulfito utilizando fuerza iónica constante	99
Figura 5.5	Dependencia de la actividad ATPásica de SMP con la concentración de sulfito a distintas [ATP]	100

Figura 5.6	Gráficas secundarias obtenidas a partir de la Figura 5.5	101
Figura 5.7	Estimación de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ a distintas concentraciones de sulfito	103
Figura 5.8	Dependencia de los parámetros cinéticos de la actividad ATPásica de SMP con la concentración de sulfito de sodio	104
Figura 5.9	Dependencia de la velocidad de hidrólisis de ATP con la concentración de bicarbonato de sodio en presencia y en ausencia de sulfito de sodio	107
Figura 5.10	Efecto de la mezcla de aniones sobre la actividad ATPásica de SMP	108
Figura 6.1	Efecto de sulfito sobre el transporte de electrones	110
Figura 6.2	Dependencia de la velocidad de síntesis de ATP con la concentración de sulfito en presencia de fosfato 3,5 mM y diferentes [ADP]	113
Figura 6.3	Gráficas secundarias obtenidas a partir de la Figura 6.2	114
Figura 6.4	Dependencia de la velocidad de síntesis de ATP con la [ADP] en presencia de fosfato 3,5 mM	115
Figura 6.5	Dependencia de $V_{m\acute{a}x}$ y $K_{m(ADP)}$ con la $[Na_2SO_3]$ en presencia de 3,5 mM fosfato	116
Figura 6.6	Dependencia de la velocidad de síntesis de ATP con la concentración de sulfito en presencia de 1 mM ADP y diferentes [Pi]	118
Figura 6.7	Dependencia de la velocidad de síntesis de ATP con la [Pi] en presencia de ADP 1 mM	120
Figura 6.8	Dependencia de $V_{m\acute{a}x}$, $K_{m(Pi)}$ y $V_{m\acute{a}x}/K_{m(Pi)}$ con la $[Na_2SO_3]$ en presencia de ADP 1 mM	121

Figura 6.9	Gráfico de Yonetani-Theorell para el estudio del efecto de mezclas de sulfito y bicarbonato sobre la síntesis de ATP	124
Figura 6.10	Gráfico de Yonetani-Theorell para el estudio del efecto de mezclas de sulfito y sulfato sobre la síntesis de ATP	125
Figura 7.1	Dependencia de los parámetros cinéticos de la actividad ATPásica de F_1 con la concentración de sulfito de sodio según el Esquema 7.2	132
Figura 7.2	Efecto de sulfito sobre la actividad de F_1 a distintas concentraciones de ATP	134
Figura 7.3	Dependencia de la actividad ATPásica de SMP con la concentración de sulfito a distintas [ATP]	136
Figura 7.4	Dependencia de los parámetros cinéticos de la actividad ATPásica de SMP con la concentración de sulfito de sodio	137
Figura 7.5	Dependencia de los parámetros cinéticos de la reacción de síntesis de ATP con la concentración de sulfito de sodio a $[P_i] = 3,5 \text{ mM}$	143
Figura 7.6	Dependencia de la actividad ATP sintasa con la concentración de sulfito a distintas $[P_i]$ y a $[ADP] = 1 \text{ mM}$	146
Figura 7.7	Dependencia de los parámetros cinéticos de la reacción de síntesis de ATP con la concentración de sulfito de sodio a $[ADP] = 1 \text{ mM}$	148

Índice de Tablas

Tabla 4.1	Dependencia con la [ATP] de los parámetros estimados a partir de la Figura 4.4	86
Tabla 4.2	Parámetros cinéticos de la actividad ATPásica de F_1 obtenidos a partir de la Figura 4.6	88
Tabla 5.1	Efecto de sales sobre los parámetros cinéticos de la actividad ATPásica de SMP	97
Tabla 5.2	Parámetros cinéticos obtenidos a partir de los datos graficados en la Figura 5.3	98
Tabla 5.3	Dependencia con la [ATP] de los parámetros estimados a partir de la Figura 5.5	102
Tabla 6.1	Análisis del efecto de sulfito de sodio sobre la activación de la ATPasa de SMP	111
Tabla 6.2	Parámetros cinéticos estimados a partir del ajuste de la Ecuación 4.1 a los datos experimentales mostrados en la Figura 6.6	119
Tabla 7.1	Constantes cinéticas utilizadas para las simulaciones que se muestran en las Figuras 7.1 y 7.2 (Efecto de sulfito sobre la actividad ATPásica de F_1)	133
Tabla 7.2	Constantes cinéticas utilizadas para las simulaciones que se muestran en las Figuras 7.3 y 7.4 (Efecto de sulfito sobre la actividad ATPásica de SMP)	135
Tabla 7.3	Constantes cinéticas utilizadas para las simulaciones que se muestran en la Figura 7.5 (Efecto de sulfito sobre la ATP sintasa a $[P_i] = 3,5 \text{ mM}$)	144
Tabla 7.4	Constantes cinéticas utilizadas para las simulaciones que se muestran en las Figura 7.6 y 7.7 (Efecto de sulfito sobre la ATP sintasa a $[ADP] = 1 \text{ mM}$)	146

Índice de Esquemas

Esquema 2.1	Sistema enzimático utilizado para la medición de la hidrólisis de ATP	46
Esquema 2.2	Sistema enzimático utilizado para la medición de la síntesis de ATP	49
Esquema 2.3	Sistema regenerante de NADH utilizado para la medición de la síntesis de ATP	49
Esquema 3.1	Representación esquemática del ciclo catalítico	55
Esquema 7.1	Sitios mutuamente excluyentes	129
Esquema 7.2	Sitios no excluyentes	130
Esquema 7.3	Mecanismo cinético de la síntesis de ATP en presencia de sulfito	140
Esquema 7.4	Mecanismo cinético para la síntesis de ATP por SMP en presencia de sulfito a $[P_i] = \infty$	141
Esquema 7.5	Mecanismo cinético simplificado ($[ADP] = \infty$) para la síntesis de ATP por SMP en presencia de sulfito	145
Apéndice		
Esquema 1	Inhibidor mixto lineal	171
Esquema 2	Activador no esencial	173

Abreviaturas y símbolos

A_{1%}	absorbancia de una solución 1% P/V
ADH	alcohol deshidrogenasa
ADP	adenosina 5'-difosfato
AMP	adenosina monofosfato
AMP-PNP	adenil-5-imido difosfato (análogo no hidrolizable de ATP)
ANOVA	análisis de la varianza
ATP	adenosina 5'-trifosfato
β_E	subunidad β en ausencia de nucleótidos (conformación abierta)
β_{DP}	subunidad β con ADP unido (conformación cerrada)
β_{TP}	subunidad β con AMP-PNP unido (conformación cerrada)
β_{HC}	conformación intermedia entre la conformación cerrada y abierta
CF₁	ATPasa soluble de cloroplastos
CoQ(H₂)	coenzima Q oxidada (reducida)
DEAE	dietilaminoetil
ΔpH	gradiente de pH a través de la membrana mitocondrial interna
EDTA	ácido etilendiamino tetraacético
FAD	flavin-adenin dinucleótido

FCCP	carbonilcianuro p-(trifluorometoxi) fenil hidrazona
FMN	mononucleótido de flavina
fpm	fuerza protón-motriz
G6P	glucosa-6-fosfato
G6PDH	glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
Gluc	glucosa
HK	hexoquinasa
IF₁	péptido inhibidor de la F ₁ F ₀ -ATPasa
LDH	lactato deshidrogenasa
LOD	límite de detección
NAD(H)	nicotinamida adenina dinucleótido forma oxidada (reducida)
NADP(H)	nicotinamida adenina dinucleótido 2'-fosfato forma oxidada (reducida)
ND(T)P	nucleósido di(tri)fosfato
OSCP	proteína que confiere sensibilidad a oligomicina ("Oligomycin Sensitivity Conferral Protein")
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PEP	fosfoenolpiruvato
Pi	ortofosfato inorgánico
Pir	piruvato
PK	piruvato quinasa
PP_i	pirofosfato inorgánico
SDS	dodecilsulfato de sodio

SEST	sacarosa 250 mM, EDTA 0,5 mM, succinato 1 mM, Tris 10 mM pH 7,8
SMP	partículas submitocondriales
ST	sacarosa 250 mM y Tris 10 mM pH 7,5
TCA	ácido tricloroacético
TEA	Tris-HCl 20 mM (pH 8), EDTA 2 mM y ATP 4 mM
TEMED	tetrametiletiléndiamina
Tris-HCl	tris(hidroximetil) aminometano-ácido clorhídrico
UTP	uracilo trifosfato
V-ATPasa	ATPasa vacuolar
Ψ	potencial de membrana

Lenguaje especial

“ADPMg inhibited form”

“ATP-waiting dwell” y “catalytic dwell”

“batch”

“catalytic cooperativity”

“closed

“his-tag”

“inside out”

“loose”

“Mg-ADP inhibited state”

“open”

“random”

“slipping”

“stock”

“strep-tag”

“subsite”

“tight”

Resumen

La ATPasa mitocondrial (F_1F_0 -ATPasa/sintasa o H^+ -ATPasa mitocondrial) cataliza de manera reversible la síntesis de ATP acoplada a la translocación de protones a través de la membrana interna mitocondrial. Está constituida por un oligómero proteico hidrofóbico (F_0) firmemente integrado en la membrana interna mitocondrial y por un sector hidrosoluble (F_1 o ATPasa soluble) que está unido a F_0 . F_1 está compuesta por cinco subunidades con la siguiente estequiometría: $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ y presenta seis sitios de unión para nucleótidos tres de ellos catalíticos y tres no catalíticos. La F_1F_0 -ATPasa unida a la membrana interna mitocondrial (SMP) es capaz de catalizar la síntesis y la hidrólisis de ATP, mientras que el sector hidrosoluble (F_1), sólo es capaz de catalizar la hidrólisis de ATP.

Un método sensible, rápido y sencillo que permita determinar la concentración de ATP y ADP presentes en el NAD(P)H o NAD(P) es necesario en estudios cinéticos de enzimas que utilizan ATP o ADP, especialmente cuando la actividad de las mismas es medida empleando sistemas acoplados basados en monitorear la oxidación de NAD(P)H o la reducción de NAD(P). Se diseñó y optimizó un método cinético, espectrofotométrico, basado en un ciclo catalítico de sustrato (hexoquinasa + piruvato quinasa), acoplado a lactato deshidrogenasa (LDH) para monitorear la velocidad del ciclo. Ésta depende, en ciertas condiciones, de manera lineal con las concentraciones de ADP y ATP. Se determinaron las concentraciones óptimas de glucosa (1 mM), PEP (2 mM) y $MgCl_2$ (2 mM). Asimismo se determinó la cantidad de LDH necesaria para minimizar el tiempo de latencia (τ). La sensibilidad del método depende con la concentración de enzimas del ciclo. Cuando se utilizaron 20 UI/mL de ambas

quinasas se determinó que la sensibilidad era igual a $0,611 \pm 0,005 \Delta\text{Abs min}^{-1} \text{ nmol}^{-1}$ de AT(D)P. El límite de detección fue igual 9,3 pmol y la reproducibilidad fue igual 5,6 %. El método permitió estimar que una preparación comercial de NADH contenía $0,85 \pm 0,01$ pmoles AD(T)P/nmol NADH. Asimismo fue posible estimar que existen trazas de ATP y ADP en otros componentes del medio de reacción, las que pueden ser eliminadas por pre-tratamiento del medio de reacción con apirasa.

La H^+ -ATPasa es una enzima de comportamiento cinético complejo que, aun cuando se utiliza un sistema acoplado PK + LDH que mantiene constante la [ATP] y muy baja y constante la [ADP], muestra cinéticas de reacción bifásicas con el tiempo, comportamiento que es modificado por sulfito. Bajas concentraciones de sulfito linealizan el curso temporal de la reacción a bajas [ATP]. La unión del anión a un sitio no catalítico acelera la velocidad de disociación de ADP del complejo $\text{MgADP}\bullet\text{F}_1$ inactivo. En cambio a altas concentraciones de ATP sulfito induce una inhibición progresiva de la reacción de hidrólisis uniéndose a un sitio catalítico aumentando la velocidad de formación del complejo inactivo $\text{MgADP}\bullet\text{F}_1$.

Es conocido desde hace más de 50 años que la actividad de la ATPasa mitocondrial es influenciada por la presencia de aniones. En el Área Biofísica de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas se han estudiado en detalle el efecto de bicarbonato y sulfato sobre las reacciones de hidrólisis y síntesis de ATP catalizadas por la ATPasa mitocondrial.

Se realizaron estudios cinéticos del efecto de sulfito sobre la hidrólisis de ATP catalizada por SMP y F_1 utilizando un amplio rango de concentraciones del anión y de ATP, los que permiten concluir que sulfito presenta un efecto dual: a

concentraciones bajas se comporta como un activador no esencial y a concentraciones mayores como un inhibidor completo.

La hidrólisis de ATP catalizada por el complejo de la ATPasa unido a membranas (SMP), fue aumentada por sulfito a concentraciones menores a 0,15 mM, mientras que concentraciones mayores la inhibieron. De manera similar a lo planteado para F_1 , estos resultados permiten postular que sulfito se une a dos sitios diferentes en la ATPasa mitocondrial. La unión a un sitio con alta afinidad ($K_d \approx 10^{-3}$ M) activa la hidrólisis de ATP incrementando $V_{m\acute{a}x}$ y disminuyendo $K_{m(ATP)}$, mientras que la unión a un sitio con menor afinidad ($K_d \approx 10^{-2}$ M) inhibe la hidrólisis de ATP disminuyendo $V_{m\acute{a}x}$ y $K_{m(ATP)}$ (inhibidor mixto lineal). Estudios empleando mezclas de sulfito y bicarbonato y sulfito y sulfato permiten sugerir que sulfito se une con alta afinidad a un sitio no catalítico (al igual que bicarbonato) y con baja afinidad a un sitio catalítico (al igual que sulfato).

Sulfito 30 mM inhibe la síntesis de ATP acoplada a la oxidación de NADH por SMP. A dicha concentración el anión no afecta el transporte de electrones de NADH a oxígeno ni el grado de acoplamiento entre la cadena respiratoria y la ATP sintasa.

De manera similar a lo observado al estudiar el efecto de sulfito sobre la actividad ATPásica, se observó un efecto dual de sulfito sobre la síntesis de ATP, estimulándola a bajas concentraciones e inhibiéndola a altas. Sulfito se comportó como un activador no esencial a $[\text{sulfito}] < 2$ mM, mientras que a mayores concentraciones el anión actuó como un inhibidor (mixto lineal respecto de ADP y de Pi) de la síntesis de ATP.

Estudios utilizando mezclas de aniones permitieron concluir que sulfito (a bajas concentraciones) se comporta como ligando mutuamente excluyente de bicarbonato respecto de sus efectos sobre la síntesis de ATP. Por otra parte sulfito (a altas concentraciones) es un ligando mutuamente excluyente con sulfato.

Fueron derivadas las ecuaciones correspondientes a las leyes cinéticas que caracterizan: la dependencia de la velocidad de hidrólisis de ATP con las [ATP] y de [sulfito] y la dependencia de la velocidad de síntesis de ATP con las [ADP], [Pi] y [sulfito], para un modelo de reacción consistente en la unión no mutuamente excluyente de sulfito a un sitio no catalítico (actuando como activador no esencial) y a un sitio catalítico (actuando como inhibidor mixto lineal). Las ecuaciones derivadas se corresponden con los comportamientos experimentalmente observados para el efecto de sulfito sobre la hidrólisis y síntesis de ATP.

CAPÍTULO 1

1. Introducción

1.1. Introducción a la bioenergética

En los mamíferos, la mayor parte del ATP proviene de la fosforilación oxidativa que ocurre en la mitocondria. Un abastecimiento adecuado de ATP es fundamental para que la célula pueda cumplir sus funciones: contracción muscular, migración celular, secreción y mantenimiento de los gradientes de iones que sostienen la excitabilidad de las membranas. Las mitocondrias tienen funciones esenciales en la homeostasis del calcio, en la señalización producida por radicales libres y actúan como guardianes de la muerte celular protegiendo tanto a las proteínas pro y anti apoptóticas. Cuando un sistema es tan fundamental para la vida y la muerte celular, su compromiso inevitablemente se manifestará como una enfermedad, como resultado del deterioro de la función celular y tisular. Los desórdenes de la función mitocondrial han estado implicados en la patogénesis de varias enfermedades neurodegenerativas y cardíacas (Duchen M.R., **2004**). Por tanto, es de importancia un adecuado entendimiento de los mecanismos que gobiernan la homeostasis mitocondrial y que rigen las respuestas de su alteración para encontrar la forma de manejar estas enfermedades.

En mitocondrias, cloroplastos y bacterias aeróbicas y fotosintéticas la F_1F_0 -ATP sintasa es responsable de la síntesis de la mayor parte del ATP esencial para el funcionamiento celular. El conocimiento del mecanismo y regulación de esta enzima es necesario para entender cómo el ATP es sintetizado en concentraciones adecuadas para que la célula pueda llevar a cabo sus funciones.

Para sintetizar ATP, el complejo de la F_1F_0 -ATP sintasa utiliza la fuerza protón-motriz generada a partir de la fotosíntesis o de la respiración celular. El mecanismo que utiliza la F_1F_0 -ATP sintasa consiste básicamente en el pasaje de protones a través de un canal que posee la enzima lo cual impulsa un movimiento rotacional el cual provoca modificaciones conformacionales en las subunidades catalíticas de la F_1F_0 -ATP sintasa necesarias para unir ADP y P_i y liberar ATP. Por otro lado, la ATP sintasa es reversible, es decir que bajo determinadas condiciones el complejo puede hidrolizar ATP. En este caso, los cambios conformacionales en la enzima son impulsados por la unión de los sustratos. Esta reacción reversa se puede observar en bacterias sometidas a anaerobiosis, mientras que en mitocondrias sólo puede ser observada bajo circunstancias patológicas. Por tanto, la F_1F_0 -ATP sintasa puede funcionar tanto para sintetizar ATP a expensas del flujo de iones como conduciendo al flujo de iones a expensas de la hidrólisis de ATP. De todas formas, el mecanismo exacto por el cual la síntesis e hidrólisis de ATP se llevan a cabo no está aún del todo claro. En particular es aún motivo de discusión si la reacción de hidrólisis sigue exactamente el camino inverso a la reacción de síntesis de ATP.

Las F_1F_0 -ATP sintasas ubicadas en la membrana interna de mitocondrias, membrana tilacoide de cloroplastos y membrana plasmática de bacterias, se encuentran estructuralmente y funcionalmente conservadas entre las especies (Fillingame R.H., **1997**). La ATP sintasa es una máquina molecular que combina aspectos eléctricos, mecánicos y químicos de la función enzimática (Boyer P.D., **1997**). Estos aspectos se encuentran perfectamente separados, atribuidos a diferentes subunidades y bastante bien comprendidos

gracias a los datos cinéticos y estructurales existentes hasta el momento. De todas formas, el entendimiento completo de la enzima a un nivel molecular requerirá de considerables esfuerzos tanto experimentales como teóricos.

La mitocondria produce ATP a expensas de la energía liberada por el transporte de electrones desde el NADH y el succinato al oxígeno a través de una serie de transportadores electrónicos localizados en la membrana interna, los que constituyen la **cadena de transporte de electrones** (también llamada cadena respiratoria). El transporte de electrones desde las coenzimas hacia el O₂ impulsa la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato, proceso conocido como **fosforilación oxidativa**.

La **teoría quimiosmótica** propuesta como hipótesis por Peter Mitchell en 1961 (Mitchell P., 1961) establece que la fuente de energía inmediata para la síntesis de ATP es una **fuerza protón-motriz** (*fpm*), cuyo valor determina tanto la velocidad como la dirección en la que opera la F₁F₀-ATPasa, y que se puede definir como:

$$fpm = \Delta\Psi - \frac{RT}{F} \Delta pH = \Delta\Psi - 60 \Delta pH$$

En donde R es la constante de los gases; T es la temperatura (en grados Kelvin), F es la constante de Faraday, ΔpH es el gradiente de pH a través de la membrana mitocondrial interna y Ψ es el potencial eléctrico transmembrana; *fpm* y Ψ se miden en milivoltios. Las mediciones en mitocondrias que respiran a 37°C han mostrado que el potencial eléctrico (Ψ) a través de la membrana interna es de ≈ 160 mV (negativo dentro de la matriz) y que $\Delta pH \approx 1,0$ (equivalente a ≈ 60 mV). Por lo tanto, la *fpm* total es de ≈ 220 mV.

Esta diferencia de potencial entre dos compartimentos acuosos (la matriz y el espacio intermembrana) se descarga a través del complejo F_1F_0 impulsando, el regreso de los protones hacia la matriz, la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i .

De manera acoplada al transporte de electrones desde los dadores de electrones hacia el O_2 se translocan protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana, generándose un gradiente de concentración de protones y una diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana interna. El bombeo de protones (carga positiva) desde la matriz hacia el espacio intermembrana torna a la primera negativa respecto de este último. De esta manera la energía liberada durante la oxidación de NADH o de succinato se almacena tanto en la forma de diferencia de potencial como de concentración de protones a través de la membrana interna

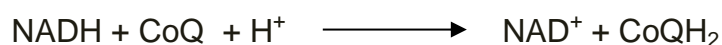
Cualquier causa que produzca el deterioro de la función mitocondrial conducirá a una disminución del potencial de membrana. Los motivos pueden ser: disponibilidad limitada de sustratos o de oxígeno (como sucede en la isquemia producida por un infarto cardíaco), defectos genéticos o adquiridos en la actividad de la cadena respiratoria (debido a mutaciones o daños en las proteínas de la cadena respiratoria). En estas situaciones la F_1F_0 -ATP sintasa puede revertir su funcionamiento, hidrolizando ATP y así bombear protones fuera de la matriz mitocondrial para restablecer el potencial de membrana. Aunque esta actividad puede conducir a una disminución de la concentración de ATP y precipitar la muerte celular, está limitada por la proteína mitocondrial IF_1 , un inhibidor endógeno de la F_1F_0 -ATPasa (Walker J.E., **1994**; Green D.W. y Grover G.J., **2000**).

En mitocondrias que respiran normalmente, la remoción del ATP por medio del translocador de nucleótidos de adenina asegura que el potencial de fosforilación intramitocondrial se mantenga relativamente bajo mientras el potencial de membrana es alto favoreciendo la fosforilación del ADP. Sin embargo, cuando se compromete la homeostasis mitocondrial la situación se puede revertir. Una disminución en el potencial de membrana acompañado por un aumento en el potencial de fosforilación por aumento de la glicólisis e incremento de la importación de ATP a través del translocador de nucleótidos de adenina, favorecerá la hidrólisis de ATP.

1.2. Cadena de transporte de electrones

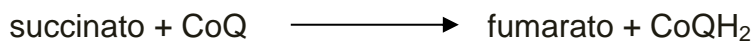
Las mitocondrias poseen en su membrana interna cinco complejos con propiedades oxidativas (I-IV) y fosforilantes (complejo V o ATP sintasa). Los complejos I a IV constituyen la cadena de transporte de electrones (Hatefi Y., **1985**). Estos complejos son oxidoreductasas que transportan electrones a través de la membrana interna mitocondrial hasta su aceptor final el O₂, acoplado este proceso a la translocación de protones. A continuación se detallan las características y reacciones que ocurren en cada uno de los complejos I-IV:

NADH-CoQ oxidoreductasa (Complejo I): Transporta electrones desde el NADH a la CoQ. El NAD⁺ es exclusivamente un transportador de dos electrones: acepta o libera un par de ellos a la vez. En el complejo NADH-CoQ oxidoreductasa, los electrones fluyen del NADH a un mononucleótido de flavina (FMN) y luego a una proteína con hierro y azufre. La reacción general catalizada por este complejo es:



La NADH-CoQ oxidoreductasa utiliza la mayor parte de la energía que se libera ($\Delta G^\circ = -16,6$ kcal/mol) al transportar el par de electrones de una molécula de NADH para bombear cuatro protones a través de la membrana interna.

Succinato-CoQ oxidoreductasa (Complejo II): La succinato deshidrogenasa, que es un componente integral del complejo, oxida una molécula de succinato a fumarato en el ciclo del ácido cítrico y se localiza en la membrana interna mitocondrial. Los dos electrones liberados en la conversión de succinato a fumarato se transfieren primero al FAD, luego a un transportador con hierro-azufre y por último a la CoQ, para formar la CoQH₂. La reacción general catalizada por este complejo es:

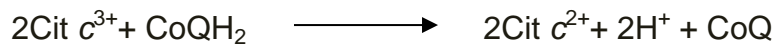


Aunque el ΔG° para esta reacción es negativo, la energía liberada es insuficiente para el bombeo de protones. Por consiguiente, el complejo succinato-CoQ oxidoreductasa no transloca protones a través de la membrana y por tanto no se genera una fuerza protón-motriz en esta parte de la cadena de transporte de electrones.

Coenzima Q (CoQ): También llamada ubiquinona, es el único transportador de electrones que no es un grupo prostético unido a una proteína. Es un transportador de átomos de hidrógeno (protones más electrones). La forma de quinona oxidada de la CoQ puede aceptar un solo electrón para formar una semiquinona, y luego aceptar un segundo electrón y dos protones para generar la forma completamente reducida, la dihidroubiquinona. Tanto la CoQ como la forma reducida CoQH₂ son solubles en los fosfolípidos y difunden con libertad en la membrana mitocondrial interna.

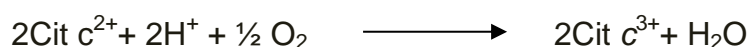
La CoQ acepta electrones liberados del complejo NADH-CoQ oxidoreductasa y del complejo succinato-CoQ oxidoreductasa.

CoQH₂-citocromo c oxidoreductasa (Complejo III): La CoQH₂ generada por la oxidación del NADH o del succinato, cede dos electrones al complejo CoQH₂-citocromo c oxidoreductasa y regenera la CoQ. Dentro de este complejo, los electrones liberados son transferidos a una proteína con hierro-azufre y a dos citocromos del tipo *b* y luego al citocromo *c*₁. Por último, los dos electrones son transferidos a dos moléculas de la forma oxidada del citocromo *c* (una proteína hidrosoluble del espacio intermembrana) para generar citocromo *c* reducido. Por cada par de electrones transferidos, la reacción general catalizada por el complejo CoQH₂-citocromo c oxidoreductasa es:



El ΔG° de esta reacción es lo suficientemente negativo como para impulsar la translocación de cuatro protones a través de la membrana interna por cada par de electrones transportados.

Citocromo c oxidasa (Complejo IV): El citocromo *c*, tras haber sido reducido por la CoQH₂-citocromo c oxidoreductasa, transporta electrones de a uno al complejo citocromo c oxidasa. Dentro de este complejo los electrones son transferidos, siempre de a uno, primero a un par de iones de cobre (Cu_a²⁺), luego al citocromo *a*, después a un complejo de un segundo ion cobre (Cu_b²⁺) y citocromo *a*₃ y por último al O₂, el aceptor electrónico final, para formar H₂O. Por cada par de electrones transportados, la reacción general catalizada por el complejo citocromo c oxidasa es:



Durante el transporte de cada par de electrones a través del complejo de la citocromo c oxidasa se translocan dos protones a través de la membrana mitocondrial interna.

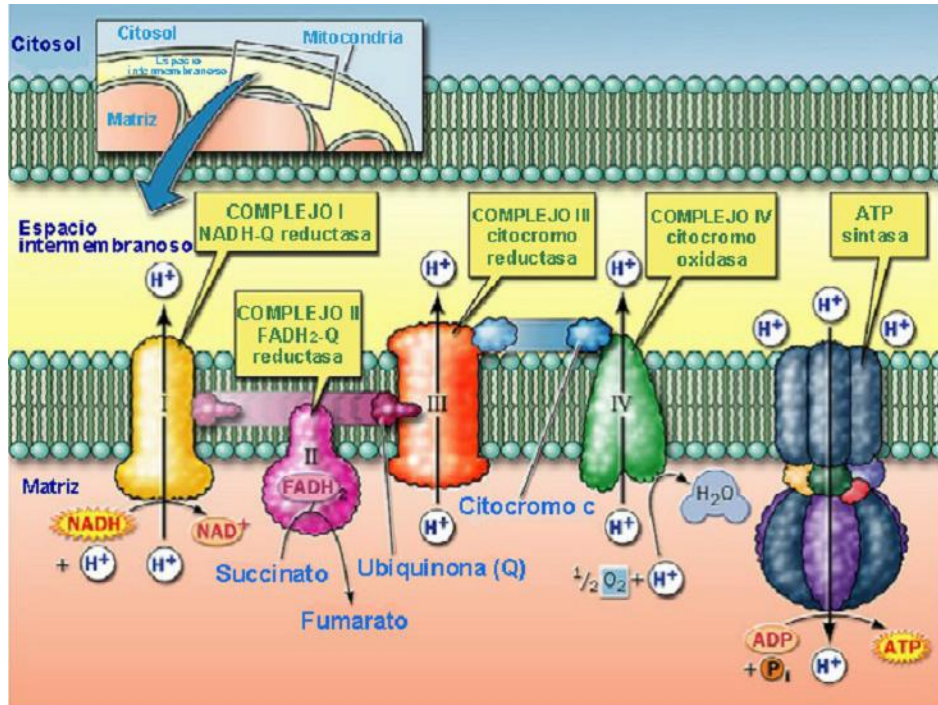


Figura 1.1 Cadena respiratoria mitocondrial y ATP sintasa (complejo V) (Tomado de Molina V., 2012)

1.3. Estructura de la F_1F_0 -ATP sintasa

La F_1F_0 -ATPasa de mitocondria de corazón bovino es la estructura asimétrica más grande resuelta hasta el momento con buena resolución atómica. Está constituida por 16 polipéptidos diferentes (incluyendo la subunidad inhibidora IF_1) y tiene una masa molecular de aproximadamente 600 kDa. Posee dos sectores principales: un complejo hidrosoluble globular llamado F_1 que cumple la función química y uno hidrofóbico inserto en la membrana llamado F_0 que cumple la función eléctrica. Ambos complejos se encuentran unidos entre sí por un tallo central y un tallo periférico.

La imagen estructural de F_1F_0 se ha obtenido mediante la utilización de dos técnicas diferentes: la microscopía electrónica y la cristalografía de proteínas. La estructura bipartita de la F_1F_0 se ha observado desde las primeras micrografías electrónicas del complejo en la membrana (Gogol E.P., **1994**; Rubinstein J.L. y otros, **2003**). F_0 está conformado por el anillo **c**, las subunidades **a**, **b**, **d**, **F₆**, **OSCP** (“Oligomycin Sensitivity Conferral Protein”) y otras proteínas integrales de membrana (**A6L**, **e**, **f** y **g**). El anillo **c** posee un poro central lipídico y el número de subunidades que integran el oligómero es variable entre especies: ocho en mitocondrias de mamíferos, diez en levadura, *Escherichia coli* y *Bacillus PS3* y catorce en cloroplastos (Futai M. y otros, **2012**). Ha sido propuesto que esta variabilidad en el número de subunidades entre los distintos sistemas transductores de energía: **i**) afecta la eficiencia termodinámica de los mismos; y **ii**) estaría vinculada a distintas condiciones ambientales (Silverstein T.P., **2014**)

La estructura de F_1 se asemeja a una esfera. Tiene una masa molecular aproximada de 371 kDa y un diámetro de 90 a 100 Å. En mitocondrias se extiende hacia la matriz mitocondrial. Se trata de un complejo constituido por cinco subunidades distintas con la siguiente estequiometría $3\alpha:3\beta:1\gamma:1\delta:1\varepsilon$ (Abrahams J.P. y otros, **1994**). En mitocondrias de corazón bovino estas subunidades contienen 510, 482, 272, 146 y 50 aminoácidos respectivamente. Las subunidades α y β tienen un plegamiento similar y sus secuencias son homólogas (20% de identidad). Ambas son capaces de unir nucleótidos y están acomodadas alternativamente conformando un hexámero el cual es parte del **estator** del motor molecular de la ATPasa (ver **Sección 1.4**). En las seis interfaces α/β se localizan seis sitios de unión para

nucleótidos: tres catalíticos y tres no catalíticos. Los sitios catalíticos están conformados mayoritariamente por cadenas laterales de aminoácidos de las subunidades β , mientras que los sitios no catalíticos por residuos de las subunidades α . Las subunidades γ , δ y ϵ constituyen el **tallo central**. La subunidad γ penetra el subcomplejo $\alpha_3\beta_3$ permitiendo la unión entre el anillo de subunidades **c** de F_0 y las subunidades catalíticas en F_1 . Las subunidades $\gamma\delta\epsilon$ de F_1 y las subunidades **c** de F_0 forman un complejo que es capaz de realizar giros de 360° , siendo por tanto el **rotor** del motor de la ATPasa (Stock D. y otros, **1999**). El **tallo periférico** es una estructura poco flexible y está constituido por las subunidades **b**, **d**, **F₆** y **OSCP** (Collison I.R. y otros, **1996**) y une la superficie externa del subcomplejo $\alpha_3\beta_3$ con la subunidad **a** evitando de esta forma que el hexámero $\alpha_3\beta_3$ y la subunidad **a** giren siguiendo el movimiento de rotación del rotor (Dickson V.K. y otros, **2006**; Walker J.E. y Dickson V.K., **2006**). La ruptura de los tallos de unión libera la porción de la enzima soluble en agua (F_1), que exhibe sólo actividad ATPásica y es también llamada ATPasa soluble.

La primera estructura de la ATPasa soluble de corazón bovino fue determinada en el año 1994 por el grupo de John E. Walker y se obtuvo a partir de una solución conteniendo ADP y el análogo de ATP no hidrolizable llamado AMP-PNP, utilizando cristalografía de rayos X a $2,8 \text{ \AA}$ de resolución (Abrahams J.P. y otros, **1994**). Se denominaron β_E , β_{DP} y β_{TP} a las subunidades β en ausencia de nucleótidos, con ADP unido y con AMP-PNP unido, respectivamente. Todos los sitios α tenían AMP-PNP unido. Dependiendo qué cadena β era la vecina, las subunidades α se denominaron α_E , α_{DP} y α_{TP} . Posteriormente fueron determinadas por el mismo y otros grupos de

investigación nuevas estructuras cristalográficas de F_1 ATPasa de corazón bovino (Menz R. I. y otros, **2001**; Kagawa R. y otros, **2004**; Bowler M.W. y otros, **2007**), las que ha sido propuesto corresponderían a diferentes intermediarios y/o estados conformacionales de transición durante la síntesis/hidrólisis de ATP. La estructura de la ATPasa soluble inhibida por fluoruro de aluminio y MgADP y cristalizada en presencia de los mismos ha sido resuelta con una resolución de 2 Å. En tales condiciones, los seis sitios de unión de nucleótidos se encuentran ocupados: los tres sitios no catalíticos con ADP, dos sitios catalíticos con ADPMg-fluoraluminato y el tercero con ADP y sulfato. Este último sitio adopta una conformación semicerrada, denominada β_{HC} , que sería una intermediaria entre las conformaciones cerradas (β_{DP} y β_{TP}) y abierta β_E (Menz R. I. y otros, **2001**).

Ha sido demostrado que las F_1F_0 -ATP sintasas se asocian en las membranas para formar dímeros y también en ocasiones se agrupan para formar tetrameros o hexámeros (Wittig I. y Schagger H., **2009**). Los dímeros se forman por asociación en forma de V de los complejos F_0 . En mitocondrias de levadura se observó que las subunidades implicadas en la formación de oligómeros son las subunidades **g** y **e**.

La estructura descrita le permite a la ATP sintasa convertir la energía electroquímica (el gradiente de protones) en energía mecánica (rotación de las subunidades **c** y γ) y a ésta en energía química (síntesis de ATP). En cambio, F_1 puede convertir la energía química derivada de la hidrólisis de ATP en una rotación que lleva a F_0 a bombear protones hacia el espacio intermembrana. Estos mecanismos serán detallados en las siguientes secciones.

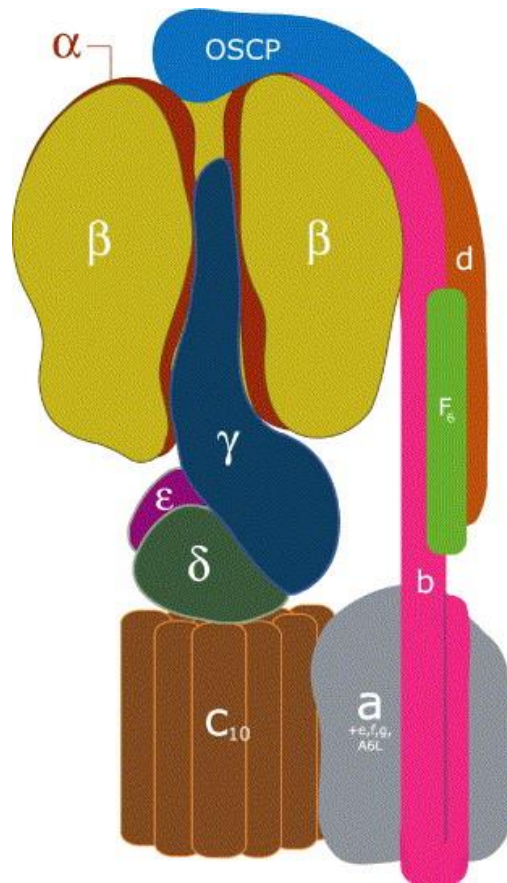


Figura 1.2 Organización de las subunidades en la F_1F_0 -ATPasa mitocondrial. El dominio globular F_1 está constituido por las subunidades α y β y las tres subunidades del tallo central γ , δ y ϵ . F_0 está conformado por el oligómero c , la subunidad a y el tallo periférico formado por las subunidades b , d , F_6 y **OSCP**. Las llamadas subunidades menores (**e**, **f**, **g** y **A6L**) que no se muestran individualmente pero están insertas en la membrana, probablemente presenten una estequiometría 1:1:1:1. El rotor está constituido por el anillo c y el tallo central. Se omite una subunidad α para mayor claridad del dibujo. Tampoco se muestra la proteína IF_1 inhibitoria, la cual se une a una interface α/β catalítica cerca de la parte inferior del complejo $\alpha_3\beta_3$ (Walker J.E. y Dickson V.K., 2006).

1.4. Mecanismo rotacional de la F_1F_0 -ATP sintasa

El mecanismo molecular de F_1F_0 tiene la característica singular de emplear la rotación mecánica del rotor para obtener energía química. El flujo de protones a favor del gradiente desde el espacio intermembrana hacia la matriz mitocondrial se produce a través de la subunidad F_0 por medio de un canal existente en la subunidad hidrofóbica a , lo que impulsa la rotación de dos subunidades que se encuentran asociadas entre sí: el anillo c y la subunidad

γ . La hélice alfa del extremo N-terminal de esta última contacta con el extremo C-terminal de las subunidades β (los sitios catalíticos). En este extremo C-terminal se encuentra el lazo conservado DELSEED, llamado así por su secuencia de aminoácidos. Este contacto ha sido propuesto como la base estructural del mecanismo de transmisión de la rotación. El mantenimiento de la rigidez del lazo es importante para una transmisión eficiente (Tanigawara M. y otros, **2012**). Recientemente ha sido mostrado que mutaciones en residuos cargados pertenecientes al sitio catalítico (α Arg364, β Lys164 y β Glu190) indispensables para la catálisis, si bien disminuyen la velocidad de rotación, no impiden la rotación continua impulsada por la hidrólisis de ATP, lo cual confirma el grado de robustez del mecanismo de acople entre la rotación y los cambios conformacionales, su dependencia del lazo DELSEED y no de residuos catalíticos (Watanabe R. y otros, **2014**).

Durante la síntesis de ATP, la rotación de la subunidad γ induce cambios conformacionales en las subunidades catalíticas lo que permite la unión de ADP y Pi, la síntesis de ATP y la liberación de ATP. Por otra parte, durante la hidrólisis de ATP, la rotación de la subunidad γ estaría inducida por los cambios conformacionales que ocurren en las subunidades catalíticas al hidrolizarse ATP (Futai M. y otros, **2012**). La rotación del rotor es en sentido horario (vista desde el lado de la membrana) para la síntesis de ATP y en sentido anti horario para la hidrólisis de ATP. La dirección del desplazamiento circular cambia la dirección en que se bombean los protones a través de la membrana: hacia la matriz en la síntesis y hacia el espacio intermembrana en la hidrólisis de ATP. Debido a que sólo existe una sola subunidad γ asimétrica, ésta interactúa de manera distinta con cada uno de los tres sitios catalíticos de

las subunidades β de F_1 dejándolos con diferentes conformaciones y afinidades por los nucleótidos (Kaibara C. y otros, **1996**).

La rotación de γ en relación a las subunidades β durante la hidrólisis ha sido demostrada por varios grupos de trabajo (Duncan T.M. y otros, **1995**; Sabbert D. y otros, **1996**; Noji H. y otros, **1997**; Diez M. y otros, **2004**). Uno de los experimentos consistió (ver **Figura 1.3**) en inmovilizar F_1 recombinante obtenida a partir de bacteria termófila sobre un soporte de níquel utilizando colas de histidina unidas al hexámero $\alpha_3\beta_3$ y en adherir un filamento de actina fluorescente a la subunidad γ para observar su rotación por microscopía de fluorescencia (Noji H. y otros, **1997**; Yasuda R. y otros, **1998**). En presencia de ATP-Mg fueron observados giros de γ en sentido contrario a las agujas del reloj (desde el lado de la membrana), lo cual permitió concluir que la hidrólisis de ATP impulsa la rotación de la subunidad γ . El mismo grupo de trabajo un año después pudo determinar que la rotación de γ se producía en intervalos de 120° (Yasuda R. y otros, **1998**), los que posteriormente pudieron ser resueltos en dos sub intervalos: uno de 90° seguido de uno de 30° (Yasuda R. y otros, **2001**). Más recientemente fue informado que dichos intervalos serían de 80° y 40° (Nishizaka T. y otros, **2004**). A concentración saturante de sustrato la rotación de la subunidad γ consiste solamente en giros de 120° , mientras que a concentraciones limitantes de sustrato se pudo además observar dos pausas denominadas “ATP-waiting dwell” y “catalytic dwell” las que preceden a cada uno de los sub pasos de rotación. La duración de la primera pausa es dependiente de la concentración de sustrato, mientras que la segunda es independiente de la misma. Como sus nombres lo indican en el estado “ATP-waiting dwell” un sitio se encuentra vacío y listo para recibir ATP-Mg bajo

condiciones de hidrólisis o ADP-Mg bajo condiciones de síntesis, mientras que en el estado “catalytic dwell” la enzima ejerce su función catalítica (Junge W. y otros, **2009**).

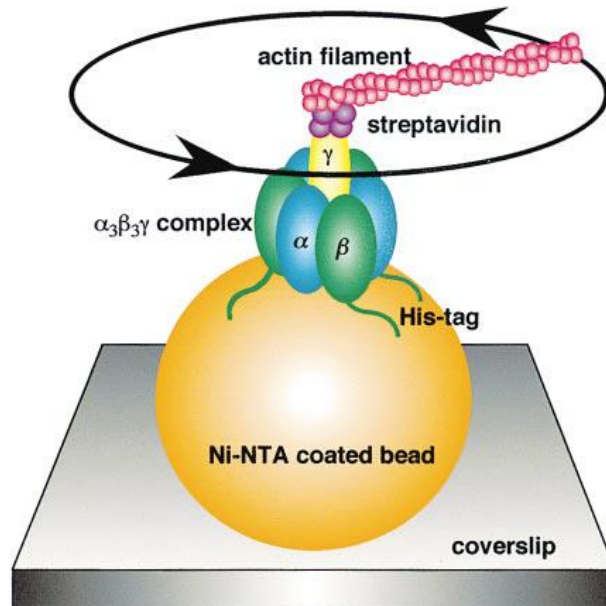


Figura 1.3 Rotación de γ en relación a las subunidades β durante la hidrólisis de ATP. Un filamento fluorescente de actina se conectó al complejo recombinante $\alpha_3\beta_3\gamma$ obtenido a partir de bacteria termófila inmovilizado a una superficie de níquel a través de 10 histidinas (“his-tag”) unidas al extremo N-terminal de cada subunidad β (Yasuda R. y otros, **1998**).

La translocación de protones a través de F_o impulsa la rotación del anillo de subunidades **c** (ver **Figura 1.4**). La estructura del oligómero **c** fue determinada cristalográficamente y se pudo observar que cada subunidad **c** posee un carboxilato (Glu59) que actúa como sitio de unión de protones (Symersky J. y otros, **2012**). El mecanismo por el cual los protones atraviesan el anillo **c** será discutido en la **Sección 1.5**.

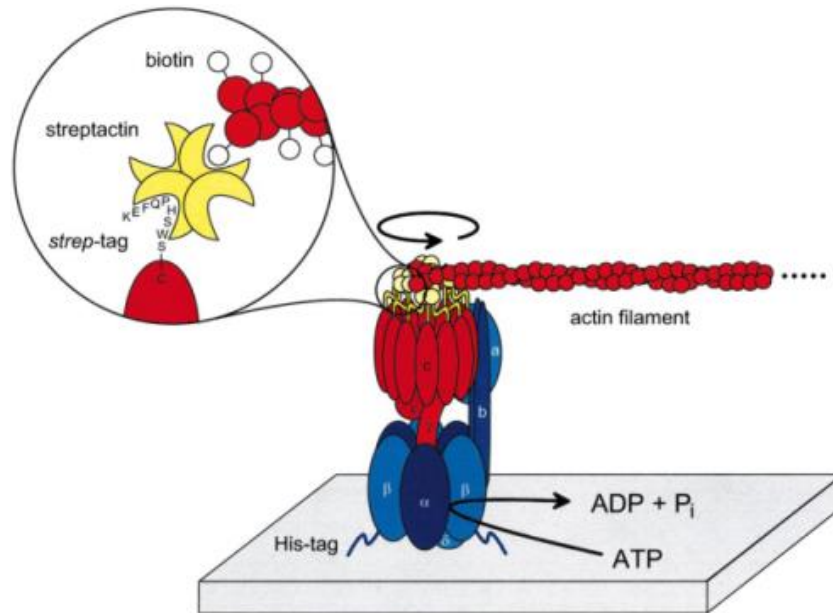


Figura 1.4 Rotación del complejo c en relación al complejo $\alpha_3\beta_3$. Un complejo fluorescente de actina-biotina-estreptacina se conectó a través de una secuencia polipeptídica (“strep-tag”) unida al C-terminal de la subunidad **c** de F_0F_1 de *E. coli* inmovilizada sobre un soporte recubierto de níquel utilizando colas de histidinas unidas al extremo N-terminal de la subunidad β . La presencia de ATP-Mg en el medio condujo a la rotación del complejo **c** en sentido anti horario (Pänke O. y otros, **2000**).

1.5. Mecanismo de translocación de protones a través de F_0

Para explicar la translocación de protones a través de F_0 fue planteado un **modelo de dos canales** (Junge W. y otros, **1997**). Este modelo propone la llegada de un protón a un canal de entrada que se encuentra en la subunidad **a**, con la posterior unión del mismo a un residuo ácido (Glu59) en la subunidad **c**. Las subunidades del anillo **c** se protonan progresivamente y el anillo rotaría de forma tal que en algún momento de la rotación el protón de cada subunidad **c** sería liberado a la matriz (síntesis de ATP) o al espacio intermembrana (hidrólisis de ATP) al enfrentarse con el canal de salida en **a** (**Figura 1.5**). El sitio de protonación en la subunidad **c** se puede encontrar en una conformación cerrada o abierta de acuerdo al medio ambiente químico que la rodee. Más precisamente, ha sido planteada una secuencia de estados conformacionales

por los que atravesaría la subunidad **c** desde que une hasta que libera un protón. El sitio de protonación se encontraría en un estado cerrado y protonado cuando las subunidades **c** enfrentan la membrana lipídica o en un estado abierto al contactar con el medio ambiente hidrofílico de la subunidad **a**, lo cual permitiría la liberación del protón unido al Glu59. (Pogoryelov D. y otros, **2010**).

Alternativamente fue planteado un **modelo de un canal** en donde el grupo carboxilo de una subunidad **c** se ubica muy cerca del lado negativo de la membrana. Una vez protonado, el carboxilato descargaría su protón directamente en la matriz cuando se sintetiza ATP.

La rotación de las subunidades **c** en relación a la subunidad **a** en F_0 produciría la rotación de la subunidad γ en relación a las subunidades catalíticas en F_1 para síntesis de ATP.

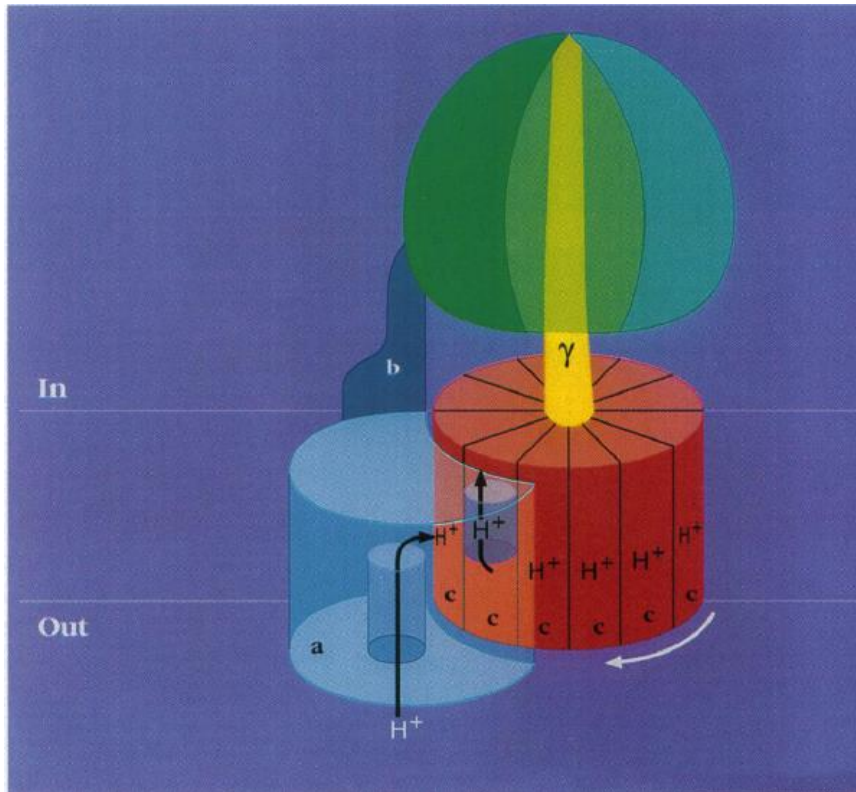


Figura 1.5 Vista lateral de F_1F_0 . La subunidad **a** contiene dos canales, cada uno en contacto con diferentes lados de la membrana. Las subunidades **c** se encuentran directa o indirectamente ancladas a la subunidad γ mientras que la subunidad **a** se encuentra anclada, probablemente indirectamente a través de la subunidad **b**, a las subunidades catalíticas (Duncan T.M. y otros, 1995).

1.6. Mecanismo de la F_1F_0 -ATP sintasa

Como se mencionó anteriormente, la rotación del tallo central impulsada por la disipación del gradiente electroquímico de protones a través del anillo de subunidades **c**, conduce a cambios conformacionales en las subunidades β . Los tres estados conformacionales de las subunidades catalíticas corresponden a baja ($K_{d3} \sim 30 - 100 \mu\text{M}$), media ($K_{d2} \sim 1 \mu\text{M}$) y alta afinidad ($K_{d1} \sim$ en el rango de nM) por los nucleótidos y están asociados a la liberación de producto (ATP), la unión de sustratos (ADP y fosfato) y la formación de ATP, respectivamente. A través de un ciclo conocido como **mecanismo de cambio de unión**, las subunidades catalíticas experimentarían cambios de conformación y de afinidad, permitiendo que cada sitio lleve a cabo

cada uno de los tres pasos secuenciales en la función de síntesis de ATP. El modelo fue propuesto y desarrollado por Paul D. Boyer (Boyer P.D., 1993; Boyer P.D., 1997; Boyer P.D., 2002) y se detalla en la **Figura 1.6**. Este mecanismo posee dos características que son ampliamente aceptadas: **i)** el paso de mayor requerimiento energético no es la síntesis de ATP sino la unión de sustratos y la liberación de productos; **ii)** la unión de sustratos y la liberación de productos ocurren simultáneamente en sitios separados pero que interactúan entre sí. Además, para que este mecanismo sea eficiente el ADP y el fosfato deben unirse a un sitio catalítico en F_1 antes que los protones sean transportados a través de F_0 a favor de un gradiente electroquímico, de lo contrario la energía sería disipada.

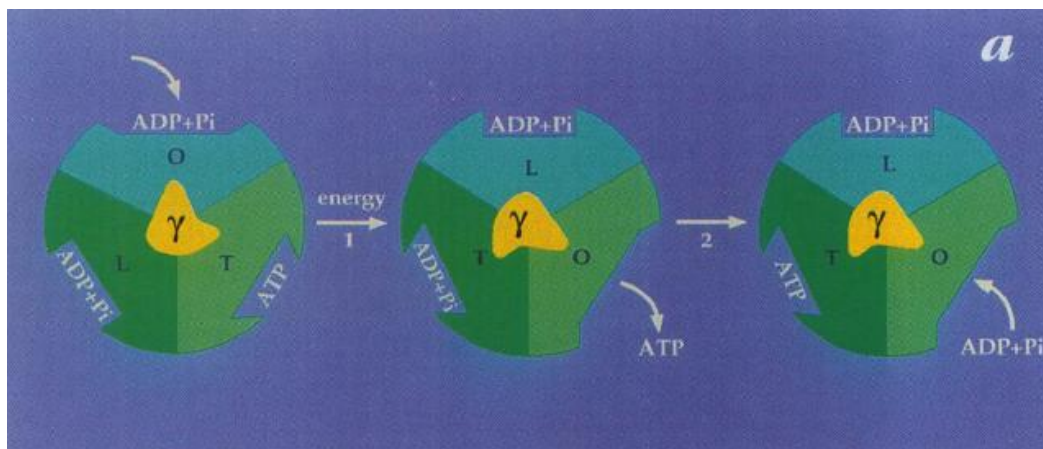


Figura 1.6 Mecanismo de cambio de unión planteado por P.D. Boyer. Vista desde arriba de F_1 . La rotación de la subunidad asimétrica γ fuerza a cambios conformacionales en los tres sitios catalíticos, lo cual resulta en cambios de las afinidades hacia los productos y sustratos. T, L y O se refieren a conformaciones con afinidad decreciente de los sitios catalíticos por los ligandos. Cada una de las tres áreas verdes representan las subunidades catalíticas β . En el paso 2, el ATP se forma espontáneamente a partir de ADP y Pi fuertemente unido. (Duncan T.M. y otros, 1995).

Los sitios catalíticos en las subunidades β pueden adoptar las siguientes conformaciones: O (“open”) la cual posee muy baja afinidad por los ligandos y es catalíticamente inactiva, L (“loose”) la cual posee una afinidad media hacia los ligandos y es también catalíticamente inactiva y T (“tight”) a la que se unen fuertemente los ligandos (ATP o ADP y Mg^{2+}) y es catalíticamente activa (**Figura 1.6**). Esta asimetría está asociada a su vez con el posicionamiento asimétrico de la subunidad γ . La disipación del potencial electroquímico convierte el sitio T, que posee ATP fuertemente unido, en el sitio O liberando el nucleótido. A su vez, el sitio L, que posee unidos ADP y fosfato, adopta la conformación del sitio T. En esta conformación, los sustratos se unen fuertemente y luego se formará ATP. Por otro lado, la conformación O, que posee los sustratos ADP y fosfato unidos, se convierte en un sitio L. Las conformaciones O, L y T están relacionadas a las subunidades designadas como β_E , β_{TP} y β_{DP} (Abrahams J.P. y otros, **1994**) y corresponden a los estados estructurales basales, siendo la conformación β_{DP} la catalíticamente activa (Kagawa R. y otros, **2004**). Estudios cristalográficos adicionales han permitido proponer la siguiente secuencia de estados: O, L', L, T, T*, L", O en donde se presentan intermediarios nuevos entre los estados estructurales basales ya establecidos (Menz R. I. y otros, **2001**). Recientemente, se encontró evidencia de la presencia de un nuevo intermediario estructural en la hidrólisis de ATP, que representaría el estado post hidrólisis o estado previo a la liberación de producto (Rees D.M. y otros, **2012**). Adicionalmente, a partir de la estructura cristalográfica de la F_1 ATPasa de hígado de rata, se ha postulado la existencia de una conformación denominada C (“closed”) (Bianchet M.A. y otros, **1998**), la cual retendría los reactivos fuertemente hasta que se produjera la translocación

de protones. Esto permitió a los autores plantear un mecanismo en donde la ATPasa oscila entre dos conformaciones: una que tiene dos nucleótidos unidos y presenta los estados estructurales O, L y T y otra que posee tres nucleótidos unidos y presenta los estados estructurales C, L y T (Bianchet M.A. y otros, **2000**).

Como ha sido explicado en la **Sección 1.4**, la subunidad γ rota de a 120° . Tres giros sucesivos de 120° del rotor permiten: **i)** que cada uno de los tres sitios catalíticos atraviese las tres conformaciones y regrese a su conformación original; y **ii)** la síntesis/hidrólisis de tres moléculas de ATP.

El orden de liberación de los productos durante la hidrólisis de ATP aún es un tema de controversia. Algunos autores sugirieron que primero se liberaría el ADP y luego el fosfato (Watanabe R. y otros, **2010**) mientras que otros grupos de trabajo proponen un orden inverso para la liberación de los productos (Shimo-Kon R. y otros, **2010**).

Recientemente, ha sido presentado un modelo que permite explicar el acoplamiento entre los giros de γ y los cambios conformacionales de los sitios catalíticos durante la hidrólisis de ATP (Watanabe R. y Noji H., **2013**). El ángulo de rotación de la subunidad γ controla el mecanismo cinético, determinando qué reacciones (liberación/unión de ATP, ADP o fosfato, síntesis o hidrólisis de ATP) ocurrirán en cada uno de los tres sitios catalíticos. La unión de ATP al sitio β_E estaría acoplada a un giro de 80° de γ y a un cambio de conformación hacia β_{TP} . Simultáneamente, el segundo sitio (conformación β_{DP}) hidrolizaría ATP y el tercero, que se encontraría en un estado semicerrado (β_{HC}), liberaría el ADP previamente formado. El giro de 40° favorecería la liberación del fosfato unido al tercer sitio, el cual cambiaría su conformación a la β_E . En resumen,

durante cualquier ciclo de 120° un sitio une sustrato, otro diferente lleva a cabo la catálisis y desde el tercero se liberan los productos. Luego de cada rotación de γ de 120° , los sitios catalíticos intercambian sus propiedades de afinidad por los sustratos y productos. A ATP no saturante, la enzima tendría dos sitios ocupados por nucleótidos y uno libre listo para recibir nucleótido antes de comenzar cada giro de 120° . Mientras que a altas concentraciones de sustrato la mayor parte del tiempo los tres sitios catalíticos estarían ocupados por nucleótidos, dado que el ATP se uniría al sitio catalítico inmediatamente luego de la liberación del fosfato (Watanabe R. y otros, **2010**). En la **Figura 1.7** se observa un esquema que ilustra el modelo descripto.

Recientemente, estudios de dinámica molecular han mostrado que la conformación preferida de la subunidad β vacía sería β_{HC} a la cual se uniría el nucleótido (por selección conformacional) y que la rotación de γ conduciría a la conformación cerrada en un sentido y a la abierta (β_E) en el sentido contrario (Czub J. y Grubmüller H., **2014**).

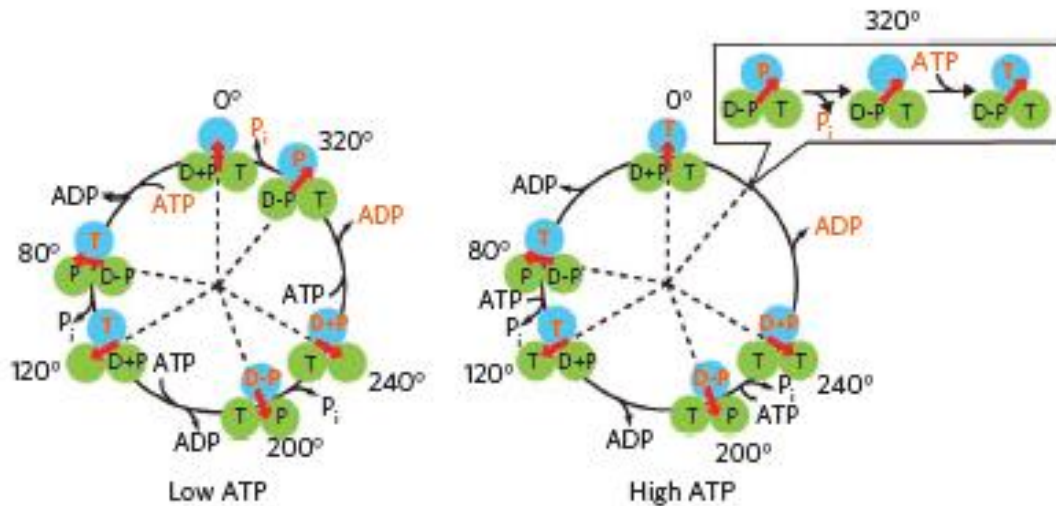


Figura 1.7 Esquemas de reacción para el acoplamiento quimio-mecánico en F_1 bajo condiciones de hidrólisis de ATP. Los círculos y las flechas rojas representan las subunidades β y las posiciones angulares de γ respectivamente. En presencia de bajas concentraciones de ATP (izquierda): El sitio catalítico mostrado en azul hidroliza ATP una vez que γ ha rotado 200° respecto a su posición inicial de unión de ATP. La subunidad β azul acopla la liberación de ADP y fosfato con una rotación de γ de 80° y 40° respectivamente. Mientras tanto, los otros dos sitios en color verde trabajan realizando los mismos eventos, pero desfasados 120° y 240° con respecto al sitio azul. A altas concentraciones de ATP (derecha) la unión del mismo se produce en forma simultánea a la liberación de fosfato (Watanabe R. y otros, **2010**)

Para finalizar, a pesar de los esfuerzos realizados por los distintos grupos de trabajo, son varios los aspectos que quedan por aclarar con respecto al mecanismo de acción de la ATP sintasa y las teorías propuestas. Aspectos aún controversiales son:

- 1) Si la ATP sintasa trabaja a través de un mecanismo de dos (Berden J.A. y otros, **1991**; Milgrom Y.M. y Cross R.L., **2005**) o tres sitios (Gao Y.Q. y otros, **2005**; Boyer P.D., **2002**)
- 2) Si las etapas de la reacción de la síntesis son exactamente la reversión de los pasos de la hidrólisis de ATP (Weber J. y Senior A.E., **2003**; Gao Y.Q. y otros, **2005**; Vinogradov A.D., **2000**).

1.7. Sitios de unión de nucleótidos

F₁ posee múltiples sitios de unión de nucleótidos. Una clasificación de los mismos fue planteada por Slater y otros (1979). La misma incluía un sitio exclusivo para la catálisis (subunidad β) y otros tres sitios no catalíticos capaces de unir ligandos (ADP o ATP y aniones) que cumplirían funciones regulatorias (efectores positivos o negativos). Estudios posteriores más arriba descritos mostraron que la enzima posee seis sitios de unión para nucleótidos, los que se encuentran localizados en las seis interfaces α/β . Tres de ellos estarían conformados fundamentalmente por residuos de aminoácidos de las subunidades β los que tendrían función catalítica, mientras que los otros tres, conformados mayoritariamente por residuos de las subunidades α , poseen una función la que es aún motivo de controversia y por tanto se los llama sitios no catalíticos. Los primeros han sido denominados sitios β y los segundos sitios α (ver **Figura 1.8** y Hartog A.F. y otros, 1997), en base a la primera estructura publicada (Abrahams J.P. y otros, 1994).

La ATPasa soluble, preparada como ha sido descrita en **Materiales y Métodos**, contiene entre 2 y 3 nucleótidos unidos aún después de haber sometido la preparación a diálisis, precipitación con sulfato de amonio, filtración molecular (Harris D.A. y otros, 1973) o al procedimiento de filtración-centrifugación descrito por Penefsky (1977). Estos resultados muestran que de los seis sitios de unión dos no intercambian nucleótidos y por tanto tendrían nucleótidos firmemente unidos. Un tercer sitio intercambiaría nucleótidos lentamente y los tres restantes lo harían rápidamente (Berden J.A. y Hartog A.F., 2000). La ubicación de los nucleótidos firmemente unidos ha sido motivo de controversia (ver **Figura 1.8**): estarían localizados en los sitios 1 (catalítico)

y 4 (no catalítico) según Hartog y Berden (1999) o en los sitios 4 y 5 (no catalíticos) según Kironde y Cross (1986). También es motivo de controversia el rol de los sitios 4 y 5 mientras que es en general aceptado que el sitio 6 sería un sitio de baja afinidad por los nucleótidos y que tendría funciones regulatorias, estando involucrado en el efecto de los aniones activadores (Berden J.A. y Hartog A.F., 2000).

1 ATP	2 AXP	3	β
4 ADP	5	6	

Figura 1.8 Sitios de unión de nucleótidos en F_1 . La fila superior corresponde a los sitios β mientras que la de abajo a los sitios α . 1 y 4 representan a sitios que contienen nucleótidos fuertemente unidos, no intercambiables; el sitio 2 a un sitio catalítico de alta afinidad; el sitio 3 a un sitio catalítico de baja afinidad; el sitio 5 a un sitio regulatorio con alta afinidad por ADP en presencia de Mg^{2+} ; el sitio 6 a un sitio regulatorio con baja afinidad por ATP (Adaptado de Hartog A.F. y otros, 1997).

1.8. Efecto de aniones sobre la síntesis e hidrólisis de ATP

Desde mediados del siglo pasado se conoce que diversos aniones se comportan como activadores o inhibidores de la hidrólisis de ATP catalizada por preparaciones relacionadas con F_1F_0 -ATPasas (ver Vasilyeva E.A. y otros, 1982 y referencias ahí citadas; Lambeth D.O. y Lardy H.A, 1971). A continuación se describen resultados informados y propuestas de mecanismos hechas acerca de la acción de algunos de estos aniones no sólo sobre la hidrólisis de ATP sino también sobre la síntesis del mismo.

1.8.1. Efecto de azida sobre la síntesis e hidrólisis de ATP

Azida es un potente inhibidor de la hidrólisis de ATP catalizada entre otras preparaciones por mitocondrias de hígado de rata y F_1 de corazón de bovino, habiéndose caracterizado su efecto como no competitivo respecto de ATP (Mitchell P. y Moyle J., **1971**). En cambio, ha sido informado que azida (NaN_3) no inhibe la reacción reversa: la síntesis de ATP (Syroeshkin A.V. y otros, **1995**). Más recientemente, ha sido resuelta por difracción de Rayos X ($1,9 \text{ \AA}$) la estructura de F_1 utilizando cristales crecidos en presencia de 3 mM NaN_3 . La misma muestra que el anión azida estaría unido cerca del fosfato β de ADP en el sitio catalítico de la subunidad β_{DP} , muy probablemente compitiendo con Pi (Bowler M.W. y otros, **2006**), estabilizando el complejo inhibido con Mg-ADP . La síntesis de ATP no sería inhibida ya que la rotación de la subunidad γ favorecería la expulsión de ADP y azida. En cambio, la unión de ATP a otro sitio catalítico no sería suficiente para impulsar la liberación del producto ADP del complejo $F_1 \bullet \text{ADP} \bullet \text{azida}$.

1.8.2. Efecto de sulfato y bicarbonato sobre la hidrólisis de ATP

Ha sido informado que gráficos de Lineweaver-Burk no lineales se obtienen cuando se hacen estudios cinéticos de la actividad ATPásica de mitocondrias de corazón bovino, de hígado de rata y de levadura (Schuster S.M. y otros, **1975**). Este comportamiento fue interpretado como la presencia de cooperatividad negativa para la hidrólisis de ATP, consecuencia de la interacción entre sitios catalíticos o entre sitios catalíticos y regulatorios (Ebel R.E. y Lardy H.A., **1975**). La presencia de efectos cooperativos en esta enzima que posee múltiples sitios de unión de nucleótidos no es inesperada. Un aspecto central del mecanismo de cambio de afinidad de unión en las F_1F_0 -ATP

sintasas es la operación de lo que ha sido dado llamar como **cooperatividad catalítica** (“catalytic cooperativity” ver Gresser M.J. y otros, **1982**), la cual tendría una doble característica: **i)** cooperatividad positiva para la catálisis, consistente en que la unión de ATP al segundo o tercer sitio catalítico facilitaría la liberación de producto en el primer sitio (Cross R.L. y otros, **1982**; Grubmeyer C. y otros, **1982**); y **ii)** cooperatividad negativa entre sitios catalíticos para la unión de ATP (Gresser M.J. y otros, **1982**). Alternativamente esta última sería debida a la unión a un sitio no catalítico de baja afinidad lo que incrementaría el K_m de los sitios catalíticos (Recktenwald D. y Hess B., **1977**; Hartog A.F. y otros, **1997**).

En 1975 fue informado que bicarbonato, sulfito y otros aniones no sólo aumentaban la velocidad inicial de la reacción, sino que también eliminaban gradualmente la curvatura de los gráficos doble recíproca (Ebel R.E. y Lardy H.A., **1975**). Sin embargo, resultados obtenidos en Rosario (Roveri O.A. y Calcaterra N.B., **1985**), al determinar la velocidad inicial de la ATPasa soluble de corazón de bovino en un amplio rango de [ATP], mostraron que: **i)** aún en presencia de bicarbonato se obtenían cinéticas no michaelianas; y **ii)** la curva de v vs [ATP] debió ser ajustada por la suma de dos hipérbolas en presencia de bicarbonato y por la suma de tres hipérbolas en ausencia del anión. La discrepancia entre las observaciones de Roveri y Calcaterra (**1985**) y las previamente informadas por Ebel y Lardy (**1975**) puede ser atribuida a que los primeros autores realizaron determinaciones a [ATP] más bajas que los últimos. Los resultados de Roveri y Calcaterra (**1985**), al igual que los informados por Kasho y Boyer (**1984**) indican que bicarbonato no afecta la actividad de la enzima a [ATP] correspondientes al primer K_m . Por otra parte los

primeros mostraron que bicarbonato estimula la actividad ATPásica a [ATP] correspondientes al segundo K_m y en menor medida al tercer K_m , atenuando la cooperatividad negativa entre los sitios responsables de estos dos últimos.

Otro anión que afecta la actividad ATPásica de F_1 es sulfato. Recktenwald y Hess (1977) informaron que sulfato inhibe la actividad ATPásica de F_1 de levadura aumentando el K_m para ATP. Más recientemente, estudios realizados en el Laboratorio (Lodeyro A.F. y otros, 2008) han mostrado que sulfato no solo aumenta el K_m para ATP sino que también la $V_{m\acute{a}x}$, comportándose como un activador no esencial a concentraciones altas de ATP y como un inhibidor parcial a concentraciones bajas del mismo. Este último resultado indica que sulfato no impide la unión de ATP de manera cinéticamente competente a la enzima.

En relación al mecanismo de acción de aniones activadores, Moyle y Mitchell (1975) sugirieron que la composición iónica del medio modularía la transición entre dos estados conformacionales (activo e inactivo) y Ebel y Lardy (1975) propusieron que la unión de los aniones a un sitio regulatorio conduciría a cambios conformacionales en la enzima con un consecuente aumento de la tasa de liberación de productos de hidrólisis aumentando la actividad ATPásica. Más recientemente, ha sido sugerido que si bien bicarbonato estimula la liberación de ADP, la activación por este anión se debe fundamentalmente al incremento de la afinidad del tercer sitio catalítico por ATP (Roveri O.A. y Calcaterra N.B., 1985).

Por otra parte Recktenwald y Hess (1977) propusieron que los aniones actuarían como ligandos alostéricos, previniendo la unión de ATP a sitios regulatorios. El estado de ocupación por ATP de estos últimos controlaría la

afinidad del sitio catalítico por ATP. La unión de sulfato a dicho sitio induciría un estado conformacional de baja afinidad por ATP (alto K_m) mientras que la de sulfito uno de alta afinidad (bajo K_m). Hartog y otros (1997) han postulado que dicho sitio: **i)** sería el sitio no catalítico de baja afinidad (sitio 6, ver **Figura 1.8**); **ii)** tendría un rol regulatorio; y **iii)** sería el sitio de unión de sulfato y de bicarbonato (Berden J.A. y Hartog A.F., 2000). Sin embargo el estudio del efecto de mezclas de bicarbonato y sulfato sobre la hidrólisis de ATP ha mostrado que ambos aniones no son mutuamente excluyentes, permitiendo concluir que sulfato y bicarbonato se unen a distintos sitios en la enzima (Lodeyro A.F. y otros, 2008).

Por último, también ha sido postulado que bicarbonato y sulfato (ver **Sección 1.8.4.**) estimularían la actividad hidrolítica de F_1 promoviendo la liberación de ADP del estado inhibido por Mg-ADP ("Mg-ADP inhibited state", Guerrero K.J. y otros, 1990) desplazando el equilibrio hacia la enzima activa (Kasho V.N. y Boyer P.D., 1984; Chernyak B.V. y otros, 1988; Murataliev M.B. y Boyer P.D., 1992).

1.8.3. Efecto de sulfato y bicarbonato sobre la síntesis de ATP

Además de estimular la hidrólisis de ATP tanto en F_1 soluble como en SMP (Roveri O.A. y Calcaterra N.B., 1985; Calcaterra N.B., 1988), bicarbonato inhibe completamente la síntesis de ATP en SMP. Estudios cinéticos permitieron caracterizar a bicarbonato como un inhibidor competitivo lineal respecto de ADP y no competitivo respecto de Pi (Calcaterra N.B., 1988; Lodeyro A.F. y otros, 2001).

La explicación más simple a estos efectos opuestos de bicarbonato sobre la síntesis e hidrólisis de ATP sería que este anión aumenta la afinidad

de ATP y disminuye la de ADP por los sitios catalíticos bajo condiciones de catálisis multisitio, de manera similar a lo previamente propuesto por Kasho y Boyer (1984). La inhibición de bicarbonato no competitiva respecto de fosfato permite concluir que el anión se une a un sitio distinto al de unión de Pi a diferencia de lo propuesto por otros autores (Du Z. y Boyer P.D., 1990; Malyan A.N. y otros, 1982), haciéndolo en cambio (Lodeyro A.F. y otros, 2001) al sitio no catalítico de baja afinidad (sitio 6 según Berden J.A. y Hartog A.F., 2000) de manera mutuamente excluyente (compitiendo) con ADP. La hipótesis de que bicarbonato no se une al sitio de unión de fosfato es consistente con los resultados obtenidos por Penefsky (1977) al estudiar la unión de Pi a F_1 .

Por otra parte, ha sido recientemente informado que sulfato es un inhibidor completo de la síntesis de ATP catalizada por SMP: competitivo lineal respecto de Pi y mixto lineal respecto de ADP (Lodeyro A.F. y otros, 2008). Asimismo el efecto de mezclas de bicarbonato y sulfato sobre la síntesis de ATP han mostrado que los mismos se comportan como ligandos no excluyentes, confirmando que sulfato y bicarbonato se unen a distintos sitios en la enzima. Este resultado y la caracterización cinética del efecto de ambos aniones sobre la síntesis e hidrólisis de ATP han permitido postular que bicarbonato se uniría a un sitio no catalítico, mientras que sulfato lo haría al sitio catalítico cerca del sub sitio de unión de fosfato. (Lodeyro A.F. y otros, 2001; Lodeyro A.F. y otros, 2008).

1.8.4. Efecto de sulfito sobre las F_1F_0 -ATPasas

Otro anión cuyos efectos sobre las F_1F_0 -ATPasas ha sido estudiado es sulfito. Este anión estimuló la actividad ATPásica de F_1 de mitocondrias de mamíferos (Ebel R.E. y Lardy H.A., 1975) y de levadura (Recktenwald D. y

Hess B., **1977**). Estos últimos autores postularon que actuaría en un sitio “regulatorio” estabilizando a la enzima en un estado de bajo K_m para ATP sin modificar significativamente $V_{m\acute{a}x}$.

Ha sido también informado que dicho anión estimula la actividad de la ATPasa soluble de cloroplastos (CF_1) e inhibe la fotofosforilación en cloroplastos de arveja, de manera no competitiva respecto de ADP y competitiva respecto de Pi (Malyan A.N. y otros, **1982**). El estímulo de la actividad ATPásica de CF_1 ocurre sin cambios en el K_m para ATP (Murataliev M.B. y Boyer P.D., **1992**). Sulfito induciría la disociación de MgADP firmemente unido a un sitio catalítico en ausencia de Pi, desplazando de tal manera el equilibrio entre formas inactiva y activa de la enzima (Du Z. y Boyer P.D., **1990**).

Bakels y otros (**1994**) estudiaron el efecto de sulfito sobre ATP sintasas de varias especies (vesículas de cianobacterias, cromatóforos de *Rhodospirillum rubrum*, vesículas de *Paracoccus denitrificans* y SMP de corazón bovino). En todas las preparaciones observaron que sulfito a concentraciones entre 0,5 y 2,2 mM estimula la hidrólisis de ATP aumentando $V_{m\acute{a}x}$. En cambio la síntesis de ATP es inhibida en cianobacterias (Bakels R.H.A. y otros, **1994**) y en cloroplastos (Bakels R.H.A. y otros, **1996**). Estos autores mostraron que dicho efecto no sería atribuible a inhibición del transporte de electrones ni a desacople postulando en cambio que podría ser atribuido a competencia entre el anión y Pi por el sitio de unión de éste.

Capellini y otros (**1997**) mostraron que sulfito aumenta de manera importante (12 – 15 veces) la $V_{m\acute{a}x}$ de la reacción de hidrólisis de ATP catalizada por cromatóforos de *Rhodobacter capsulatus*. Este aumento no es

acompañado por aumento en la translocación de protones, observándose un progresivo desacople entre la hidrólisis de ATP y la translocación de protones, así como inhibición de la síntesis de ATP impulsada tanto por luz, como por gradientes iónicos artificialmente inducidos. En base a estos resultados estos autores postularon: **i)** que sulfito, al igual que Pi, se uniría a dos sitios en la enzima; y **ii)** que induciría un aumento en el deslizamiento (“slipping”) de protones en la ATP sintasa (desacople parcial entre F_1 y F_0) de manera similar a lo propuesto por Kibak y otros (1993) para el efecto de sulfito sobre la ATPasa de vacuolas (V-ATPasa).

Pacheco-Moisés y otros (2000) estudiaron el efecto de sulfito sobre la actividad ATPásica de vesículas “inside out” de membrana plasmática de *Paracoccus denitrificans*. Estas vesículas muestran en condiciones basales una muy baja actividad de hidrólisis de ATP mientras que catalizan la reacción inversa (síntesis de ATP) a muy alta velocidad. Sulfito induce un marcado aumento de la actividad ATPásica de estas membranas: la unión de sulfito (probablemente a un sitio no catalítico) induciría la disociación del ADP inhibitorio unido a sitios catalíticos de manera similar a lo propuesto para la ATPasa de cloroplastos (Du Z. y Boyer P.D., 1990). Por otra parte, a concentraciones de sulfito menores a 10 mM, la sensibilidad de la actividad ATPásica a oligomicina y venturicidina (inhibidores que actúan a nivel de F_0) sugiere que sulfito no afectaría el acoplamiento entre F_1 y F_0 (Pacheco-Moisés F. y otros, 2000) a diferencia de lo postulado para el efecto de sulfito sobre la ATPasa de *R. capsulatus* (Capellini P. y otros, 1997). Por otra parte, sulfito se comporta como un inhibidor mixto respecto de ADP y de Pi de la síntesis de ATP en *P. denitrificans* (Pacheco-Moisés F. y otros, 2002), aumentando los K_{ms}

de ambos sustratos, al igual que la IC_{50} para ADP como inhibidor de la hidrólisis de ATP.

En resumen Pacheco Moisés y otros (2002) han postulado que sulfito afecta de manera opuesta la hidrólisis de ATP y la síntesis de ATP y han descartado de manera concluyente que dicho efecto diferencial sea atribuible tanto a desacoplamiento clásico como a desacople a nivel molecular entre F_1 y F_0 .

Los mecanismos de inhibición y activación que ejercen los aniones sobre la cadena respiratoria varían entre las distintas especies estudiadas y entre los procedimientos de preparación y almacenamiento de las enzimas. Por ejemplo, ha sido observado que sulfato 20 mM produce un efecto activador de la hidrólisis de ATP en vesículas de mitocondrias de hígado de rata (Moyle J. y Mitchell P., 1975) mientras que la misma concentración conduce a una inhibición en F_1 -ATPasa de levadura (Recktenwald D. y Hess B, 1977).

1.8.5. Consideraciones finales

Tal como se ha descrito en las secciones anteriores, hay informaciones contradictorias sobre los efectos de los aniones efectores. Dichas diferencias pueden ser atribuidas a diferencias entre las fuentes de la enzima, en los procedimientos de purificación o almacenamiento de la enzima o en el tratamiento de la enzima antes de los experimentos.

En el laboratorio se han llevado a cabo detallados estudios cinéticos de los efectos de bicarbonato (Roveri O.A. y Calcaterra N.B., 1985; Calcaterra N.B., 1988; Lodeyro A.F. y otros, 2001) y sulfato (Lodeyro A.F., 2002; Lodeyro A.F. y otros, 2008) sobre la hidrólisis y síntesis de ATP sobre preparaciones (F_1 y SMP) del mismo origen (corazón de bovino), procedimiento de preparación y

almacenamiento. Los resultados obtenidos han permitido postular que bicarbonato actuaría compitiendo con ADP por el sitio no catalítico de baja afinidad regulando las afinidades relativas del sitio catalítico por ATP y ADP, mientras que sulfato lo haría uniéndose al sitio catalítico impidiendo la unión de Pi y favoreciendo la disociación de los productos de la hidrólisis de ATP.

1.9. Objetivos de esta Tesis

1.9.1. Objetivo general

Continuar con el estudio del efecto de aniones sobre la ATPasa/sintasa mitocondrial para contribuir al conocimiento del mecanismo de la síntesis/hidrólisis de ATP por las F-ATPasas. Analizar el comportamiento cinético de ATPasa reversible mitocondrial de corazón bovino en presencia de sulfito.

1.9.2. Objetivos específicos

- Realizar un estudio cinético del efecto de sulfito sobre la hidrólisis de ATP por F_1 y partículas submitocondriales.
- Estudiar el efecto de sulfito sobre la cadena respiratoria, el acoplamiento entre la misma y la ATP sintasa y la síntesis de ATP.
- Estudiar el efecto de mezclas de sulfito y sulfato o bicarbonato sobre la hidrólisis y síntesis de ATP para tratar de identificar los sitios involucrados en la acción de los distintos aniones.
- Elaborar modelos de reacción consistentes con los resultados obtenidos.

1.9.3. Objetivo instrumental

Diseñar y optimizar un método cinético sensible y sencillo basado en un ciclo catalítico de sustrato para determinar concentraciones submicromolares de ATP y ADP presentes como ligandos de proteínas y/o contaminantes de medios utilizados en el estudio cinético de reacciones enzimáticas. En particular:

- i) Caracterizar el comportamiento cinético del sistema enzimático, estudiando la dependencia de la velocidad del ciclo con las concentraciones de enzimas, co-sustratos y cofactores.
- ii) Determinar la sensibilidad y límite de detección del método.
- iii) Cuantificar la cantidad de ATP y ADP presentes como trazas contaminantes en el NADH y en otros componentes del medio de reacción.

CAPÍTULO 2

2. Materiales y Métodos

2.1. Materiales

Las drogas utilizadas fueron de calidad analítica. Las enzimas, sustratos y coenzimas fueron provistos por ICN y Sigma-Aldrich.

Los corazones bovinos fueron obtenidos por donación del frigorífico Sugarosa.

2.1.1. Preparación y determinación de la actividad de las enzimas utilizadas

Tanto para lactato deshidrogenasa ((S)-lactato:NAD⁺ oxidoreductasa E.C. 1.1.1.27) como para piruvato quinasa (ATP:piruvato 2-O-fosfotransferasa E.C. 2.7.1.40) se emplearon dos preparaciones comerciales de enzimas de músculo de conejo y proporcionadas por Sigma-Aldrich: una suspensión cristalina en sulfato de amonio 3 M pH 6,0 la que previo a su uso fue dializada 24 horas frente a buffer glicerol 50% y otra preparación liofilizada la que se disolvió directamente en glicerol 50%. Para hexoquinasa (ATP:D-hexosa 6-fosfotransferasa E.C. 2.7.1.1) se utilizó una preparación liofilizada de enzima de levadura obtenida de Sigma-Aldrich la cual se disolvió en glicerol 50%. Las soluciones de enzimas se almacenaron a -20°C. La enzima alcohol deshidrogenasa proveniente de levadura (alcohol:NAD⁺ oxidoreductasa EC 1.1.1.1) se obtuvo de ICN Biomedical Inc. y se disolvió en agua destilada. La concentración proteica se determinó a 280 nm ($A_{1\%} = 14,6$). La enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (D-glucosa-6-fosfato:NADP⁺ 1-oxidoreductasa EC 1.1.1.49) de *Leuconostoc mesenteroides* fue provista por Sigma-Aldrich y se preparó por disolución del polvo liofilizado en glicerol 50%.

A continuación se detallan los medios de reacción empleados para la determinación de la actividad enzimática de lactato deshidrogenasa, piruvato quinasa y hexoquinasa. En todos los casos se trabajó a 25°C.

Lactato deshidrogenasa (LDH): La actividad fue ensayada en un medio de reacción que contenía Tris-HCl 100 mM (pH 7,5), piruvato de sodio 0,6 mM y NADH 0,2 mM. La reacción fue iniciada por la adición de diferentes cantidades de LDH. La velocidad de reacción se determinó directamente siguiendo la oxidación del NADH a 340 nm. Una Unidad Internacional (UI) se definió como la cantidad de enzima capaz de oxidar 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ de NADH bajo las condiciones especificadas.

Piruvato quinasa (PK): Para determinar la actividad de PK se utilizó un sistema acoplado PK/LDH. Se utilizó un medio de reacción constituido por: Tris-HCl 100 mM (pH 7,5), fosfoenolpiruvato (PEP) 1 mM, MgCl_2 2,5 mM, KCl 10 mM, ADP 5 mM, NADH 0,2 mM y LDH 10 UI/mL. Las reacciones se iniciaron por el agregado de PK y fueron seguidas a 340 nm. Una UI se definió como la cantidad de enzima que produce 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ de piruvato, lo cual es equivalente a la oxidación de 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ de NADH.

Hexoquinasa (HK): El método tradicional para la determinación de la actividad de HK es un método espectrofotométrico que acopla a la reacción de la HK la de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), lo que permite seguirla midiendo la producción de NADPH a 340 nm. La reacción se inició por el agregado simultáneo de G6PDH y HK a un medio de reacción compuesto por: Tris-HCl 80 mM (pH 7,5), glucosa 220 mM, ATP 0,75 mM, MgCl_2 8 mM, NADP 1,1 mM, G6PDH 0,01 mg/mL. Una UI se definió como la cantidad de enzima que reduce 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ de NADP. También se utilizó otro método para

la medida de la actividad de la HK que consiste en acoplar PK y LDH a la reacción catalizada por la HK, empleando un medio de reacción constituido por: Tris- HCl 40 mM (pH 7,5), glucosa 220 mM, ATP 0,75 mM, MgCl₂ 2 mM, PEP 1 mM, sacarosa 100 mM, KCl 10 mM, NADH 0,20 mM, LDH 10 UI/mL y PK 5 UI/mL. La reacción fue iniciada con la adición de HK y seguida a 340 nm. Una UI se definió como la cantidad de enzima que produce 1 μmol/min de ADP, lo cual es equivalente a la oxidación de 1 μmol/min NADH. Ambos métodos dieron resultados comparables.

2.1.2. Determinación de la concentración de nucleótidos de adenina **Determinación espectrofotométrica de la concentración de nucleótidos de adenina**

La concentración de nucleótidos totales fue determinada a partir de la medida espectrofotométrica a 260 nm de soluciones madre de ATP, ADP o AMP ($\epsilon_{260} = 15,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Determinación enzimática de la concentración de ADP

La concentración de ADP de las soluciones madres fue determinada enzimáticamente por un método de punto final que utiliza el sistema acoplado PK + LDH (Jaworek D. y otros, **1974**). El medio de reacción empleado fue: Tris- HCl 100 mM (pH 7,5), PEP 1 mM, MgCl₂ 2,5 mM, KCl 10 mM, NADH 0,2 mM PK 2,5 UI/mL y LDH 10 UI/mL. Se determinó la disminución de absorbancia a 340 nm por el agregado de alícuotas de la solución madre de ADP.

Determinación enzimática de la concentración de ATP

La concentración de ATP de las soluciones madres fue determinada enzimáticamente utilizando un ensayo acoplado compuesto por HK y G6PDH (Lamprecht D. y Traustschold I., **1974**).

2.1.3. Determinación de la concentración y pureza de nucleótidos de nicotinamida

Determinación espectrofotométrica

La concentración de NADH, NAD⁺ y NADP⁺ fueron determinadas espectrofotométricamente a 340 nm y a 260 nm. Los coeficientes de extinción molar para NADH son $\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $\epsilon_{260} = 14 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, para NAD⁺ $\epsilon_{260} = 17,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y para NADP⁺ $\epsilon_{260} = 18 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Determinación enzimática de NADH

La determinación enzimática de NADH consiste en un ensayo de punto final que utiliza un medio de reacción compuesto por: fosfato de potasio 100 mM (pH 7,0), piruvato de sodio 0,5 mM y un volumen aproximadamente equivalente a 0,02 μmol de NADH según lo determinado espectrofotométricamente. La reacción se inicia con 1 UI de LDH determinándose la disminución de absorbancia a 340 nm. El volumen de reacción fue de 1 mL.

Determinación de la concentración de NAD⁺ en el reactivo comercial NADH

La concentración de NAD⁺ en el reactivo comercial NADH se midió a 340 nm utilizando un ensayo enzimático de punto final cuyo medio de reacción está compuesto por: pirofosfato de sodio 50 mM (pH 8,8), etanol rectificado 1 % V/V y semicarbazida 0,5 % P/V. Luego del agregado de concentraciones conocidas de NADH, la reacción fue iniciada por el agregado de 35 UI/mL de alcohol deshidrogenasa (ADH).



La presencia de semicarbazida en el medio de reacción desplaza la reacción por consumo del producto acetaldehído.

2.1.4. Determinación de la concentración de PEP y piruvato

Para determinar las concentraciones de PEP y piruvato se utilizó un método espectrofotométrico de punto final que mide la disminución de absorbancia a 340 nm por consumo de NADH. El medio está constituido por Tris-HCl 100 mM (pH 7,5), MgCl₂ 2,5 mM, KCl 10 mM, ADP 5 mM y NADH 0,2 mM. Luego del agregado de PEP a la cubeta, la reacción se inicia con la adición de las enzimas, comenzando con 10 UI/mL de LDH para medir el piruvato contaminante del PEP seguido por 10 UI/mL de PK para cuantificar el PEP.

2.2. Preparación de partículas submitocondriales Mg-ATP (SMP) a partir de mitocondrias de corazón bovino

Las mitocondrias fueron preparadas a partir de corazones de bovino (Smith A.L., 1967). Los mismos fueron extraídos inmediatamente después de ser sacrificado el animal y mantenidos en una mezcla hielo/agua. Todo el procesamiento fue llevado a cabo a una temperatura entre 0 y 4°C.

Luego de separar el tejido conectivo, vasos y grasas; el miocardio fue trozado y lavado con sacarosa 250 mM y Tris 10 mM pH 7,5 (ST) hasta obtener una solución límpida. Posteriormente dichos trozos fueron pesados y homogeneizados utilizando una licuadora industrial Waring Commercial Blendor durante 10 segundos a baja velocidad y tres ciclos de 5 segundos a alta velocidad en un medio conteniendo sacarosa 250 mM, EDTA 0,5 mM, succinato 1 mM, Tris 10 mM pH 7,8 (SEST). Luego de cada homogeneización el pH se controló y se mantuvo constante mediante el agregado de KOH 6 N.

El homogenado fue centrifugado en una centrífuga Sorvall RC5C con rotor GS-3 a 3500 rpm durante 10 minutos a 0°C. El sobrenadante fue filtrado

(de ser necesario se le adicionó KOH 6 N para mantener el pH igual a 7,8) y centrifugado 30 minutos a 12500 rpm utilizando un rotor GS-A a 0°C. El precipitado obtenido se resuspendió en un volumen pequeño de SEST y luego se homogeneizó lentamente utilizando un Potter-Elvehjem. El homogenado luego se centrifugó durante 30 minutos a 0°C utilizando un rotor SS-34 a 18000 rpm con el objetivo de separar las mitocondrias pesadas de las livianas. Este procedimiento se repitió hasta obtener una buena separación de mitocondrias pesadas y livianas. Las mitocondrias pesadas y livianas fueron homogeneizadas y conservadas a -70°C.

Las partículas submitocondriales fosforilantes fueron preparadas a partir de las mitocondrias pesadas de acuerdo al procedimiento de Löw y Vallin (1963) con algunas modificaciones.

Las mitocondrias pesadas fueron descongeladas, resuspendidas en sacarosa 250 mM y centrifugadas durante 20 minutos a 18000 rpm en un rotor SS-34 a 0°C. Se descartó el sobrenadante y las mitocondrias pesadas se resuspendieron en sacarosa 250 mM, ATP 1 mM, MgCl₂ 10 mM a una concentración igual a 20 mg/mL. Esta suspensión fue sometida a cuatro tratamientos de 30 segundos utilizando un desintegrador ultrasónico Branson Sonifier 250 manteniendo la temperatura entre 2 y 6°C con un baño de agua-hielo-sal gruesa. Los restos de membranas y mitocondrias pesadas intactas fueron precipitadas y descartadas centrifugando en una Sorvall RC5C con un rotor SS-34 a 12.800 rpm a 0°C durante 6 minutos. A continuación el sobrenadante fue centrifugado durante 30 minutos a 41100 rpm utilizando una ultracentrífuga Beckman Coulter Optima L-90 K con rotor Ti 90. El precipitado fue resuspendido en sacarosa 250 mM y MgCl₂ 10 mM y centrifugado

nuevamente en las condiciones anteriores. Las partículas submitocondriales obtenidas fueron resuspendidas en sacarosa 250 mM y glicil-glicina 10 mM (pH 7,0) y almacenadas en nitrógeno líquido.

2.3. Preparación de ATPasa soluble

A partir de las mitocondrias obtenidas se purificó la ATPasa soluble según el método descrito por Knowles y Penefsky (1972) con algunas modificaciones. El procedimiento se realizó en el transcurso de tres días y consta de las etapas detalladas a continuación:

Primer día:

Las mitocondrias livianas se resuspendieron a una concentración de 30 mg/mL en medio ST, y fueron sometidas a desintegración ultrasónica a máxima potencia en un baño agua-hielo durante 4 minutos (la temperatura máxima no superó los 30 - 35°C). El sonicado se centrifugó a 12.500 rpm utilizando un rotor GSA durante 30 min a 0°C. El precipitado fue resuspendido en sacarosa 250 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 7,0), y sometido a una nueva sonicación y centrifugación. Ambos sobrenadantes fueron centrifugados en una ultracentrífuga Beckman Coulter Optima L-90 K a 35.000 rpm en rotor tipo 35 durante 100 min a 3°C.

El pellet (SMP) se resuspendió en ST y fue llevado a una concentración de 8 mg/mL y sonicado durante 50 segundos a máxima potencia (la temperatura no superó los 40°C). A continuación el sonicado se centrifugó en una ultracentrífuga Beckman Coulter Optima L-90 K a 35.000 rpm en rotor tipo 35 durante 100 min a 3°C. El precipitado se resuspendió en sacarosa 100 mM, ATP 4 mM y EDTA 2 mM (concentración final 8 mg/mL) y se llevó a pH 9,2 por

el agregado de NH_4OH . Esta suspensión se mantuvo con agitación suave a temperatura ambiente durante doce horas.

Segundo día:

La suspensión alcalina de SMP se sonicó durante 7,5 minutos utilizando baño hielo-agua. Luego se retiró del baño y se continuó con la sonicación hasta que dicha suspensión alcanzara los $50,5^\circ\text{C}$, luego de lo cual se enfrió rápidamente en baño de agua a temperatura ambiente (20°C). El sonicado se centrifugó utilizando una ultracentrífuga Beckman Coulter Optima L-90 K durante 100 min a 35.000 rpm en rotor tipo 35 a 20°C . El precipitado de esta centrifugación fue resuspendido en sacarosa 100 mM, EDTA 2 mM y ATP 4 mM y llevado a pH 9,2 por el agregado de NH_4OH repitiéndose el procedimiento descripto.

Los sobrenadantes se juntaron y se llevaron a pH 5,4 por el agregado de ácido acético 3 N. Luego se centrifugó utilizando una centrífuga IEC B-22M a 15.000 rpm en un rotor 875 durante 5 min a 20°C . Los sobrenadantes fueron llevados a pH 8,0 por el agregado de Tris 2 M. En la realización de esta etapa no deben transcurrir más de 10 minutos.

El sobrenadante neutralizado se sembró en una columna de DEAE-Sephadex A-50.120 previamente equilibrada con una solución conteniendo Tris-HCl 20 mM (pH 8,0), EDTA 2 mM y ATP 4 mM (TEA). La columna se lavó con TEA y luego con la misma solución más el agregado de Na_2SO_4 (concentración final = 100 mM). La ATPasa se eluyó con TEA más el agregado de Na_2SO_4 150 mM (concentración final). Las fracciones con actividad ATPásica fueron recogidas y precipitadas con 370 gramos de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por

litro de solución, manteniendo el pH 7,5 con NH_4OH . Los cristales se dejaron crecer a 4°C durante una noche.

Tercer día:

La suspensión en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se centrifugó utilizando una centrífuga IEC B-22M durante 20 min a 15.000 rpm en un rotor 875 a 4°C y el precipitado se resuspendió usando un pequeño volumen de un medio que contiene: sacarosa 250 mM, ATP 4 mM, EDTA 2 mM, Tris- H_2SO_4 10 mM (pH 7,5). Con el objeto de eliminar enzima desnaturalizada se centrifugó en una centrífuga IEC B-22M a 5.000 rpm en un rotor 877 durante 20 min a 20°C y el sobrenadante (F_1) fue conservado en nitrógeno líquido.

La pureza e integridad de la preparación se verificó por geles en condición desnaturalizante.

Típicamente se obtuvo una actividad específica igual a 120 UI/mg en presencia de 30 mM NaHCO_3 , empleando 1 mM ATP como sustrato.

2.4. Determinación de proteínas

La concentración de proteínas en mitocondrias y en SMP fue determinada utilizando el método de Biuret modificado (Suranyi E.V. y Avi Dor Y., 1966).

Para determinar la concentración de ATPasa soluble se utilizó el método de Lowry (Lowry O.H. y otros, 1951). El testigo empleado fue albúmina sérica bovina cuya concentración se determinó espectrofotométricamente a 280 nm ($A_{1\%} = 6,67$) de acuerdo a Foster y Sterman (1956).

2.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida

La electroforesis en geles en condiciones desnaturalizantes fue realizada de manera discontinua en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS) y β -mercaptoetanol (Laemmli U.K., 1970).

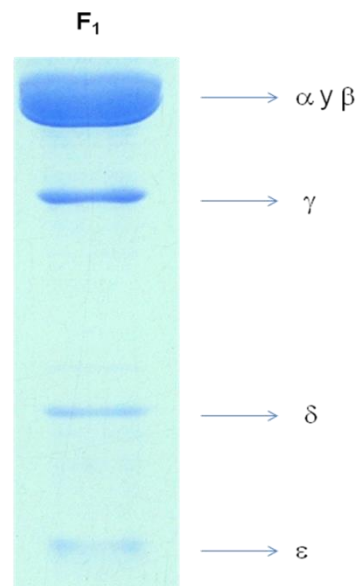


Figura 2.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en presencia de SDS. En la calle se muestra la corrida de 9 μ g de F₁.

2.6. Eliminación de nucleótidos libres y débilmente unidos a F₁

Previamente a las medidas cinéticas la preparación fue extraída del nitrógeno líquido, rápidamente descongelada y sometida a la técnica de filtración-centrifugación descrita por Penefsky (1977) para liberar a la misma de nucleótidos libres y débilmente unidos. Se utilizaron jeringas de 2 ml rellenas con Sephadex G-50 equilibrado con sacarosa 250 mM, EDTA 2 mM y Tris-H₂SO₄ 10 mM (pH 7,5). Una vez finalizado el tratamiento la solución así obtenida fue diluida entre 10 y 20 veces para los ensayos cinéticos. Tanto la solución “stock” como las diluciones fueron mantenidas a 30°C, temperatura a

la cual se observó la máxima estabilidad en concordancia con lo previamente informado por Gastaldi (2004).

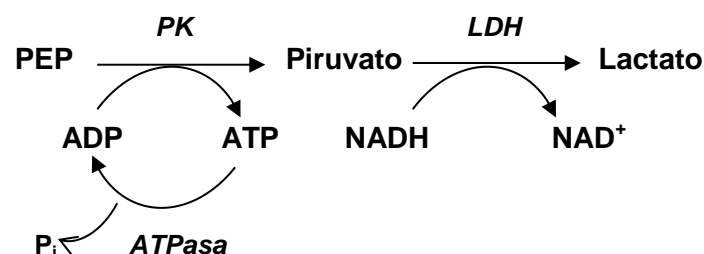
2.7. Ensayos cinéticos

Las reacciones enzimáticas se realizaron a 25°C cuando se trabajó con SMP y a 30°C cuando se lo hizo con F₁. Se utilizaron volúmenes finales de 1 mL, salvo que se indique lo contrario. Se trabajó en condiciones en las cuales la velocidad de reacción dependía de manera lineal con la cantidad de enzima utilizada.

Los estudios realizados fueron repetidos al menos con dos preparaciones distintas y por duplicado.

2.8. Medida de la actividad ATPásica

La actividad ATPásica fue determinada utilizando un sistema acoplado de piruvato quinasa/lactato deshidrogenasa (PK + LDH) regenerante de ATP (Pullman M.E. y otros, 1960). Este sistema permite mantener constante la concentración de ATP. Cada mol de ATP hidrolizado es acompañado por la oxidación de un mol de NADH, la cual se sigue espectrofotométricamente a 340 nm ($\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).



Esquema 2.1 Sistema enzimático utilizado para la medición de la hidrólisis de ATP.

La actividad ATPásica de F_1 soluble fue determinada empleando un medio de ensayo compuesto por sacarosa 100 mM, Tris-HCl 40 mM (pH 8,0), $MgCl_2$ 1 mM, PEP 4 mM, PK 5 UI/mL, LDH 5 UI/mL, NADH 0,3 mM y ATP-Mg variable.

La actividad ATPásica de SMP fue determinada en un medio similar salvo que la concentración de sacarosa fue igual a 180 mM y se adicionaron rotenona 3 μ M (inhibidor de la NADH deshidrogenasa) y FCCP 1,5 μ M (desacoplante).

Las reacciones fueron iniciadas por el agregado de proteína salvo que se indique lo contrario. Para las reacciones correspondientes a los estudios empleando SMP se utilizó 0,1 mg. En el caso de aquellas determinaciones utilizando F_1 soluble se adicionaron valores entre 0,1 y 5 μ g de proteína.

2.9. Activación de la ATPasa de partículas Mg-ATP

Las SMP obtenidas tal cual se describe más arriba, contiene cantidades importantes del inhibidor peptídico (IF_1) unido a F_1 , lo cual limita la actividad ATPásica de las mismas. La oxidación de succinato en condiciones acopladas genera un gradiente electroquímico de protones el cual induce la disociación de IF_1 con el consiguiente aumento de la actividad ATPásica de las SMP (van de Stadt R.J. y otros, **1973**; Roveri O.A., **1981**). Las SMP son incubadas en un medio conteniendo sacarosa 180 mM, Tris-HCl 40 mM (pH 7,5), $MgCl_2$ 1 mM, PEP 4 mM, rotenona 3,5 μ M, LDH 5 UI/mL, PK 5 UI/mL, NADH 0,3 mM, succinato 20 mM.

El diseño experimental empleado para activar la ATPasa de las SMP fue el siguiente: **i)** incubar las SMP (0,5 mg/mL) en el medio más arriba descrito, en condiciones acopladas y en aerobiosis a 25°C durante 20 minutos **ii)**

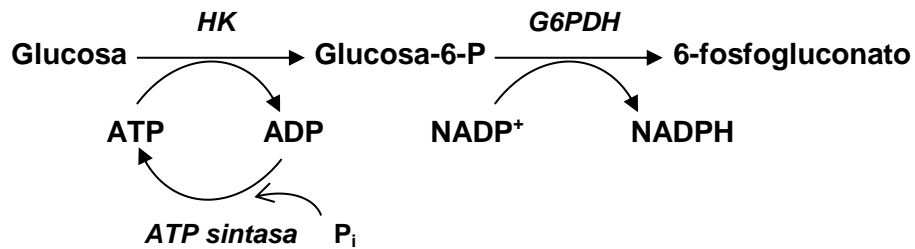
adicionar FCCP 1 μM y colocar las partículas en hielo; y **iii)** utilizar estas SMP activadas para hacer los estudios cinéticos correspondientes.

2.10. Medida de la velocidad de transporte de electrones

La medición de la velocidad de transporte de electrones en SMP se hizo a través de la determinación de la velocidad de consumo de oxígeno y para ello se utilizó un electrodo de Clark conectado a un oxígrafo YSI 5300. La cámara de reacción (2 ml volumen final) fue mantenida a 30°C con agitación continua. El medio de ensayo consistió en Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) y sacarosa 180 mM. Se emplearon como sustratos NADH 1 mM o succinato 10 mM. Las reacciones fueron iniciadas por el agregado de SMP. La concentración de oxígeno disuelto a 30°C en equilibrio con el aire utilizada para los cálculos fue 480 μmol de O₂/mL (Vallejos R.H., 1965).

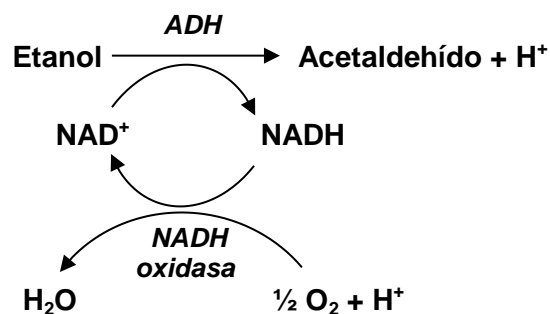
2.11. Medida de la velocidad de síntesis de ATP

Se determinó la velocidad de síntesis de ATP impulsada por la oxidación de NADH, utilizando un método continuo espectrofotométrico. El método consiste en utilizar un sistema enzimático acoplado compuesto por hexoquinasa (HK) a la que se le acopla como enzima monitora glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) (EC 1.1.1.49) (Cross R.L. y Kohlbrenner W.E., 1978). La síntesis de ATP se determina siguiendo la producción estequiométrica de NADPH espectrofotométricamente a 340 nm ($\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).



Esquema 2.2 Sistema enzimático utilizado para la medición de la síntesis de ATP.

La utilización de NADH como sustrato oxidable es un potencial problema para el método elegido, ya que éste monitorea la reacción siguiendo el aumento de absorbancia a 340 nm debido a la producción de NADPH, mientras que el consumo del sustrato oxidable (NADH) resultaría en una disminución de absorbancia. Para resolver este problema y además prolongar la linealidad de la reacción en el tiempo se usó un sistema regenerante de NADH, el cual permite mantener constante la concentración de este último. Dicho sistema está constituido por alcohol deshidrogenasa (ADH) y etanol. En presencia de ADH, el NAD^+ es reducido a NADH obteniéndose acetaldehído como producto.



Esquema 2.3 Sistema regenerante de NADH utilizado para la medición de la síntesis de ATP.

El medio de ensayo consistió en Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), MgCl_2 3 mM, glucosa 20 mM, AMP 11 mM, NADP^+ 0,75 mM, HK 15 UI/mL, G6PDH 15

UI/mL, ADH 35 UI/mL, etanol 50 mM y NADH 0,05 mM. Las concentraciones de ADP-Mg y fosfato fueron variables.

Al medio se agrega AMP para inhibir la actividad de la adenilato quinasa (ATP:AMP fosfotransferasa EC 2.7.4.3) presente en la preparación de SMP. A concentraciones bajas y altas de ADP (0,05 mM y 1 mM) y de fosfato (0,1 mM y 3,5 mM) se controló que la producción de ATP era totalmente inhibida por oligomicina. Este resultado confirma que 11 mM AMP es suficiente como para inhibir en dichas condiciones la adenilato quinasa, permitiendo por tanto una buena estimación de la actividad de la ATP sintasa.

Las reacciones de síntesis de ATP fueron iniciadas por el agregado de 0,05 mg/mL de SMP al medio de reacción.

Las velocidades de síntesis de ATP fueron calculadas en la porción lineal de las cinéticas, zona que corresponde al estado estacionario, en donde la velocidad de producción de NADPH es directamente proporcional a la velocidad de síntesis de ATP.

2.12. General

Rotenona y FCCP fueron disueltos en etanol de calidad espectrofotométrica, el cual fue obtenido por calentamiento a reflujo en presencia de Zn y NaOH, y posterior rectificación.

Los ajustes de las gráficas fueron realizados por regresión no lineal utilizando el algoritmo de Marquardt-Levenberg. Los parámetros de los ajustes son expresados como el valor esperado \pm el desvío estándar. Comparaciones múltiples fueron realizadas usando análisis de la varianza (ANOVA) de un solo sentido validado con el test de Student-Newman-Keuls. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

CAPÍTULO 3

3. Diseño y optimización de un método cinético continuo, simple y sensible para determinar ATP y ADP

3.1. Introducción

La determinación de trazas de ATP y/o ADP es de interés no solo para el estudio de muestras biológicas sino también en el análisis de medios de reacción empleados en estudios cinéticos que utilizan enzimas ATP o ADP dependientes. Por ejemplo, el método tradicional para el estudio cinético de las ATPasas (Pullman M.E. y otros, **1960**) utiliza un sistema acoplado de piruvato quinasa y lactato deshidrogenasa que permite determinar en forma continua la hidrólisis de ATP, manteniendo constante la [ATP] y permitiendo que la [ADP] (producto inhibidor de la reacción) se mantenga baja. Debido a que algunas ATPasas, entre ellas la ATPasa mitocondrial, exhiben una alta afinidad por su sustrato, las medidas cinéticas se deben realizar a bajas [ATP] (Roveri O.A. y Calcaterra N.B., **1985**). El NADH es un componente esencial del medio de reacción del sistema acoplado PK+LDH. Milgrom y otros (**1998**) han reportado que las preparaciones comerciales de NADH contienen como contaminantes trazas de ATP y ADP. Para conocer con exactitud la concentración de ATP en el medio de ensayo, es necesario contar con un método simple, rápido y sensible que permita determinar concentraciones sub-micromolares de ATP y/o ADP aportadas por los componentes del medio de reacción utilizado para determinar la actividad ATPásica.

Diversos métodos enzimáticos han sido desarrollados para determinar ATP o ADP. Entre ellos se encuentran los métodos (tanto de punto final como cinéticos) basados en el seguimiento espectrofotométrico de reacciones enzimáticas. Los más simples, usan una quinasa acoplada a una

deshidrogenasa, por ejemplo: HK + G6PDH para ATP (Lamprecht D. y Traustschold I., **1974**) y PK + LDH para ADP (Jaworek D. y otros, **1974**). Sin embargo, la sensibilidad de estos métodos está limitada por el coeficiente de absorción de NAD(P)H. Métodos enzimáticos más sensibles fueron desarrollados basados en la medición de la luminiscencia generada en la reacción de la luciferasa, la cual depende linealmente con la [ATP] (Lust W.D. y otros, **1981**). A pesar de su elevada sensibilidad, la reacción de la luciferasa exhibe inhibición por producto (De Luca M. y otros, **1979**). Por lo tanto, la cinética de emisión de luz es compleja. Además, a concentraciones de ATP bajas se observa un decaimiento rápido de las señales. Para solucionar esto, Sakakibara y otros (**1999**) desarrollaron un método que permite mantener la luminiscencia por más tiempo, acoplado a la reacción de la luciferasa la enzima piruvato ortofosfato diquinasa (encargada de regenerar ATP a partir de AMP y pirofosfato). Recientemente, Lee y otros (**2011**) describieron un procedimiento que no solo regenera ATP a partir de AMP (utilizando adenilato quinasa, UTP, acetato quinasa y acetil fosfato) sino también a partir de pirofosfato y adenosina 5' fosfo-sulfato, reacción catalizada por la ATP sulfurilasa. Esta amplificación exponencial del ATP genera un incremento de la sensibilidad del método de la luciferasa, el cual es adecuado para la determinación de la cantidad de unidades formadoras de colonias de *Escherichia coli*. Sin embargo, la optimización y el control de calidad de este ensayo son bastante complicados, debido a la cantidad de componentes del medio de reacción. Además, los métodos que utilizan luciferasa requieren instrumentación no siempre disponible en los laboratorios.

La búsqueda de una alta sensibilidad en el análisis cuantitativo de trazas de metabolitos ha transformado a los ciclos catalíticos de sustratos en una herramienta cuya aplicación ha crecido de manera considerable (Lowry O.H. y otros, **1961**). A su vez, la necesidad de contar con un método sensible y sencillo para determinar concentraciones sub-micromolares de ATP y ADP presentes como ligandos de proteínas y/o contaminantes de medios utilizados en el estudio cinético de reacciones enzimáticas, llevó a diseñar y optimizar un método cinético basado en un ciclo catalítico de sustrato.

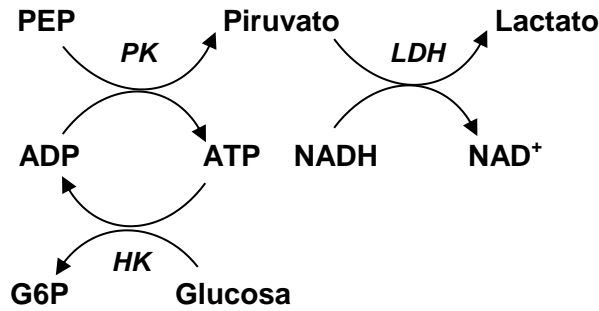
El método descrito en este Capítulo utiliza un ciclo compuesto por dos enzimas acopladas en dirección opuesta: HK y PK. La cinética de sistemas similares ha sido caracterizada por Passoneau y Lowry (**1993**) y por Valero y García Carmona (**1998**). Una vez iniciada la reacción se observa una fase de aceleración transiente luego de la cual se alcanza el estado estacionario. Para una estequiometría del tipo 1:1 la concentración de los metabolitos ATP+ADP se mantiene constante durante la reacción mientras los productos glucosa-6-fosfato y piruvato se acumulan linealmente en el tiempo. La velocidad de acumulación de estos productos es directamente proporcional a la cantidad original de ATP+ADP presente en la muestra.

Breckenridge (**1964**) ha utilizado el ciclo PK/HK como paso final en la determinación de 3,5-AMP, previamente convertido en ATP. El ciclo se detiene por calentamiento y luego de una centrifugación, se mide fluorométricamente la cantidad de glucosa-6-fosfato acumulada utilizando glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y NADP. A pesar de su alta sensibilidad, el método posee todas las desventajas de un método discontinuo: es bastante laborioso, por lo tanto más susceptible a errores y su realización demanda más tiempo.

El uso óptimo de los ciclos catalíticos de sustrato se logra cuando se puede medir de manera continua la acumulación de los productos del ciclo, ya sea directamente o por medio de una enzima monitora acoplada. Valero y García-Carmona (1998) optimizaron un método continuo para determinar cantidades bajas de glutamato basado en un ciclo enzimático que acopla las enzimas glutamato oxidasa y glutámico-pirúvica transaminasa y utiliza como enzima monitora del ciclo una peroxidasa.

El método discontinuo desarrollado por Breckenridge (1964) puede convertirse en un método continuo al acoplar la enzima LDH como monitora del ciclo PK/HK. Valero y otros (2004) han utilizado LDH para evaluar la velocidad del primer ciclo de un método constituido por dos ciclos acoplados. Sin embargo, no estudiaron en detalle el comportamiento cinético del sistema HK+PK+LDH como así tampoco su aplicación para la determinación cuantitativa de trazas de ATP y ADP.

Al acoplar al ciclo LDH como enzima monitora, la concentración de piruvato se mantiene constante y el NADH es oxidado linealmente en el tiempo. La velocidad de producción de piruvato, la cual se mide espectrofotométricamente a través del consumo de NADH a 340 nm, es un buen indicador de la velocidad del ciclo. Al alcanzarse el estado estacionario la concentración de nucleótidos en la muestra se mantiene constante en el tiempo y la velocidad de consumo de NADH es directamente proporcional a la [ATP+ADP] presente en la muestra.



Esquema 3.1 Representación esquemática del ciclo catalítico. PEP: fosfoenolpiruvato, PK: piruvato quinasa, HK: hexoquinasa, LDH: lactato deshidrogenasa, G6P: glucosa-6-fosfato.

Para derivar las ecuaciones que describen el sistema mostrado en el esquema de arriba, se plantean los siguientes supuestos según hicieron Valero y García-Carmona (1998) para un sistema similar:

- las concentraciones de ATP, ADP y piruvato son mucho menores que los valores de sus K_m para HK, PK y LDH, respectivamente. Por tanto las reacciones son de primer orden respecto de los metabolitos mencionados;
- las concentraciones de glucosa, PEP y NADH son suficientemente altas como para que su consumo durante el tiempo de reacción no las modifique de manera significativa.

Cumpliendo con estos supuestos, las ecuaciones diferenciales que describen el sistema mostrado en el **Esquema 3.1** son:

$$\frac{d[ADP]}{dt} = -k_{PK}[ADP] + k_{HK}[ATP] \quad (3.1)$$

$$\frac{d[ATP]}{dt} = k_{PK}[ADP] - k_{HK}[ATP] \quad (3.2)$$

$$\frac{d[Pir]}{dt} = k_{PK}[ADP] - k_{LDH}[Pir] \quad (3.3)$$

$$\frac{d[G6P]}{dt} = k_{HK}[ATP] \quad (3.4)$$

$$\frac{d[NAD]}{dt} = k_{LDH}[Pir] \quad (3.5)$$

$$\frac{d[NADH]}{dt} = -\frac{d[NAD]}{dt} = -k_{LDH}[Pir] \quad (3.6)$$

En donde k_i ($i = PK, HK, LDH$) son las constantes de velocidad de primer orden aparentes, las que dependen de la concentración de co-sustratos y enzimas.

La resolución de las **Ecuaciones 3.1 – 3.6** permite obtener las siguientes curvas de progreso (adaptado de Valero y García-Carmona (1998))

$$[ADP] = \frac{k_{PK}[ADP]_0 - k_{HK}[ATP]_0}{k_{PK} + k_{HK}} e^{-(k_{PK} + k_{HK})t} + \frac{k_{HK}[AXP]_0}{k_{PK} + k_{HK}} \quad (3.7)$$

$$[ATP] = -\frac{k_{PK}[ADP]_0 - k_{HK}[ATP]_0}{k_{PK} + k_{HK}} e^{-(k_{PK} + k_{HK})t} + \frac{k_{PK}[AXP]_0}{k_{PK} + k_{HK}} \quad (3.8)$$

$$[Pir] = -A_1 e^{-k_{LDH}t} - \frac{(k_{PK} + k_{HK})}{k_{LDH}} A_2 e^{-(k_{PK} + k_{HK})t} + \frac{k_{PK} k_{HK} [AXP]_0}{k_{LDH} (k_{PK} + k_{HK})} \quad (3.9)$$

$$[G6P] = \frac{k_{HK}(k_{LDH} - k_{PK} - k_{HK})}{k_{PK} k_{LDH}} A_2 [1 - e^{-(k_{PK} + k_{HK})t}] + \frac{k_{PK} k_{HK} [AXP]_0}{(k_{PK} + k_{HK})} t \quad (3.10)$$

$$[NAD] = A_1 e^{-k_{LDH}t} + A_2 e^{-(k_{PK} + k_{HK})t} + \frac{k_{PK} k_{HK} [AXP]_0}{(k_{PK} + k_{HK})} t + A_3 \quad (3.11)$$

$[ADP]_0$ y $[ATP]_0$ son las concentraciones iniciales de ADP y ATP y $[AXP]_0$ la suma de ambos. Las constantes A_1 , A_2 y A_3 son iguales a:

$$A_1 = -\frac{k_{PK} k_{HK} [AXP]_0 - k_{PK} k_{LDH} [ADP]_0}{k_{LDH} (k_{LDH} - k_{PK} - k_{HK})} \quad (3.12)$$

$$A_2 = -\frac{k_{PK} k_{LDH} (k_{PK} [ADP]_0 - k_{HK} [ATP]_0)}{(k_{PK} + k_{HK})^2 (k_{LDH} - k_{PK} - k_{HK})} \quad (3.13)$$

$$A_3 = -(A_1 + A_2) \quad (3.14)$$

La **Ecuación 3.11** muestra que luego de una fase de aceleración inicial (términos exponenciales), la reacción alcanza un estado estacionario cuando $t \rightarrow \infty$. En el estado estacionario las concentraciones de ADP, ATP, piruvato, G6P y NAD^+ dependen con el tiempo según las siguientes ecuaciones:

$$[ADP] = \frac{k_{HK}[AXP]_0}{k_{PK} + k_{HK}} \quad (3.15)$$

$$[ATP] = \frac{k_{PK}[AXP]_0}{k_{PK}+k_{HK}} \quad (3.16)$$

$$[Pir] = \frac{k_{PK}k_{HK}[AXP]_0}{k_{LDH}(k_{PK}+k_{HK})} \quad (3.17)$$

$$[G6P] = \frac{(k_{LDH}-k_{PK}-k_{HK})k_{HK}}{k_{PK}k_{LDH}}A_2 + \frac{k_{PK}k_{HK}[AXP]_0}{k_{PK}+k_{HK}}t \quad (3.18)$$

$$[NAD] = \frac{k_{PK}k_{HK}[AXP]_0}{k_{PK}+k_{HK}}t + A_3 \quad (3.19)$$

En resumen, cuando se alcanza el estado estacionario las concentraciones de ADP, ATP y piruvato se mantienen constantes (ver **Ecuaciones 3.15, 3.16 y 3.17**). Por tanto $\frac{d[ADP]}{dt} = \frac{d[ATP]}{dt} = \frac{d[Pir]}{dt} = 0$, mientras que las concentraciones de G6P y NAD⁺ (**Ecuaciones 3.18 y 3.19**) se incrementan de manera lineal ($\frac{d[G6P]}{dt} = \frac{d[NAD]}{dt} = cte \neq 0$) con el tiempo de reacción. La velocidad en el estado estacionario del sistema enzimático no depende de la enzima auxiliar LDH y es igual a:

$$v = \frac{d[NAD]}{dt} = -\frac{d[NADH]}{dt} = \frac{k_{PK}k_{HK}}{k_{PK}+k_{HK}}[AXP]_0 \quad (3.20)$$

La [NADH] disminuye de manera lineal con el tiempo de reacción siempre que la [ADP+ATP], k_{PK} y k_{HK} se mantengan constantes a lo largo de la misma. La primera condición es inherente al ciclo catalítico de sustrato, mientras que las constantes no variarán siempre y cuando: **i)** las concentraciones de co-sustratos (PEP y glucosa) no cambien significativamente durante el tiempo de reacción; y **ii)** la G6P y el NAD⁺ (productos que se acumulan) no se comporten como inhibidores.

En este capítulo de Tesis se describen los resultados obtenidos al estudiar la dependencia de la velocidad del ciclo catalítico con las concentraciones de enzimas, co-sustratos y cofactores. Por otra parte se

cuantifica la cantidad de ATP+ADP presente como traza contaminante en el NADH y en otros componentes del medio de reacción. Por último se muestra que con este procedimiento se puede detectar 10^{-11} moles de ATP o ADP y se discute la posibilidad de incrementar su límite de detección y sensibilidad.

3.2. Resultados y Discusión

3.2.1. Determinación de las concentraciones óptimas de co-sustratos (glucosa y PEP), de Mg^{2+} y enzima monitora (LDH)

Los valores de k_{PK} y k_{HK} no solo dependen de las concentraciones de enzimas presentes sino también de las de sus respectivos co-sustratos. De esta forma, a concentraciones de ADP+ATP y enzimas fijos, la velocidad del ciclo dependerá de la concentraciones de glucosa y PEP en el medio. Además las actividades de las quinasas dependerán también de la concentración del cofactor Mg^{2+} .

En la **Figura 3.1** puede observarse una dependencia hiperbólica de la velocidad del ciclo tanto con la concentración de glucosa como con la de PEP. Los valores de K_m aparentes (con $1 \mu M$ ADP) estimados por regresión no lineal de una hipérbola a los datos experimentales fueron $0,034 \pm 0,004$ y $0,065 \pm 0,009$ mM para glucosa y PEP, respectivamente. Los valores de $V_{máx}$ estimados a PEP ($13,9 \pm 0,4$ nmol min^{-1} mL^{-1}) y glucosa variables ($14,4 \pm 0,3$ nmol min^{-1} mL^{-1}) no fueron significativamente distintos entre ellos. Este tipo de experimento permitió establecer las concentraciones adecuadas de co-sustratos a utilizar de forma tal que su consumo a lo largo de la reacción no influyera sobre la velocidad del ciclo.

La velocidad de reacción también depende de la concentración de Mg^{2+} , un cofactor esencial de quinasas. Para evaluar su efecto se realizaron

determinaciones empleando distintas $[Mg^{2+}]$ en presencia de 0,2 y 0,5 μM ADP. En la **Figura 3.2** se observa que el catión se comporta como un activador a bajas concentraciones, mientras que a altas concentraciones lo hace como un inhibidor. Las mayores velocidades fueron observadas entre 1 y 3 mM Mg^{2+} .

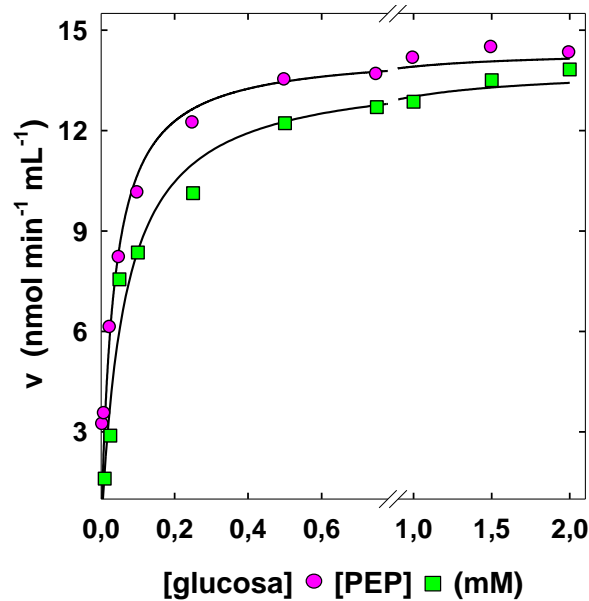


Figura 3.1 Efecto de glucosa y PEP sobre la velocidad de ciclo. Las reacciones fueron llevadas a cabo a 25°C en un medio conteniendo sacarosa 100 mM, KCl 10 mM y Tris-HCl 40 mM (pH 7,5), variando la concentración de glucosa y manteniendo fija la concentración de PEP (2 mM, ●) y variando la concentración de PEP a concentración fija de glucosa (1 mM, ■). Las concentraciones de los otros componentes fueron: LDH 5 UI/mL, PK 5 UI/mL, NADH 0,3 mM, $MgCl_2$ 2 mM y ADP 1 μM . La reacción fue iniciada con el agregado de 5 UI/mL de HK. Las líneas representan el mejor ajuste de una hipérbola rectangular a los valores experimentales.

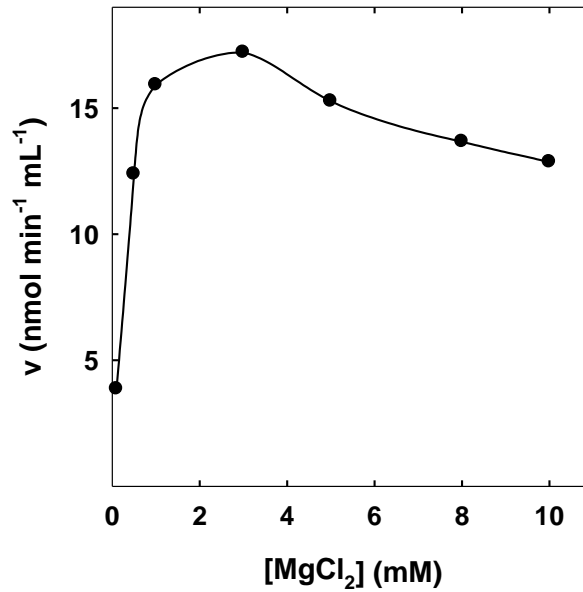


Figura 3.2 Efecto del cofactor MgCl₂ sobre la velocidad del ciclo. Las reacciones fueron llevadas a cabo en un medio conteniendo sacarosa 100 mM, KCl 10 mM, Tris-HCl 40 mM (pH 7,5), PEP 1 mM, glucosa 1 mM, LDH 5 UI/mL, PK 6,5 UI/mL, NADH 0,3 mM y ADP 0,2 μM. La reacción fue iniciada con el agregado de 6,5 UI/mL de HK.

Tal como se indicó previamente, la fase de aceleración inicial es seguida por la fase en estado estacionario donde el NAD⁺ se acumula linealmente en el tiempo (**Ecuación 3.19**). El tiempo de latencia τ es una medida de la duración de la fase de aceleración. En la **Figura 3.3-A** se muestra como a partir de una curva de progreso se estima τ . En la **Figura 3.3-B**, se muestra la dependencia de τ con distintas concentraciones de LDH a concentraciones fijas de PK y HK.

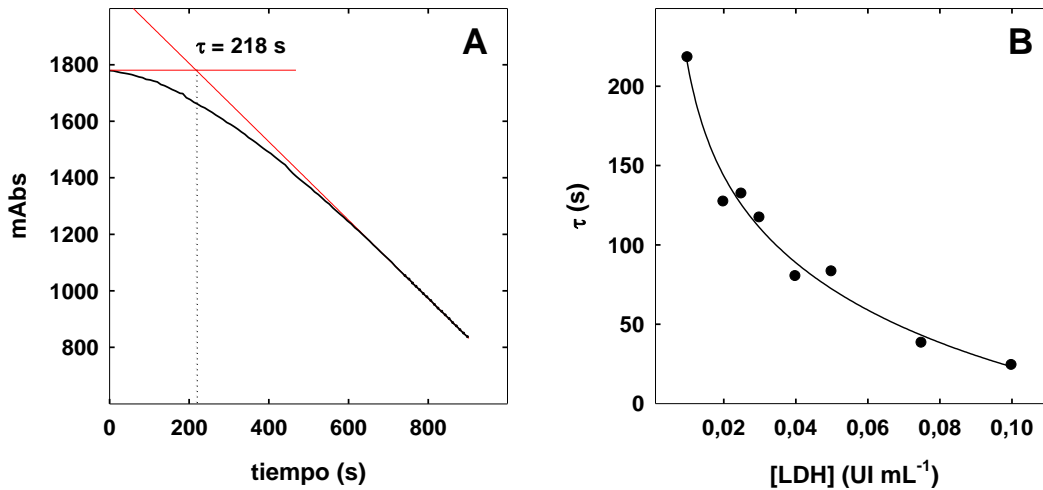


Figura 3.3 Estimación de τ . La reacción fue llevada a cabo en un medio conteniendo sacarosa 100 mM, KCl 10 mM, Tris-HCl 40 mM (pH 7,5), PEP 2 mM, glucosa 1 mM, MgCl₂ 2 mM, NADH 0,3 mM, ADP 0,5 μ M, HK 10 UI/mL y PK 10 UI/mL y fue iniciada por el agregado de distintas concentraciones de LDH. **A)** Curva de progreso obtenida por el agregado de 10 mUI/mL de LDH. El τ obtenido es de 218 segundos. **B)** Dependencia de τ con la [LDH]. La línea representa el mejor ajuste de la **Ecuación 3.21** a los puntos experimentales.

El tiempo de latencia depende con las concentraciones de nucleótidos y de las tres enzimas según se muestra en la siguiente Ecuación, cuyo ajuste a los datos experimentales se muestra en la **Figura 3.3-B**

$$\tau = \frac{1 - Ak_{LDH} + Bk_{LDH}^2}{k_{LDH} - Ck_{LDH}^2} \quad (3.21)$$

Donde

$$A = \frac{[ADP]_0}{k_{HK}[AXP]_0}$$

$$B = \frac{k_{PK}[ADP]_0 - k_{HK}[ATP]_0}{\lambda^2 k_{HK}[AXP]_0}$$

$$C = \frac{1}{\lambda}$$

$$\lambda = k_{PK} + k_{HK}$$

En resumen, teniendo en cuenta los resultados descritos en esta sección se resuelve utilizar 2 mM PEP y 1 mM glucosa (valores 30 veces

superiores a los K_m obtenidos, ver **Figura 3.1**), 2 mM $MgCl_2$ (**Figura 3.2**) y 5 UI/mL de LDH.

3.2.2. Estimación de k_{PK} y k_{HK}

Los parámetros k_{PK} y k_{HK} utilizados en las Ecuaciones anteriores dependen de manera lineal con la concentración de las enzimas respectivas. Si las $[PK]$ y $[HK]$ se expresan en Unidades Internacionales (UI/mL):

$$k_{PK} = f_{PK}[PK]_{UI} \quad k_{HK} = f_{HK}[HK]_{UI} \quad (3.22)$$

Las constantes de proporcionalidad f_{PK} y f_{HK} son función de las concentraciones de los cosustratos (PEP y glucosa), cofactores y de los parámetros cinéticos de PK y HK. Reemplazando en la **Ecuación 3.20**:

$$v = \frac{f_{PK}[PK]_{UI}f_{HK}[HK]_{UI}}{f_{PK}[PK]_{UI}+f_{HK}[HK]_{UI}} [AXP]_0 \quad (3.23)$$

Para confirmar dicho comportamiento y estimar los valores de f_{PK} y f_{HK} , se hicieron medidas variando una enzima del ciclo y manteniendo la otra constante. Por lo tanto, la dependencia de la velocidad del ciclo catalítico con la $[HK]$ manteniendo constante la $[PK]$ es:

$$v = \frac{f_{PK}[PK]_{UI} [HK]_{UI}}{\frac{f_{PK}[PK]_{UI}}{f_{HK}} + [HK]_{UI}} [AXP]_0 \quad (3.24)$$

La velocidad de reacción dependió con la $[HK]_{UI}$ de acuerdo a la **Ecuación 3.24 (Figura 3.4-A)**. Se observaron comportamientos similares cuando se probaron distintas concentraciones fijas de PK. Una forma simplificada de expresar la **Ecuación 3.24** es la siguiente ecuación empírica:

$$v = \frac{k^{app}[HK]_{UI}}{K^{app}+[HK]_{UI}} \quad (3.25)$$

donde k^{app} es la velocidad máxima del ciclo y K^{app} es la concentración de HK correspondiente a la mitad de la velocidad máxima para una dada

concentración de PK y de nucleótidos. Ambos parámetros dependen linealmente con PK (**Figura 3.4-B y 3.4-C**) de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$k^{app} = f_{PK}[AXP]_0[PK]_{UI} \quad (3.26)$$

$$K^{app} = \frac{f_{PK}}{f_{HK}}[PK]_{UI} \quad (3.27)$$

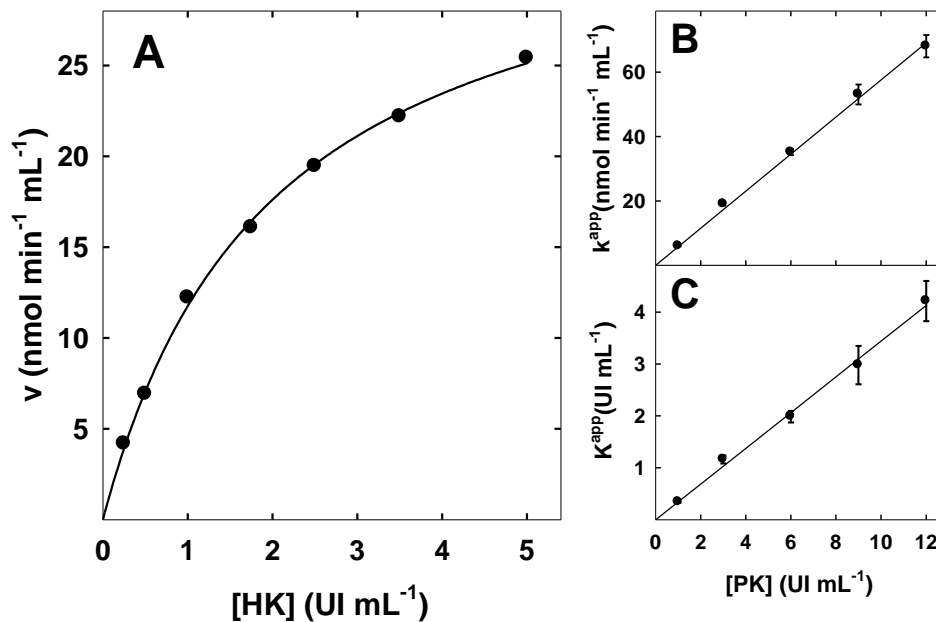


Figura 3.4 Dependencia de la velocidad de reacción con la [HK]. A) La velocidad de reacción fue medida empleando un medio similar al descrito en la **Figura 3.3**, cantidades variables de HK y fijas de PK (6 UI/mL). Las concentraciones de NADH, PEP, glucosa y MgCl₂ fueron 0,3, 2, 1 y 2 mM, respectivamente. La concentración de LDH fue de 5 UI/mL y la de ADP fue 1 μM. Las líneas representan el mejor ajuste de una hipérbola rectangular (**Ecuación 3.25**) a los valores experimentales, el cual permitió estimar los siguientes parámetros: $k^{app} = 35,1 \pm 0,8$ nmol min⁻¹ mL⁻¹ y $K^{app} = 2,0 \pm 0,1$ UI mL⁻¹. **B)** Los puntos representan los valores de k^{app} estimados a partir de experimentos similares a los mostrados en **(A)** llevados a cabo con distintas [PK]. La línea representa el mejor ajuste de la **Ecuación 3.26** a los valores estimados. **C)** Los puntos muestran valores de K^{app} estimados tal como se indica en **(B)** y la línea representa el mejor ajuste de la **Ecuación 3.27** a los valores estimados.

La pendiente de la línea de regresión de la **Figura 3.4-B** ($5,76 \pm 0,06$ nmol min⁻¹ UI⁻¹) permite estimar f_{PK} de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$f_{PK} = \frac{\text{pendiente}}{[AXP]_0} \quad (3.28)$$

Teniendo en cuenta que $[AXP]_0 = 1 \mu\text{M} = 1 \text{ nmol mL}^{-1}$ es posible estimar que $f_{PK} = 5,76 \pm 0,06 \text{ min}^{-1} \text{ UI}^{-1} \text{ mL} = 5,76 \pm 0,06 \text{ mM}^{-1}$.

De manera similar, utilizando la **Ecuación 3.27** y la pendiente de la línea de regresión de la **Figura 3.4-C** ($0,344 \pm 0,005$) es posible estimar el valor de f_{HK} si es conocido f_{PK} .

$$f_{HK} = \frac{f_{PK}}{\text{pendiente}} \quad (3.29)$$

Por tanto, $f_{HK} = 16,74 \pm 0,02 \text{ mM}^{-1}$.

Alternativamente, para obtener los valores de f_{PK} y f_{HK} se puede realizar un análisis global directo de la matriz de datos obtenidos con las distintas concentraciones de HK y PK. Si a ambos miembros de la **Ecuación 3.24** se los divide por $[AXP]_0$ se obtiene:

$$\frac{v}{[AXP]_0} = \frac{f_{PK}[PK]_{UI} [HK]_{UI}}{f_{HK}[PK]_{UI} + [HK]_{UI}} \quad (3.30)$$

El análisis global de las velocidades utilizando la **Ecuación 3.30** a diferentes concentraciones de PK, HK y ATP+ADP permitió obtener los valores de $f_{PK} = 5,61 \pm 0,15 \text{ mM}^{-1}$ y $f_{HK} = 15,46 \pm 0,08 \text{ mM}^{-1}$.

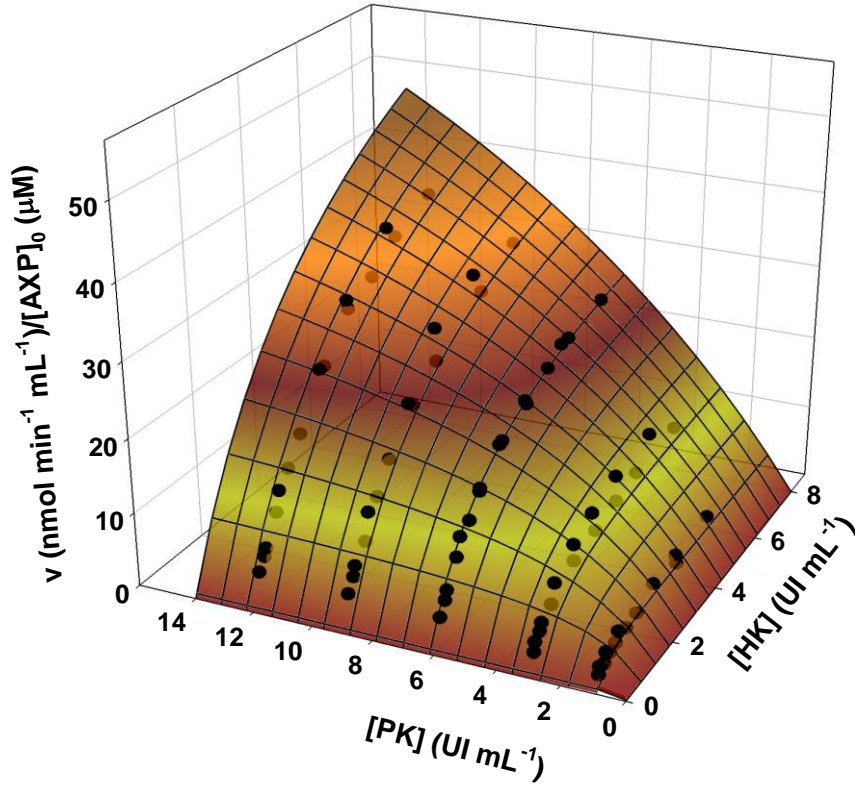


Figura 3.5 Dependencia de la velocidad de reacción con la [PK] y [HK]. La velocidad fue determinada utilizando un medio de reacción similar al que se describe en la **Figura 3.4**. Los puntos representan los valores experimentales obtenidos a concentraciones variables de PK y HK. La grilla indica la superficie descrita por el mejor ajuste de la **Ecuación 3.30** a los datos experimentales.

3.2.3. Significado de f_{PK} y f_{HK}

Varios autores han informado que ambas quinasas siguen un mecanismo secuencial al azar cercano a equilibrio (Ainsworth S. y otros, 1983; Fromm H.J. y otros, 1964; Fromm H.J. y Zewe V., 1962; Reynard A.M. y otros, 1961). Por tanto, las ecuaciones de velocidad para ambas enzimas son:

$$v_{PK} = \frac{V_{m\acute{a}x}[PEP][ADP]}{\alpha K_{PEP}K_{ADP} + \alpha K_{PEP}[ADP] + \alpha K_{ADP}[PEP] + [ADP][PEP]} \quad (3.31)$$

$$v_{HK} = \frac{V_{m\acute{a}x}[Gluc][ATP]}{\alpha K_{Gluc}K_{ATP} + \alpha K_{Gluc}[ATP] + \alpha K_{ATP}[Gluc] + [Gluc][ATP]} \quad (3.32)$$

En las condiciones del ciclo, las concentraciones de ADP y de ATP son mucho menores que los K_{ms} correspondientes. Por tanto, las ecuaciones de velocidad se reducen a:

$$v_{PK} = \frac{\frac{V_{m\acute{a}x}}{\alpha K_{PEP}} [ADP]}{\alpha K_{ADP} \left(1 + \frac{K_{PEP}}{[PEP]}\right) + [ADP]} \cong \frac{V_{m\acute{a}x} [ADP]}{\alpha K_{ADP} \left(1 + \frac{K_{PEP}}{[PEP]}\right)} \cong \frac{V_{m\acute{a}x}}{\alpha K_{ADP}} [ADP] \quad (3.33)$$

$$v_{HK} = \frac{\frac{V_{m\acute{a}x}}{\alpha K_{Gluc}} [ATP]}{\alpha K_{ATP} \left(1 + \frac{K_{Gluc}}{[Gluc]}\right) + [ATP]} \cong \frac{V_{m\acute{a}x} [ATP]}{\alpha K_{ATP} \left(1 + \frac{K_{Gluc}}{[Gluc]}\right)} \cong \frac{V_{m\acute{a}x}}{\alpha K_{ATP}} [ATP] \quad (3.34)$$

Por tanto:

$$v_{PK} = \frac{k_{cat(PK)} [PK]}{\alpha K_{ADP}} [ADP] = \frac{[PK]_{UI}}{\alpha K_{ADP}} [ADP] = k_{PK} [ADP] \quad (3.35)$$

$$v_{HK} = \frac{k_{cat(HK)} [HK]}{\alpha K_{ATP}} [ATP] = \frac{[HK]_{UI}}{\alpha K_{ATP}} [ATP] = k_{HK} [ATP] \quad (3.36)$$

A partir de las **Ecuaciones 3.35 y 3.36**:

$$f_{PK} = \frac{1}{\alpha K_{ADP}} \quad \text{y} \quad f_{HK} = \frac{1}{\alpha K_{ATP}} \quad (3.37)$$

De esta forma, a partir de los valores de f_{PK} y f_{HK} se pueden estimar los K_m aparentes para ADP y ATP que se observan bajo las condiciones experimentales utilizadas: $\alpha K_{ADP} = 0,17 \pm 0,02$ mM y $\alpha K_{ATP} = 0,06 \pm 0,01$ mM. Estos valores se corresponden razonablemente con los informados en la literatura (Reynard A.M. y otros, **1961**; Fromm H.J. y otros, **1964**; Fromm H.J. y Zewe V., **1962**).

3.2.4. Dependencia de la velocidad del ciclo con las concentraciones de ADP y NADH

En la **Figura 3.6** se muestra, a distintas $[NADH]$, la dependencia de la velocidad de reacción con el ADP agregado. La velocidad depende de manera

lineal con ADP de acuerdo al comportamiento predicho por la **Ecuación 3.23**. Sin embargo, a diferencia de lo establecido por dicha **Ecuación**, se observaron ordenadas al origen (y_0^{ADP}) distintas de cero, indicando que el medio de reacción posee ATP y/o ADP endógeno. Por tanto, la **Ecuación 3.23** debe ser modificada de la siguiente manera:

$$v = \frac{f_{PK}[PK]_{UI} f_{HK}[HK]_{UI}}{f_{PK}[PK]_{UI} + f_{HK}[HK]_{UI}} ([AXP]_0^{endógeno} + [AXP]_0^{agregado}) \quad (3.38)$$

Por tanto, la ordenada al origen (y_0^{ADP}) depende del AXP endógeno según una recta (**Figura 3.6-C**):

$$y_0^{ADP} = \frac{f_{PK}[PK]_{UI} f_{HK}[HK]_{UI}}{f_{PK}[PK]_{UI} + f_{HK}[HK]_{UI}} [AXP]_0^{endógeno} \quad (3.39)$$

En cambio, las pendientes de los gráficos mostrados en la **Figura 3.6-A** son independientes del mismo (**Figura 3.6-B**):

$$pendiente^{ADP} = \frac{f_{PK}[PK]_{UI} f_{HK}[HK]_{UI}}{f_{PK}[PK]_{UI} + f_{HK}[HK]_{UI}} \quad (3.40)$$

En los experimentos realizados a diferentes concentraciones de NADH se observan líneas rectas paralelas (**Figura 3.6-A** y **3.6-B**), con ordenadas al origen (y_0^{ADP}) que dependen linealmente con la concentración de NADH (**Figura 3.6-C**), lo cual señala la presencia de ATP y/o ADP en el NADH, tal como había sido previamente informado por Milgrom y otros (1998). Sin embargo, dado que la ordenada al origen en la **Figura 3.6-C** es significativamente distinta de cero ($4,2 \pm 0,1 \text{ nmol min}^{-1}\text{mL}^{-1}$), se concluye que otros componentes del medio de reacción están también contaminados con ATP y/o ADP.

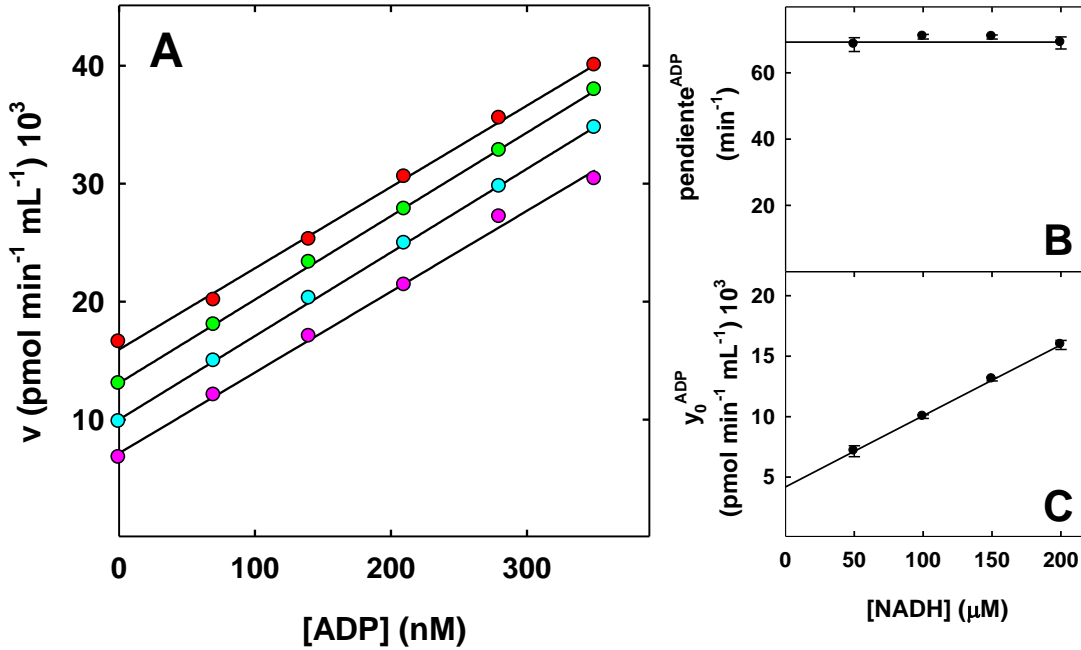


Figura 3.6 Dependencia de la velocidad del ciclo con [ADP] y [NADH]. A) La velocidad de reacción fue determinada empleando el medio de reacción que se describe en la **Figura 3.4** con las siguientes salvedades: PK 10 UI/mL, HK 20 UI/mL, y NADH 0,05 (●), 0,1 (●), 0,15 (●) y 0,2 (●) mM. Las líneas representan el mejor ajuste de una recta ($v = y_0^{ADP} + pendiente^{ADP} \times [ADP]$) a los valores determinados experimentalmente. En las gráficas (B) y (C) se muestran los valores de $pendiente^{ADP}$ y y_0^{ADP} estimados de los gráficos primarios. Las líneas representan el mejor ajuste de rectas a los valores estimados.

El ADP y/o ATP endógeno (AXP) es descrito por la siguiente **Ecuación**:

$$[AXP]_0^{end\acute{o}geno} = [AXP]_{MR} + AXP_{PK}[PK]_{UI} + AXP_{HK}[HK]_{UI} + AXP_{NADH}[NADH] \quad (3.41)$$

La presencia de nucleótidos en NADH, HK, PK y otros componentes del medio de reacción está representada por AXP_{NADH} , AXP_{HK} , AXP_{PK} y AXP_{MR} . En consecuencia, cuando los valores de y_0^{ADP} obtenidos a partir de la **Figura 3.6-A** son graficados en función de las concentraciones de NADH utilizadas (**Figura 3.6-C**), se obtiene una línea recta cuyas ordenadas al origen y pendiente están representadas por las siguientes ecuaciones:

$$y_0^{NADH} = \frac{f_{PK}[PK]_{UI} f_{HK}[HK]_{UI}}{f_{PK}[PK]_{UI} + f_{HK}[HK]_{UI}} ([AXP]_{MR} + AXP_{PK}[PK]_{UI} + AXP_{HK}[HK]_{UI}) \quad (3.42)$$

$$pendiente^{NADH} = \frac{f_{PK}[PK]_{UI}f_{HK}[HK]_{UI}}{f_{PK}[PK]_{UI}+f_{HK}[HK]_{UI}} AXP_{NADH} \quad (3.43)$$

El cociente entre $pendiente^{NADH}$ ($58,7 \pm 0,4 \text{ pmol min}^{-1} \text{ nmol}^{-1}$) y $pendiente^{ADP}$ ($69,3 \pm 0,5 \text{ min}^{-1}$) permite determinar que 1 nmol del NADH comercial utilizado contiene $0,85 \pm 0,01$ pmoles AD(T)P.

Con el fin de establecer cuáles son los otros componentes del medio de reacción que poseen trazas de ADP o ATP, se realizaron determinaciones utilizando distintas concentraciones de NADH, PK y HK, sin adicionar ATP ni ADP. Para simplificar, en todos los casos se utilizaron las mismas cantidades de PK y HK ($[PK]_{UI} = [HK]_{UI} = [XK]_{UI}$). En la **Figura 3.7-A** se muestran en función de la $[NADH]$ los valores de velocidad obtenidos a distintos valores constantes de $[XK]_{UI}$. La dependencia de las pendientes ($(pendiente^{NADH})_{XK}$) y de las ordenadas al origen ($(y_0^{NADH})_{XK}$) con la $[XK]_{UI}$ se muestra en las **Figuras 3.7-B y 3.7-C**. En este caso particular las **Ecuaciones 3.42 y 3.43** se pueden reescribir de la siguiente forma:

$$(y_0^{NADH})_{XK} = [AXP]_{MR} \frac{f_{PK}f_{HK}}{f_{PK}+f_{HK}} [XK]_{UI} + 2 \times \overline{AXP}_{XK} \frac{f_{PK}f_{HK}}{f_{PK}+f_{HK}} [XK]_{UI}^2 \quad (3.44)$$

$$(pendiente^{NADH})_{XK} = AXP_{NADH} \frac{f_{PK}f_{HK}}{f_{PK}+f_{HK}} [XK]_{UI} \quad (3.45)$$

Siendo $\overline{AXP}_{XK} = \frac{AXP_{PK}+AXP_{HK}}{2}$. Tal cual predicen estas Ecuaciones, en la **Figura 3.7-A** se observa una familia de líneas rectas que difieren en sus pendientes y ordenadas al origen según la concentración de enzima utilizada $[XK]_{UI}$. Las pendientes muestran una relación lineal con la $[XK]_{UI}$ con ordenada al origen que no difiere significativamente de cero (**Figura 3.7-B**), tal cual predice la **Ecuación 3.45**. Por regresión lineal pesada se pudo estimar un valor de pendiente para dicha recta igual a $0,0055 \pm 0,0001 \text{ min}^{-1} \text{ UI}^{-1}\text{mL}$, el cual no

difiere significativamente del calculado a partir de los valores de AXP_{NADH} , f_{PK} y f_{HK} estimados más arriba.

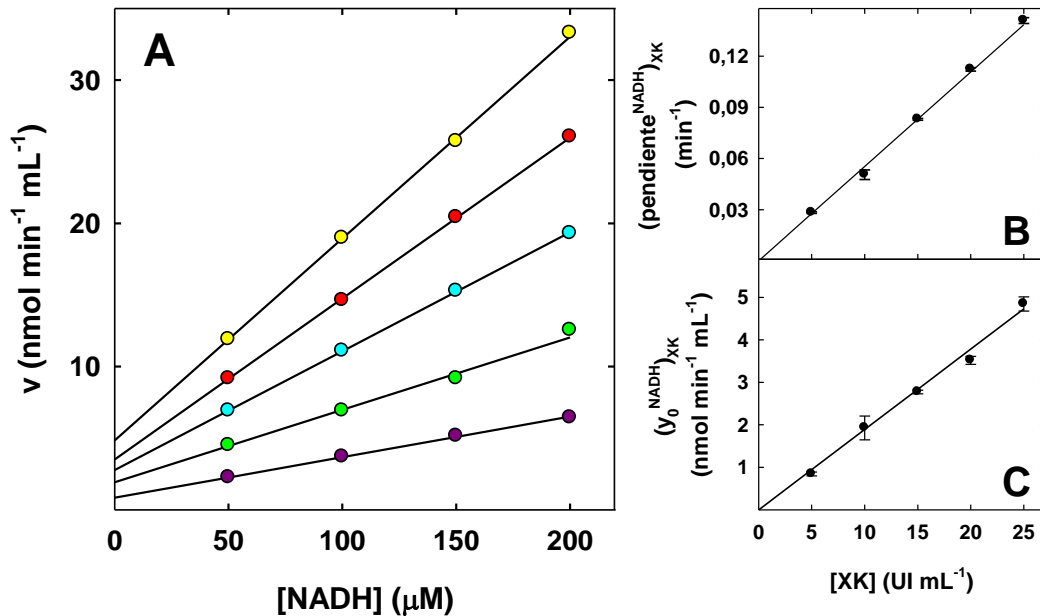


Figura 3.7 Evaluación de la presencia de AT(D)P endógeno en las enzimas PK y HK. **A)** La velocidad de reacción fue medida utilizando un medio similar al que se describe en la **Figura 3.4**, a diferentes [NADH] y empleando cantidades iguales de PK y HK: 5 (●), 10 (●), 15 (●), 20 (●), 25 (●) UI/mL. No fueron adicionados ni ADP ni ATP. Las líneas indican el mejor ajuste de una recta ($v = y_0^{NADH} + pendiente^{NADH} \times [NADH]$) a los valores determinados experimentalmente. **B)** Las pendientes ($pendiente^{NADH}$) de los gráficos mostrados en **(A)** son graficadas frente a [XK]. La línea sólida representa la regresión lineal pesada (ver **Ecuación 3.45**). **C)** Los puntos representan las ordenadas al origen estimadas a partir de los gráficos primarios mostrados en **(A)**. La línea sólida muestra el mejor ajuste a los valores estimados por regresión lineal.

Por otra parte las ordenadas al origen ($(y_0^{NADH})_{XK}$) estimadas a diferentes valores de $[XK]_{UI}$ (**Figura 3.7-A**) fueron graficadas en la **Figura 3.7-C**. De acuerdo con la **Ecuación 3.44**, los datos mostrados en la **Figura 3.7-C** dependerán linealmente con $[XK]_{UI}$ solo si PK y HK se encuentran libres de ADP y/o ATP contaminante ($\overline{AXP}_{XK} = 0$). El ajuste utilizando un polinomio de segundo grado ($(y_0^{NADH})_{XK} = a \times [XK]_{UI} + b \times [XK]_{UI}^2$) permitió estimar un valor de b que no difiere significativamente de cero, lo cual permite concluir

que las preparaciones de HK y de PK no poseen contaminación de ATP o ADP detectables por este procedimiento. Por tanto, en la **Figura 3.7-C** se muestra el ajuste realizado utilizando una función lineal $((y_0^{NADH})_{XK} = a \times [XK]_{UI})$.

3.2.5. Sensibilidad

La **Figura 3.8** muestra que la velocidad de la reacción del ciclo depende de manera lineal con la [ADP] tanto cuando se emplean 10 como 20 UI/mL de HK y de PK. En este caso particular ($[PK] = [HK]$), la **Ecuación 3.38** se modifica según se detalla:

$$(v)_{XK} = \frac{f_{PK}f_{HK}}{f_{PK}+f_{HK}} [XK]_{UI} ([AXP]_0^{end\acute{o}geno} + [AXP]_0^{agregado}) \quad (3.46)$$

Donde $(v)_{XK}$ es la velocidad cuando $[PK]_{UI} = [HK]_{UI} = [XK]_{UI}$. Por tanto de la **Ecuación 3.41**:

$$[AXP]_0^{end\acute{o}geno} = [AXP]_{MR} + AXP_{NADH}[NADH] + 2\overline{AXP}_{XK}[XK]_{UI} \quad (3.47)$$

En consecuencia:

$$(y_0^{ADP})_{XK} = \frac{f_{PK}f_{HK}}{f_{PK}+f_{HK}} [([AXP]_{MR} + AXP_{NADH}[NADH]) [XK]_{UI} + 2\overline{AXP}_{XK}[XK]_{UI}^2] \quad (3.48)$$

$$(pendiente^{ADP})_{XK} = \frac{f_{PK}f_{HK}}{f_{PK}+f_{HK}} [XK]_{UI} \quad (3.49)$$

Las ordenadas al origen $((y_0^{ADP})_{XK})$ dependen linealmente con la $[XK]_{UI}$ ($6,52 \pm 0,15 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$ (10 UI/mL) y $12,87 \pm 0,16 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$ (20 UI/mL)). Este resultado confirma la conclusión (ver sección **3.2.4**) de que las preparaciones de HK y PK no contienen cantidades detectables de ATP y/o ADP ($\overline{AXP}_{XK} = 0$ en la **Ecuación 3.48**).

Por otra parte, la sensibilidad del método depende de las concentraciones de enzimas del ciclo de acuerdo a la **Ecuación 3.49**. Esta ecuación predice que la sensibilidad incrementa de manera lineal con la $[XK]_{UI}$ tal cual muestran las pendientes estimadas por regresión lineal de los datos

presentados en la **Figura 3.8** ($0,302 \pm 0,006 \Delta\text{Abs min}^{-1} \text{ nmol}^{-1}$ para $[XK]_{UI} = 10 \text{ UI/mL}$ y $0,611 \pm 0,005 \Delta\text{Abs min}^{-1} \text{ nmol}^{-1}$ para 20 UI/mL). No obstante, el incremento de la sensibilidad está limitado por los supuestos que usualmente se hacen cuando se derivan ecuaciones cinéticas.

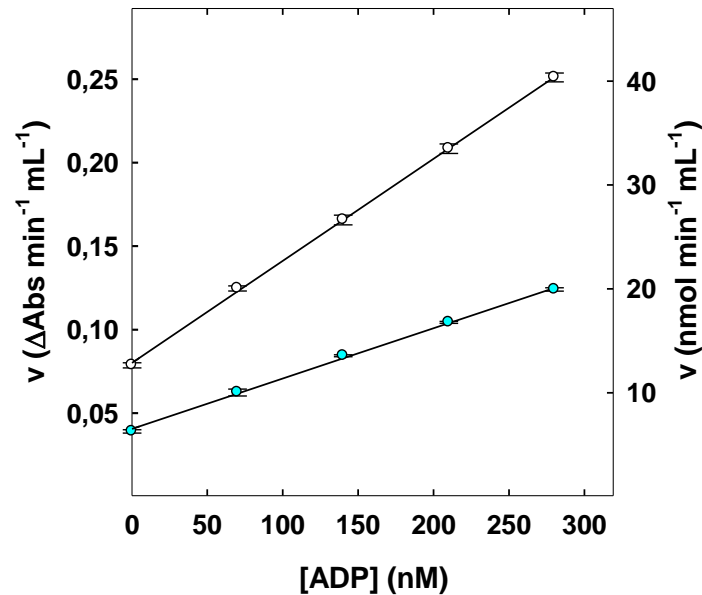


Figura 3.8 Dependencia de la sensibilidad con las enzimas PK y HK. La velocidad de reacción fue determinada empleando un medio esencialmente similar al descrito en la **Figura 3.4** a diferentes $[ADP]$ y utilizando concentraciones iguales de PK y HK: 10 (●) y 20 (○) UI/mL. La $[NADH]$ empleada fue de 0,1 mM. Los puntos indican el promedio para las determinaciones realizadas por triplicado. Las líneas representan el mejor ajuste (regresión pesada) de una recta ($v = y_0^{ADP} + pendiente^{ADP} \times [ADP]$) a los valores determinados experimentalmente.

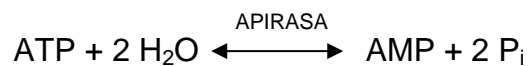
3.2.6. Límite de detección

El límite de detección (LOD) de ADP fue calculado utilizando la fórmula $LOD = 2 \times t_{0,05, m-2} \times s_0$ donde m es el número de determinaciones (cinco niveles de concentración analizados por triplicado) y s_0 la desviación estándar del blanco (Clayton C.A. y otros, **1987**; Currie L.A., **1999**). Se obtuvieron valores de 12,8 y 9,3 pmol cuando 10 y 20 UI/mL de cada quinasa fueron

utilizados (volumen del medio de reacción = 1 mL), respectivamente (**Figura 3.8**).

3.2.7. Eliminación de los nucleótidos presentes en el medio de reacción utilizado apirasa

Con el objeto de ampliar el rango dinámico del método deben disminuirse los valores de velocidad que se obtienen en ausencia de AXP agregado, los que son debidos a la presencia de nucleótidos contaminantes en los componentes del medio de reacción. Para ello se propone la utilización de la enzima apirasa (ATP difosfohidrolasa, E.C. 3.6.1.5), que cataliza la reacción:



Y que actúa también sobre ADP y otros nucleósidos difosfatos (NDP) y trifosfatos (NTP):



Para disminuir los valores de los blancos se preincubó el medio de reacción (no conteniendo PK, HK ni LDH) con apirasa durante 20 minutos a 25°C. A continuación, se inactivó la apirasa por incubación a 90°C durante 5 minutos y luego el medio fue enfriado en hielo (Valero E. y otros, **2000**). Una vez finalizado este procedimiento se agregaron las enzimas antes mencionadas para completar el medio de reacción y se procedió a determinar la velocidad de reacción a distintas [ADP]. En paralelo se hicieron determinaciones similares utilizando medio de reacción no tratado con apirasa. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 3.9**. La preincubación con apirasa disminuye de manera importante la ordenada al origen. Con el medio

de reacción no preincubado con apirasa se obtuvo un valor de ordenada al origen igual a $29,44 \pm 0,29 \text{ nmol min}^{-1}\text{mL}^{-1}$, mientras que el obtenido con el medio preincubado con apirasa ($1,12 \pm 0,52 \text{ nmol min}^{-1}\text{mL}^{-1}$) fue muy próximo a cero. En conclusión, el agregado de apirasa elimina de manera prácticamente total los nucleótidos presentes en el medio de reacción, permitiendo por tanto un aumento en el rango dinámico del método.

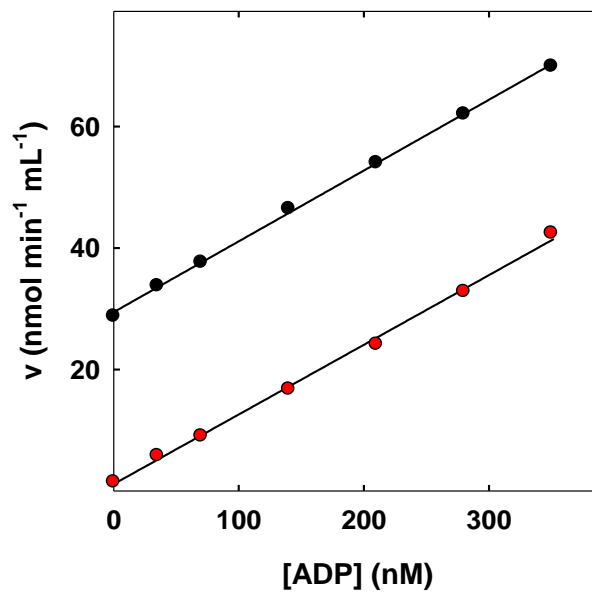


Figura 3.9 Eliminación de nucleótidos endógenos por pretratamiento del medio de reacción con apirasa. La velocidad de reacción fue determinada empleando un medio de reacción similar al que se describe en la **Figura 3.4** a diferentes [ADP] y utilizando 20 UI/mL de PK y HK y 0,2 mM NADH, el cual fue preincubado en presencia (●) y en ausencia de apirasa (●). Las líneas representan la regresión lineal de los valores determinados experimentalmente.

3.2.8. Consideraciones generales

Métodos más sensibles que el presentado en este Capítulo de Tesis han sido propuestos para la determinación de ATP o ADP. Sin embargo los mismos presentan los siguientes problemas: **i)** comportamiento cinético complejo que dificulta su puesta a punto, optimización y control de calidad; y **ii)** empleo de

instrumentación no siempre disponible. En cambio, el método presentado en este Capítulo de Tesis utiliza sólo un espectrofotómetro común y consiste esencialmente en determinar la velocidad de una disminución lineal de la absorbancia a 340 nm. El comportamiento cinético experimentalmente determinado coincide con el predicho a partir del análisis teórico del ciclo catalítico. Este método permite, utilizando las condiciones experimentales descritas en la **Figura 3.8**, la detección de aproximadamente 15 pmol de ATP o ADP, valor similar al de un ciclo sencillo auto-amplificado informado por Valero y otros (**2000**). Sin embargo, éste último procedimiento consiste en determinar un decaimiento exponencial de la [NADH], a diferencia del presentado aquí, que se basa en un decaimiento lineal. Recientemente, los mismos autores han presentado un ensayo utilizando un ciclo doble (Valero E. y otros, **2004**) con menor límite de detección (2,28 pmol). Si bien el método presentado en este trabajo de Tesis posee un LOD mayor, el mismo se basa en la determinación de la velocidad de una reacción lineal, procedimiento que es mucho más simple y más adecuado para la automatización que la determinación de la aceleración de una reacción (Valero E. y otros, **2004**).

El método posee una alta sensibilidad (ver **Sección 3.2.5.**), la cual puede ser incrementada aumentando los valores de HK y PK utilizados en el ensayo. Este incremento se verá limitado por los supuestos establecidos para la deducción de las ecuaciones cinéticas y por la presencia de ATP y/o ADP endógeno. La reproducibilidad fue evaluada midiendo soluciones patrón de 35 y 140 pmol/mL de ADP (10 repeticiones). Los desvíos estándar fueron 12,3 y 5,6 % respectivamente. La eliminación del ADP+ATP endógeno por pre

tratamiento de los reactivos con apirasa, disminuirían significativamente dichos valores.

El rango dinámico del método puede ser modificado usando diferentes cantidades de HK y/o PK. El incremento en el valor máximo del rango dinámico sólo estará limitado por restricciones teóricas (las [ADP] y [ATP] deben ser 10 veces menor que los valores de K_m correspondientes para cada quinasa) e instrumentales (tiempo de respuesta del instrumento).

3.3. Perspectivas

El método aquí presentado es un método simple, rápido y confiable, adecuado para medir la concentración de muestras que contienen de 10^{-11} a 10^{-9} mol del nucleótido. Utiliza equipamiento presente en cualquier laboratorio y pequeñas cantidades de enzimas fácilmente disponibles en el mercado. Debido a que se trata de un método que determina la velocidad de disminución lineal de la Absorbancia a 340 nm, es adecuado para su automatización. Ya sea en presencia de nucleótidos endógenos provenientes del NADH o de otro origen, se pueden llevar a cabo experimentos para identificar la fuente de contaminación y cuantificarla. De esta forma, fue posible demostrar que las enzimas PK y HK no contenían cantidades detectables de ATP y/o ADP. Por otra parte, se ha determinado que el lote del reactivo comercial 096K7033 de NADH utilizado en estos ensayos contenía 0,85 pmol ADP+ATP por nmol de NADH.

Este ensayo es particularmente útil cuando se realizan estudios cinéticos de enzimas ATP o ADP dependientes utilizando concentraciones micro y sub-micromolares de nucleótidos en presencia de NADH, como ocurre en el ensayo continuo de ATPasa (Pullman M.E. y otros, **1960**). El método también puede

ser utilizado para la determinación de nucleótidos firmemente unidos a proteínas (por ejemplo nucleótidos firmemente unidos a la F_1 -ATPasa) midiendo la cantidad de ATP+ADP luego de un tratamiento de la proteína con ácido perclórico (Harris D.A. y otros, **1973**).

Una desventaja del método es que el mismo no es capaz de discriminar entre ATP y ADP. Sin embargo, el tratamiento previo de las muestras a ensayar con enzimas capaces de: **i)** hidrolizar ATP a AMP y PP_i ; o **ii)** usar ATP en reacciones de adenilación o pirofosforilación, en ambos casos en combinación con pirofosfatasas, permitirá la destrucción del ATP y por tanto la determinación directa del ADP que contiene la muestra. La sustracción de este último valor del obtenido con mezclas no tratadas permitirá determinar el ATP en la muestra.

En general, se sugiere realizar una curva de calibración con una solución de ADP titulado abarcando un rango de concentración que incluya la [ADP+ATP] que se estima posee la muestra. Para muestras que contengan entre 50 y 2000 pmol se recomienda utilizar 10 UI/mL de PK y HK (ver **Figura 3.8**). Para muestras que contengan menos de 50 pmol, se debe disminuir la señal del blanco pre-tratando los medios con apirasa y trabajar con mayores concentraciones de enzimas PK y HK.

CAPÍTULO 4

4. Efecto de sulfito sobre la actividad ATPásica de F₁ mitocondrial

4.1. Introducción

En este Capítulo se presentan los resultados obtenidos al estudiar el efecto de sulfito sobre el comportamiento cinético de la hidrólisis de ATP catalizada por la ATPasa soluble (F₁) de mitocondrias de miocardio bovino. Con el objeto de tratar de identificar el sitio de acción de sulfito, se realizaron estudios cinéticos utilizando mezclas de sulfito con sulfato y con bicarbonato.

4.2. Resultados y Discusión

4.2.1. Determinación de nucleótidos presentes en el medio de reacción utilizado para medir la actividad ATPásica de F₁

El método tradicional para el estudio cinético de la ATPasa mitocondrial utiliza un sistema acoplado PK + LDH (Pullman M.E. y otros, **1960**) y requiere realizar determinaciones a concentraciones micromolares de ATP (Roveri O.A. y Calcaterra N.B., **1985**). Dicho sistema utiliza NADH, cuyas preparaciones comerciales suelen estar contaminadas con ATP y/o ADP (Milgrom Y.M. y otros, **1998**). Por tanto, previo a las determinaciones es necesario conocer con la mayor exactitud posible la cantidad de ADP+ATP endógeno presente en el medio de reacción preparado para los ensayos cinéticos, para lo cual se utilizó el método cinético descrito en el **Capítulo 3** de este trabajo de Tesis, el cual se basa en determinar la velocidad de reacción de un ciclo catalítico de sustrato. Se determinó la velocidad de reacción del ciclo en ausencia y en presencia de cantidades conocidas de ADP adicionadas al medio de reacción. En la **Figura 4.1** se muestra un ejemplo de la determinación de ATP+ADP

endógenos en un “batch” de medio de reacción preparado para ensayos cinéticos de la actividad de F_1 . Se observa que la velocidad del ciclo catalítico depende de manera lineal con la cantidad de ADP adicionado. La extrapolación de la recta al eje de las abscisas, permite estimar que 1 mL de ese medio de reacción contiene 325 pmoles de ATP+ADP. Esta determinación fue realizada cada vez que se preparó medio reacción para un conjunto de ensayos cinéticos. La concentración real de ATP fue estimada sumando al ATP agregado el endógeno determinado como se describe más arriba.

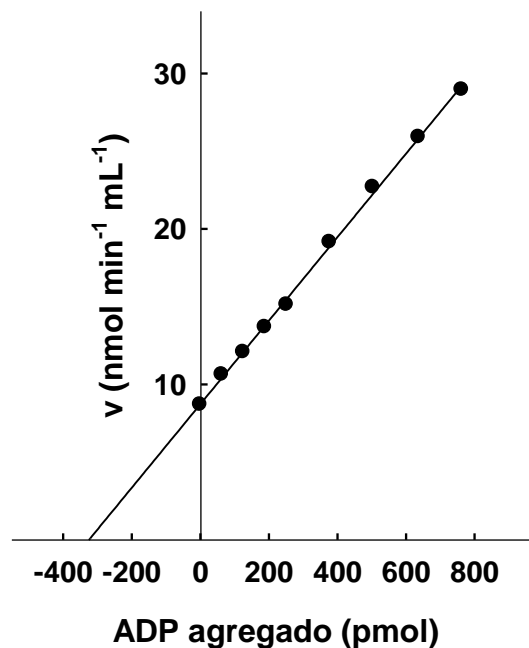


Figura 4.1 [ADP+ATP] endógeno presente en el medio de reacción utilizado para medir actividad ATPásica de F_1 . Se agregaron distintas cantidades de ADP a un medio compuesto por: sacarosa 100 mM, Tris-HCl 40 mM (pH 8,0), $MgCl_2$ 1 mM, PEP 4 mM, glucosa 1 mM, PK 5 UI, LDH 5 UI, NADH 0,3 mM (volumen final 1 mL). Las reacciones fueron iniciadas por el agregado de HK (10 UI). La línea representa el mejor ajuste de una recta a los valores determinados experimentalmente.

4.2.2. Análisis de las cinéticas de hidrólisis de ATP por F_1

Tal cual se describió en Materiales y Métodos, para los estudios cinéticos de la actividad ATPásica de F_1 se utilizó un sistema acoplado de PK y LDH. Con este sistema se puede no sólo seguir la reacción espectrofotométricamente midiendo el consumo de NADH sino que además permite: **i)** mantener la [ATP] constante; y **ii)** la [ADP] no sólo constante sino lo suficientemente baja como para hacer despreciable la inhibición por producto. Este sistema debiera producir cinéticas lineales con el tiempo de reacción. Sin embargo, la reacción de hidrólisis de ATP catalizada por F_1 muestra un comportamiento bifásico con el tiempo de reacción (Jault J-M. y Allison W.S., **1993** y Lodeyro A.F., **2002**). Este comportamiento permite estimar valores de velocidad inicial (v_i) y final (v_f) para cada uno de los perfiles cinéticos observados. Operacionalmente se definió como v_i a la velocidad medida dentro del primer minuto de la cinética de reacción mientras que v_f es la velocidad alcanzada en el estado estacionario.

En la **Figura 4.2** se muestran perfiles representativos obtenidos a 0,05, 0,2 y 0,8 mM ATP. En el primer caso se observa claramente que la reacción se acelera con el tiempo mientras que en el último la misma se inhibe de manera progresiva hasta un valor límite. En cambio a concentraciones intermedias no se observó una desviación notable respecto de un comportamiento lineal con el tiempo.

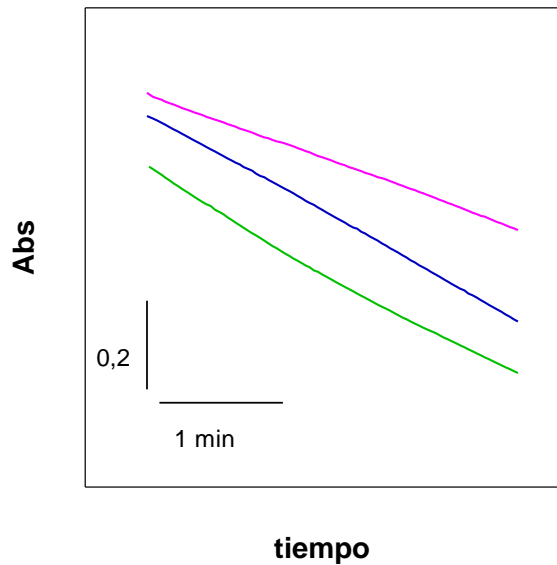


Figura 4.2 Progreso temporal de las reacciones de hidrólisis de ATP catalizadas por F_1 . Perfiles cinéticos que se observan en presencia de 0,05 (—), 0,2 (—) y 0,8 (—) mM ATP. Las reacciones fueron determinadas tal cual se detalla en Materiales y Métodos utilizando 1,5 μg de F_1 para 0,05 mM ATP y 0,7 μg de F_1 para las otras dos concentraciones.

4.2.3. Efecto de sulfito sobre la cinética de hidrólisis de ATP por F_1

Se estudió el efecto de sulfito sobre el progreso temporal de la reacción de hidrólisis de ATP catalizada por F_1 soluble. Se utilizaron concentraciones de ATP en el rango de 0,025 a 1,5 mM. La presencia de sulfito modifica los comportamientos descritos en la **Sección 4.2.2**. En la **Figura 4.3** se muestran perfiles cinéticos representativos. A 0,025 mM ATP, concentración a la cual se observa una activación progresiva para el control, la cinética es prácticamente lineal en presencia de sulfito 1 mM, mientras que con sulfito 30 mM se observa una inhibición progresiva de la misma. En cambio a 0,25 mM ATP, concentración a la cual la cinética del control es lineal, se observa una inhibición progresiva en presencia de ambas concentraciones de sulfito. Por último, a concentraciones altas de ATP (1,5 mM) tanto en ausencia como en presencia de sulfito (1 o 30 mM) se observa una inhibición progresiva hasta alcanzar una v_f constante, comportamiento que se acentúa a 30 mM sulfito.

Además, para todas las concentraciones de ATP empleadas, se pudo observar que sulfito 1 mM aumentaba las v_i respecto del control, mientras que sulfito 30 mM las disminuía (ver **Sección 4.2.4**).

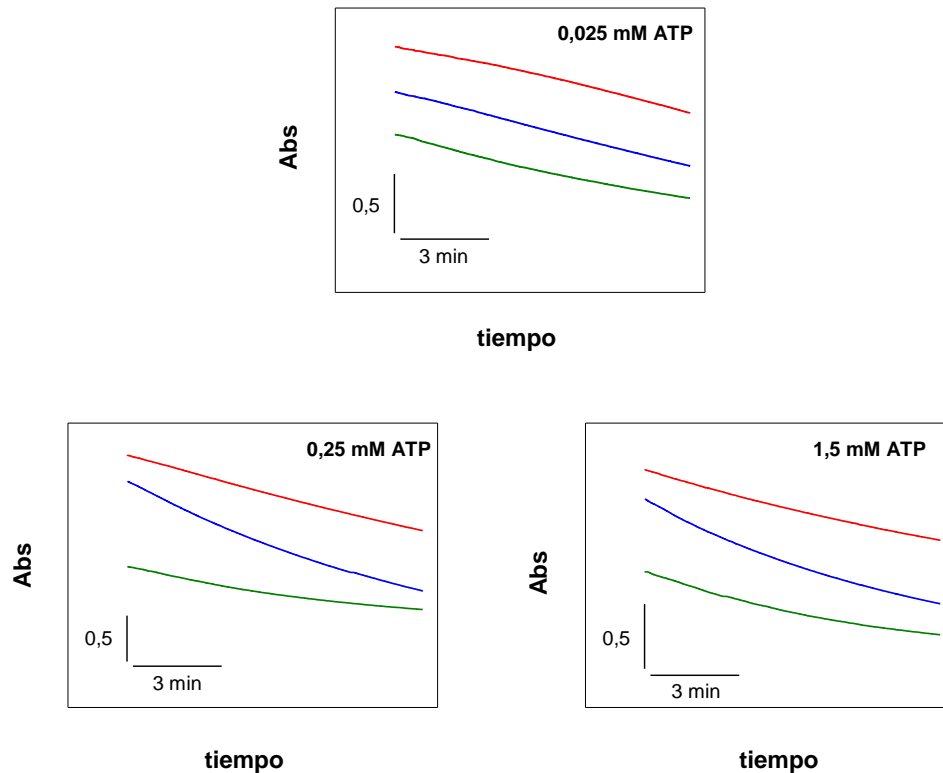


Figura 4.3 Efecto de sulfito sobre el progreso temporal de la reacción de hidrólisis de ATP catalizada por F_1 . Las reacciones fueron determinadas tal cual se detalla en Materiales y Métodos e iniciadas por el agregado de 1, 0,5 y 0,3 μg de F_1 al medio de reacción para 0,025, 0,25 y 1,5 mM ATP respectivamente. Control (—), sulfito 1 mM (—), sulfito 30 mM (—).

4.2.4. Efecto de sulfito sobre la actividad ATPásica de F_1

Se determinó el efecto de sulfito (0,01 – 30 mM) sobre la actividad ATPásica de F_1 a distintas concentraciones de ATP. En todos los experimentos que se describen a continuación se adicionó la cantidad necesaria de acetato con el objeto de mantener constante la fuerza iónica (Lodeyro A.F., **2002**).

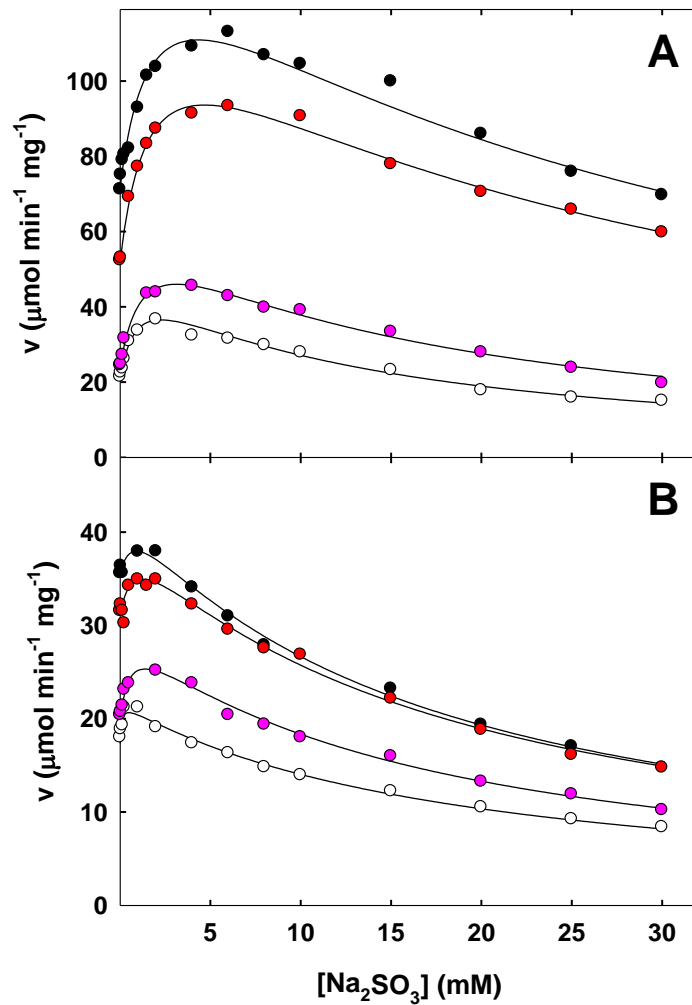


Figura 4.4 Efecto de sulfito sobre la actividad de F_1 a distintas concentraciones de ATP. El medio de reacción fue preparado tal cual se detalla en Materiales y Métodos manteniendo la fuerza iónica constante con acetato de sodio en 84 mM y se determinaron los valores de v_i y v_f tal cual se explica en el texto. Las reacciones se iniciaron por el agregado de: 0,8, 0,5, 0,2 y 0,2 μg de F_1 para 0,025 (\circ), 0,05 (\bullet), 0,25 (\bullet) y 0,5 (\bullet) mM ATP respectivamente. En el panel **(A)** se muestran los valores de velocidades iniciales y en el **(B)** los de velocidades finales.

En la **Figura 4.4** se puede observar que a todas las $[\text{ATP}]$ ensayadas la dependencia de v_i de reacción con la $[\text{Na}_2\text{SO}_3]$ muestra un máximo indicando que a bajas concentraciones sulfito se comporta como activador no esencial mientras que a altas lo hace como un inhibidor. La v_f fue afectada de manera

similar, salvo que el efecto activador observado a bajas concentraciones de sulfito fue menos notorio.

El análisis de los experimentos mostrados en la **Figura 4.4** permitió concluir que la inhibición observada a altas concentraciones de sulfito fue completa, dado que el valor de velocidad estimada extrapolando los valores experimentales de velocidad a concentración infinita de sulfito no fue significativamente distinto de cero.

Las líneas de la **Figura 4.4** representan el mejor ajuste de la **Ecuación 4.1** a los valores experimentales.

$$v = \frac{v_0 + \frac{v_A}{K_a}[Na_2SO_3]}{1 + \left(\frac{1}{K_a} + \frac{1}{K_i}\right)[Na_2SO_3] + \frac{1}{K_a K_i}[Na_2SO_3]^2} \quad (4.1)$$

Donde v_0 es la velocidad de la reacción en ausencia de sulfito; v_A la que se hubiera obtenido a concentración infinita del anión en ausencia del efecto inhibitorio producido por altas concentraciones del mismo; y K_a y K_i las constantes de activación e inhibición respectivamente.

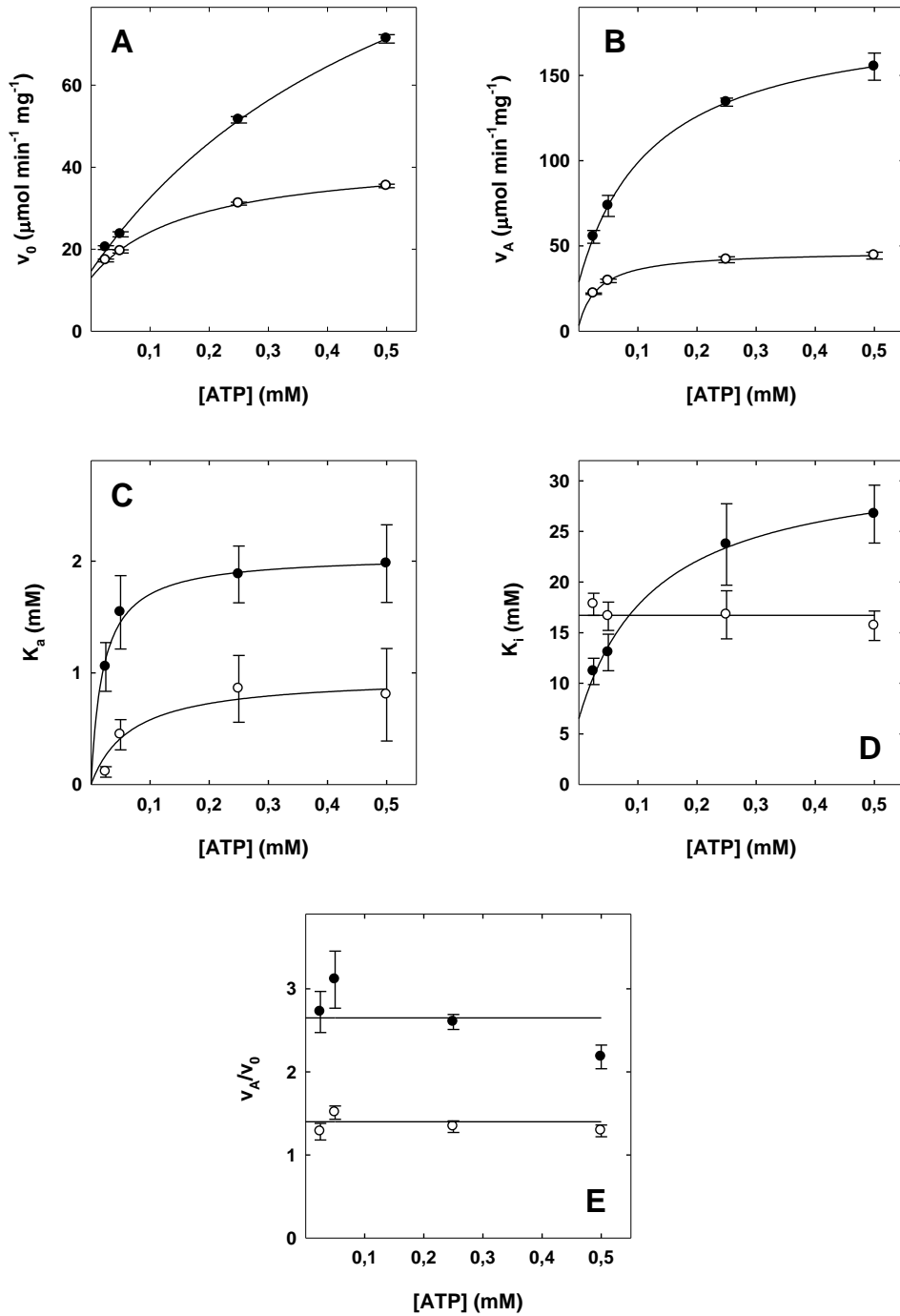


Figura 4.5 Gráficas secundarias obtenidas a partir de la Figura 4.4. Dependencia de v_0 (A), v_A (B), K_a (C), K_i (D) y v_A/v_0 (E) con la concentración de ATP. Los puntos en todos los casos representan los valores estimados ajustando la **Ecuación 4.1** a los valores experimentales de velocidades iniciales (símbolos llenos) y de velocidades finales (símbolos vacíos) indicados en la **Figura 4.4**. Las líneas corresponden a los ajustes indicados en el texto y en la **Tabla 4.1**.

La dependencia con la [ATP] de v_0 (**Figura 4.5-A**) y v_A (**Figura 4.5-B**) puede ser descrita por una hipérbola que no pasa por el origen (**Tabla 4.1**). Sulfito aumentó un 170% la velocidad inicial y un 40% la velocidad final (**Figura 4.5-E**).

Tabla 4.1 Dependencia con la [ATP] de los parámetros estimados a partir de la **Figura 4.4**.

		y	y_0	y_∞	K_{ATP}
v_0	$y = y_0 + \frac{(y_\infty - y_0)[ATP]}{K_{ATP} + [ATP]}$	v_i	$14 \pm 1^{**}$	$124 \pm 11^{**}$	$0,59 \pm 0,10^*$
		v_f	$13 \pm 1^{**}$	$30 \pm 1^{**}$	$0,17 \pm 0,04^*$
v_A		v_i	$29 \pm 1^{**}$	$158 \pm 1^{**}$	$0,13 \pm 0,06^*$
		v_f	$3,2 \pm 0,2^{**}$	$43,8 \pm 0,2^{**}$	$0,033 \pm 0,004^*$
K_a		v_i	0	$2,05 \pm 0,05^*$	$0,021 \pm 0,003^*$
		v_f	0	$1,0 \pm 0,1^*$	$0,068 \pm 0,044^*$
K_i		v_i	$6,5 \pm 2,3^*$	$25,6 \pm 1,6^*$	$0,128 \pm 0,059^*$
		v_f	$16,5 \pm 0,4^*$		-
$\frac{v_A}{v_0}$		v_i	$2,7 \pm 0,4$		-
		v_f	$1,4 \pm 0,1$		-

* mM; ** $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$.

En cambio, una hipérbola que intersecta al eje y en un punto que no difiere significativamente de cero pudo ser ajustada a los valores de K_a estimados para ambas velocidades (**Figura 4.5-C**).

Los valores de K_i estimados para el efecto de sulfito sobre las velocidades iniciales dependieron con la [ATP] de acuerdo a una hipérbola que

no pasa por el origen. El valor estimado para $[ATP] \rightarrow 0$ fue igual 6 ± 2 mM y a 26 ± 2 mM para $[ATP] \rightarrow \infty$. La mitad de la variación se obtuvo con $0,128 \pm 0,059$ mM ATP (**Figura 4.5-D**, círculos llenos). No se observó dependencia significativa de los valores de K_i (≈ 17 mM) estimados para las velocidades finales con la $[ATP]$ (**Figura 4.5-D**, círculos vacíos).

4.2.5. Efecto de sulfito sobre los parámetros cinéticos de la actividad ATPásica de F_1

Para completar la caracterización del efecto dual de sulfito sobre la actividad ATPásica, se estimaron los parámetros cinéticos a partir de titulaciones con ATP hechas en ausencia y en presencia de concentraciones bajas (1 mM) y altas (30 mM) del anión (**Figura 4.6**).

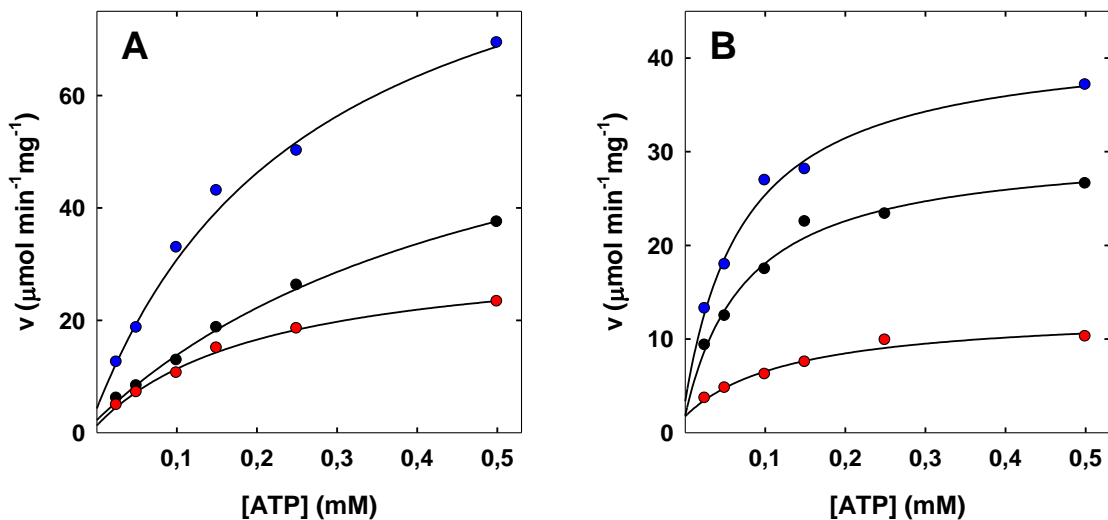


Figura 4.6 Efecto de sulfito sobre el comportamiento cinético de la actividad ATPásica de F_1 . Los datos experimentales fueron obtenidos tal cual se detalla en Materiales y Métodos, en ausencia (●) y en presencia de sulfito 1 (●) y 30 (●) mM. En todos los casos la fuerza iónica se mantuvo constante (84 mM) por el agregado de acetato de sodio. En el panel (A) se muestran los valores de v_i y en el (B) los de v_f . Las líneas representan el mejor ajuste de la siguiente ecuación $v = v_{ATP=0} + V_{m\acute{a}x} [ATP] / (K_{m(ATP)} + [ATP])$ a los datos experimentales.

En la **Tabla 4.2** se detallan los valores de $K_{m(ATP)}$ y $V_{m\acute{a}x}$ estimados a partir de los datos mostrados en la **Figura 4.6**. Sulfito 30 mM inhibe la hidrólisis de ATP disminuyendo los valores de $K_{m(ATP)}$ y $V_{m\acute{a}x}$, mientras que sulfito 1 mM estimula la reacción aumentando (aunque de manera no estadísticamente significativa) $V_{m\acute{a}x}$ y disminuyendo $K_{m(ATP)}$. Efectos similares se observan para v_f excepto que en este caso no se observa un efecto significativo de sulfito sobre los valores de $K_{m(ATP)}$. Además los efectos sobre v_f son menos notorios que sobre v_i (**Figura 4.5**).

Tabla 4.2 Parámetros cinéticos de la actividad ATPásica de F_1 obtenidos a partir de la Figura 4.6

VELOCIDAD INICIAL		
	$V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	$K_{m(ATP)}$ (mM)
Control	65 ± 6	0,37 ± 0,06
Sulfito 1 mM	94 ± 6 ^{ns}	0,19 ± 0,02 ^(p = 0,03)
Sulfito 30 mM	31 ± 2 ^(p = 0,0002)	0,17 ± 0,02 ^(p = 0,007)
VELOCIDAD FINAL		
	$V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	$K_{m(ATP)}$ (mM)
Control	29 ± 3	0,063 ± 0,009
Sulfito 1 mM	41 ± 2 ^(p = 0,002)	0,059 ± 0,008 ^{ns}
Sulfito 30 mM	12 ± 1 ^(p = 0,003)	0,075 ± 0,016 ^{ns}

^{ns} No hay diferencia significativa con el control ($p > 0,05$).

4.2.6. Efecto de mezcla de aniones

Se estudió el efecto de mezclas de aniones sobre la actividad ATPásica de F_1 (Figura 4.7). Tal cual ha sido informado (Roveri O.A. y Calcaterra N.B., 1985) bicarbonato es un activador no esencial, comportándose de acuerdo a la siguiente Ecuación:

$$v = v_0 + \frac{(v_\infty - v_0)[NaHCO_3]}{K_a + [NaHCO_3]} \quad (4.2)$$

donde v_0 ($39 \pm 3 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$) es la velocidad de la reacción en ausencia de bicarbonato; v_∞ ($74 \pm 8 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$) la estimada cuando $[NaHCO_3] \rightarrow \infty$ y K_a ($7 \pm 3 \text{ mM}$) la concentración de bicarbonato que produce la mitad de la activación.

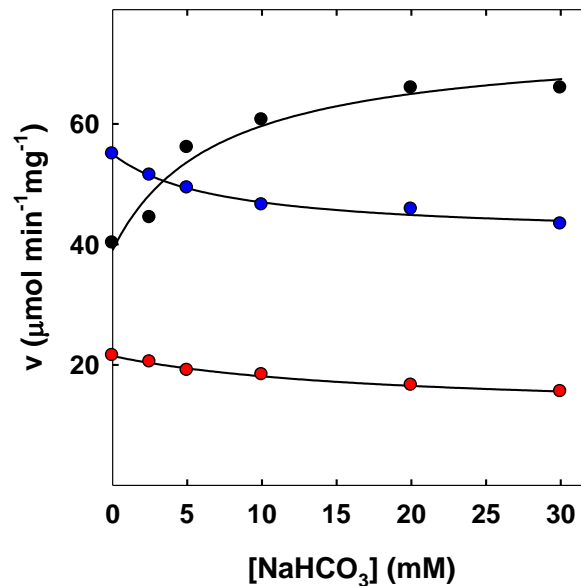


Figura 4.7 Dependencia de la velocidad de hidrólisis de F_1 con la concentración de bicarbonato a distintas concentraciones fijas de sulfito. Las medidas se llevaron a cabo según se detalla en Materiales y Métodos en presencia de 1 mM ATP. Las reacciones se iniciaron por el agregado de 0,5 μg de F_1 al medio de reacción. Control (●), sulfito 5 (●) y 16 (●) mM.

Cuando se estudió el efecto de concentraciones crecientes de bicarbonato sobre las velocidades iniciales en presencia de 5 mM sulfito

(concentración a la cual predomina el efecto activador del anión, ver **Figura 4.4**) no se observó activación por bicarbonato sino que por el contrario se observó una pequeña inhibición creciente, comportamiento que pudo ser descripto por la siguiente Ecuación:

$$v = v_{\infty} + \frac{(v_0 - v_{\infty})}{1 + \frac{[NaHCO_3]}{K_i}} \quad (4.3)$$

v_0 y v_{∞} son las velocidades de reacción en presencia de 5 mM sulfito estimadas a $[NaHCO_3] = 0$ y $[NaHCO_3] = \infty$, respectivamente. De acuerdo con el más arriba descripto efecto activador de sulfito a bajas concentraciones, v_0 ($55 \pm 10 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$) fue mayor que la estimada en ausencia de ambos aniones ($39 \pm 3 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$). En cambio, la velocidad de reacción estimada cuando la $[NaHCO_3]$ tiende a infinito en presencia de 5 mM sulfito (v_{∞}) fue menor ($41 \pm 1 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$) que v_0 y prácticamente igual a la estimada en ausencia de ambos aniones. La mitad del efecto máximo (K_i) se observó con 7 ± 2 mM bicarbonato. Un comportamiento similar fue observado en presencia de 16 mM sulfito (**Figura 4.7**), salvo que todos los valores de velocidad fueron menores al estimado en ausencia de ambos aniones, en concordancia con el efecto inhibitor descripto más arriba a altas concentraciones de sulfito ($v_0 = 21 \pm 7 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$; $v_{\infty} = 12 \pm 1 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$; y $K_i = 18 \pm 5$ mM). Estos resultados permiten sugerir que en el efecto activador observado a bajas concentraciones de sulfito estaría involucrado el sitio regulatorio al que ha sido previamente postulado se uniría bicarbonato como anión activador (Lodeyro A.F. y otros, **2001**).

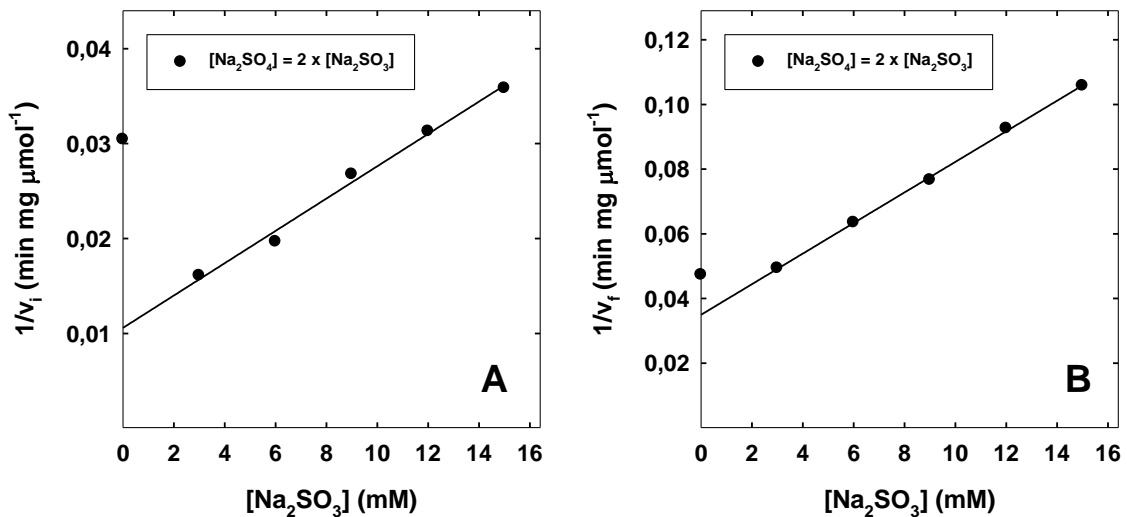


Figura 4.8 Efecto de la mezcla de sulfato y sulfito sobre la actividad ATPásica de F_1 . Se utilizó el procedimiento descrito por Yagi y Osawa (1960), utilizando una relación igual a 2 para la mezcla. Las medidas se llevaron a cabo según se detalla en Materiales y Métodos en presencia de 1 mM ATP. Las reacciones se iniciaron por el agregado de 0,4 μg de F_1 al medio de reacción. En (A) se muestran los valores de velocidades iniciales y en (B) los valores de velocidades finales.

Respecto del efecto inhibitorio observado a altas concentraciones de sulfito, cabe preguntarse si el mismo se produce por unión de sulfito al sitio al cual fue postulado por Lodeyro y otros (2008) se uniría sulfato como modificador generalizado de la reacción de hidrólisis de ATP. A los fines de poner a prueba esta hipótesis, se utilizó el procedimiento de Yagi y Ozawa (1960) el cual consiste en estudiar el efecto de una relación fija de dos ligandos ($I = r \times J$). Si ambos ligandos son mutuamente excluyentes se obtiene un gráfico de Dixon lineal mientras que si no lo son se obtiene uno curvo. En la **Figura 4.8** se puede observar que sulfito a altas concentraciones inhibe la reacción de hidrólisis de ATP comportándose como ligando mutuamente excluyente respecto de sulfato. A bajas concentraciones se observa el efecto activador de sulfito más arriba descrito. La extrapolación al eje de las ordenadas de la zona lineal del gráfico de Dixon sugiere que sulfito activa

uniéndose a un sitio de alta afinidad aun cuando el mismo anión y sulfato se están uniendo al sitio de baja afinidad (Lodeyro A.F. y otros, **2008**)

4.3. Consideraciones finales

El complejo comportamiento del progreso temporal de la reacción de hidrólisis de ATP catalizada por F_1 es atribuible a dos fenómenos: **i)** la fase inicial de aceleración sería debida a la lenta unión de ATP a un sitio regulatorio (sitio no catalítico de baja afinidad para ATP) lo que produciría un aumento de la actividad enzimática (Jault J-M. y Allison W.S., **1993**); y **ii)** la progresiva inhibición observada se correspondería a un lento cambio conformacional del complejo F_1 -ADP (intermediario del ciclo catalítico) dando origen a un complejo más estable (“ADPMg inhibited form”) fuera del ciclo catalítico (Minkov I.B. y otros, **1979**; Roveri O.A. y otros, **1980**; Vasilyeva E.A. y otros, **1982**). El primer efecto sería el resultado del aumento en la velocidad de disociación de ADP del complejo $MgADP \bullet F_1$ inactivo cuando el sitio no catalítico es ocupado por ATP. La unión de sulfito a dicho sitio (sitio de alta afinidad por sulfito) produciría un efecto similar linealizando la cinética a baja [ATP] y aumentando la v_i a todas las [ATP] (**Figura 4.3**). Por otra parte, la inhibición progresiva que se manifiesta en ausencia de sulfito a altas [ATP], en su presencia lo hace aún a bajas [ATP] (**Figura 4.2 y 4.3**). Este último resultado no puede ser fácilmente explicado por la unión de sulfito al sitio no catalítico más arriba mencionado. En consecuencia es razonable postular como hipótesis que la unión del anión a otro sitio (posiblemente un sitio catalítico) aumentaría la velocidad de formación del complejo inactivo $MgADP \bullet F_1$.

Moyle y Mitchell (**1975**) informaron que sulfito 4 mM es un activador de la ATPasa de mitocondrias de hígado de rata y de corazón de bovinos,

disminuyendo el K_m para ATP. Sulfito a concentraciones en el rango de mM produjo un efecto similar sobre la actividad de la ATPasa soluble de levaduras (Recktenwald D. y Hess B., **1977**). Los resultados a bajas concentraciones de sulfito coinciden con lo informado por estos autores. Sin embargo a concentraciones mayores a las ensayadas por estos autores se puede observar que sulfito se comporta como un inhibidor lineal.

En resumen, los resultados presentados en este **Capítulo** permiten concluir que sulfito es capaz de interactuar con dos sitios en la ATPasa de mitocondrias de corazón de bovino. Muy probablemente el de mayor afinidad sería un sitio no catalítico (comportándose como activador) y el de menor afinidad uno catalítico (comportándose como inhibidor).

CAPÍTULO 5

5. Efecto de sulfito sobre la hidrólisis de ATP catalizada por partículas submitocondriales

5.1. Introducción

En este Capítulo se describen los resultados obtenidos al estudiar el efecto de sulfito sobre la reacción de hidrólisis de ATP en partículas submitocondriales de corazón de bovino (SMP) como una etapa previa al estudio del efecto de este anión sobre la reacción inversa (síntesis de ATP) catalizada por las mismas.

5.2. Resultados y discusión

5.2.1. Análisis de las cinéticas de hidrólisis de ATP

De manera similar a lo observado con F_1 (**Capítulo 4**) la hidrólisis de ATP catalizada por SMP muestra un comportamiento bifásico con el tiempo de reacción aún en presencia del sistema PK + LDH acoplado. Como se puede ver en la **Figura 5.1** la reacción muestra una aceleración inicial hasta alcanzar el estado estacionario, comportamiento que se observa también en presencia de bicarbonato o de sulfito.

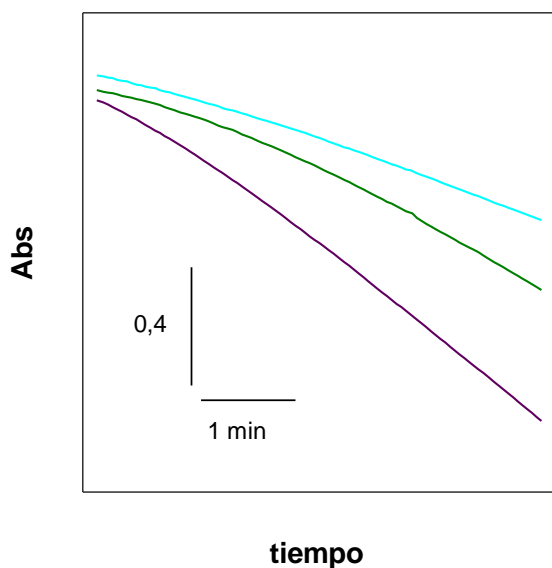


Figura 5.1 Progreso temporal de la hidrólisis de ATP por SMP. Las reacciones se iniciaron con el agregado de 0,1 mg de SMP al medio de ensayo preparado tal cual se indica en Materiales y Métodos en presencia de 0,6 mM ATP y de las siguientes sales: bicarbonato de sodio 18,5 mM (línea morada), acetato de sodio 28 mM (línea verde) y sulfito de sodio 10 mM (línea celeste).

5.2.2. Elección de una sal monobásica para mantener la fuerza iónica constante

La fuerza iónica es un factor que es recomendable mantener constante cuando se realizan estudios cinéticos del efecto de sales sobre la actividad de enzimas. En particular, es sabido que las partículas Mg-ATP contienen importantes cantidades del inhibidor peptídico de F_1 (IF_1) el cual se disocia entre otras causas por el aumento de la fuerza iónica (Bruni A. y otros, **1977**). En estudios previos realizados en el laboratorio, se utilizó acetato de sodio para mantener la fuerza iónica constante (Lodeyro A.F., **2002**). Con el objeto de confirmar que: **i)** la fuerza iónica afecta la actividad ATPásica de SMP; y **ii)** acetato es una buena elección para complementar los medios de reacción a fin de mantener constante la fuerza iónica, se determinó el efecto de acetato de sodio y cloruro de sodio, sales para cuyos aniones no se ha informado ningún efecto específico sobre la ATPasa mitocondrial (Ebel R.E. y Lardy H.A., **1975**).

En la **Figura 5.2** se observa que tanto en ausencia como en presencia de ambas sales, la actividad ATPásica pudo ser ajustada con una hipérbola que no pasa por el origen. Los valores de $V_{m\acute{a}x}$ y K_m estimados para ambas sales no mostraron diferencias significativas (ver **Tabla 5.1**). En cambio cuando se comparan los valores de $V_{m\acute{a}x}$ y K_m estimados en presencia de cualquiera de los aniones con los estimados en ausencia de los mismos se puede observar un aumento significativo de $V_{m\acute{a}x}$, consistente con la disociación de IF_1 a alta fuerza iónica. Por tanto se decidió utilizar acetato de sodio para mantener constante la fuerza iónica en los experimentos que se describen a continuación.

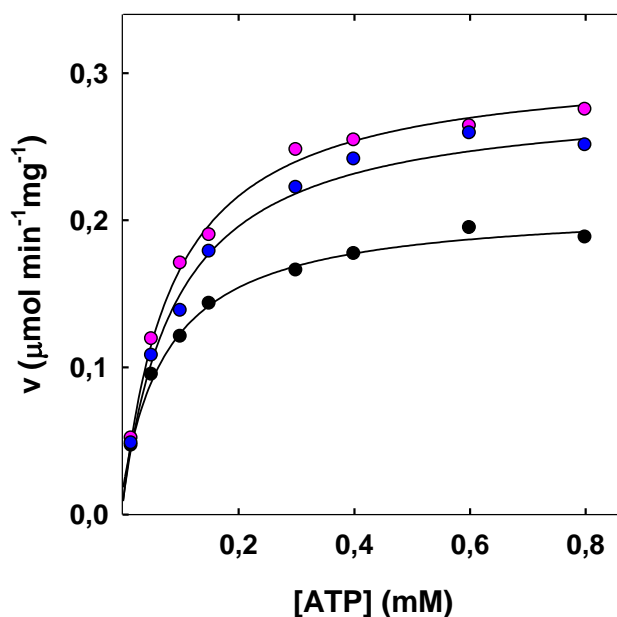


Figura 5.2 Dependencia de la velocidad de reacción con la [ATP] en presencia y en ausencia de sales monobásicas. Los valores de velocidades corresponden al estado estacionario de las cinéticas. Las reacciones fueron iniciadas con 0,1 mg de SMP. Los valores experimentales fueron obtenidos tal cual se detalla en Materiales y Métodos y ajustaron a hipérbolas. Los medios contenían acetato de sodio 28 mM (●), cloruro de sodio 28 mM (●), control (●).

Tabla 5.1 Efecto de sales sobre los parámetros cinéticos de la actividad ATPásica de SMP

ADICION	$V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	K_m (mM)
Ninguna	$0,192 \pm 0,007$	$0,082 \pm 0,013$
Acetato de sodio 28 mM	$0,298 \pm 0,009^{*+}$	$0,083 \pm 0,010^{*\#}$
Cloruro de sodio 28 mM	$0,280 \pm 0,012^{*+}$	$0,110 \pm 0,021^{*\#}$

*No hay diferencias significativas entre acetato y cloruro. +Diferencia significativa entre acetato o cloruro y control ($p < 0,0001$). # No hay diferencias significativas entre acetato o cloruro y control.

5.2.3. Efecto de bicarbonato y sulfito sobre la velocidad de hidrólisis de ATP

En la **Figura 5.3** se muestran los resultados obtenidos al realizar determinaciones cinéticas utilizando medios de reacción con idéntica fuerza iónica y concentraciones constantes de los distintos aniones en estudio.

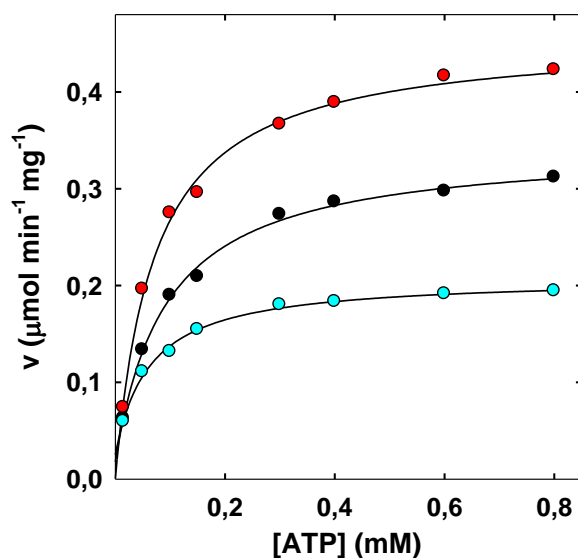


Figura 5.3 Efecto de aniones sobre la actividad ATPásica de SMP. Las determinaciones se realizaron según se detalla en Materiales y Métodos iniciando la reacción con 0,1 mg de SMP. Las líneas representan el mejor ajuste de la siguiente ecuación $v = v_{ATP=0} + V_{m\acute{a}x}[ATP]/(K_m(ATP) + [ATP])$ a los datos experimentalmente determinados en presencia de acetato de sodio 28 mM (●), sulfito de sodio 10 mM (●), bicarbonato de sodio 18,5 mM (●).

Se puede observar que bicarbonato activa mientras que sulfito inhibe la hidrólisis de ATP. Bicarbonato aumenta la $V_{m\acute{a}x}$ y disminuye K_m si bien no hace esto último de manera estadísticamente significativa (**Tabla 5.2**). En cambio, sulfito aumenta de manera significativa la afinidad aparente de la ATPasa por el sustrato al disminuir aproximadamente un 30 % el valor de K_m estimado en su presencia. Sin embargo, también disminuye $V_{m\acute{a}x}$ respecto del control, lo que en suma resulta en una acción inhibitoria de sulfito sobre la actividad ATPásica.

Tabla 5.2 Parámetros cinéticos obtenidos a partir de los datos graficados en la Figura 5.3

ANIÓN	$V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	K_m (mM)
Acetato 28 mM	0,327 ± 0,008	0,093 ± 0,009
Sulfito 10 mM	0,183 ± 0,006*	0,063 ± 0,006**
Bicarbonato 18,5 mM	0,457 ± 0,006 ⁺	0,071 ± 0,004 ^{ns}

Diferencias significativas respecto del control: *($p < 0,0001$); **($p < 0,03$); ⁺($p < 0,0001$).

^{ns} No hay diferencias significativas respecto del control ($p > 0,05$).

Con el objeto de analizar el efecto de sulfito sobre la hidrólisis de ATP catalizada por SMP, se determinó la velocidad de hidrólisis de 1 mM ATP a concentraciones crecientes del anión (**Figura 5.4**). Este ensayo se realizó también con el anión bicarbonato, el cual en estudios previos ha sido demostrado que se comporta como activador de la reacción de hidrólisis de ATP (Roveri O. A. y Calcaterra N. B, **1985**).

Las siguientes ecuaciones se ajustaron a los puntos experimentalmente obtenidos:

$$v = v_0 + \frac{(v_{\infty} - v_0)[\text{NaHCO}_3]}{K_a + [\text{NaHCO}_3]} \quad (5.1)$$

$$v = v_{\infty} + \frac{(v_0 - v_{\infty})}{1 + \frac{[Na_2SO_3]}{K_i}} \quad (5.2)$$

v_0 es la velocidad en ausencia de aniones; v_{∞} la estimada a concentración infinita de cada anión; K_a ($9,2 \pm 0,7$ mM) la constante de activación por bicarbonato; y K_i ($14,5 \pm 0,6$ mM) la constante de inhibición por sulfito. Bicarbonato estimula aproximadamente un 30% ($v_0 = 0,342 \pm 0,001$ y $v_{\infty} = 0,457 \pm 0,003 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$). En cambio sulfito inhibe totalmente (v_{∞} no es significativamente distinto de cero).

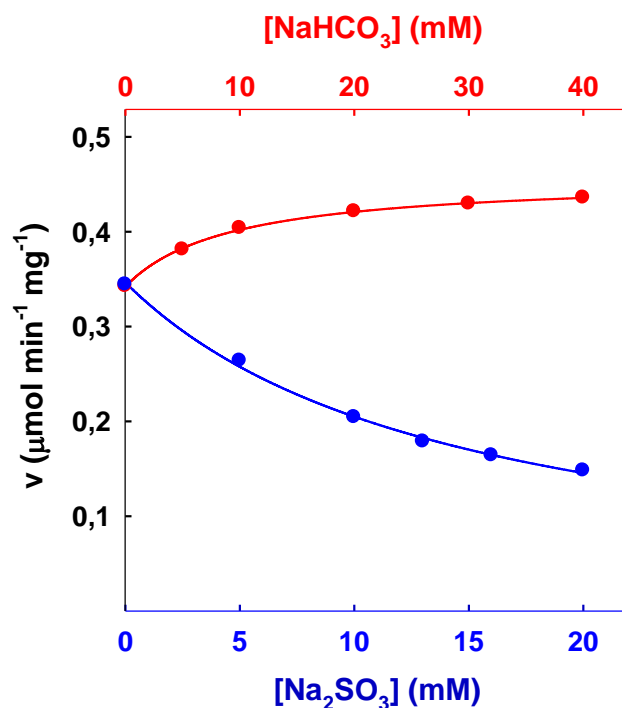


Figura 5.4 Dependencia de la velocidad de hidrólisis de ATP con la concentración de bicarbonato y sulfito utilizando fuerza iónica constante. Las medidas se llevaron a cabo según se detalla en Materiales y Métodos en presencia de 1 mM ATP. Bicarbonato de sodio (●), sulfito de sodio (●).

5.2.4. Análisis cinético del efecto de sulfito sobre la actividad ATPásica

Para profundizar en el conocimiento del mecanismo de acción de sulfito sobre la hidrólisis de ATP, se realizó un estudio cinético detallado utilizando un rango de concentraciones de sulfito de sodio desde 0,005 mM hasta 30 mM a

distintas concentraciones fijas de ATP. De manera cualitativamente similar a lo observado con F_1 , sulfito aumenta la actividad ATPásica de SMP a bajas concentraciones y la inhibe a altas concentraciones (**Figura 5.5**).

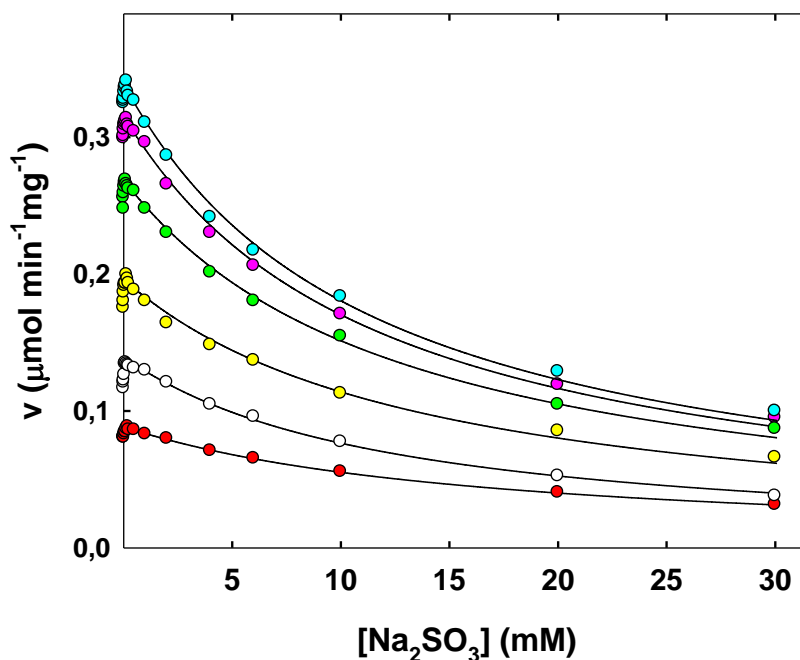


Figura 5.5 Dependencia de la actividad ATPásica de SMP con la concentración de sulfito a distintas [ATP]. El medio de reacción (1 mL) fue preparado tal cual se detalla en Materiales y Métodos manteniendo la fuerza iónica constante con acetato de sodio. Se inició la reacción por el agregado de 0,2 mg de proteína para 0,025 (●) y 0,050 (○) mM ATP y de 0,1 mg de SMP para 0,1 (●), 0,25 (●), 0,5 (●) y 1 (●) mM ATP. Las líneas muestran la regresión no lineal utilizando la **Ecuación 4.1**.

La activación fue menos notoria que la observada con F_1 y ocurrió a menores concentraciones de sulfito (< 0,15 mM). Este comportamiento dual de sulfito sugiere que el anión se une al menos a dos sitios diferentes en la ATPasa mitocondrial: uno de mayor afinidad a través del cual ejercería su acción activadora y otro de menor afinidad en donde se uniría para actuar como inhibidor.

La **Ecuación 4.1** ($v = (v_0 + \frac{v_A}{K_a}[Na_2SO_3]) / (1 + (\frac{1}{K_a} + \frac{1}{K_i})[Na_2SO_3] + \frac{[Na_2SO_3]^2}{K_a K_i})$) fue ajustada a los datos experimentales para determinar la dependencia de los valores de v_0 , v_A y K_i con la [ATP] (**Figura 5.6**)

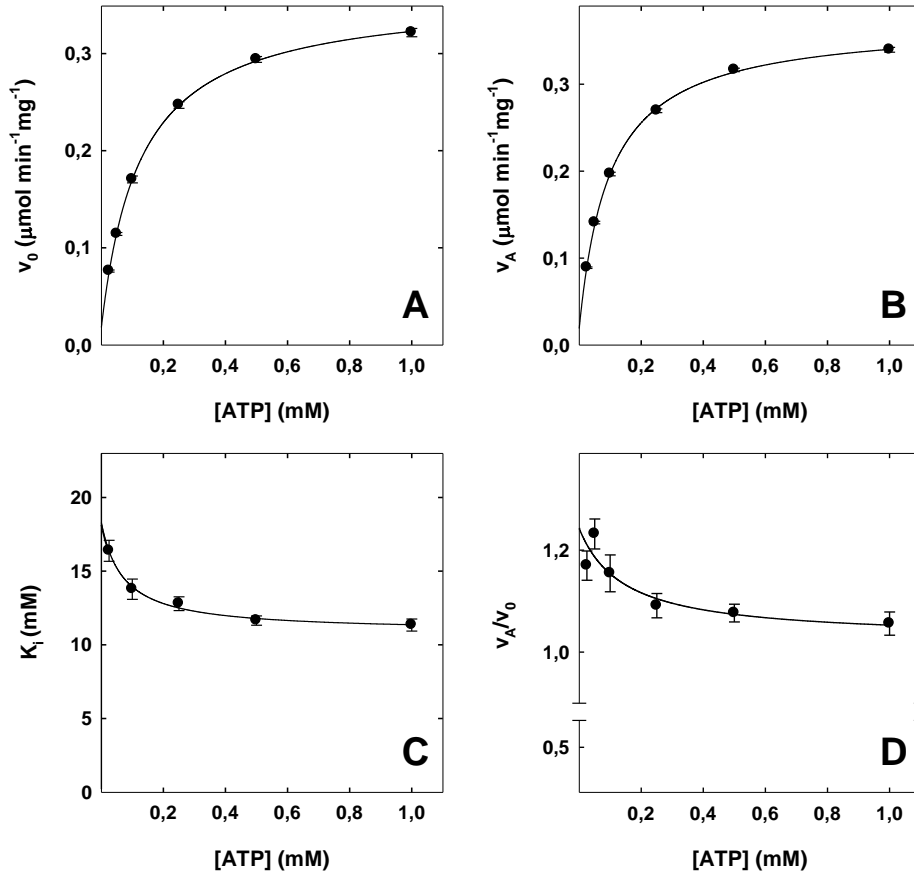


Figura 5.6 Gráficas secundarias obtenidas a partir de la Figura 5.5. Dependencia de v_0 (A), v_A (B), K_i (C) y v_A/v_0 (D) con la [ATP]. Los puntos en todos los casos representan los valores estimados ajustando la **Ecuación 4.1** a los valores experimentales de velocidades indicados en la **Figura 5.5**. Las líneas corresponden a los ajustes indicados en el texto y en la **Tabla 5.3**.

Tanto v_0 como v_A dependieron de manera hiperbólica (con ordenada distinta de cero) con la [ATP] (**Figura 5.6-A y -B**). En ambos casos se pudo estimar un valor de K_{ATP} cercano a 0,1 mM (ver **Tabla 5.3**).

Tabla 5.3 Dependencia con la [ATP] de los parámetros estimados a partir de la Figura 5.5.

		y_0	y_∞	K_{ATP}
v_0	$y = y_0 + \frac{(y_\infty - y_0)[ATP]}{K_{ATP} + [ATP]}$	$0,016 \pm 0,004^{**}$	$0,344 \pm 0,003^{**}$	$0,123 \pm 0,005^*$
v_A		$0,021 \pm 0,008^{**}$	$0,351 \pm 0,007^{**}$	$0,100 \pm 0,007^*$
K_i	$y = y_\infty + \frac{(y_0 - y_\infty)K_{ATP}}{K_{ATP} + [ATP]}$	$18 \pm 1^*$	$10,9 \pm 0,3^*$	$0,072 \pm 0,028^*$
$\frac{v_A}{v_0}$		$1,24 \pm 0,09$	$1,04 \pm 0,04$.

*mM; ** $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$.

La relación entre v_A y v_0 disminuyó con la [ATP] (**Figura 5.6-D y Tabla 5.3**). Para [ATP] tendiendo a cero, sulfito estimuló aproximadamente un 20%, mientras que a [ATP] tendiendo a infinito el estímulo fue prácticamente nulo. No fue posible hacer razonables estimaciones del valor de K_a . En cambio fue posible estimar el valor de K_i el cual varió de 18 mM cuando la [ATP] $\rightarrow 0$ a 11 mM para [ATP] $\rightarrow \infty$ (**Figura 5.6-C y Tabla 5.3**).

5.2.5. Efecto de sulfito sobre los parámetros cinéticos de la actividad ATPásica de SMP

Los datos mostrados en la **Figura 5.5**, fueron graficados en función de la [ATP] a concentraciones fijas de sulfito de sodio. A todas las $[\text{Na}_2\text{SO}_3]$ se pudo observar una dependencia hiperbólica de la velocidad de reacción con la [ATP] (**Figura 5.7**).

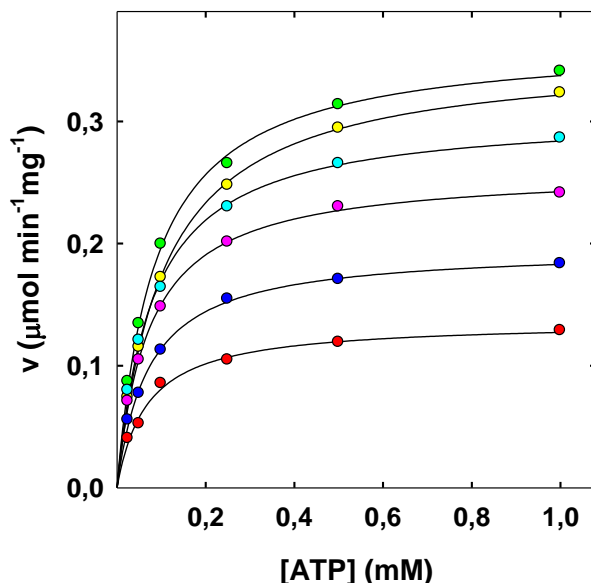


Figura 5.7 Estimación de K_m y $V_{máx}$ a distintas concentraciones de sulfito. Los puntos corresponden a medidas de velocidad realizadas tal cual se indica en Materiales y Métodos, en presencia de 0 (●), 0,15 (●), 2 (●), 4 (●), 10 (●) y 20 (●) mM sulfito de sodio. Las líneas se corresponden al mejor ajuste de una hipérbola rectangular a los datos experimentalmente determinados. En todos los casos, se mantuvo constante la fuerza iónica por el agregado de acetato de sodio.

En la **Figura 5.8** se grafican los valores de $V_{máx}$ y K_m estimados a las distintas concentraciones de sulfito en función de la concentración del anión. A bajas concentraciones de sulfito (inserto **Figura 5.8-A**) se puede observar un pequeño pero consistente aumento de $V_{máx}$, el que es seguido por un decaimiento hiperbólico simple (**Figura 5.8-A**). La siguiente ecuación fue ajustada a los datos obtenidos experimentalmente:

$$V_{máx} = \frac{V_{máx}^0 + \frac{V_{máx}^A}{K_a} [Na_2SO_3]}{1 + \left(\frac{1}{K_a} + \frac{1}{K_i}\right) [Na_2SO_3] + \frac{1}{K_a K_i} [Na_2SO_3]^2} \quad (5.3)$$

Donde $V_{máx}^0$ es el valor de $V_{máx}$ estimado en ausencia de sulfito ($0,348 \pm 0,010$ $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$) y $V_{máx}^A$ el que hubiera correspondido a $[Na_2SO_3] = \infty$ ($0,379 \pm 0,028$ $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$) en ausencia de inhibición ($K_i = \infty$); K_a la constante de activación y K_i la de inhibición. La activación observada a bajas

concentraciones del anión fue muy pequeña (9%, ver inserto de la **Figura 5.8-A**) por lo cual no fue posible hacer una buena estimación del valor de K_a , el cual estaría en el orden de 10^{-5} M. En cambio fue posible obtener una buena estimación del K_i (12 ± 1 mM), valor que correspondería a la constante de disociación de sulfito del sitio inhibitorio a $[ATP] = \infty$.

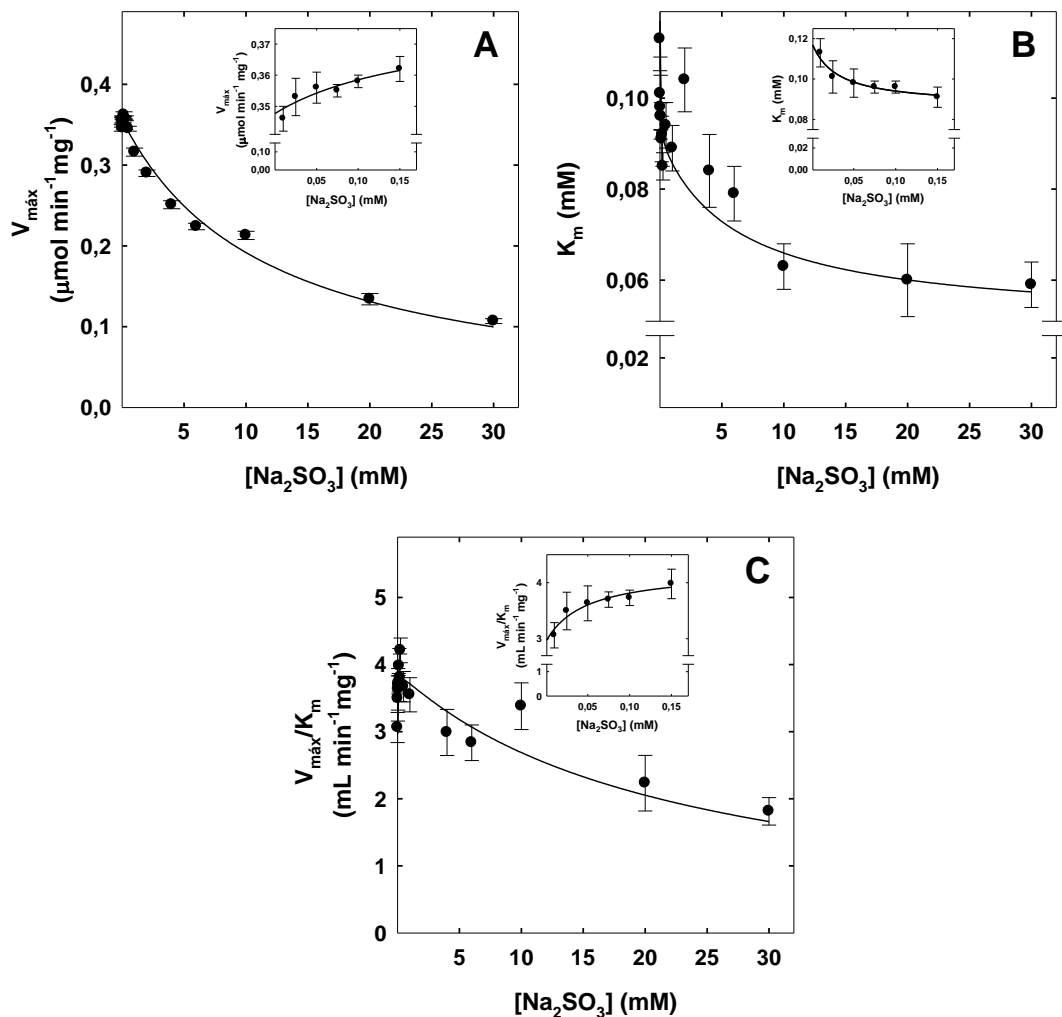


Figura 5.8 Dependencia de los parámetros cinéticos de la actividad ATPásica de SMP con la concentración de sulfito de sodio. Los puntos representan los valores de $V_{m\acute{a}x}$ (A), K_m (B) y $V_{m\acute{a}x}/K_m$ (C) estimados a partir de los datos mostrados en la **Figura 5.7**. En los insertos se muestran los valores de dichos parámetros estimados a bajas $[Na_2SO_3]$.

Por otra parte el K_m disminuyó con la $[Na_2SO_3]$ (**Figura 5.8-B**). Esta disminución no pudo ser descrita por un decaimiento hiperbólico simple. Un

buen ajuste se pudo obtener utilizando una relación entre polinomios de grado dos, tal cual sería de esperar si sulfito se uniera a dos sitios dando origen a tres especies de enzima con distinto valor de K_m . Dicho comportamiento es descrito por la siguiente Ecuación:

$$K_m = \frac{K_m^0 + \left(\frac{K_m^1}{K_d^1} + \frac{K_m^2}{K_d^2}\right)[Na_2SO_3] + \frac{K_m^2}{K_d^1 K_d^2}[Na_2SO_3]^2}{1 + \left(\frac{1}{K_d^1} + \frac{1}{K_d^2}\right)[Na_2SO_3] + \frac{1}{K_d^1 K_d^2}[Na_2SO_3]^2} \quad (5.4)$$

K_m^0 ($0,118 \pm 0,003$ mM), K_m^1 ($0,091 \pm 0,003$ mM) y K_m^2 ($0,050 \pm 0,006$ mM) son los valores de K_m estimados en ausencia de sulfito, cuando sulfito ocupa un sitio de alta afinidad y cuando sulfito ocupa además un sitio de baja afinidad, respectivamente; K_d^1 ($0,02 \pm 0,01$ mM) y K_d^2 (6 ± 3 mM) son las constantes de disociación de sulfito de los sitios de alta y de baja afinidad respectivamente. En la **Figura 5.8-B** se puede ver que la **Ecuación 5.4** ajusta razonablemente a los valores de K_m estimados a partir de los datos mostrados en la **Figura 5.7**, lo cual confirma la presencia de dos sitios de unión para el anión. Por otra parte sulfito como inhibidor produce la variación de K_m entre dos valores finitos (K_m^1 y K_m^2) y disminuye a 0 el valor de $V_{m\acute{a}x}$.

Por último, la relación $V_{m\acute{a}x}/K_m$ (**Figura 5.8-C**) depende con la concentración de sulfito según la siguiente Ecuación:

$$\frac{V_{m\acute{a}x}}{K_m} = \frac{\frac{V_{m\acute{a}x}^0}{K_m^0} + \frac{V_{m\acute{a}x}^1}{K_m^1} \frac{1}{K_d^1} [Na_2SO_3]}{1 + \left(\frac{1}{K_d^1} + \frac{1}{K_d^2}\right)[Na_2SO_3] + \frac{1}{K_d^1 K_d^2}[Na_2SO_3]^2} \quad (5.5)$$

$\frac{V_{m\acute{a}x}^0}{K_m^0}$ es la relación en ausencia de sulfito ($2,9 \pm 0,1$ mL min⁻¹ mg⁻¹); $\frac{V_{m\acute{a}x}^1}{K_m^1}$ la relación en ausencia de inhibición ($K_d^2 = \infty$) y a concentración infinita de sulfito

($4,2 \pm 0,3 \text{ mL min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$); K_d^1 la constante de disociación del sitio de unión de sulfito como activador ($0,05 \pm 0,02 \text{ mM}$); y K_d^2 la del sitio inhibidor ($22 \pm 3 \text{ mM}$).

En conclusión, el efecto de sulfito sobre la actividad ATPásica de SMP se manifiesta tal como lo haría un **inhibidor mixto lineal** a concentraciones mayores a $0,15 \text{ mM}$ ATP y como lo haría un activador no esencial a concentraciones menores. Estos resultados apoyan la hipótesis de que sulfito se une al menos a dos sitios diferentes. La unión al sitio de alta afinidad ($K_d^1 \approx 10^{-5} \text{ M}$) activaría la hidrólisis de ATP incrementando $V_{m\acute{a}x}$ y disminuyendo K_m , mientras que la unión al sitio de baja afinidad ($K_d^2 \approx 10^{-2} \text{ M}$) inhibiría la hidrólisis de ATP disminuyendo tanto $V_{m\acute{a}x}$ como K_m .

5.2.6. Determinación del sitio de unión de sulfito en la ATPasa mitocondrial

Para evaluar si bicarbonato y sulfito compiten por el mismo sitio de unión se determinó la actividad ATPásica utilizando medios conteniendo mezclas de ambos aniones. En primera instancia, se realizó el experimento detallado en la **Figura 5.9**, donde se observa que el efecto activador de bicarbonato es suprimido en presencia de $2,5 \text{ mM}$ sulfito (concentración a la cual sulfito habría saturado el sitio de alta afinidad y estaría ocupando parcialmente el sitio de baja afinidad). Este resultado puede ser explicado postulando que ambos aniones compiten por un mismo sitio en la ATPasa.

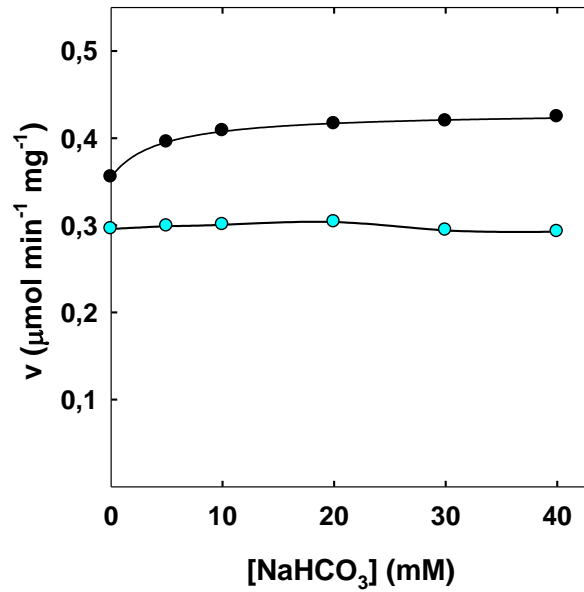


Figura 5.9 Dependencia de la velocidad de hidrólisis de ATP con la concentración de bicarbonato de sodio en presencia y en ausencia de sulfato de sodio. Las medidas se llevaron a cabo según se detalla en Materiales y Métodos utilizando un medio de reacción que contenía 1 mM ATP. 0 (●) y 2,5 (●) mM sulfato de sodio.

De manera similar a lo descrito en el **Capítulo 4**, se utilizó el procedimiento de Yagi y Ozawa para evaluar si sulfato compite con sulfato por su sitio de unión, obteniéndose un gráfico de Dixon lineal lo cual permite concluir que los ligandos en estudio son mutuamente excluyentes (**Figura 5.10**). En conclusión, sulfato a altas concentraciones compite con sulfato por su sitio de unión en el complejo de la ATPasa mitocondrial.

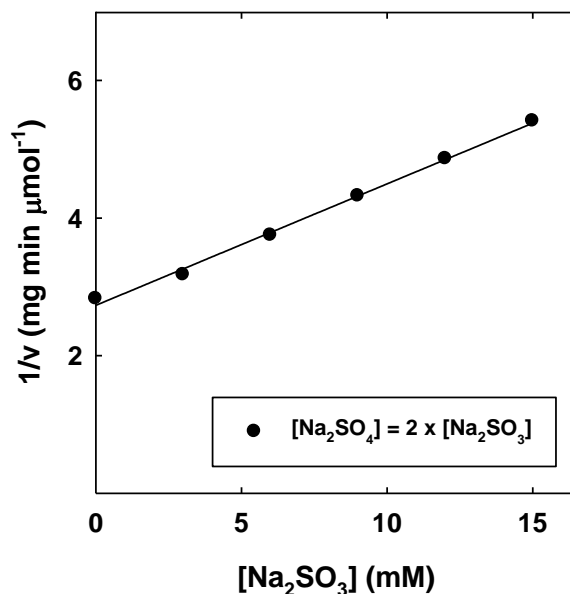


Figura 5.10 Efecto de la mezcla de aniones sobre la actividad ATPásica de SMP. Se utilizó el método de Yagi y Ozawa con un $r = 2$ para la mezcla sulfato/sulfito. Las medidas se llevaron a cabo según se detalla en Materiales y Métodos en presencia de una concentración de 1 mM ATP.

5.3. Consideraciones generales

La actividad ATPásica de SMP es afectada de manera dual por sulfito de manera similar a lo informado en el **Capítulo 4** sobre la actividad de la ATPasa soluble. Cappellini y otros (1997) informaron que sulfito estimulaba la actividad ATPásica de cromatóforos de *R. capsulatus* aumentado 12 – 15 veces la $V_{m\acute{a}x}$ sin afectar el K_m . También ha sido informado por Bakels y otros (1994) que sulfito, a concentraciones entre 0,5 y 2,2 mM, aumenta la $V_{m\acute{a}x}$ de vesículas de cianobacterias, de *P. denitrificans*, cromatóforos de *R. rubrum* y SMP de corazón de bovino, no habiendo realizado experimentos a mayores concentraciones del anión. Por tanto, el hecho de que dichos autores no informaran el efecto inhibitorio de sulfito a altas concentraciones debe ser atribuido a diferencias entre las preparaciones utilizadas y en el rango de concentraciones de sulfito ensayadas.

CAPÍTULO 6

6. Efecto de sulfito sobre la síntesis de ATP

6.1. Introducción

Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que bicarbonato es un inhibidor de la síntesis de ATP en SMP de corazón bovino. Los resultados mostraron una inhibición lineal no competitiva con respecto a fosfato (Lodeyro A.F. y otros, **2001**). Por otra parte, también ha sido mostrado que sulfato se comporta como un inhibidor lineal de la síntesis de ATP compitiendo con fosfato por la unión a un sitio catalítico (Lodeyro A.F. y otros, **2008**).

En este Capítulo se presentan los resultados obtenidos al hacer un análisis del efecto del anión sulfito sobre la ATP sintasa de SMP de corazón bovino.

6.2. Resultados y discusión

6.2.1. Efecto de sulfito sobre el transporte de electrones

El objetivo de esta Tesis es estudiar el mecanismo de acción de sulfito sobre el complejo de la ATPasa mitocondrial. Para determinar cómo inciden sobre la síntesis de ATP los efectos descritos en los capítulos anteriores, es necesario descartar todo efecto sobre el transporte de electrones y el acoplamiento entre el mismo y el complejo de la ATPasa. Por ello se estudió en primer lugar el efecto de sulfito sobre el transporte de electrones empleando succinato o NADH como sustratos oxidables.

Los resultados presentados en la **Figura 6.1-A** muestran que sulfito de sodio 40 mM inhibe un 47% el transporte de electrones de succinato a oxígeno, resultado concordante con las observaciones de Bakels y otros (**1994**), motivo por el cual no es posible utilizar succinato como sustrato oxidable para estudiar

el efecto de sulfito sobre la ATP sintasa. En cambio el consumo de oxígeno no es afectado por sulfito cuando se utiliza NADH como sustrato oxidable (**Figura 6.1-B**). Por tanto, para el estudio del efecto de sulfito sobre la síntesis de ATP, se decidió utilizar la oxidación de NADH como fuerza impulsora.

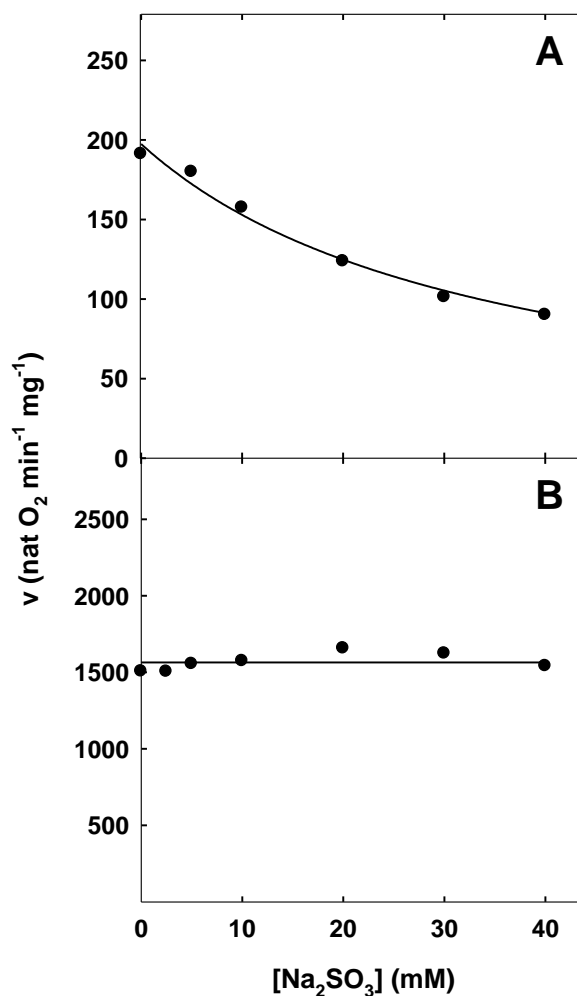


Figura 6.1 Efecto de sulfito sobre el transporte de electrones. El consumo de oxígeno se midió tal cual se detalla en Materiales y Métodos en presencia de concentraciones variables de sulfito. **A)** succinato 10 mM. **B)** NADH 1 mM. Las reacciones se iniciaron por el agregado de 0,50 y 0,34 mg de SMP al medio de reacción para **(A)** y **(B)** respectivamente.

Para descartar que sulfito afecte el grado de acoplamiento entre la cadena respiratoria y la ATP sintasa, se estudió el efecto del anión sobre la

disociación del inhibidor (IF_1). IF_1 es el inhibidor natural de F_1F_0 y es capaz de unirse reversiblemente a la subunidad F_1 del complejo. La incubación de las SMP con un sustrato oxidable produce un aumento del potencial de membrana, el cual induce la disociación del inhibidor con el consiguiente aumento de la actividad ATPásica (Gaballo A. y otros, **2002**). Esta activación es dependiente del estado acoplado de las SMP durante la incubación con el sustrato oxidable. Es decir, si sulfito tuviera un efecto desacoplante debería inhibir el aumento de la actividad ATPásica. Por tanto se decidió determinar si la activación de la ATPasa de las SMP era sensible a sulfito. Para ello se incubaron SMP con succinato durante 20 minutos en ausencia y en presencia del anión. La actividad ATPásica fue determinada luego de la pre-incubación y comparada con la obtenida con las SMP no pre-incubadas.

Tabla 6.1 Análisis del efecto de sulfito de sodio sobre la activación de la ATPasa de SMP. SMP (0,05 mg) fueron pre-incubadas durante 20 min con succinato tal cual se detalla en Materiales y Métodos, al cabo de los cuales se determinó la velocidad de hidrólisis de ATP (activada). La reacción fue iniciada por el agregado de 4 mM ATP y de 1 μ M FCCP (concentraciones finales). La actividad basal se determinó iniciando la reacción por el agregado de SMP al medio conteniendo ATP y FCCP.

[Na ₂ SO ₃] (mM)	Velocidad (μ mol min ⁻¹ mg ⁻¹)	
	basal	activada
0	0,21	2,38
0,5	0,33	2,81
10	0,17	1,60

En la **Tabla 6.1** se puede ver que la actividad ATPásica determinada con SMP no pre-incubadas (basal) fue estimulada por 0,5 e inhibida por 10 mM sulfito, en concordancia con lo descrito en el **Capítulo 5**. La incubación de las SMP con succinato en condiciones aeróbicas y acopladas aumenta más de 10 veces la actividad ATPásica (activada). Dicho aumento de actividad se observa también cuando la pre-incubación se hace en presencia de sulfito (**Tabla 6.1**). Este resultado permite descartar que sulfito actúe como desacoplante.

6.2.2. Análisis cinético de la síntesis de ATP en presencia de sulfito

En primer lugar se determinó la linealidad de la reacción con la [SMP]. La velocidad de síntesis de ATP fue proporcional a la concentración de SMP hasta 0,05 mg/mL para las siguientes combinaciones de sustratos: 3,5 mM Pi + 1 mM ADP; 0,1 mM Pi + 1 mM ADP; y 3,5 mM Pi + 0,05 mM ADP.

Se realizaron experimentos utilizando un rango de concentraciones del anión (0,25 a 20 mM) en presencia de distintas concentraciones de los sustratos fosfato y ADP. En la **Figura 6.2** se detallan las determinaciones efectuadas en presencia de ADP variable y fosfato 3,5 mM, mientras que en la **Figura 6.6** aquellas realizadas con ADP 1 mM y fosfato variable.

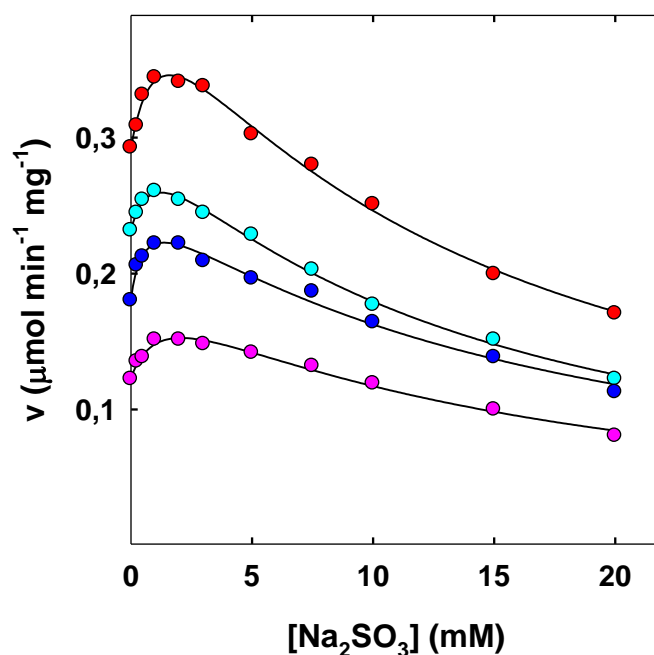


Figura 6.2 Dependencia de la velocidad de síntesis de ATP con la concentración de sulfito en presencia de fosfato 3,5 mM y diferentes [ADP]. Las medidas se llevaron a cabo según se detalla en Materiales y Métodos iniciando las reacciones por el agregado de 0,05 mg de SMP al medio de reacción. Las concentraciones de ADP empleadas fueron: 0,1 (●), 0,25 (●), 0,5 (●) y 1 (●) mM. Las líneas representan el mejor ajuste de la **Ecuación 4.1** a los datos experimentales.

Cuando el sustrato constante es Pi (3,5 mM) sulfito se comporta como un activador no esencial a concentraciones bajas, mientras que a concentraciones mayores a 2 mM el anión actúa como un inhibidor total de la síntesis de ATP. Los valores de los parámetros cinéticos, estimados ajustando la **Ecuación 4.1** ($v = \left(v_0 + \frac{v_A}{K_a} [Na_2SO_3] \right) / \left(1 + \left(\frac{1}{K_a} + \frac{1}{K_i} \right) [Na_2SO_3] + \frac{[Na_2SO_3]^2}{K_a K_i} \right)$) a los datos experimentales, son graficados en la **Figura 6.3**. La velocidad de reacción en ausencia de sulfito (v_0) aumentó de manera hiperbólica (de $0,07 \pm 0,01$ a $0,41 \pm 0,02 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$) con la [ADP] (**Figura 6.3-A**). La mitad de dicho aumento se produjo con $0,5 \pm 0,1$ mM ADP. La velocidad estimada a concentración infinita de sulfito en ausencia de efecto inhibitorio (v_A) se comportó de manera

similar por lo cual la relación entre ésta y la velocidad en ausencia de sulfito (v_A/v_0) no mostró una dependencia definida con la [ADP] (**Figura 6.3-B**).

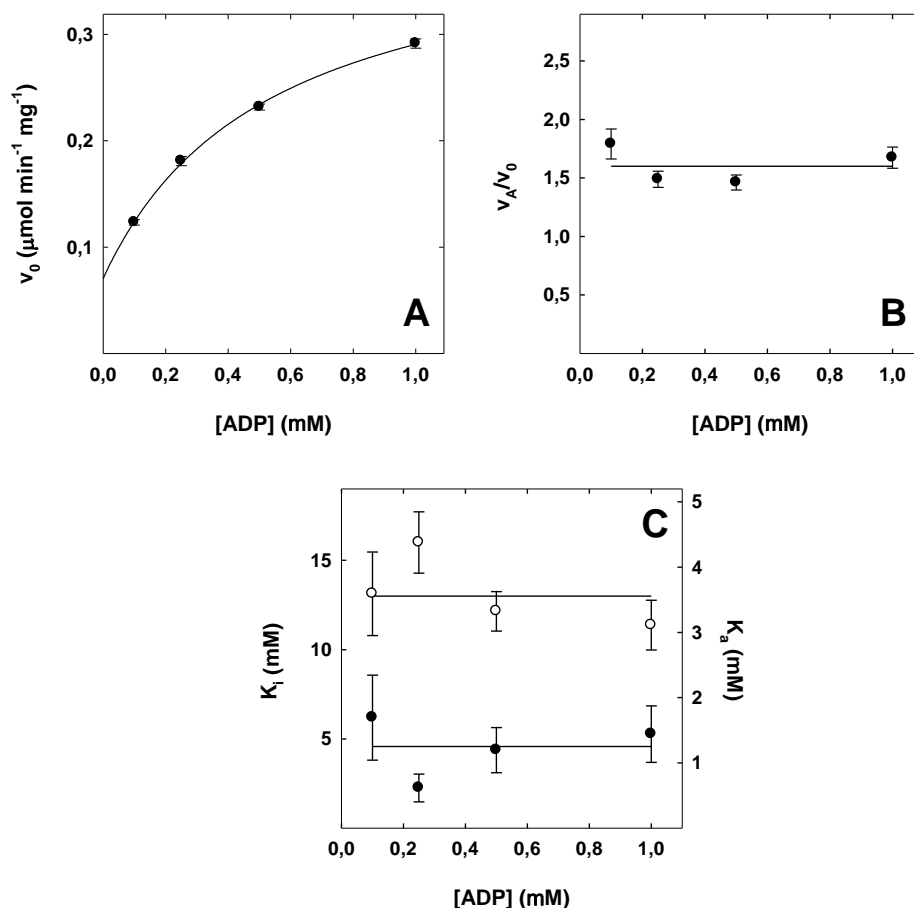


Figura 6.3 Gráficas secundarias obtenidas a partir de la Figura 6.2. Dependencia de: v_0 (A), v_A/v_0 (B) y K_i (○) y K_a (●) (C) con la concentración de ADP.

Los valores de K_i estimados no dependieron de manera significativa con la concentración de ADP (**Figura 6.3-C**). El promedio de los mismos fue igual a 13 ± 1 mM. Por último los errores en la estimación de K_a fueron del orden del 30 – 35%. Su variación con la concentración de ADP no permitió determinar una tendencia definida (**Figura 6.3-C**). Los mismos oscilaron alrededor de 1,25 mM con un desvío estándar igual a 0,2 mM

Para caracterizar el tipo de inhibición, se graficó la velocidad de síntesis de ATP en función de la [ADP] y a fosfato fijo 3,5 mM para cada una de las concentraciones de sulfito empleadas (**Figura 6.4**).

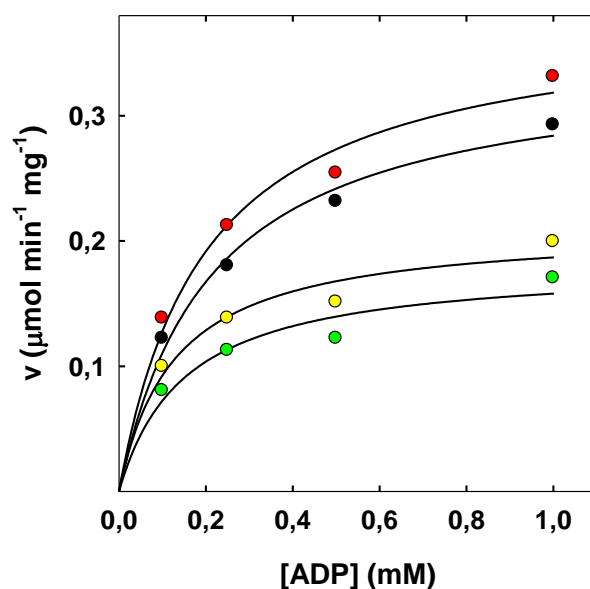


Figura 6.4 Dependencia de la velocidad de síntesis de ATP con la [ADP] en presencia de fosfato 3,5 mM. Las medidas se llevaron a cabo según se detalla en Materiales y Métodos iniciando las reacciones por el agregado de 0,05 mg de SMP al medio de reacción. Las concentraciones de sulfito mostradas corresponden a: 0 (●), 0,5 (●), 15 (●) y 20 (●) mM. Las líneas representan el mejor ajuste de una hipérbola rectangular a los datos experimentales.

Esto permitió estimar los valores de $V_{m\acute{a}x}$ y $K_{m(ADP)}$ a las distintas $[\text{Na}_2\text{SO}_3]$, los que se muestran en la **Figura 6.5**.

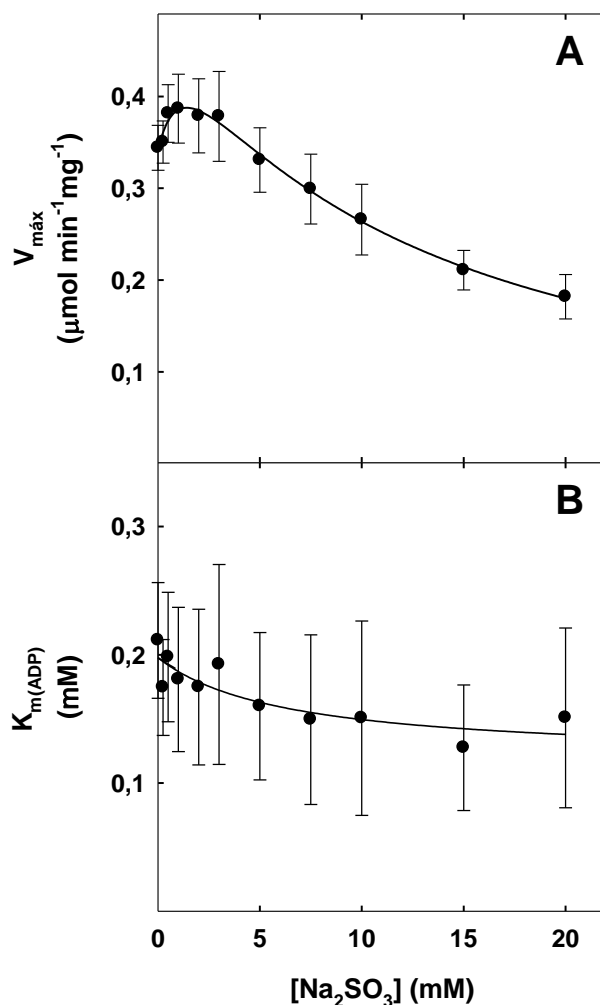


Figura 6.5 Dependencia de $V_{m\acute{a}x}$ y $K_{m(ADP)}$ con la $[Na_2SO_3]$ en presencia de 3,5 mM fosfato. A) Los s\u00edmbolos representan los valores de $V_{m\acute{a}x}$ estimados a partir de hip\u00e9rbolas similares a las mostradas en la **Figura 6.4** y la l\u00ednea el mejor ajuste de la **Ecuaci\u00f3n 6.1** a los mismos. **B)** Los s\u00edmbolos representan los valores de $K_{m(ADP)}$ estimados a partir de hip\u00e9rbolas similares a las mostradas en la **Figura 6.4** y la l\u00ednea el mejor ajuste de la **Ecuaci\u00f3n 6.2** a dichos valores.

En la **Figura 6.5-A** se puede observar que, a bajas concentraciones, sulfito aumenta $V_{m\acute{a}x}$. El m\u00e1ximo de $V_{m\acute{a}x}$ se obtiene entre 1 y 2 mM sulfito. A concentraciones mayores, sulfito disminuye $V_{m\acute{a}x}$. Este comportamiento es descrito por la **Ecuaci\u00f3n 6.1**:

$$V_{m\acute{a}x} = \frac{V_{m\acute{a}x}^0 + \frac{V_{m\acute{a}x}^A}{K_a} [Na_2SO_3]}{1 + \left(\frac{1}{K_a} + \frac{1}{K_i}\right) [Na_2SO_3] + \frac{[Na_2SO_3]^2}{K_a K_i}} \quad (6.1)$$

Este análisis confirma que sulfito se comporta a concentraciones bajas como un activador no esencial mientras que a concentraciones mayores a 2 mM lo hace como un inhibidor lineal de la reacción de síntesis de ATP. La $V_{m\acute{a}x}$ ($V_{m\acute{a}x}^0$) estimada a $[Na_2SO_3] = 0$ fue igual a $0,341 \pm 0,006 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$. El efecto como activador no esencial responde a un valor de $K_a = 1,7 \pm 0,8$ mM sulfito. La $V_{m\acute{a}x}$ ($V_{m\acute{a}x}^A$) estimada en ausencia de efecto inhibitorio y a concentración infinita de sulfito fue igual a $0,57 \pm 0,07 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$. La inhibición es total con un $K_i = 10 \pm 2$ mM sulfito.

Los valores de $K_{m(ADP)}$ mostraron una leve tendencia a disminuir con concentraciones crecientes de sulfito, la cual puede ser descrita por la siguiente ecuación:

$$K_{m(ADP)} = K_{m(ADP)}^\infty + \frac{(K_{m(ADP)}^0 - K_{m(ADP)}^\infty)}{1 + \frac{[Na_2SO_3]}{C_{0,5}}} \quad (6.2)$$

Donde $K_{m(ADP)}^0$ ($0,20 \pm 0,07$ mM) es el valor de $K_{m(ADP)}$ en ausencia de sulfito; $K_{m(ADP)}^\infty$ ($0,12 \pm 0,03$ mM) el estimado a concentración infinita del anión y $C_{0,5}$ la concentración de sulfito que produce la mitad del efecto máximo. La pequeña variación de $K_{m(ADP)}$ y los altos desvíos standard obtenidos con el ajuste, no han permitido obtener una buena estimación de $C_{0,5}$, el cual estaría entre 1 y 10 mM.

En resumen el efecto de sulfito como activador no esencial y como inhibidor se circunscribe fundamentalmente a variaciones en la $V_{m\acute{a}x}$ acompañado por una leve disminución del $K_{m(ADP)}$. Estos resultados permiten

caracterizar a sulfito como un **inhibidor lineal mixto** respecto de ADP para la síntesis de ATP.

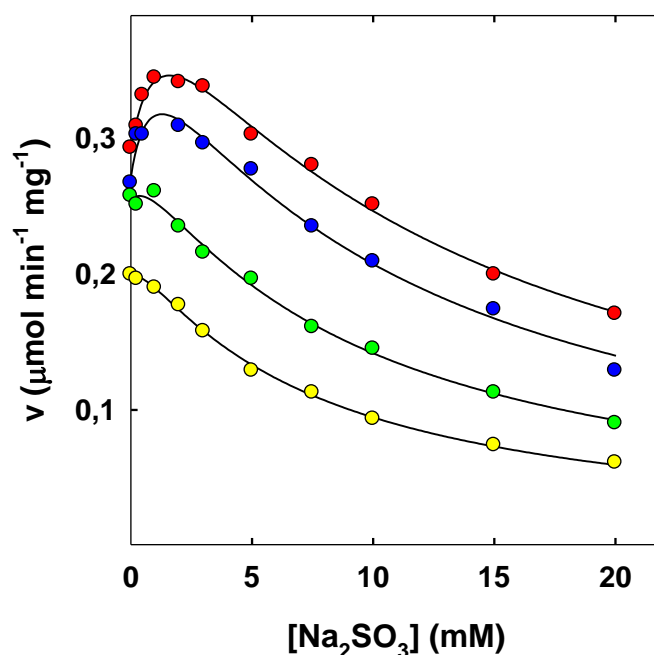


Figura 6.6 Dependencia de la velocidad de síntesis de ATP con la concentración de sulfito en presencia de 1 mM ADP y diferentes [Pi]. Las medidas se llevaron a cabo según se detalla en Materiales y Métodos iniciando las reacciones por el agregado de 0,05 mg de SMP al medio de reacción. Las concentraciones de fosfato empleadas fueron: 0,5 (●), 1 (●), 2 (●) y 3,5 (●) mM. Las líneas representan el mejor ajuste de la **Ecuación 4.1** a los datos experimentales.

Cuando se estudió el efecto de sulfito sobre la velocidad de síntesis de ATP en presencia de 1 mM ADP y distintas [Pi] se observó que el efecto activador a bajas concentraciones se hace menos aparente a medida que disminuye la concentración de Pi (**Figura 6.6**). En cambio, a todas las concentraciones de Pi sulfito se comporta como un inhibidor total de la síntesis de ATP. Los valores de los parámetros cinéticos estimados a partir de los ajustes mostrados en la **Figura 6.6** se encuentran detallados en la **Tabla 6.2**.

Tabla 6.2 Parámetros cinéticos estimados a partir del ajuste de la Ecuación 4.1 a los datos experimentales mostrados en la Figura 6.6.

	Parámetros cinéticos			
[Pi] (mM)	v_0 ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	v_A ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	K_a (mM)	K_i (mM)
0,5	0,198 \pm 0,003	0,24 \pm 0,03	1,2 \pm 1,2	7 \pm 1
1	0,255 \pm 0,005	0,33 \pm 0,06	1,5 \pm 1,7	8 \pm 2
2	0,271 \pm 0,008	0,44 \pm 0,06	1,2 \pm 0,6	10 \pm 2
3,5	0,291 \pm 0,004	0,49 \pm 0,04	1,4 \pm 0,4	11 \pm 1

v_0 , v_A y K_i aumentaron de manera hiperbólica con la concentración de Pi, mientras que K_a no varió de manera significativa con la misma.

Para estimar la influencia de sulfito sobre los valores de $V_{m\acute{a}x}$ y $K_{m(Pi)}$ se graficaron en función de la concentración de Pi los valores de velocidad de síntesis de ATP determinados a 1 mM ADP (**Figura 6.7**).

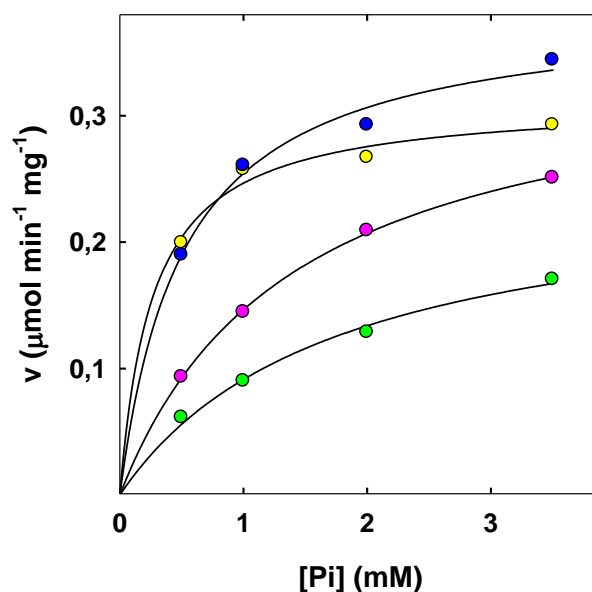


Figura 6.7 Dependencia de la velocidad de síntesis de ATP con la [Pi] en presencia de ADP 1 mM. Las medidas se llevaron a cabo según se detalla en Materiales y Métodos iniciando las reacciones por el agregado de 0,05 mg de SMP al medio de reacción. Las concentraciones de sulfito mostradas corresponden a: 0 (●), 1 (●), 10 (●) y 20 (●) mM. Las líneas representan el mejor ajuste de una hipérbola rectangular a los datos experimentales.

Los parámetros así estimados fueron graficados en función de la concentración de sulfito, tal cual se muestra en la **Figura 6.8**. La dependencia de $V_{m\acute{a}x}$ puede ser descrita por la **Ecuación 6.1**, cuyo ajuste a los datos mostrados en la **Figura 6.8-A** indica que la $V_{m\acute{a}x}$ estimada a $[\text{Na}_2\text{SO}_3] = 0$ ($V_{m\acute{a}x}^0$) fue igual a $0,318 \pm 0,006 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$; el efecto como activador no esencial responde a un valor de $K_a = 3,6 \pm 1,9$ mM sulfito y una $V_{m\acute{a}x}^A = 0,81 \pm 0,24 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$. El efecto inhibitorio es total con un $K_i = 10,4 \pm 3,8$ mM sulfito.

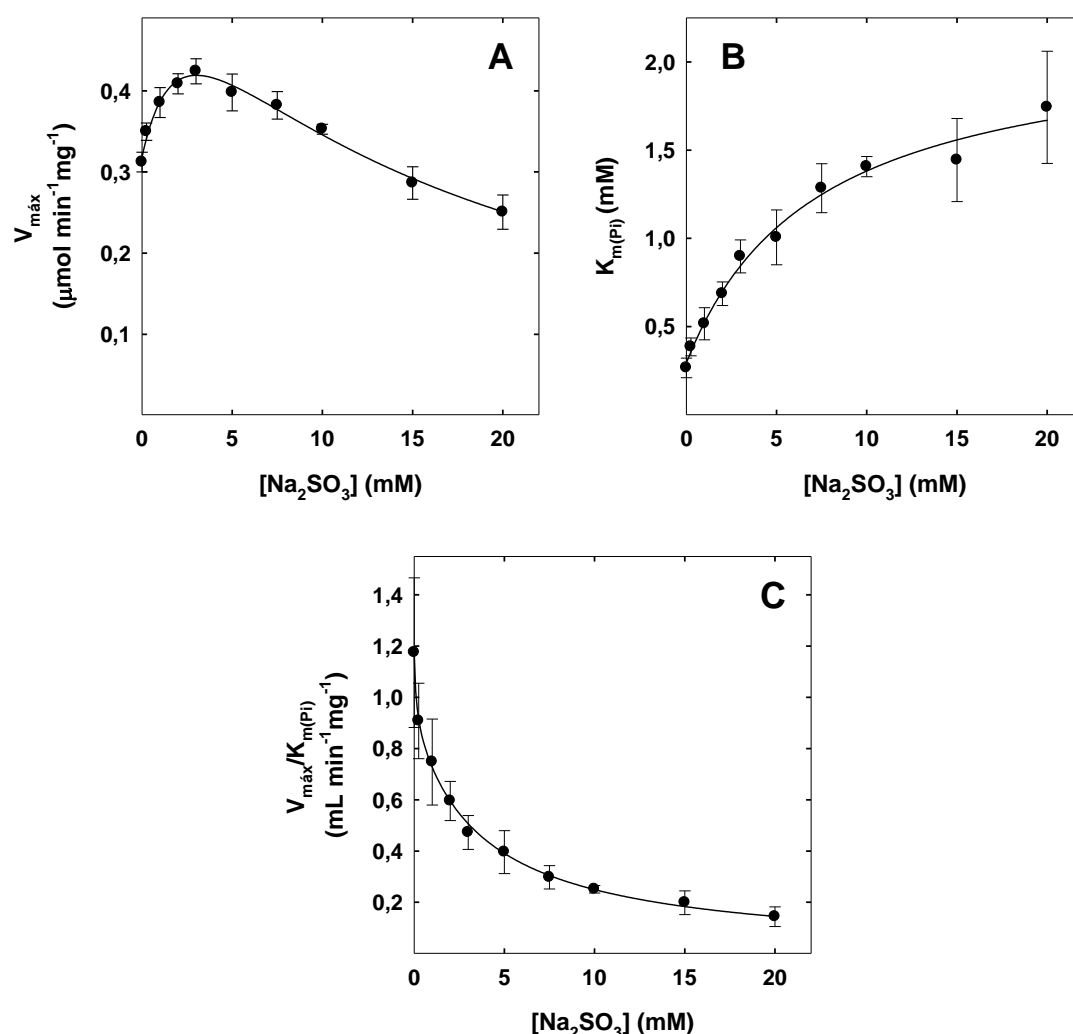


Figura 6.8 Dependencia de $V_{m\acute{a}x}$, $K_{m(Pi)}$ y $V_{m\acute{a}x}/K_{m(Pi)}$ con la $[Na_2SO_3]$ en presencia de ADP 1 mM. **A)** Los s\u00edmbolos representan los valores de $V_{m\acute{a}x}$ estimados a partir de hip\u00e9rbolas similares a las mostradas en la **Figura 6.7** y la l\u00ednea el mejor ajuste de la **Ecuaci\u00f3n 6.1** a los valores experimentales. **B)** Los s\u00edmbolos representan los valores de $K_{m(Pi)}$ estimados a partir de hip\u00e9rbolas similares a las mostradas en la **Figura 6.7**. La l\u00ednea representa el mejor ajuste de la **Ecuaci\u00f3n 6.3** a los valores experimentales. **C)** Los s\u00edmbolos representan los valores de $V_{m\acute{a}x}/K_{m(Pi)}$ y la l\u00ednea el mejor ajuste de la **Ecuaci\u00f3n 6.4** a los valores experimentales.

Por otra parte el $K_{m(Pi)}$ depende de la $[Na_2SO_3]$ de acuerdo a la **Ecuaci\u00f3n 6.3**:

$$K_{m(Pi)} = K_{m(Pi)}^0 + \frac{(K_{m(Pi)}^\infty - K_{m(Pi)}^0)[Na_2SO_3]}{c_{0,5} + [Na_2SO_3]} \quad (6.3)$$

donde $K_{m(Pi)}^0$ es el $K_{m(Pi)}$ en ausencia de sulfito, $K_{m(Pi)}^\infty$ el estimado cuando $[Na_2SO_3] \rightarrow \infty$ y $C_{0,5}$ la concentración de sulfito que produce la mitad de la variación en el $K_{m(Pi)}$. En la **Figura 6.8-B** se muestra la dependencia de los valores de $K_{m(Pi)}$ con la $[Na_2SO_3]$. El ajuste de la **Ecuación 6.3** a dichos valores permite estimar que el valor de $K_{m(Pi)}^0$ es igual a $0,29 \pm 0,04$ mM, mientras que el obtenido cuando la $[Na_2SO_3]$ tiende a infinito es igual a $2,16 \pm 0,18$ mM. La mitad del efecto máximo se obtiene con $7,2 \pm 1,5$ mM sulfito. La disminución de los valores de $V_{m\acute{a}x}$ y el aumento de los valores de $K_{m(Pi)}$ con la concentración de sulfito corresponden al comportamiento de un **inhibidor lineal mixto** respecto de fosfato. Por último, la relación $V_{m\acute{a}x}/K_{m(Pi)}$ decayó con la concentración de sulfito de acuerdo a la siguiente Ecuación y tal cual se muestra en la **Figura 6.8-C**.

$$\frac{V_{m\acute{a}x}}{K_{m(Pi)}} = \frac{\frac{V_{m\acute{a}x}^0}{K_{m(Pi)}^0} + \frac{V'_{m\acute{a}x}}{K_{m(Pi)}^1} \frac{1}{K_d^1} [Na_2SO_3]}{1 + \left(\frac{1}{K_d^1} + \frac{1}{K_d^2} \right) [Na_2SO_3] + \frac{1}{K_d^1 K_d^2} [Na_2SO_3]^2} \quad (6.4)$$

Donde $V_{m\acute{a}x}^0/K_{m(Pi)}^0$ es el valor de la relación en ausencia de sulfito ($1,17 \pm 0,02$ mL min⁻¹mg⁻¹); K_d^1 y K_d^2 las constantes de disociación de sulfito de ambos sitios de unión; $V'_{m\acute{a}x}/K_{m(Pi)}^1$ la relación estimada a concentración saturante de sulfito en el hipotético caso que K_d^2 fuera infinito ($0,88 \pm 0,06$ mL min⁻¹mg⁻¹). El valor de K_d^2 ($3,9 \pm 0,4$ mM) permite estimar la constante de disociación de sulfito del sitio de baja afinidad en la enzima libre de Pi (**Figura 6.8-C** y **Apéndice Sección 2**). Por otra parte la constante de disociación de sulfito del mismo sitio pero en el complejo $F_1F_0 \bullet ADP \bullet Pi$ ($10,4 \pm 3,8$ mM) puede ser estimada a partir de la dependencia de $V_{m\acute{a}x}$ con la $[Na_2SO_3]$ (**Figura 6.8-A** y **Apéndice Sección 2**). Por último, el valor estimado para K_d^1 ($0,11 \pm 0,09$ mM)

indica que la constante de disociación de sulfito del sitio de alta afinidad estaría en el orden de 0,1 mM.

6.2.3. Estudio del efecto de mezclas de aniones efectores

De manera similar a lo observado para la actividad ATPásica, sulfito tiene un comportamiento dual lo que permite confirmar la hipótesis de que este anión se une a dos sitios diferentes en la ATP sintasa mitocondrial. La síntesis de ATP se ve incrementada por la unión de sulfito al sitio de alta afinidad ($K_d \approx 10^{-3}$ M) observándose un aumento de $V_{m\acute{a}x}$ a medida que aumenta la concentración de sulfito, mientras que la unión al sitio de baja afinidad ($K_d \approx 10^{-2}$ M) inhibe la síntesis de ATP de manera total disminuyendo $V_{m\acute{a}x}$. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que para síntesis de ATP, bicarbonato se comporta como un inhibidor completo competitivo respecto de ADP y no competitivo respecto de fosfato (Lodeyro A.F. y otros, **2001**). Por otro lado, sulfato actúa como un inhibidor completo competitivo respecto de fosfato y mixto respecto de ADP en la síntesis de ATP (Lodeyro A.F. y otros, **2008**). Para determinar si sulfito compite con bicarbonato y con sulfato por los sitios de unión, se utilizó el método de Yonetani-Theorell (**1964**) el cual examina las pendientes del gráfico de Dixon. Este procedimiento establece que si dos ligandos que se agregan al sistema de reacción son mutuamente excluyentes respecto de un sitio de unión, se observarán líneas paralelas en el gráfico de Dixon respecto de uno de ellos para distintas concentraciones fijas del otro.

En la **Figura 6.9** se encuentran detallados los experimentos de mezclas de aniones utilizando concentraciones fijas de sulfito y variables de bicarbonato. Los resultados permiten concluir que a $[\text{Na}_2\text{SO}_3]$ bajas (< 5 mM),

ambos aniones son mutuamente excluyentes y que en presencia de $[\text{Na}_2\text{SO}_3]$ altas, bicarbonato y sulfito no compiten por el mismo sitio de unión.

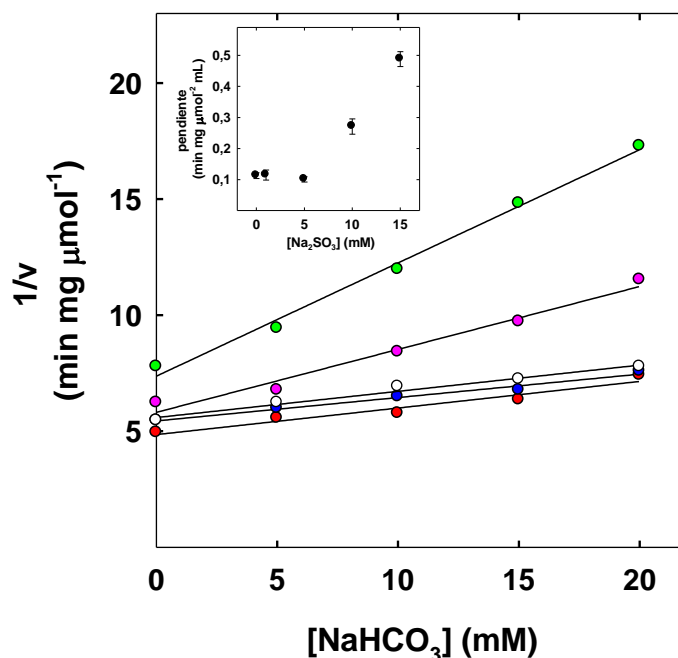


Figura 6.9 Gráfico de Yonetani-Theorell para el estudio del efecto de mezclas de sulfito y bicarbonato sobre la síntesis de ATP. Las determinaciones fueron realizadas tal cual se indica en Materiales y Métodos utilizando $[\text{Pi}] = 3,5 \text{ mM}$ y $[\text{ADP}] = 0,1 \text{ mM}$ a bicarbonato variable y sulfito fijo. Los símbolos representan los valores experimentales obtenidos a 0 (\circ), 1 (\bullet), 5 (\bullet), 10 (\bullet) y 15 (\bullet) mM sulfito. En el inserto se observan las pendientes para cada una de las concentraciones de sulfito.

En la **Figura 6.10** se muestran los gráficos obtenidos a concentraciones fijas de sulfito y variables de sulfato: a $[\text{Na}_2\text{SO}_3]$ bajas ($< 1 \text{ mM}$), sulfito y sulfato se unen a distintos sitios en la enzima mientras que a $[\text{Na}_2\text{SO}_3]$ altas ambos aniones compiten por el mismo sitio de unión.

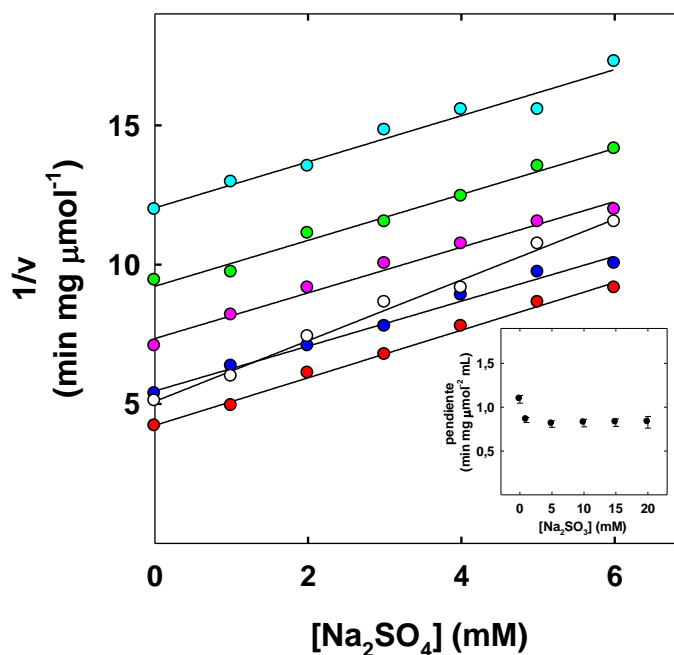


Figura 6.10 Gráfico de Yonetani-Theorell para el estudio del efecto de mezclas de sulfito y sulfato sobre la síntesis de ATP. Las determinaciones fueron realizadas tal cual se indica en Materiales y Métodos utilizando $[P_i] = 0,5 \text{ mM}$ y $[ADP] = 1 \text{ mM}$ a sulfato variable y sulfito fijo. Los símbolos representan los valores experimentales obtenidos a 0 (\circ), 1 (\bullet), 5 (\bullet), 10 (\bullet), 15 (\bullet) y 20 (\bullet) mM sulfito. En el inserto se observan las pendientes para cada una de las concentraciones de sulfito.

6.3. Consideraciones generales

En resumen, los resultados más arriba presentados permiten concluir que la unión de sulfito a un sitio con alta afinidad ($K_d \approx 10^{-3} \text{ M}$) produce un aumento de la velocidad de síntesis de ATP consecuencia de un incremento en $V_{m\acute{a}x}$ (**Figuras 6.5-A y 6.8-A**). El $K_{m(ADP)}$ disminuye sólo marginalmente (**Figura 6.5-B**), mientras que el $K_{m(P_i)}$ aumenta provocando una disminución de la relación $V_{m\acute{a}x}/K_{m(P_i)}$ (**Figura 6.8-C**). La ocupación de un segundo sitio con una afinidad más baja ($K_d \approx 10^{-2} \text{ M}$), produce una inhibición total de la reacción de síntesis de ATP, originada fundamentalmente en disminución de la $V_{m\acute{a}x}$ (**Figuras 6.5-A y 6.8-A**) acompañada por una pequeña disminución del $K_{m(ADP)}$ (**Figura 6.5-B**) y un aumento hiperbólico del $K_{m(P_i)}$ (**Figura 6.8-B**). Estos

resultados indican que: **i)** sulfito desplazaría, por ocupación de un sitio con alta afinidad, el equilibrio entre dos conformaciones de la F_1F_0 -ATP sintasa con distinta capacidad catalítica; **ii)** la ocupación de un sitio con más baja afinidad, si bien no impediría la unión de ADP y P_i , inhibiría completamente la reacción; y **iii)** por tanto, el complejo cuaternario ($F_1F_0 \bullet \text{sulfito} \bullet \text{ADP} \bullet P_i$) se puede formar si bien no es catalíticamente competente.

Previamente, fue informado que sulfito se comportaba como inhibidor competitivo respecto de P_i para la fotofosforilación en cloroplastos de arveja (Malyan A.N. y otros, **1982**). Asimismo, ha sido mostrado que sulfito inhibe la síntesis de ATP en cianobacterias y en cloroplastos (Bakels R.H.A. y otros, **1994**; Bakels R.H.A. y otros, **1996**) compitiendo con P_i por su sitio de unión. Los experimentos descritos en este Capítulo fueron realizados en un amplio rango de concentraciones de sulfito y haciendo un completo estudio cinético a distintas concentraciones de ambos sustratos, utilizando ensayos cinéticos continuos, siendo ésta y los distintos sistemas membranosos estudiados la posible causa de la diferencia entre lo informado por estos autores y lo presentado en este Capítulo (inhibición competitiva vs. mixta respecto de P_i).

Pacheco-Moisés y otros (**2002**) informaron que sulfito se comporta como un inhibidor mixto respecto de ADP y de P_i en vesículas de membranas de *P. denitrificans*, resultado que coincide con lo aquí presentado, salvo que sulfito aumentó el $K_{m(ADP)}$ según estos autores, mientras que los resultados más arriba mostrados indican que el anión lo disminuyó levemente. Esta pequeña discrepancia no es importante desde el punto de vista mecanístico y puede ser atribuida a diferencias entre los sistemas de *P. denitrificans* y de corazón bovino.

Más importante es el hecho de que los resultados aquí presentados muestran inequívocamente que sulfito se comporta, a bajas concentraciones, como activador no esencial de la síntesis de ATP, propiedad que no ha sido informada por ninguno de los autores antes mencionados. Los experimentos descritos en este trabajo de Tesis fueron realizados en un amplio rango de concentraciones de sulfito (0,25 – 20 mM), mientras que la de los autores antes mencionados fueron realizadas a concentraciones mayores, si bien no es posible descartar que la activación por sulfito sea una propiedad particular de la síntesis de ATP catalizada por preparaciones de membrana interna de mamíferos.

CAPÍTULO 7

7. Conclusiones

El comportamiento de sulfito descrito en los capítulos anteriores sólo puede explicarse postulando que el mismo se une a dos sitios en el sector F_1 del complejo de la ATPasa/sintasa mitocondrial. Tanto los estudios realizados sobre la reacción de hidrólisis de ATP empleando SMP o F_1 soluble como sobre la síntesis de ATP, permitieron concluir que a concentraciones bajas sulfito se comporta como activador no esencial compitiendo con bicarbonato por su sitio de unión (**Figuras 4.7, 5.9 y 6.9**), mientras que a altas concentraciones actúa como inhibidor de las reacciones de síntesis e hidrólisis de ATP comportándose como un ligando mutuamente excluyente respecto de sulfato (**Figuras 4.8, 5.10 y 6.10**). Previamente ha sido postulado que el sitio de acción de bicarbonato como activador de la hidrólisis de ATP e inhibidor de su síntesis sería el sitio no catalítico de baja afinidad (Lodeyro A.F. y otros, **2001**), mientras que sulfato ejercería sus efectos uniéndose a los sitios catalíticos (Lodeyro A.F. y otros, **2008**).

La dependencia de los valores de velocidad con la concentración de sulfito pudo ser descrita, tanto para la hidrólisis como para la síntesis de ATP,

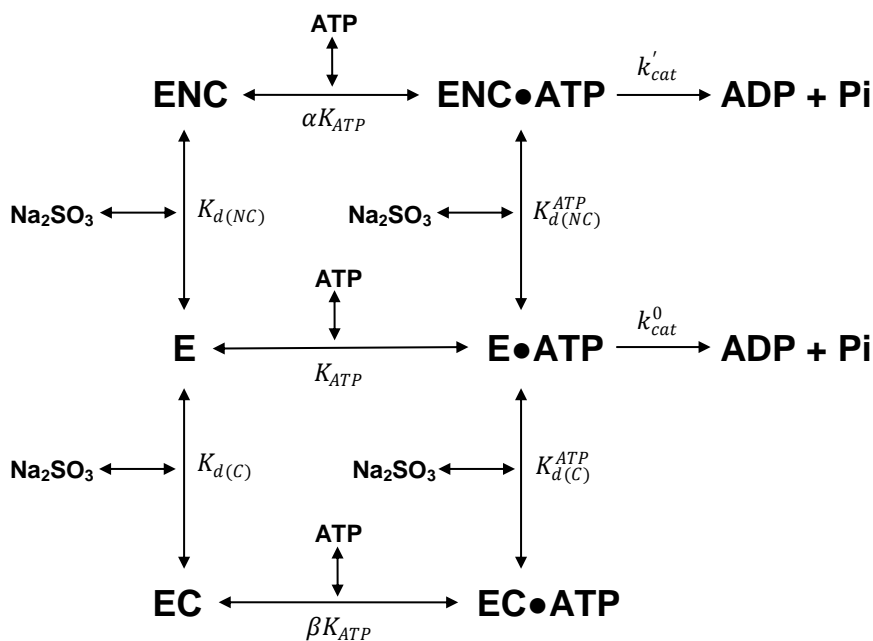
por la siguiente ecuación empírica: $v = \frac{v_0 + \frac{v_A}{K_a}[Na_2SO_3]}{1 + \left(\frac{1}{K_a} + \frac{1}{K_i}\right)[Na_2SO_3] + \frac{1}{K_a K_i}[Na_2SO_3]^2}$ (**Ecuación**

4.1).

Dicha ecuación es algebraicamente equivalente a la relación entre un polinomio de grado uno y uno de grados dos, ambos con término independiente:

$$v = \frac{a + b[Na_2SO_3]}{1 + c[Na_2SO_3] + d[Na_2SO_3]^2} \quad (7.1)$$

Si sulfito puede unirse tanto a un sitio no catalítico, como a un sitio catalítico, un primer interrogante es si lo hace de manera mutuamente excluyente. De ser así el esquema de reacción siguiente describiría el comportamiento de la enzima en presencia de sulfito:



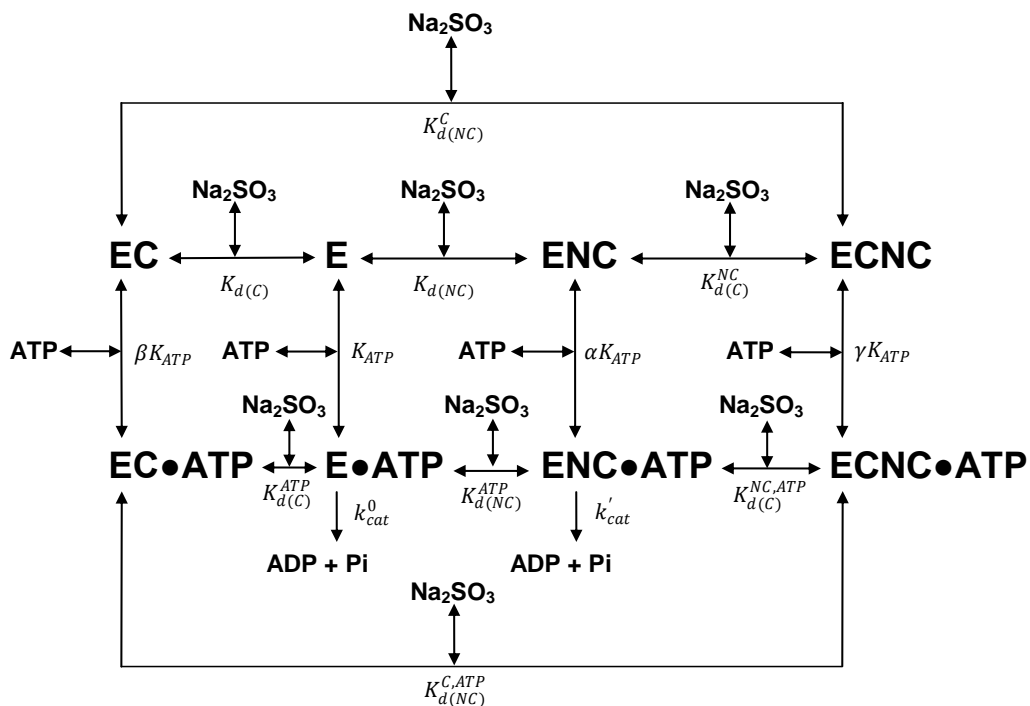
Esquema 7.1 Sitios mutuamente excluyentes.

E es la enzima libre, **E•ATP** el complejo enzima-sustrato, **ENC** la enzima con sulfito unido al sitio no catalítico, **ENC•ATP** el complejo enzima-sustrato con sulfito unido al sitio no catalítico, **EC** la enzima con sulfito unido al sitio catalítico y **EC•ATP** el complejo enzima-sustrato con sulfito unido al sitio catalítico, siendo este último un complejo de punto final. Sólo las especies **E•ATP** y **ENC•ATP** serían generadoras de producto.

Cuando se deriva la ecuación que describe la dependencia de la velocidad de reacción con la concentración de sulfito de acuerdo al **Esquema 7.1** se obtiene la siguiente ecuación (ver **Apéndice Sección 3**):

$$v = \frac{k_{cat}^0 \frac{[ATP]}{(K_{ATP} + [ATP])} + k'_{cat} \frac{[ATP]}{\alpha K_{d(NC)}(K_{ATP} + [ATP])} [Na_2SO_3]}{1 + \frac{\left(\frac{K_{ATP} + [ATP]}{K_{d(NC)}}\right) + \left(\frac{K_{ATP} + [ATP]}{K_{d(C)}}\right)}{(K_{ATP} + [ATP])} [Na_2SO_3]} [E]_0 \quad (7.2)$$

donde $[E]_0$ es la concentración total de enzima. Dicha ecuación es equivalente a la relación de dos polinomios de grado uno lo que no coincide con el comportamiento descrito en los capítulos anteriores. Por tanto es posible concluir que sulfito se puede unir al sitio no catalítico y a los sitios catalíticos de manera no excluyente dando origen a los siguientes complejos no presentes en el **Esquema 7.1: ECNC** (enzima con sulfito unido a ambos sitios) y **ECNC•ATP** (enzima-sustrato con sulfito unido a ambos sitios). Este último sería también un complejo de punto final. El siguiente modelo de reacción describe dicho comportamiento.



Esquema 7.2 Sitios no excluyentes.

La siguiente ecuación describe, según el **Esquema 7.2**, la dependencia de la velocidad de reacción con la concentración de sulfito (ver **Apéndice**

Sección 3):

$$v = \frac{k_{cat}^0 \frac{[ATP]}{(K_{ATP}+[ATP])} + k'_{cat} \frac{[ATP]}{\alpha K_{d(NC)}(K_{ATP}+[ATP])} [Na_2SO_3]}{1 + \frac{\left(\frac{K_{ATP}+[ATP]}{K_{d(NC)}}\right) + \left(\frac{K_{ATP}+[ATP]}{K_{d(C)}}\right)}{(K_{ATP}+[ATP])} [Na_2SO_3] + \frac{\left(\frac{K_{ATP}+[ATP]}{K_{d(C)}^{NC} K_{d(NC)}}\right)}{(K_{ATP}+[ATP])} [Na_2SO_3]^2} [E]_0 \quad (7.3)$$

Esta ecuación corresponde a la relación entre un polinomio de grado uno y uno de grado dos equivalente a la ecuación empírica utilizada en los capítulos anteriores.

7.1. Efecto de sulfito sobre la actividad ATPásica

Las determinaciones de velocidad de hidrólisis de ATP fueron realizadas a [ATP] correspondientes al K_m de baja afinidad (Roveri O.A. y Calcaterra N.B. **1985**; Calcaterra N.B., **1988**). Debido a ello los valores de velocidad dependieron con la concentración de ATP según una hipérbola que no pasa por el origen lo cual permitió estimar a las distintas $[Na_2SO_3]$ valores de $v_{ATP=0}$, $V_{m\acute{a}x}$, K_m y $V_{m\acute{a}x}/K_m$ (**Figura 7.1**). La dependencia de $V_{m\acute{a}x}$, K_m y $V_{m\acute{a}x}/K_m$ con la $[Na_2SO_3]$ de acuerdo al **Esquema 7.2** es descrita por las siguientes ecuaciones:

$$V_{m\acute{a}x} = \frac{V_{m\acute{a}x}^0 + V'_{m\acute{a}x} \frac{1}{\alpha K_{d(NC)}} [Na_2SO_3]}{1 + \left(\frac{1}{\alpha K_{d(NC)}} + \frac{1}{\beta K_{d(C)}}\right) [Na_2SO_3] + \frac{1}{\gamma K_{d(C)}^{NC} K_{d(NC)}} [Na_2SO_3]^2} \quad (7.4)$$

$$K_m = K_{ATP} \frac{1 + \left(\frac{1}{K_{d(NC)}} + \frac{1}{K_{d(C)}}\right) [Na_2SO_3] + \frac{1}{K_{d(C)}^{NC} K_{d(NC)}} [Na_2SO_3]^2}{1 + \left(\frac{1}{\alpha K_{d(NC)}} + \frac{1}{\beta K_{d(C)}}\right) [Na_2SO_3] + \frac{1}{\gamma K_{d(C)}^{NC} K_{d(NC)}} [Na_2SO_3]^2} \quad (7.5)$$

$$\frac{V_{m\acute{a}x}}{K_m} = \frac{V_{m\acute{a}x}^0 + V'_{m\acute{a}x} \frac{1}{\alpha K_{d(NC)}} [Na_2SO_3]}{K_{ATP} \left[1 + \left(\frac{1}{K_{d(NC)}} + \frac{1}{K_{d(C)}}\right) [Na_2SO_3] + \frac{1}{K_{d(C)}^{NC} K_{d(NC)}} [Na_2SO_3]^2 \right]} \quad (7.6)$$

El comportamiento teórico calculado utilizando las constantes detalladas en la **Tabla 7.1** describe razonablemente la dependencia de los valores estimados de $V_{m\acute{a}x}$, K_m y $V_{m\acute{a}x}/K_m$ con la $[\text{Na}_2\text{SO}_3]$ (**Figura 7.1**).

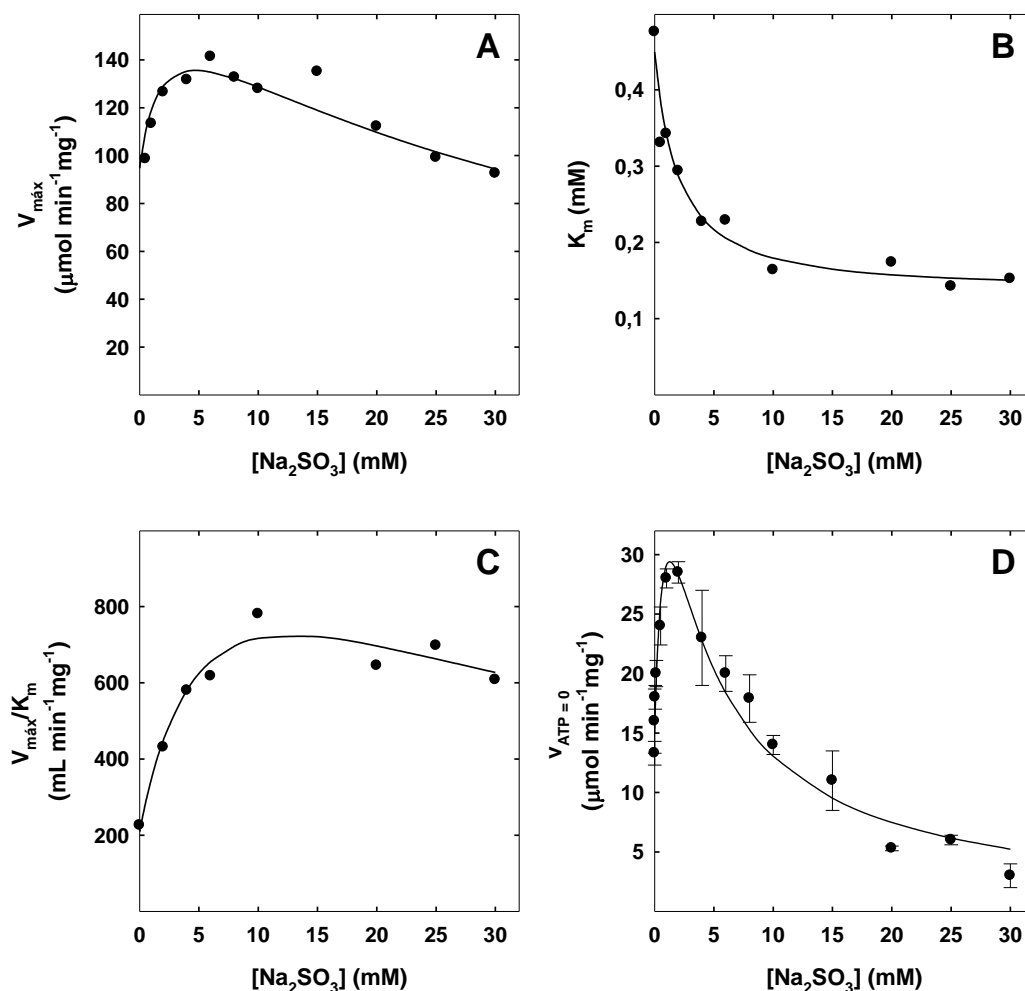


Figura 7.1 Dependencia de los parámetros cinéticos de la actividad ATPásica de F_1 con la concentración de sulfito de sodio según el Esquema 7.2. La ecuación $v = v_{ATP=0} + V_{m\acute{a}x}[ATP]/(K_m + [ATP])$ fue ajustada a los valores experimentales mostrados en la **Figura 4.4** a concentraciones de sulfito constante, lo que permitió estimar los valores $V_{m\acute{a}x}$ (**A**), K_m (**B**), $V_{m\acute{a}x}/K_m$ (**C**) y $v_{ATP=0}$ (**D**). Las líneas representan el comportamiento calculado según las **Ecuaciones 7.4 (A)**, **7.5 (B)** y **7.6 (C)** utilizando los valores de las constantes mostradas en la **Tabla 7.1**. La línea en el panel (**D**) es el mejor ajuste de la ecuación $v_{ATP=0} = (a + b[\text{Na}_2\text{SO}_3]) / (1 + c[\text{Na}_2\text{SO}_3] + d[\text{Na}_2\text{SO}_3]^2)$ a los valores de $v_{ATP=0}$ estimados.

Tabla 7.1 Constantes cinéticas utilizadas para las simulaciones que se muestran en las Figuras 7.1 y 7.2 (Efecto de sulfito sobre la actividad ATPásica de F₁).

Parámetros	
$V_{m\acute{a}x}^0$	95 $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$
$V'_{m\acute{a}x}$	200 $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$
K_{ATP}	0,45 mM
$K_{d(NC)}$	10 mM
α	0,2
$K_{d(C)}$	18 mM
β	0,7
$K_{d(C)}^{NC}$	23 mM
γ	0,3

Cuando se simuló utilizando la **Ecuación 7.7** (equivalente a la **Ecuación 7.3**) el comportamiento descrito en el **Capítulo 4** al estudiar el efecto de sulfito sobre la velocidad de hidrólisis de ATP catalizada por F₁ (**Figura 4.4**), se puede ver que dicha ecuación describe razonablemente la dependencia de la velocidad de reacción con las concentraciones de ATP y Na₂SO₃ cuando se utiliza el set de constantes detallado en la **Tabla 7.1**.

$$v - v_{ATP=0} = \frac{V_{m\acute{a}x}^0 \frac{[ATP]}{(K_{ATP}+[ATP])} + V'_{m\acute{a}x} \frac{[ATP]}{\alpha K_{d(NC)}(K_{ATP}+[ATP])} [Na_2SO_3]}{1 + \frac{\left(\frac{K_{ATP}+[ATP]}{K_{d(NC)}}\right) + \left(\frac{K_{ATP}+[ATP]}{K_{d(C)}}\right)}{(K_{ATP}+[ATP])} [Na_2SO_3] + \frac{\left(\frac{K_{ATP}+[ATP]}{K_{d(C)}^{NC} K_{d(NC)}}\right) + \left(\frac{K_{ATP}+[ATP]}{\gamma}\right)}{(K_{ATP}+[ATP])} [Na_2SO_3]^2} \quad (7.7)$$

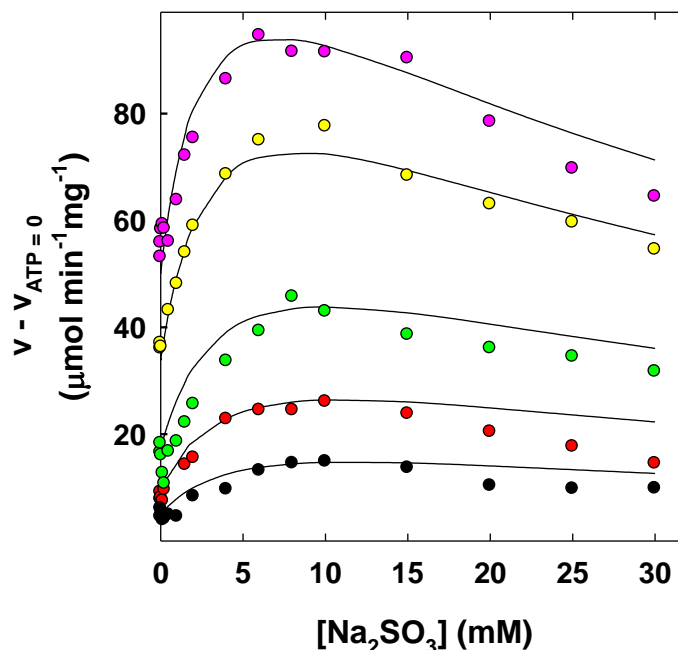


Figura 7.2 Efecto de sulfito sobre la actividad de F_1 a distintas concentraciones de ATP. Los puntos son los datos experimentales (Figura 4.4, velocidad inicial) obtenidos a las siguientes concentraciones fijas de ATP: 0,025 (●), 0,05 (●), 0,1 (●), 0,25 (●) y 0,5 (●) mM, a los que se les restó el valor teórico de $v_{ATP=0}$ (ver panel D de la Figura 7.1). Las líneas indican el comportamiento teórico según la Ecuación 7.7 utilizando los valores de las constantes detalladas en la Tabla 7.1.

En resumen, la propuesta de que sulfito se une a dos sitios en la ATPasa mitocondrial es consistente con el comportamiento experimental descrito en el **Capítulo 4**. La unión de sulfito a un sitio no catalítico aumenta k_{cat} y la afinidad aparente de la enzima por ATP (K_m). En consecuencia aumenta la eficiencia catalítica de la enzima libre ($V_{m\acute{a}x}/K_m$). A pesar de que la afinidad de la enzima por ATP también aumenta por la unión de sulfito a un sitio catalítico, el valor de $V_{m\acute{a}x}/K_m$ disminuye debido a que k_{cat} disminuye a cero (inhibición total). De acuerdo con la observación de que la unión de sulfito tanto a un sitio no catalítico como a un sitio catalítico aumenta la afinidad de la ATPasa por ATP, este último aumenta la afinidad de ambos sitios por sulfito (ver **Tabla 7.1**).

De manera similar, el efecto de sulfito sobre la actividad ATPásica de SMP puede ser razonablemente descrito por las **Ecuaciones 7.4 – 7.7** cuando se remplazan en las mismas las constantes por los valores detallados en la siguiente Tabla.

Tabla 7.2 Constantes cinéticas utilizadas para las simulaciones que se muestran en las Figuras 7.3 y 7.4 (Efecto de sulfito sobre la actividad ATPásica de SMP).

Parámetros	
$V_{máx}^0$	0,360 $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$
$V'_{máx}$	0,375 $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$
K_{ATP}	0,1 mM
$K_{d(NC)}$	0,02 mM
α	0,8
$K_{d(C)}$	3,2 mM
β	0,4
$K_{d(C)}^{NC}$	20 mM
γ	0,4

En la **Figura 7.3** se muestra como el comportamiento teórico calculado utilizando: la **Ecuación 7.7** y las constantes de la **Tabla 7.2**, describe bien la dependencia de los valores determinados de la velocidad de la reacción de hidrólisis de ATP catalizada por SMP a distintas [ATP] y de $[\text{Na}_2\text{SO}_3]$.

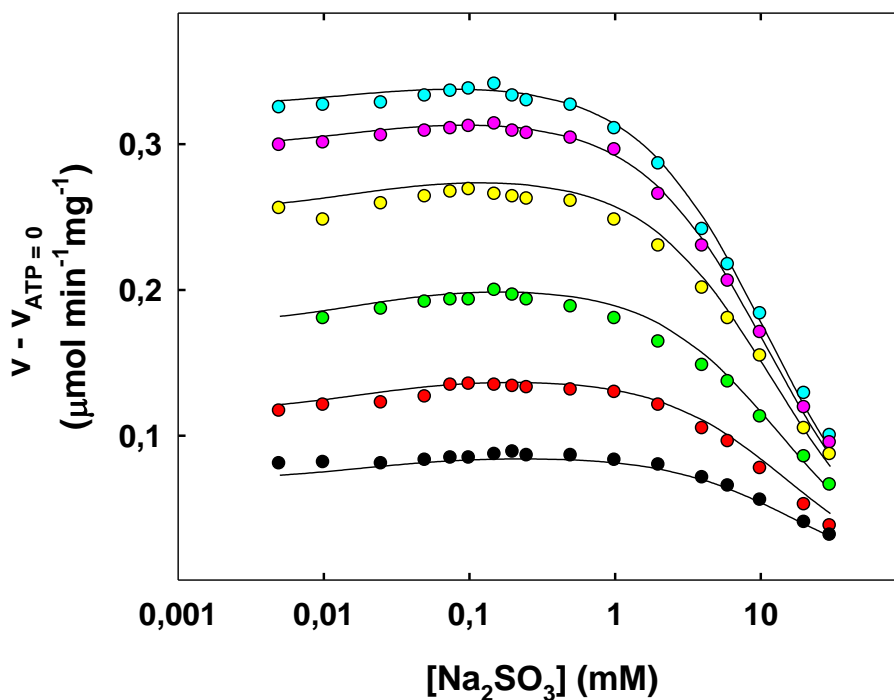


Figura 7.3 Dependencia de la actividad ATPásica de SMP con la concentración de sulfito a distintas [ATP]. Los puntos representan la diferencia entre los valores de velocidad tomados de la **Figura 5.5** y los de $v_{ATP=0}$ estimados a partir de la **Figura 5.7** (0,025 (●), 0,05 (●), 0,1 (●), 0,25 (●), 0,50 (●) y 1 (●) mM ATP). Las líneas indican los valores calculados utilizando la **Ecuación 7.7** con las constantes mostradas en la **Tabla 7.2**. Se emplea una escala logarítmica para la concentración de sulfito de sodio.

La dependencia de $V_{m\acute{a}x}$, K_m y $V_{m\acute{a}x}/K_m$ con la concentración de sulfito es también razonablemente descrita por las **Ecuaciones 7.4 – 7.6** utilizando el juego de valores de constantes de la **Tabla 7.2** (**Figura 7.4**)

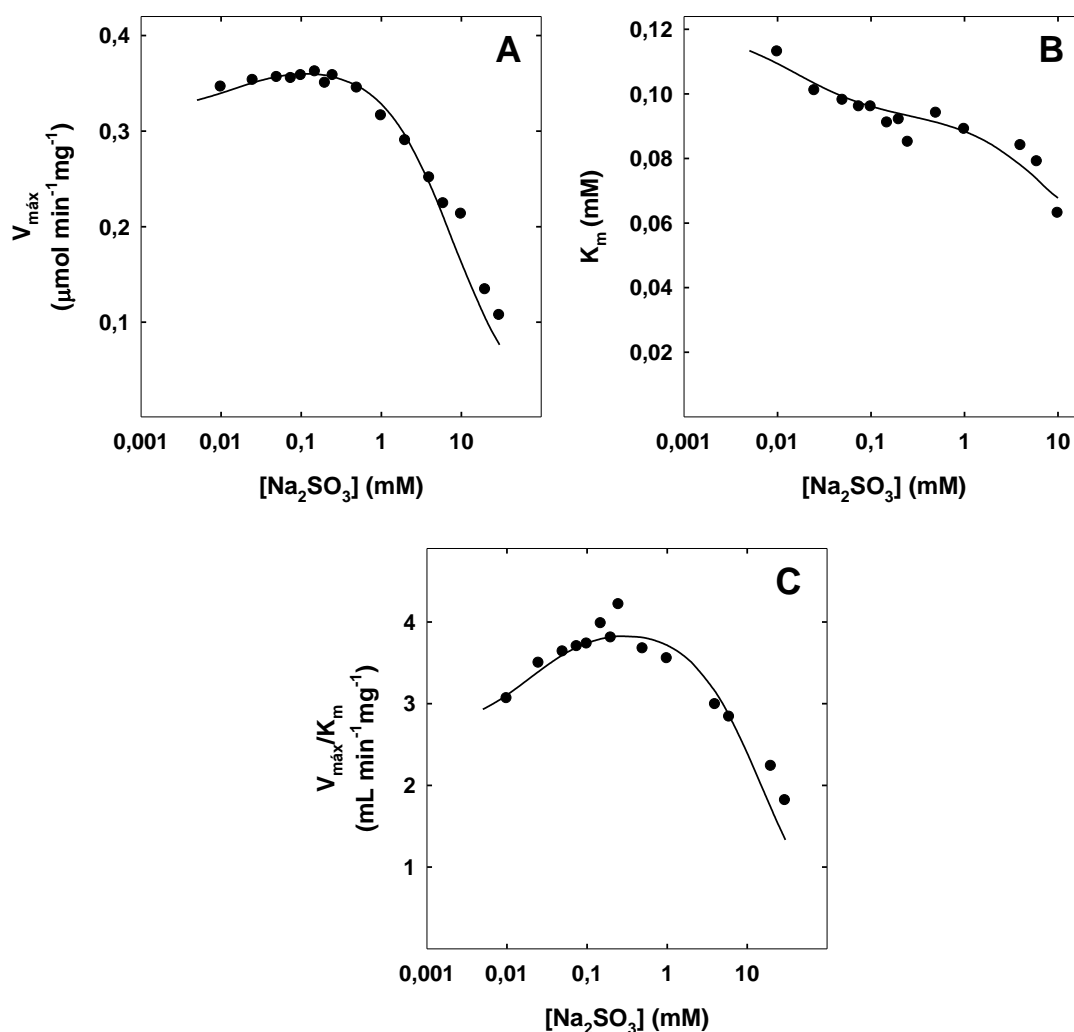


Figura 7.4 Dependencia de los parámetros cinéticos de la actividad ATPásica de SMP con la concentración de sulfito de sodio. Los puntos representan los valores de $V_{\text{máx}}$ (A), K_m (B) y $V_{\text{máx}}/K_m$ (C) y las líneas la dependencia descrita por las Ecuaciones 7.4, 7.5 y 7.6 utilizando los valores de constantes mostrados en la Tabla 7.2.

En conclusión, el modelo de reacción más arriba postulado (**Esquema 7.2**) para la actividad ATPásica de F_1 es también consistente con el comportamiento experimentalmente observado al estudiar el efecto de sulfito sobre la reacción catalizada por SMP (**Capítulo 5**). En ambos casos la unión de ATP aumenta la afinidad de sulfito por ambos sitios de unión. Sulfito afecta de manera similar a la actividad ATPásica de ambas preparaciones. Sin

embargo, la afinidad de los sitios de unión es mayor para SMP ($K_{d(NC)} = 0,02$ mM y $K_{d(C)} = 3,2$ mM) que para la ATPasa soluble ($K_{d(NC)} = 10$ mM y $K_{d(C)} = 18$ mM) y la relación $V'_{m\acute{a}x}/V^0_{m\acute{a}x}$ es mayor para F_1 (2,1) que para SMP (1,04).

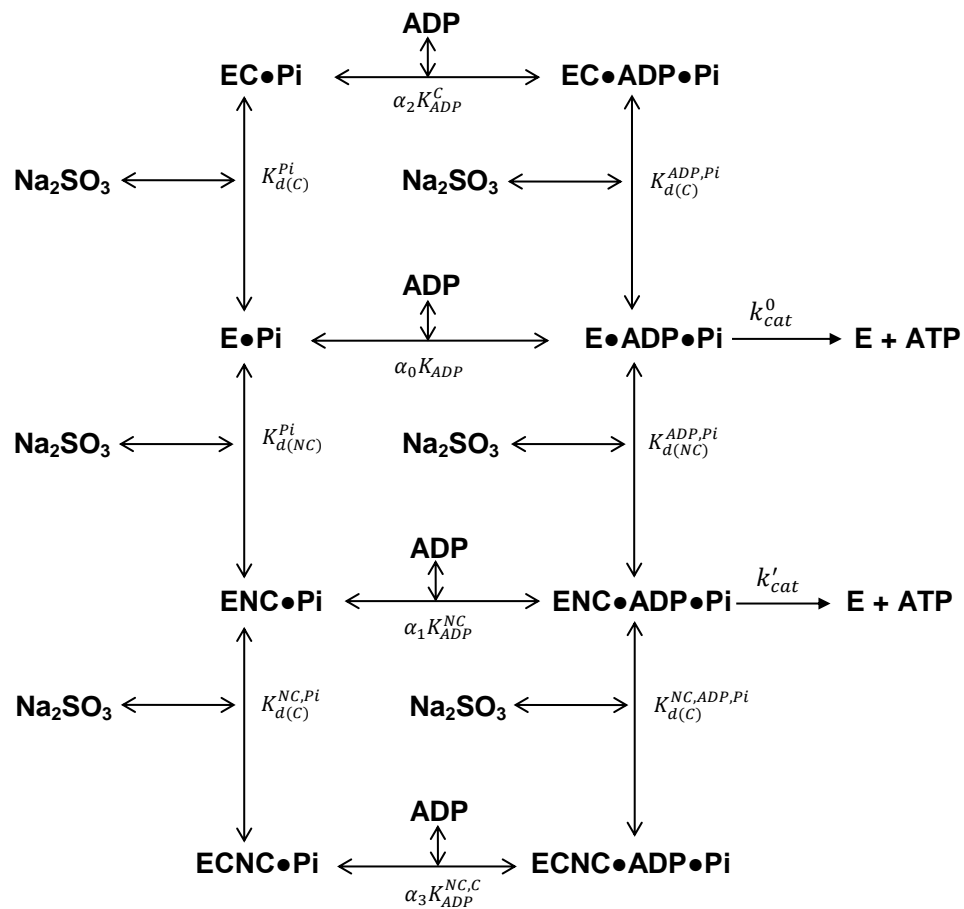
Por último, el hecho de que la inhibición sea mixta (no competitiva) lineal, indica claramente que el ATP puede unirse a F_1 aun cuando sulfito se encuentre unido a sus sitios de unión. Sin embargo, lo hace generando un complejo (**ECNC•ATP**) de punto final (**Esquema 7.2**).

7.2. Efecto de sulfito sobre la síntesis de ATP

A diferencia de la hidrólisis de ATP (reacción con un solo sustrato), la reacción de síntesis de ATP es una reacción de dos sustratos, para la que han sido postulados distintos mecanismos cinéticos para la unión de ADP y Pi. Calcaterra (1988) estudió la dependencia de velocidades iniciales con la concentración de ADP y Pi, lo que le permitió: **i)** confirmar la operación de un mecanismo secuencial; y **ii)** detectar la presencia de inhibición por exceso de ADP. Estos resultados, sumados a los obtenidos al estudiar el efecto de inhibidores competitivos, permitieron descartar la operación de un mecanismo Secuencial Ordenado Clásico con Pi como sustrato conductor (Calcaterra N.B., 1988; Lodeyro A.F. y otros, 2001). Pérez y Ferguson (1990) postularon que la síntesis de ATP en membranas de *Paracoccus denitrificans* seguiría un mecanismo Secuencial "Random". En cambio, Xing y otros (2005) modelaron un mecanismo Secuencial Ordenado con ADP como sustrato conductor para la síntesis de ATP. Sin embargo, esta propuesta no es compatible con la observación de que sulfato (inhibidor competitivo respecto de Pi), es inhibidor mixto respecto de ADP (Lodeyro A.F. y otros, 2008). Más recientemente, Watanabe y otros (2010) a partir de estudios de moléculas únicas, postularon

un mecanismo secuencial ordenado con Pi como sustrato conductor, mecanismo que no es compatible con el hecho de que bicarbonato (inhibidor competitivo respecto de ADP) sea no competitivo respecto de Pi (Lodeyro A.F. y otros, **2001**). Si bien la operación de un mecanismo Secuencial Ordenado-“Subsite” (Fromm H.J., **1969a** y **1969b**) con Pi como sustrato conductor es también compatible con los resultados anteriores obtenidos en el laboratorio (Calcaterra N.B., **1988**; Lodeyro A.F. y otros, **2001**; Lodeyro A.F. y otros, **2008**) para la discusión siguiente se asumirá que la síntesis de ATP por SMP sigue un mecanismo Secuencial “Random” y que la unión y disociación de ADP, Pi y sulfito son mucho más rápidas que la catálisis.

Los resultados obtenidos permiten proponer para el efecto de sulfito sobre la síntesis de ATP el siguiente esquema de reacción:



Esquema 7.4 Mecanismo cinético para la síntesis de ATP por SMP en presencia de sulfito a $[Pi] = \infty$.

A dicho esquema de reacción corresponde la siguiente ecuación de velocidad (ver **Apéndice Sección 5**):

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x}^0 \frac{[ADP]}{(\alpha_0 K_{ADP} + [ADP])} + V'_{m\acute{a}x} \frac{\alpha_0 K_{ADP}}{\alpha_1 K_{ADP}^{NC} K_{d(NC)}^{Pi}} \frac{[ADP]}{(\alpha_0 K_{ADP} + [ADP])} [Na_2SO_3]}{1 + \frac{\left[\frac{\alpha_0 K_{ADP}}{K_{d(NC)}^{Pi}} \left(1 + \frac{[ADP]}{\alpha_1 K_{ADP}^{NC}} \right) \right]}{(\alpha_0 K_{ADP} + [ADP])} + \frac{\left[\frac{\alpha_0 K_{ADP}}{K_{d(C)}^{Pi}} \left(1 + \frac{[ADP]}{\alpha_2 K_{ADP}^C} \right) \right]}{(\alpha_0 K_{ADP} + [ADP])}} \left[Na_2SO_3 \right] + \frac{\alpha_0 K_{ADP}}{K_{d(C)}^{NC,Pi} K_{d(NC)}^{Pi}} \left(\frac{1 + \frac{[ADP]}{\alpha_3 K_{ADP}^{NC,C}}}{(\alpha_0 K_{ADP} + [ADP])} \right) [Na_2SO_3]^2} \quad (7.8)$$

Esta ecuación es equivalente a la relación entre un polinomio de grado uno y uno de grado dos en $[Na_2SO_3]$ ambos con término independiente, equivalentes a las funciones semiempíricas que ajustaron los comportamientos descriptos en el **Capítulo 6**.

Las siguientes ecuaciones describen la dependencia de los parámetros cinéticos ($V_{m\acute{a}x}$, $K_{m(ADP)}$ y $V_{m\acute{a}x}/K_{m(ADP)}$) con la $[Na_2SO_3]$ para la síntesis de ATP:

$$V_{m\acute{a}x} = \frac{V_{m\acute{a}x}^0 + V_{m\acute{a}x}' \frac{\alpha_0 K_{ADP}}{\alpha_1 K_{ADP}^{NC} K_{d(NC)}^{Pi}} [Na_2SO_3]}{1 + \left(\frac{\alpha_0 K_{ADP}}{\alpha_1 K_{ADP}^{NC} K_{d(NC)}^{Pi}} + \frac{\alpha_0 K_{ADP}}{\alpha_2 K_{ADP}^C K_{d(C)}^{Pi}} \right) [Na_2SO_3] + \frac{\alpha_0 K_{ADP}}{\alpha_3 K_{ADP}^{NC,C} K_{d(C)}^{NC} K_{d(NC)}^{Pi}} [Na_2SO_3]^2} \quad (7.9)$$

$$K_{m(ADP)} = \alpha_0 K_{ADP} \frac{1 + \left(\frac{1}{K_{d(NC)}^{Pi}} + \frac{1}{K_{d(C)}^{Pi}} \right) [Na_2SO_3] + \frac{1}{K_{d(C)}^{NC} K_{d(NC)}^{Pi}} [Na_2SO_3]^2}{1 + \left(\frac{\alpha_0 K_{ADP}}{\alpha_1 K_{ADP}^{NC} K_{d(NC)}^{Pi}} + \frac{\alpha_0 K_{ADP}}{\alpha_2 K_{ADP}^C K_{d(C)}^{Pi}} \right) [Na_2SO_3] + \frac{\alpha_0 K_{ADP}}{\alpha_3 K_{ADP}^{NC,C} K_{d(C)}^{NC} K_{d(NC)}^{Pi}} [Na_2SO_3]^2} \quad (7.10)$$

$$\frac{V_{m\acute{a}x}}{K_{m(ADP)}} = \frac{\frac{V_{m\acute{a}x}^0}{\alpha_0 K_{ADP}} + \frac{V_{m\acute{a}x}'}{\alpha_1 K_{ADP}^{NC} K_{d(NC)}^{Pi}} [Na_2SO_3]}{1 + \left(\frac{1}{K_{d(NC)}^{Pi}} + \frac{1}{K_{d(C)}^{Pi}} \right) [Na_2SO_3] + \frac{1}{K_{d(C)}^{NC} K_{d(NC)}^{Pi}} [Na_2SO_3]^2} \quad (7.11)$$

En la **Figura 7.5** se muestra que las **Ecuaciones 7.9 – 7.11** describen bien la dependencia con la concentración de sulfito de los parámetros cinéticos estimados a $[Pi] = 3,5$ mM.

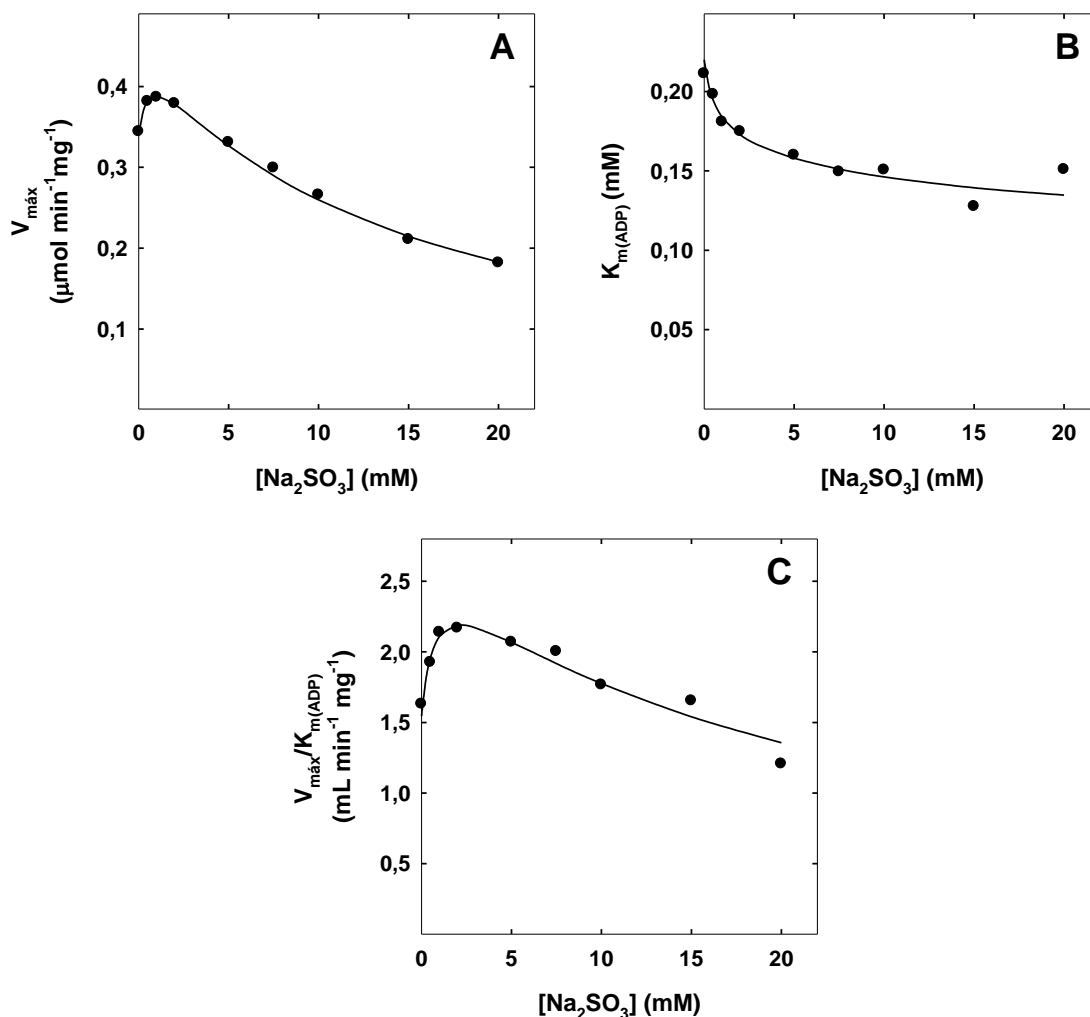
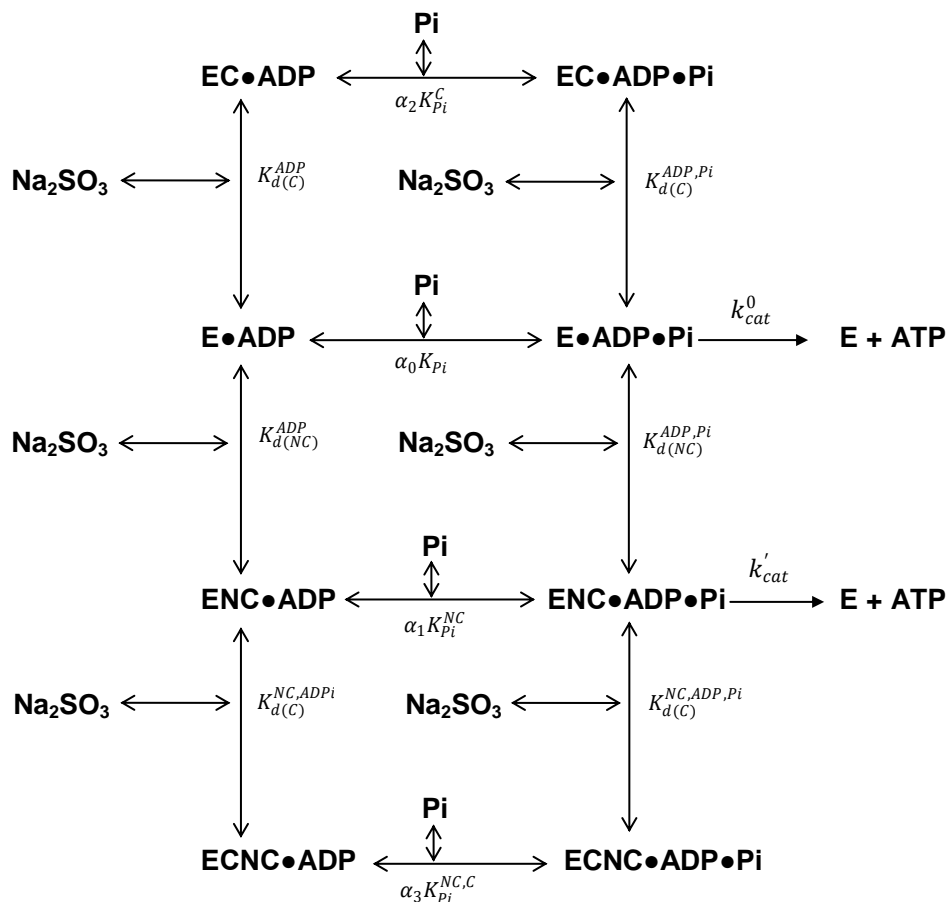


Figura 7.5 Dependencia de los parámetros cinéticos de la reacción de síntesis de ATP con la concentración de sulfito de sodio a $[\text{Pi}] = 3,5 \text{ mM}$. Los puntos representan los valores de $V_{\text{máx}}$ (A), $K_{\text{m(ADP)}}$ (B) y $V_{\text{máx}}/K_{\text{m(ADP)}}$ (C) estimados a partir de los datos mostrados en la Figura 6.4 y las líneas la dependencia descrita por las Ecuaciones 7.9, 7.10 y 7.11 utilizando los valores de constantes mostrados en la Tabla 7.3.

Tabla 7.3 Constantes cinéticas utilizadas para las simulaciones que se muestran en la Figura 7.5 (Efecto de sulfito sobre la ATP sintasa a $[P_i] = 3,5 \text{ mM}$).

Parámetros	
$V_{m\acute{a}x}^0$	$0,34 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$
$V'_{m\acute{a}x}$	$0,55 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$
$\alpha_0 K_{ADP} \equiv K_{m(ADP)}^0$	$0,2 \text{ mM}$
$K_{d(NC)}^{Pi}$	$0,8 \text{ mM}$
$\alpha_1 K_{ADP}^{NC} \equiv K_{m(ADP)}^1$	$0,2 \text{ mM}$
$\alpha_2 K_{ADP}^C \equiv K_{m(ADP)}^2$	$0,05 \text{ mM}$
$K_{d(C)}^{Pi}$	15 mM
$\alpha_3 K_{ADP}^{C,NC} \equiv K_{m(ADP)}^3$	$0,1 \text{ mM}$
$K_{d(C)}^{Pi,NC}$	20 mM

De manera similar, para el análisis del efecto de sulfito sobre la síntesis de ATP a $[ADP] = 1 \text{ mM}$ (**Figura 6.6**) se utilizó un modelo simplificado en el que se asume que la enzima se encuentra saturada con ADP.



Esquema 7.5 Mecanismo cinético simplificado ($[ADP] = \infty$) para la síntesis de ATP por SMP en presencia de sulfito.

La siguiente ecuación (ver **Apéndice Sección 6**) describe la dependencia de la velocidad de síntesis de ATP con las concentraciones de Pi y de sulfito:

$$v = \frac{V_{\text{máx}}^0 \frac{[Pi]}{(\alpha_0 K_{Pi} + [Pi])} + V'_{\text{máx}} \frac{\alpha_0 K_{Pi}}{\alpha_1 K_{Pi}^{NC} K_{d(NC)}^{ADP}} \frac{[Pi]}{(\alpha_0 K_{Pi} + [Pi])} [Na_2SO_3]}{1 + \left[\frac{\alpha_0 K_{Pi} \left(1 + \frac{[Pi]}{\alpha_1 K_{Pi}^{NC}} \right)}{K_{d(NC)}^{ADP} (\alpha_0 K_{Pi} + [Pi])} + \frac{\alpha_0 K_{Pi} \left(1 + \frac{[Pi]}{\alpha_2 K_{Pi}^C} \right)}{K_{d(C)}^{ADP} (\alpha_0 K_{Pi} + [Pi])} \right] [Na_2SO_3] + \left[\frac{\alpha_0 K_{Pi} \left(1 + \frac{[Pi]}{\alpha_3 K_{Pi}^{NC,C}} \right)}{K_{d(C)}^{NC,ADP} K_{d(NC)}^{ADP} (\alpha_0 K_{Pi} + [Pi])} \right] [Na_2SO_3]^2} \quad (7.12)$$

Los valores teóricos calculados según la ecuación anterior utilizando los valores de constantes cinéticas detallados en la **Tabla 7.4** describen

razonablemente el comportamiento observado al determinar el efecto de sulfito sobre la síntesis de ATP a distintas $[Pi]$ y a 1 mM ADP (**Figura 7.6**).

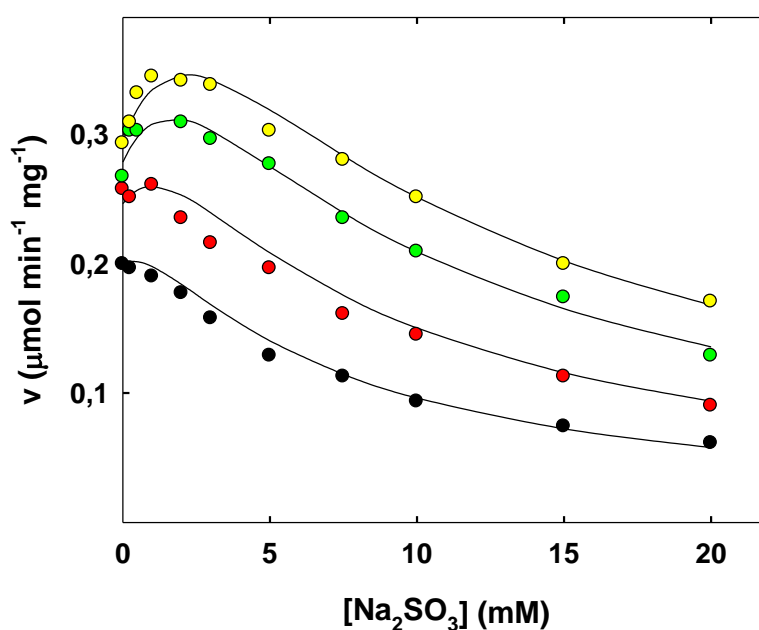


Figura 7.6 Dependencia de la actividad ATP sintasa con la concentración de sulfito a distintas $[Pi]$ y a $[ADP] = 1$ mM. Los datos experimentales fueron tomados de la **Figura 6.6** (0,5 (●), 1 (●), 2 (●) y 3,5 (●) mM Pi). Las líneas indican los valores calculados utilizando la **Ecuación 7.12** con las constantes mostradas en la **Tabla 7.4**.

Tabla 7.4 Constantes cinéticas utilizadas para las simulaciones que se muestran en las **Figuras 7.6** y **7.7** (Efecto de sulfito sobre la ATP sintasa a $[ADP] = 1$ mM).

Parámetros	
$V_{máx}^0$	$0,32 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$
$V'_{máx}$	$0,85 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$
$\alpha_0 K_{Pi} \equiv K_{m(Pi)}^0$	0,3 mM
$K_{d(NC)}^{ADP}$	1,4 mM
$\alpha_1 K_{Pi}^{NC} \equiv K_{m(Pi)}^1$	1,1 mM
$\alpha_2 K_{Pi}^C \equiv K_{m(Pi)}^2$	1,8 mM
$K_{d(C)}^{ADP}$	2,7 mM
$\alpha_3 K_{Pi}^{C,NC} \equiv K_{m(Pi)}^3$	2,2 mM
$K_{d(C)}^{ADP,NC}$	4,7 mM

De acuerdo al **Esquema 7.5** $V_{m\acute{a}x}$, $K_{m(Pi)}$ y $V_{m\acute{a}x}/K_{m(Pi)}$ dependen con la $[Na_2SO_3]$ segun:

$$V_{m\acute{a}x} = \frac{V_{m\acute{a}x}^0 + V_{m\acute{a}x}' \frac{\alpha_0 K_{Pi}}{\alpha_1 K_{Pi}^{NC} K_{ADP}^{d(NC)}} [Na_2SO_3]}{1 + \left(\frac{\alpha_0 K_{Pi}}{\alpha_1 K_{Pi}^{NC} K_{ADP}^{d(NC)}} + \frac{\alpha_0 K_{Pi}}{\alpha_2 K_{Pi}^C K_{ADP}^{d(C)}} \right) [Na_2SO_3] + \frac{\alpha_0 K_{Pi}}{\alpha_3 K_{Pi}^{NC,C} K_{ADP}^{d(C)} K_{ADP}^{d(NC)}} [Na_2SO_3]^2} \quad (7.13)$$

$$K_{m(Pi)} = \alpha_0 K_{Pi} \frac{1 + \left(\frac{1}{K_{ADP}^{d(NC)}} + \frac{1}{K_{ADP}^{d(C)}} \right) [Na_2SO_3] + \frac{1}{K_{ADP}^{NC,ADP} K_{ADP}^{d(NC)}} [Na_2SO_3]^2}{1 + \left(\frac{\alpha_0 K_{Pi}}{\alpha_1 K_{Pi}^{NC} K_{ADP}^{d(NC)}} + \frac{\alpha_0 K_{Pi}}{\alpha_2 K_{Pi}^C K_{ADP}^{d(C)}} \right) [Na_2SO_3] + \frac{\alpha_0 K_{Pi}}{\alpha_3 K_{Pi}^{NC,C} K_{ADP}^{d(C)} K_{ADP}^{d(NC)}} [Na_2SO_3]^2} \quad (7.14)$$

$$\frac{V_{m\acute{a}x}}{K_{m(Pi)}} = \frac{\frac{V_{m\acute{a}x}^0}{\alpha_0 K_{Pi}} + \frac{V_{m\acute{a}x}'}{\alpha_1 K_{Pi}^{NC} K_{ADP}^{d(NC)}} [Na_2SO_3]}{1 + \left(\frac{1}{K_{ADP}^{d(NC)}} + \frac{1}{K_{ADP}^{d(C)}} \right) [Na_2SO_3] + \frac{1}{K_{ADP}^{NC,ADP} K_{ADP}^{d(NC)}} [Na_2SO_3]^2} \quad (7.15)$$

En la **Figura 7.7** se puede observar que hay una buena concordancia entre los valores de los parámetros cinéticos calculados usando estas ecuaciones con el juego de constantes detallados en la **Tabla 7.4** y los estimados a partir de las determinaciones experimentales realizadas a 1 mM ADP (**Figura 6.8**).

En resumen, los esquemas de reacción simplificados (**Esquema 7.4 y 7.5**) describen de manera razonable el comportamiento experimental observado al estudiar el efecto de sulfito sobre la velocidad de la reacción de síntesis de ATP. De manera similar a lo observado para la actividad ATPásica de F_1 y de SMP, sulfito se uniría de manera no excluyente a dos sitios: no catalítico y catalítico. La unión a este último conduciría a la formación de complejos de punto final **EC•ADP•Pi** y **ECNC•ADP•Pi**. En cambio, la unión de sulfito con mayor afinidad al sitio no catalítico estabilizaría a la enzima en una conformación de mayor actividad fundamentalmente atribuible a un

marcado aumento de la $V_{m\acute{a}x}$. La uni3n de sulfito tanto al sitio no catal3tico como al catal3tico aumenta el K_m para Pi (ver **Tabla 7.4**), mientras que produce una leve disminuci3n en el K_m para ADP (ver **Tabla 7.3**).

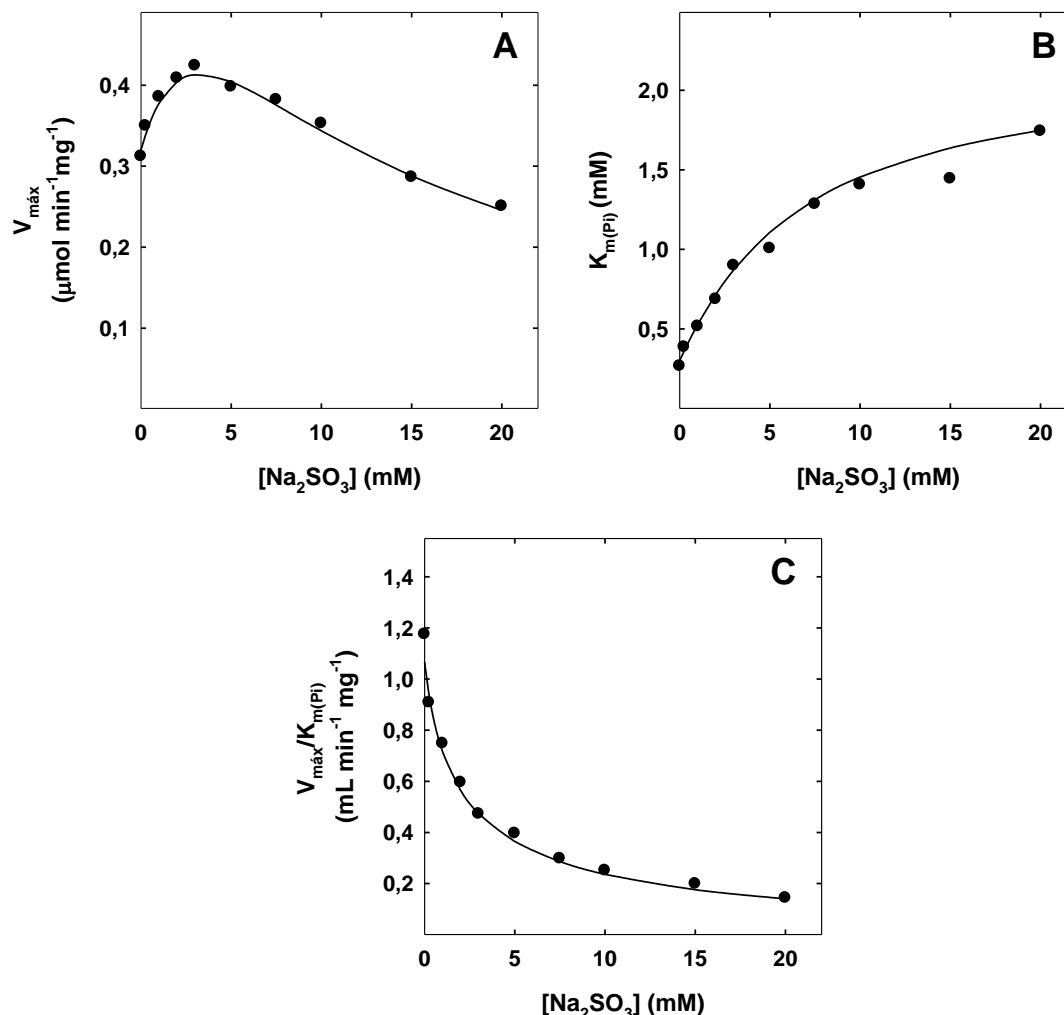


Figura 7.7 Dependencia de los par3metros cin3ticos de la reacci3n de s3ntesis de ATP con la concentraci3n de sulfito de sodio a $[\text{ADP}] = 1 \text{ mM}$. Los puntos representan los valores de $V_{m\acute{a}x}$ (A), $K_{m(\text{Pi})}$ (B) y $V_{m\acute{a}x}/K_{m(\text{Pi})}$ (C) estimados (Figura 6.8) y las l3neas la dependencia descrita por las Ecuaciones 7.13, 7.14 y 7.15 utilizando los valores de constantes mostrados en la **Tabla 7.4**.

Por 3ltimo, la afinidad del sitio no catal3tico por sulfito es mayor para la enzima en presencia de 3,5 mM Pi que en presencia de 1 mM ADP. Esta observaci3n es consistente con la propuesta de que sulfito compite con

bicarbonato y en consecuencia con nucleótidos de adenina por el sitio no catalítico de baja afinidad (Lodeyro A.F. y otros, **2001**).

Ha sido propuesto por Malyan y Vitseva (**2001**) que sulfito interactuaría con sitios no catalíticos y con sitios catalíticos de CF_1 . La observación de que el efecto activador de sulfito se mantendría aun cuando estarían ocupados por nucleótidos los tres sitios no catalíticos llevó a estos autores a postular que la activación se produciría por la unión del anión a un sitio catalítico lo cual estimularía la unión de sustrato, hidrólisis y disociación de productos en los otros dos sitios catalíticos. Esta propuesta está basada en el supuesto de que los tres nucleótidos firmemente unidos lo están a sitios no catalíticos, el que es aun motivo de discusión (Hartog A.F. y Berden J.A., **1999**; Kironde F.A. y Cross R.L., **1986**).

7.3. Observaciones finales

7.3.1. Unión de aniones a sitios no catalíticos

Los aniones bicarbonato y sulfito serían ligandos del sitio no catalítico de baja afinidad (sitio 6 según Berden J.A y Hartog A.F., **2000**) sitio al cual también se unen los nucleótidos de adenina y que tendría una función regulatoria sobre la ATP sintasa. La unión de bicarbonato induciría una conformación con menor afinidad del sitio catalítico por ADP (inhibición de la síntesis de ATP) y con mayor afinidad de dicho sitio por ATP (estímulo de la actividad ATPásica y atenuación la cooperatividad negativa) (Roveri O.A. y Calcaterra N.B., **1985**; Lodeyro A.F. y otros, **2001**).

A pesar de que se ha considerado que sulfito y bicarbonato actuarían de manera similar sobre la F_1F_0 -ATP sintasa (Recktenwald D. y Hess B., **1977**; Hartog A.F. y otros, **1997**), los resultados descriptos en esta Tesis muestran

que, al menos para las preparaciones de corazón bovino, no es ese el caso. La unión de sulfito con alta afinidad al sitio 6 estimula no sólo la actividad ATPásica (**Figuras 4.4 y 5.5**) sino que también estimula la síntesis de ATP (**Figuras 6.2 y 6.6**) a diferencia de bicarbonato que la inhibe de manera competitiva respecto de ADP (Lodeyro A.F. y otros, **2001**). El estímulo de la síntesis de ATP por sulfito se debe a un aumento en k_{cat} , dado que el anión afecta sólo marginalmente el $K_{m(ADP)}$, no evidenciándose competencia entre sulfito y ADP (**Figura 6.5**).

Es posible postular como hipótesis de trabajo que la F_1F_0 -ATP sintasa existe en distintas conformaciones según la ocupación del sitio 6: una conformación activa como hidrolasa e inactiva como sintasa cuando bicarbonato está unido a dicho sitio y una conformación con alta actividad tanto de hidrolasa como de sintasa cuando lo hace sulfito. La unión de ATP o ADP al sitio 6 modularía las afinidades relativas de los sitios catalíticos por ATP o ADP, regulando de tal manera las actividades de hidrolasa y de sintasa de la enzima (Roveri O.A. y Calcaterra N.B., **1985**; Lodeyro A.F. y otros, **2001**).

7.3.2. Unión de aniones a sitios catalíticos

Ha sido propuesto que sulfato se une al sitio catalítico (Lodeyro A.F. y otros, **2008**) inhibiendo la síntesis de ATP de manera competitiva respecto de Pi. De hecho Shirakihara y otros (**1997**) y Menz y otros (**2001**) al resolver la estructura de F_1 con todos los sitios catalíticos ocupados por nucleótidos, han observado una densidad electrónica compatible con sulfato unido al sitio de Pi. Por otra parte ha sido también informado que la enzima con sulfato unido, si bien no cataliza la síntesis de ATP, es capaz de catalizar la hidrólisis de ATP acoplada a la translocación de protones y de hacerlo con una k_{cat} mayor que

en ausencia del anión (Lodeyro A.F. y otros, **2008**), observación que ha permitido postular que la síntesis de ATP no es exactamente la reversa de su hidrólisis.

Según los resultados presentados en esta Tesis sulfito (a altas concentraciones) y sulfato son ligados mutuamente excluyentes: la unión de uno impide la del otro, aunque no necesariamente esta propiedad indica de manera inequívoca que lo hacen exactamente a un mismo subsitio del sitio catalítico de la enzima. De hecho ambos aniones muestran claras diferencias de comportamiento. Sulfato disminuye la afinidad de la enzima por ATP mientras que sulfito la aumenta, si bien al mismo tiempo impide de manera total la catálisis de la hidrólisis de ATP. La disminución a cero de la k_{cat} explica no sólo la inhibición total de la hidrólisis de ATP, sino que también sería una explicación razonable de la disminución del $K_{m(ATP)}$. Por otra parte sulfato inhibe la síntesis de ATP de manera competitiva respecto de Pi (Lodeyro A.F. y otros, **2008**) mientras que sulfito no impide la unión de ADP y Pi, pero conduce a la formación de un complejo catalíticamente no competente. Esta diferencia de comportamiento indica que sulfato y sulfito inducen distintas conformaciones del sitio catalítico: sulfato induciría una conformación que no permite la unión catalíticamente competente de Pi, mientras que sulfito induciría una conformación que, si bien permite la unión de ADP y Pi (sintasa) o ATP (hidrolasa), lo hace de manera tal que los mismos no estarían adecuadamente orientados respecto de los residuos responsables de catalizar las reacciones de deshidratación/hidratación.

BIBLIOGRAFIA

Bibliografía

Abrahams J.P., Leslie A.G.W., Lutter R., Walker J.E. (1994) "Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria" *Science* **370**, 621-628.

Ainsworth S., Kinderlerer J., Gregory R.B. (1983) "The regulatory properties of rabbit muscle pyruvate kinase. The influence of substrate concentrations" *Biochem. J.* **209**, 401-411.

Bakels R.H.A., Van Walraven H.S., Van Wielink J.E., Van Der Zwet-De Graaff I., Krenn B.E., Krab K., Berden J.A., Kraayenhof R. (1994) "The effect of sulfite on the ATP hydrolysis and synthesis activity of membrane-bound H⁺-ATP synthase from various species" *Biochem. Biophys. Res. Com.* **201**, 487-492.

Bakels R.H.A., Van Wielink J.E., Krab K., Van Walraven H.S. (1996) "The effect of sulfite on the ATP hydrolysis and synthesis activities in chloroplast and cyanobacterial membrane vesicles can be explained by competition with phosphate" *Arch. Biochem. Biophys.* **332**, 170-174.

Berden J.A., Hartog A.F. (2000) "Analysis of the nucleotide binding sites of mitochondrial ATP synthase provides evidence for a two-site catalytic mechanism" *Biochim. Biophys. Acta* **1458**, 234-251.

Berden J.A., Hartog A.F., Edel C.M. (1991) "Hydrolysis of ATP by F₁ can be described only on the basis of a dual-site mechanism" *Biochim. Biophys. Acta* **29**, 151-156.

Bianchet M.A., Hüllihen J., Pedersen P.L., Amzel L.M. (1998) "The 2.8-Å structure of rat liver F₁-ATPase: Configuration of a critical intermediate in ATP synthesis/hydrolysis" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 11065-11070.

Bianchet M.A., Pedersen P.L., Amzel M. (2000) "Notes on the mechanism of ATP synthesis" *J. Bioenerg. Biomembr.* **32**, 517-521.

Bowler M.W., Montgomery M.G., Leslie A.G.W., Walker J.E. (2006) "How azide inhibits ATP hydrolysis by the F-ATPases" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 8646-8649.

Bowler M.W., Montgomery M.G., Leslie A.G.W., Walker J.E. (2007) "Ground State Structure of F₁-ATPase from Bovine Heart Mitochondria at 1.9 Å Resolution" *J. Biol. Chem.* **282**, 14238-14242.

Boyer P.D. (1993) "The binding change mechanism for ATP synthase-some probabilities and possibilities" *Biochim. Biophys. Acta* **1140**, 215-250.

Boyer P.D. (1997) "The ATP synthase: a splendid molecular machine" *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 717-749.

Boyer P.D. (2002) "Catalytic site occupancy during ATP synthase catalysis" *FEBS Lett.* **512**, 29-32.

Breckenridge B.M. (1964) "The measurement of cyclic adenylate in tissues" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **52**, 1580-1586.

Bruni A., Frigeri L., Bigon E. (1977) "Cold lability of membrane-bound F₁-ATPase" *Biochim. Biophys. Acta* **462**, 323-332.

Calcaterra N.B. (1988) "Estructura y Función de Enzimas de Membranas. Mecanismo Reaccional y Regulación de la H⁺-ATPasa Mitocondrial" *Tesis Doctoral*, Universidad Nacional de Rosario.

Capellini P., Turina P., Fregni V., Melandri B.A. (1997) "Sulfite stimulates the ATP hydrolysis of but not proton translocation by the ATP synthase of *Rhodobacter capsulatus* and interferes with its activation by $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ " *Eur. J. Biochem.* **248**, 496-506.

Chernyak B.V., Dukhovich V.F., Khodiaev E.Yu. (1988) "The interaction of MgADP with H⁺-ATPase in rat liver mitochondria" *FEBS Lett.* **230**, 159-162.

Clayton C.A., Hines J.W., Elkins P.D. (1987) "Detection limits with specified assurance probabilities" *Anal. Chem.* **59**, 2506-2514.

Collison I.R., Skehel J.M., Fearnley I.M., Runswick M.J., Walker J.E. (1996) "The F₁F₀-ATPase complex from bovine heart mitochondria: the molar ratio of the subunits in the stalk region linking the F₁ and F₀ domains" *Biochemistry* **35**, 12640-12646.

Cross R.L., Grubmeyer C., Penefsky H.S. (1982) "Mechanism of ATP hydrolysis by beef heart mitochondrial ATPase. Rate enhancements resulting from cooperative interactions between multiple catalytic sites" *J. Biol. Chem.* **257**, 12101-12105.

Cross R.L., Kohlbrenner W.E. (1978) "The mode of inhibition of oxidative phosphorylation by efrapeptin (A23871). Evidence for an alternating site mechanism for ATP synthesis" *J. Biol. Chem.* **253**, 4865-4873.

- Currie L.A. (1999) "Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995)" *Anal. Chim. Acta* **391**, 105-126.
- Czub J., Grubmüller H. (2014) "Rotation Triggers Nucleotide-Independent Conformational Transition of the Empty β Subunit of F_1 -ATPase" *J. Am. Chem Soc.* **136**, 6960-6968.
- De Luca M., Wannlund J., McElroy W.D. (1979). "Factors affecting the kinetic of light emission from crude and purified firefly luciferase" *Anal. Biochem.* **95**, 194-198.
- Dickson V.K., Silvester J.A., Fearnley I.M., Leslie A.G.W., Walker J.E. (2006) "On the structure of the stator of the mitochondrial ATP synthase" *EMBO J.* **25**, 2911-2918.
- Diez M., Zimmermann B., Börsch M., König M., Schweinberger E., Steigmüller S., Reuter R., Felekyan S., Kudryavtsev V., Seidel C.A., Gräber P. (2004) "Proton-powered subunit rotation in single membrane-bound F_0F_1 -ATP synthase" *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 135-141.
- Du Z., Boyer P.D. (1990) "On the mechanism of sulfite activation of chloroplast thylakoid ATPase and the relation of ADP tightly bound at a catalytic site to the binding change mechanism" *Biochemistry* **29**, 402-407.
- Duchen M.R. (2004) "Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology" *Mol. Aspects. Med.* **25**, 365-451.

Duncan T.M., Bulygin V.V., Zhou Y., Hutcheon M.L., Cross R. (1995) "Rotation of subunits during catalysis by *Escherichia coli* F₁-ATPase" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 10964-10968.

Ebel R.E., Lardy H.A. (1975) "Stimulation of rat liver mitochondrial adenosine triphosphatase by anions" *J. Biol. Chem.* **250**, 191-196.

Fillingame R.H. (1997) "Coupling H⁺ transport and ATP synthesis in F₁F_o-ATP synthases: glimpses of interacting parts in a dynamic molecular machine" *J. Exp. Biol.* **200**, 217-224.

Foster J.F., Serman M.D. (1956) "Conformation changes in bovine serum albumin associated with hydrogen ion and urea binding. II Hydrogen ion titration curves" *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 3656-3660.

Fromm H.J., Zewe V. (1962) "Kinetics studies of yeast hexokinase" *J. Biol. Chem.* **237**, 3027-3032.

Fromm H.J., Silverstein E., Boyer P.D. (1964) "Equilibrium and net reaction rate in relation to the mechanism of yeast hexokinase" *J. Biol. Chem.* **239**, 3645-3652.

Fromm H.J. (1969a) "Summary of kinetic reaction mechanisms" *Method Enzymol.* **63**, 42-53.

Fromm H.J. (1969b). "Use of Competitive Inhibitors to Study Substrate Binding Order" *Method Enzymol.* **63**, 467-485.

Futai M., Nakanishi-Matsui M., Okamoto H., Sekiya M., Nakamoto R.K. (2012) "Rotational catalysis in proton pumping ATPases: from *E. coli* F-ATPase to mammalian V-ATPase" *Biochim. Biophys. Acta* **1817**, 1711-1721.

Gaballo A., Zanotti F., Papa S. (2002) "Structure and Interactions of Proteins Involved in the Coupling Function of the Proton motive F_0F_1 -ATP Synthase" *Curr. Protein Pept. Sc.* **3**, 451-460.

Gao Y.Q., Yang W., Karplus M. (2005) "A structure-based model for the synthesis and hydrolysis of ATP by F_1 -ATPase" *Cell* **123**, 195-205.

Gastaldi L.M. (2004) "Estabilidad Térmica de la ATPasa Soluble Mitocondrial. Efecto de Aniones reguladores" *Tesina de Grado*, Universidad Nacional de Rosario.

Gogol E.P. (1994) "Electron microscopy of the F_1F_0 ATP synthase: from structure to function" *Microsc. Res. Tech.* **27**, 294-306.

Green D.W., Grover G.J. (2000) "The IF_1 inhibitor protein of the mitochondrial F_1F_0 ATPase" *Biochim. Biophys. Acta* **1458**, 343-355.

Gresser M.J., Myers J.A., Boyer P.D. (1982) "Catalytic site cooperativity of beef heart mitochondrial F_1 adenosine triphosphatase. Correlations of initial velocity, bound intermediate and oxygen exchange measurements with an alternating three-site model" *J. Biol. Chem.* **257**, 12030-12038.

Grubmeyer C., Cross R.L, Penefsky H.S. (1982) "Mechanism of ATP hydrolysis by beef heart mitochondrial ATPase. Rate constants for elementary steps in catalysis at a single site" *J. Biol. Chem.* **257**, 12092-12100.

Guerrero K.J., Xue Z., Boyer P.D. (1990) "Active/Inactive state transitions of the chloroplast F₁ ATPase are induced by a slow binding and release of Mg²⁺ " *J. Biol. Chem.* **265**, 16280-16287.

Harris D.A., Rosing J., van der Stadt R.J., Slater E.C. (1973) "Tight binding of adenine nucleotides to beef-heart mitochondrial ATPase" *Biochim. Biophys. Acta* **314**, 149-153.

Hartog A.F., Berden J.A. (1999) "One of the non-exchangeable nucleotides of the mitochondrial F₁-ATPase is bound at beta-subunit: evidence for a non-rotatory two-site catalytic mechanism" *Biochim. Biophys. Acta* **1412**, 79-93.

Hartog A.F., Edel C.M., Braham J., Muijsers A.O., Berden J.A. (1997) "FSBA modifies both α - and β - subunits of F₁ specifically and can be bound together with AXP at the same α -subunit" *Biochim. Biophys. Acta* **1318**, 107-122.

Hatefi Y. (1985) "The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system" *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 1015-1069.

Jault J-M., Allison W.S. (1993) "Slow binding of ATP to non catalytic nucleotide binding sites which accelerates catalysis is responsible for apparent negative cooperativity exhibited by the bovine mitochondrial F₁-ATPase" *J. Biol. Chem.* **268**, 1558-1566.

Jaworek D., Gruber H., Bergmeyer H. U. (1974) "Adenosine-5'-diphosphate and adenosine-5'-monophosphate" en "*Methods of enzymatic analysis*" (H.U. Bergmeyer Ed.) Vol. 4, pp 2127-2129, Academic Press, New York.

Junge W., Lill H., Engelbrecht S. (1997) "ATP synthase: an electrochemical transducer with rotatory mechanics" *Trends Biochem. Sci.* **22**, 420-423.

Junge W., Sielaff H., Engelbrecht S. (2009) "Torque generation and elastic power transmission in the rotary F_0F_1 -ATPase" *Nature* **459**, 364-370.

Kagawa R., Montgomery M.G., Braig K., Leslie A.G., Walker J.E. (2004) "The structure of bovine F_1 -ATPase inhibited by ADP and beryllium fluoride" *EMBO J.* **23**, 2734-2744.

Kaibara C., Matsui T., Hisabori T., Yoshida M. (1996) "Structural asymmetry of F_1 -ATPase caused by the γ subunit generates a high affinity nucleotide binding site" *J. Biol. Chem.* **271**, 2433-2438.

Kasho V.N., Boyer P.D. (1984) "Relationships of inosine triphosphate and bicarbonate effects on F_1 ATPase to the binding change mechanism" *J. Bioenerg. Biomembr.* **16**, 407-419.

Kibak H., Van Eeckhout D., Cutler T., Taiz S.L., Taiz L. (1993) "Sulfite both stimulates and inhibits the yeast vacuolar H^+ -ATPase" *J. Biol. Chem.* **282**, 14238-14242.

Kironde F.A., Cross R.L. (1986) "Adenine nucleotide-binding sites on beef heart F_1 -ATPase. Conditions that affect occupancy of catalytic and non-catalytic sites" *J. Biol. Chem.* **261**, 12544-12549.

Knowles A.F., Penefsky H.S. (1972) "The subunit structure of beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. Isolation procedures" *J. Biol. Chem.* **247**, 6617-6623.

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

Lambeth D.O., Lardy H.A. (1971) "Purification and properties of rat-liver-mitochondrial adenosine triphosphatase" *Eur. J. Biochem.* **22**, 355-363.

Lamprecht D., Trautshold I. (1974) "Adenosine-5' triphosphate. Determination with hexokinase and glucose-6-P dehydrogenase" en "*Methods of enzymatic analysis*" (H.U. Bergmeyer, Ed.) Vol. 4, pp. 2101-2110, Academic Press, New York.

Lee H-J., Ho M-R., Tseng C-S., Hsu C-Y., Huang M-S., Peng H-L., Chang H-Y., (2011) "Exponential ATP amplification through simultaneous regeneration from AMP and pyrophosphate for luminescence detection of bacteria" *Anal. Biochem.* **418**, 19-23.

Lodeyro A.F. (2002) "Regulación de la H⁺-ATPasa reversible mitocondrial" *Tesis Doctoral*, Universidad Nacional de Rosario

Lodeyro A.F., Calcaterra N.B. Roveri O.A. (2001) "Inhibition of steady-state mitochondrial ATP synthesis by bicarbonate, an activating anion of ATP hydrolysis" *Biochim. Biophys. Acta* **1506**, 236-243.

Lodeyro A.F., Castelli M.V., Roveri O.A. (2008) "ATP hydrolysis-driven H⁺ translocation is stimulated by sulfate, a strong inhibitor of mitochondrial ATP synthesis" *J. Bioenerg. Biomembr.* **40**, 269-279.

Löw H., Vallin I. (1963) "Succinate-linked diphosphopyridine-nucleotide reduction in submitochondrial particles" *Biochim. Biophys. Acta* **69**, 361-374.

Lowry O.H., Passonneau J.V., Schulz D.W., Rock M.K. (1961) "The measurement of pyridine nucleotides by enzymatic cycling" *J. Biol. Chem.* **236**, 2746-2755.

Lowry O.H., Rosebrough A.L., Lewis Farr A., Randall R.J. (1951) "Protein measurement with the folin phenol reagent" *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.

Lust W.D., Feussner G.K., Barbehenn E.K., Passonneau J.V. (1981) "The enzymatic measurement of adenine nucleotides and P-creatine in picomole amounts" *Anal. Biochem.* **110**, 258-266.

Malyan A.N., Kuzmin A.N., Vitseva O.I. (1982) "On the participation of the "regulatory" site of CF₁-ATPase in phosphorylation" *Biochem. Int.* **5**, 325-328.

Malyan A.N., Vitseva O.I. (2001) "Interaction of Sulfite with the Noncatalytic and Catalytic Sites of Chloroplast Coupling Factor CF₁" *Biochemistry (Moscow)* **66**, 410-414.

Menz R. I., Walker J.E., Leslie A.G.W. (2001) "Structure of bovine mitochondrial F₁-ATPase with nucleotide bound to all three catalytic sites: implications for the mechanism of rotary catalysis" *Cell* **106**, 331-341.

Milgrom Y.M., Cross R.L. (2005) "Rapid hydrolysis of ATP by mitochondrial F₁-ATPase correlates with the filling of the second of three catalytic sites" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 13831-13836.

Milgrom Y.M., Murataliev M., Boyer P.D. (1998) "Bi-site activation occurs with the native and nucleotide-depleted mitochondrial F₁-ATPase" *Biochem. J.* **330**, 1037-1043.

Minkov I.B., Fitin A.F., Vasilyeva E.A., Vinogradov A.D. (1979) "Mg²⁺-induced ADP-dependent inhibition of the ATPase activity of beef heart mitochondrial coupling factor F₁" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **89**, 1300-1306.

Mitchell P. (1961) "Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type mechanism" *Nature* **191**, 144-148.

Mitchell P., Moyle J. (1971) "Activation and inhibition of mitochondrial adenosine triphosphatase by various anions and other agents" *J. Bioenerg.* **1**, 1-11.

Moyle J., Mitchell P. (1975) "Active/inactive state transitions of mitochondrial ATPase molecules influenced by Mg²⁺, anions and aurovertin" *FEBS Lett.* **56**, 55-61.

Molina V. (2012) <http://molinavirginiabiologia.blogspot.com.ar/2012/03/metabolismo-celular-respiracion-y.html>

Murataliev M.B., Boyer P.D. (1992) "The mechanism of stimulation of MgATPase activity of chloroplast F₁-ATPase by non-catalytic adenine-nucleotide binding. Acceleration of the ATP-dependent release of inhibitory ADP from catalytic site" *Eur. J. Biochem.* **209**, 681-687.

Nishizaka T., Oiwa K., Noji H., Kimura S., Muneyuki E., Yoshida M., Kinosita K. (2004) "Chemomechanical coupling in F₁-ATPase revealed by simultaneous observation of nucleotide kinetics and rotation" *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 142-148.

Noji H., Yasuda R., Yoshida M., Kinosita K. (1997) "Direct observation of the rotation of F₁-ATPase" *Nature* **386**, 299-302.

Pacheco-Moisés F., García J.J., Rodríguez-Zavala J.S., Moreno-Sánchez R. (2000) "Sulfite and membrane energization induce two different active states of the *Paracoccus denitrificans* F₀F₁-ATPase" *Eur. J. Biochem.* **267**, 993-1000.

Pacheco-Moisés F., Minauro-Sanmiguel F., Bravo C., García J.J. (2002) "Sulfite inhibits the F₁F₀-ATP synthase and activates the F₁F₀-ATPase of *Paracoccus denitrificans*" *J. Bioenerg. Biomembr.* **34**, 269-278.

Pänke O., Gumbiowski K., Junge W., Engelbrecht S. (2000) "F-ATPase: specific observation of the rotating c subunit oligomer of F₀F₁" *FEBS Lett.* **472**, 34-38.

Passoneau J.V., Lowry O.H. (1993) "Enzymatic Cycling" en "*Enzymatic Analysis. A Practical Guide*", pp. 85-110, Humana Press, Totowa, NJ.

Penefsky H.S. (1977) "Reversible binding of P_i by beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase" *J. Biol. Chem.* **252**, 2891-2899.

Perez J.A., Ferguson S.J. (1990) "Kinetics of oxidative phosphorylation in *Paracoccus denitrificans*. 1. Mechanism of ATP synthesis at the active site(s) of F₀F₁-ATPase" *Biochemistry* **29**, 10503-10518.

Pogoryelov D., Krah A., Langer J.D., Yildiz O., Faraldo-Gómez J.D., Meier T. (2010) "Microscopic rotary mechanism of ion translocation in the F₀ complex of ATP synthases" *Nature* **6**, 891-899.

Pullman M.E., Penefsky H.S., Data A., Racker E. (1960) "Partial resolution of enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. Purification and properties of

soluble dinitrophenol stimulated adenosine triphosphatase" *J. Biol. Chem.* **235**, 3322-3329.

Recktenwald D., Hess B. (1977) "Allosteric influence of anions on mitochondrial ATPase of yeast" *FEBS Lett.* **76**, 25-28.

Rees D.M., Montgomery M.G., Leslie A.G.W., Walker J.E. (2012) "Structural evidence of a new catalytic intermediate in the pathway of ATP hydrolysis by F₁-ATPase from bovine heart mitochondria" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 11139-11143.

Reynard A.M., Hass L.F., Jacobsen D.D., Boyer P.D. (1961) "The correlation of reaction kinetics and substrate binding with the mechanism of pyruvate kinase" *J. Biol. Chem.* **236**, 2277-2283.

Roveri O.A. (1981) "Estudio cinético de la modificación de partículas submitocondriales fosforilantes de corazón de bovino por fenilgloxal" 10^a Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Biofísica, La Plata. Argentina.

Roveri O.A., Calcaterra N.B. (1985) "Steady-state kinetics of F₁ ATPase. Mechanism of anion activation" *FEBS Lett.* **192**, 123-127.

Roveri O.A., Muller J.L.M., Wilms J., Slater E.C. (1980) "The pre-steady state and steady state kinetics of the ATPase activity of mitochondrial F₁" *Biochem. Biophys. Acta* **589**, 241-255.

Rubinstein J.L., Walker J.E., Henderson R. (2003) "Structure of the mitochondrial ATP synthase by electron cryomicroscopy" *EMBO J.* **22**, 6182-6192.

Sabbert D., Engelbrecht S., Junge W. (1996) "Intersubunit rotation in active F-ATPase" *Nature* **381**, 623-625.

Sakakibara T., Murakami S., Eisaki N., Nakajima Mo, Imai K. (1999) "An enzymatic cycling method using pyruvate orotophosphate dikinase and firefly luciferase for the simultaneous determination of ATP and AMP (RNA)" *Anal. Biochem.* **268**, 94-101.

Schuster S.M., Ebel R.E., Lardy H.A. (1975) "Kinetic studies on rat liver and beef heart mitochondrial ATPase. Evidence for nucleotide binding at separate regulatory and catalytic sites" *J. Biol. Chem.* **250**, 7848-7853.

Shimo-Kon R., Muneyuki E., Sakai H., Adachi K., Yoshida M., Kinoshita Jr. K. (2010) "Chemo-mechanical coupling in F₁-ATPase revealed by catalytic site occupancy during catalysis" *Biophys. J.* **98**, 1227-1236.

Shirakihara Y., Leslie A.G., Abrahams J.P., Walker J.E., Ueda T., Sekimoto Y., Kambara M., Saika K., Kagawa Y., Yoshida M. (1997) "The crystal structure of the nucleotide-free $\alpha_3\beta_3$ subcomplex of F₁-ATPase from the thermophilic *Bacillus PS3* is a symmetric trimer" *Structure* **5**, 812-836.

Silverstein T.P. (2014) "An exploration of how the thermodynamic efficiency of bioenergetic membrane systems varies with c-subunit stoichiometry of F₁F₀ ATP synthases" *J. Bioenerg. Biomembr.* **46**, 229-241.

Slater E.C., Kemp A., van der Kraan I., Muller J.L.M., Roveri O.A., Verschoor G.J., Wagenvoort R.J., Wielders J.P.M. (1979) "The ATP- and ADP-binding sites in mitochondrial coupling factor F₁ and their possible role in oxidative phosphorylation" *FEBS Lett.* **103**, 7-11.

Smith A.L. (1967) "Preparation, properties and conditions for assay of mitochondria: slaughterhouse material" *Method Enzymol.* **10**, 81-86.

Stock D., Leslie A.G., Walker J.E. (1999) "Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase" *Science* **286**, 1700-1705.

Suranyi E.M., Avi-Dor Y. (1966) "Swelling-contraction of mitochondria in hypotonic medium" *Biochim. Biophys. Acta* **118**, 445-452.

Syroeshkin A.V., Vasilyeva E.A., Vinogradov A.D. (1995) "ATP synthesis catalyzed by the mitochondrial F₁-F₀ ATP synthase is not a reversal of its ATPase activity" *FEBS Lett.* **366**, 29-32.

Symersky J., Pagadala V., Osowski D., Krah A., Meier T., Faraldo-Gómez J.D., Mueller D.M. (2012) "Structure of the c₁₀ ring of the yeast mitochondrial ATP synthase in the open conformation" *Nature* **19**, 485-492.

Tanigawara M., Tabata K.V., Ito Y., Ito J., Watanabe R., Ueno H., Ikeguchi M., Noji H. (2012) "Role of the DELSEED loop in torque transmission of F₁-ATPase" *Biophys. J.* **103**, 970-978.

Valero E., García-Carmona F. (1998) "A continuous spectrophotometric method based on enzymatic cycling for determining L-Glutamate" *Anal. Biochem.* **259**, 265-271.

Valero E., Varón R., García-Carmona F. (2000) "Kinetics of a self-amplifying substrate cycle: ADP-ATP cycling assay" *Biochem. J.* **350**, 237-243.

Valero E., Varón R., García-Carmona F. (2004) "Kinetic analysis of a model for double substrate cycling: highly amplified ADP (and/or ATP) quantification" *Biophys. J.* **86**, 3598-3606.

Vallejos R.H. (1965) "Propiedades de los sistemas multienzimáticos de transporte de electrones. (Mecanismo de respiración celular, influencia de los esteroides)" *Tesis Doctoral*, Universidad de La Plata.

van de Stadt R.J., de Boer B.L., van Dam K. (1973) "The interaction between the mitochondrial ATPase (F1) and the ATPase inhibitor" *Biochim. Biophys. Acta* **292**, 338-349.

Vasilyeva E.A., Minkov I.B., Fitin A.F., Vinogradov A.D. (1982) "Kinetic mechanism of mitochondrial adenosine triphosphatase. Inhibition by azide and activation by sulphite" *Biochem. J.* **202**, 15-23.

Vinogradov A.D. (2000) "Steady-state and pre-steady-state kinetics of the mitochondrial F₁F₀ATPase: is ATP synthase a reversible molecular machine?" *J. Exp. Biol.* **203**, 41-49.

Walker J.E. (1994) "The regulation of catalysis in ATP synthase" *Curr. Opin. Struc. Biol.* **4**, 912-918.

Walker J.E., Dickson V.K. (2006) "The peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase" *Biochim. Biophys. Acta* **1757**, 286-296.

Watanabe R., Matsukage Y., Yukawa A., Tabata K.V., Noji H. (2014) "Robustness of the Rotary Catalysis Mechanism of F1-ATPase" *J. Biol. Chem.* **289**, 19331-19340.

Watanabe R., Iino R., Noji H. (2010) "Phosphate release in F₁-ATPase catalytic cycle follows ADP release" *Nat. Chem. Biol.* **6**, 814-820.

Watanabe R., Noji H. (2013) "Chemomechanical coupling mechanism of F₁-ATPase: catalysis and torque generation" *FEBS Lett.* **587**, 1030-1035.

Weber J., Senior A.E. (2003) "ATP synthesis driven by proton transport in F₁F₀-ATP synthase" *FEBS Lett.* **12**, 61-70.

Wittig I., Schägger H. (2009) "Supramolecular organization of ATP synthase and respiratory chain in mitochondrial membranes" *Biochim. Biophys. Acta* **1787**, 672-680.

Xing J., Liao J-C., Oster G. (2005) "Making ATP" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 16539-16546.

Yagi K., Osawa T. (1960) "Complex formation of apo-enzyme, coenzyme and substrate of D-amino acid oxidase. I. Kinetic analysis using indicators" *Biochim. Biophys. Acta* **42**, 381-387.

Yasuda R., Noji H., Kinosita K. (2001) "Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F₁-ATPase" *Nature* **410**, 898-904.

Yasuda R., Noji H., Kinosita K., Yoshida M. (1998) "F₁-ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120° substeps" *Cell* **93**, 1117-1124.

Yonetani T., Theorell H. (1964) "Studies on liver alcohol dehydrogenase complexes. III Multiple inhibition kinetics in the presence of two competitive inhibitors" *Arch. Biochem. Biophys.* **106**, 243-251.

APÉNDICE

Apéndice

1. Desarrollo de ecuaciones semiempíricas

1.1. Velocidad vs. $[Na_2SO_3]$

El efecto de sulfito como activador no esencial puede ser descrito por la siguiente Ecuación:

$$v = \left(v_0 + \frac{(v_A - v_0)[Na_2SO_3]}{K_a + [Na_2SO_3]} \right) \quad (1)$$

v_0 y v_A son las velocidades en ausencia de sulfito y a concentración infinita del mismo y K_a la constante de disociación aparente del activador. Por otra parte la ecuación correspondiente a un inhibidor completo es:

$$v = v_0 \frac{K_i}{K_i + [Na_2SO_3]} \quad (2)$$

K_i es la constante de disociación aparente del inhibidor. Si sulfito se une a dos sitios actuando como activador en uno de ellos y como inhibidor en el segundo, combinando (1) y (2):

$$v = \left(v_0 + \frac{(v_A - v_0)[Na_2SO_3]}{K_a + [Na_2SO_3]} \right) \left(\frac{K_i}{K_i + [Na_2SO_3]} \right) \quad (3)$$

Multiplicando ambos paréntesis y sacando denominador común se obtiene:

$$v = \frac{v_0 + \frac{v_A}{K_a}[Na_2SO_3]}{1 + \left(\frac{1}{K_a} + \frac{1}{K_i} \right)[Na_2SO_3] + \frac{[Na_2SO_3]^2}{K_a K_i}} \quad (4)$$

1.2. $V_{m\acute{a}x}$ vs. $[Na_2SO_3]$

De manera similar a lo discutido en la Sección 1.1., $V_{m\acute{a}x}$ dependerá con la $[Na_2SO_3]$ de acuerdo a la siguiente Ecuación:

$$V_{m\acute{a}x} = \frac{v_{m\acute{a}x}^0 + \frac{v_{m\acute{a}x}^A}{K_a}[Na_2SO_3]}{1 + \left(\frac{1}{K_a} + \frac{1}{K_i} \right)[Na_2SO_3] + \frac{[Na_2SO_3]^2}{K_a K_i}} \quad (5)$$

Las constantes K_a y K_i corresponden en este caso a las constantes de disociación de sulfito de los sitios activador e inhibidor en el complejo **ES** (ver **Sección 2.**).

1.3. K_m vs. $[Na_2SO_3]$

Si asumimos que sulfito se une al sitio activador con una constante de disociación igual a K_d^1 y produce un cambio en el valor de K_m de K_m^0 a K_m^1 de acuerdo a la siguiente Ecuación:

$$K_m = K_m^1 + \frac{(K_m^0 - K_m^1)}{1 + \frac{[Na_2SO_3]}{K_d^1}} \quad (6)$$

Si además la unión con menor afinidad (K_d^2) al sitio inhibitorio modificaría el K_m de K_m^1 a K_m^2 . En conjunto la unión a ambos sitios modificaría el K_m de acuerdo a:

$$K_m = K_m^2 + \frac{\left(\frac{K_m^1 + K_m^1 \frac{[Na_2SO_3]}{K_d^1} + K_m^0 - K_m^1}{1 + \frac{[Na_2SO_3]}{K_d^1}} \right) - K_m^2}{1 + \frac{[Na_2SO_3]}{K_d^2}} \quad (7)$$

Resolviendo el segundo término

$$K_m = K_m^2 + \frac{K_m^1 \frac{[Na_2SO_3]}{K_d^1} + K_m^0 - K_m^2 - K_m^2 \frac{[Na_2SO_3]}{K_d^1}}{1 + \frac{[Na_2SO_3]}{K_d^2} + \frac{[Na_2SO_3]}{K_d^1} + \frac{[Na_2SO_3]^2}{K_d^1 K_d^2}} \quad (8)$$

Multiplicando K_m^2 por el denominador del segundo término, simplificando y agrupando:

$$K_m = \frac{K_m^0 + \left(\frac{K_m^1}{K_d^1} + \frac{K_m^2}{K_d^2} \right) [Na_2SO_3] + \frac{K_m^2}{K_d^1 K_d^2} [Na_2SO_3]^2}{1 + \left(\frac{1}{K_d^2} + \frac{1}{K_d^1} \right) [Na_2SO_3] + \frac{1}{K_d^1 K_d^2} [Na_2SO_3]^2} \quad (9)$$

1.4. V_{max}/K_m vs. $[Na_2SO_3]$

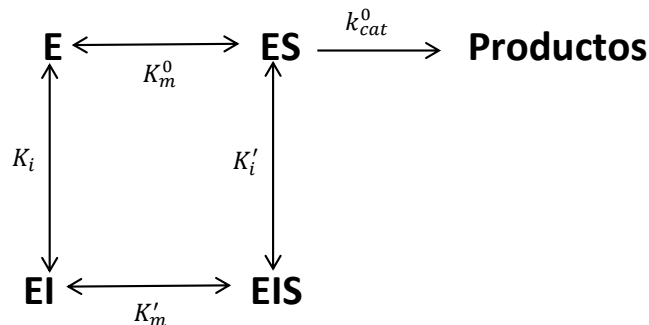
De manera similar es posible deducir que la acción conjunta de un activador no esencial y de un inhibidor total resultará en la siguiente dependencia de $V_{m\acute{a}x}/K_m$ con la $[Na_2SO_3]$:

$$\frac{V_{m\acute{a}x}}{K_m} = \frac{\frac{v_{m\acute{a}x}^0}{K_m^0} + \frac{v'_{m\acute{a}x}}{K_m^1} \frac{1}{K_d^1} [Na_2SO_3]}{1 + \left(\frac{1}{K_d^1} + \frac{1}{K_d^2}\right) [Na_2SO_3] + \frac{1}{K_d^1 K_d^2} [Na_2SO_3]^2} \quad (10)$$

La **Ecuación 10** tiene como numerador un polinomio de grado 1 en $[Na_2SO_3]$ a diferencia de la **Ecuación 9** pues $\frac{v_{m\acute{a}x}^2}{K_m^2} = 0$ dado que $v_{m\acute{a}x}^2 = 0$ (parámetro correspondiente a la enzima con sulfito unido al sitio inhibitorio).

2. Significado de constantes

2.1. De inhibición



Esquema 1 Inhibidor mixto lineal.

La Ecuación que rige la dependencia de la velocidad de reacción con la concentración de sustrato e inhibidor para un inhibidor mixto lineal es:

$$v = \frac{k_{cat}^0 [E]_0 [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_i'}\right)} = \frac{v_{m\acute{a}x}^0 [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_i'}\right)} \quad (11)$$

$[E]_0$ es la concentración total de enzima; K_i es la constante de disociación del inhibidor de la enzima libre (K_d^E) y K_i' la del complejo enzima-sustrato K_d^{ES} .

Cuando se determina el efecto sobre $V_{m\acute{a}x}$ se observa que ésta disminuye con la concentración de inhibidor según la siguiente ecuación:

$$V_{m\acute{a}x} = \frac{V_{m\acute{a}x}^0}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \quad (12)$$

Dicha ecuación es la ecuación de una hipérbola con asíntota horizontal igual a 0 y ordenada al origen igual a $V_{m\acute{a}x}^0$. La asíntota vertical permite estimar K_i' y por ende K_d^{ES} . Por otra parte, K_m depende con la concentración de inhibidor de una manera más compleja:

$$K_m = K_m^0 \frac{1 + \frac{[I]}{K_i}}{1 + \frac{[I]}{K_i'}} = K_m^0 + \frac{\Delta K_m [I]}{K_i' + [I]} \quad (13)$$

La **Ecuación 13** representa a una hipérbola rectangular con ordenada al origen igual a K_m^0 , asíntota horizontal igual $K_m^0 \frac{K_i'}{K_i}$ y asíntota vertical igual a $-K_i'$. La variación del valor de K_m es función de ambas constantes de disociación ($\Delta K_m = K_m^0 \left(\frac{K_i'}{K_i} - 1 \right)$).

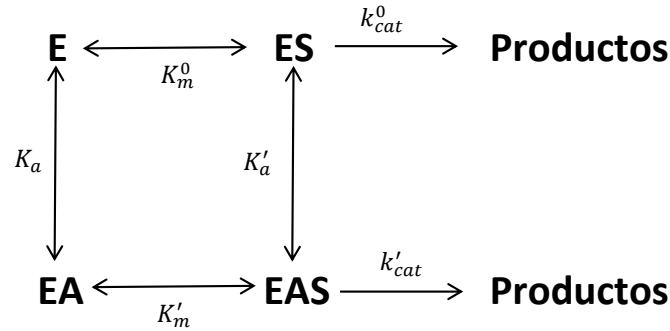
Por último, la relación $V_{m\acute{a}x}/K_m$ depende con la concentración de inhibidor según:

$$\frac{V_{m\acute{a}x}}{K_m} = \frac{V_{m\acute{a}x}^0}{K_m^0} \frac{1}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)} \quad (14)$$

Al igual que para V_{max} la hipérbola que describe la dependencia de $V_{m\acute{a}x}/K_m$ con la concentración de inhibidor posee una asíntota horizontal igual a

0, pero a diferencia de aquella, la asíntota vertical es igual a $-K_i$, equivalente a la constante de disociación del inhibidor de la enzima libre (K_d^E).

2.2. De activación



Esquema 2 Activador no esencial

La velocidad de reacción depende con la concentración de sustrato y de un activador no esencial (A) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x}^0 \left(1 + \beta \frac{[A]}{K'_a}\right) [S]}{K_s \left(1 + \frac{[A]}{K_a}\right) + [S] \left(1 + \frac{[A]}{K'_a}\right)} \quad (15)$$

K_a es la constante de disociación de A de la enzima libre (K_d^E), K'_a la del complejo enzima-sustrato (K_d^{ES}) y β es igual a k'_{cat}/k_{cat} . Cuando se determina el efecto sobre $V_{m\acute{a}x}$ se observa que ésta varía según una hipérbola que no pasa por el origen según la siguiente ecuación:

$$V_{m\acute{a}x} = V_{m\acute{a}x}^0 \left(\frac{1 + \beta \frac{[A]}{K'_a}}{1 + \frac{[A]}{K'_a}} \right) = V_{m\acute{a}x}^0 + \frac{\Delta V_{m\acute{a}x} [A]}{K'_a + [A]} \quad (16)$$

La ordenada al origen es igual a $V_{m\acute{a}x}^0$; la asíntota horizontal es igual $V_{m\acute{a}x}^0 + \Delta V_{m\acute{a}x}$, el aumento de $V_{m\acute{a}x}$ depende de β y K'_a ($\Delta V_{m\acute{a}x} = V_{m\acute{a}x}^0 (\beta - 1)$) y la asíntota vertical es igual a $-K'_a$, permitiendo estimar la constante de disociación del activador del complejo enzima-sustrato.

Por otra parte el K_m varía con la $[A]$ según la siguiente ecuación:

$$K_m = K_m^0 \left(\frac{1 + \frac{[A]}{K_a}}{1 + \frac{[A]}{K_a'}} \right) = K_m^0 + \left(\frac{\Delta K_m [A]}{K_a' + [A]} \right) \quad (17)$$

K_m varía de manera hiperbólica entre K_m^0 y $K_m^0 + \Delta K_m$ donde $\Delta K_m = K_m^0 \left(\frac{K_a'}{K_a} - 1 \right)$. La asíntota vertical ($-K_a'$) es una buena estimación de la constante de disociación del activador del complejo enzima-sustrato (K_d^{ES}).

Por último la dependencia de la relación $V_{m\acute{a}x}/K_m$ es descrita por la siguiente ecuación:

$$\frac{V_{m\acute{a}x}}{K_m} = \frac{V_{m\acute{a}x}^0}{K_m^0} \left(\frac{1 + \beta \frac{[A]}{K_a'}}{1 + \frac{[A]}{K_a}} \right) = \frac{V_{m\acute{a}x}^0}{K_m^0} + \frac{\Delta \frac{V_{m\acute{a}x}}{K_m} [A]}{K_a + [A]} \quad (18)$$

La **Ecuación 18** es la de una hipérbola rectangular, con ordenada al origen distinta de 0 ($\frac{V_{m\acute{a}x}^0}{K_m^0}$), asíntota horizontal igual a $\frac{V_{m\acute{a}x}^0}{K_m^0} \beta \frac{K_a}{K_a'}$ y asíntota vertical igual a $-K_a$, la cual permite estimar la constante de disociación del activador de la enzima libre (K_d^E).

3. Sitios mutuamente excluyentes

La dependencia de la velocidad de reacción según el **Esquema 7.1** es descrita por la siguiente ecuación:

$$\frac{v}{[E]_0} = \frac{[E \cdot ATP] k_{cat}^0 + [ENC \cdot ATP] k'_{cat}}{[E] + [E \cdot ATP] + [ENC] + [ENC \cdot ATP] + [EC] + [EC \cdot ATP]} \quad (19)$$

Asumiendo que la velocidad de unión y disociación de sustrato, productos y efectores es mucho mayor que k_{cat}^0 y k'_{cat} es posible reemplazar las concentraciones de cada una de las especies de enzimas en función de la concentración de ligandos y constantes de disociación de los mismos:

$$\frac{v}{[E]_0} = \frac{\frac{[E][ATP]}{K_{ATP}} k_{cat}^0 + \frac{[E][Na_2SO_3][ATP]}{\alpha K_{ATP} K_{d(NC)}} k'_{cat}}{[E] + \frac{[E][ATP]}{K_{ATP}} + \frac{[E][Na_2SO_3]}{K_{d(NC)}} + \frac{[E][Na_2SO_3][ATP]}{\alpha K_{ATP} K_{d(NC)}} + \frac{[E][Na_2SO_3]}{K_{d(C)}} + \frac{[E][Na_2SO_3][ATP]}{\beta K_{ATP} K_{d(C)}}} \quad (20)$$

Dividiendo numerador y denominador por $[E]$

$$\frac{v}{[E]_0} = \frac{\frac{[ATP]k_{cat}^0}{K_{ATP}} + \frac{[Na_2SO_3][ATP]k'_{cat}}{\alpha K_{ATP}K_{d(NC)}}}{1 + \frac{[ATP]}{K_{ATP}} + \frac{[Na_2SO_3]}{K_{d(NC)}} + \frac{[Na_2SO_3][ATP]}{\alpha K_{ATP}K_{d(NC)}} + \frac{[Na_2SO_3]}{K_{d(C)}} + \frac{[Na_2SO_3][ATP]}{\beta K_{ATP}K_{d(C)}}} \quad (21)$$

Multiplicando numerador y denominador por K_{ATP} y ambos miembros de la ecuación por $[E]_0$ y agrupando en $[Na_2SO_3]$:

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x}^0[ATP] + V'_{m\acute{a}x} \frac{1}{\alpha K_{d(NC)}} [Na_2SO_3][ATP]}{K_{ATP} + [ATP] + \left(\frac{K_{ATP}}{K_{d(NC)}} + \frac{[ATP]}{\alpha K_{d(NC)}} + \frac{K_{ATP} + [ATP]}{K_{d(C)}} + \frac{[ATP]}{\beta K_{d(C)}} \right) [Na_2SO_3]} \quad (22)$$

Dividiendo numerador y denominador por $(K_{ATP} + [ATP])$:

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x}^0 \frac{[ATP]}{(K_{ATP} + [ATP])} + V'_{m\acute{a}x} \frac{[ATP]}{\alpha K_{d(NC)}(K_{ATP} + [ATP])} [Na_2SO_3]}{1 + \frac{\left(\frac{K_{ATP} + \frac{[ATP]}{\alpha}}{K_{d(NC)}} \right) + \left(\frac{K_{ATP} + \frac{[ATP]}{\beta}}{K_{d(C)}} \right)}{(K_{ATP} + [ATP])} [Na_2SO_3]} \quad (23)$$

En resumen, la ley de velocidad correspondiente a este modelo de reacción es equivalente a la relación de dos polinomios de grado uno, no compatible con los resultados descritos en los **Capítulos 4, 5 y 6**.

4. Sitios no mutuamente excluyentes

La dependencia de la velocidad de reacción según el **Esquema 7.2** es descrita por la siguiente ecuación:

$$\frac{v}{[E]_0} = \frac{k_{c\acute{a}t}^0[E \cdot ATP] + k'_{c\acute{a}t}[ENC \cdot ATP]}{[E] + [E \cdot ATP] + [ENC] + [ENC \cdot ATP] + [EC] + [EC \cdot ATP] + [ECNC] + [ECNC \cdot ATP]} \quad (24)$$

Asumiendo que la velocidad de unión y disociación de sustrato, productos y efectores es mucho mayor que k_{cat}^0 y k'_{cat} es posible reemplazar las concentraciones de cada una de las especies de enzimas en función de la concentración de ligandos y constantes de disociación de los mismos y dividiendo por $[E]$:

$$\frac{v}{[E]_0} = \frac{k_{cát}^0 \frac{[ATP]}{K_{ATP}} + k_{cát}' \frac{[ATP]}{\alpha K_{ATP} K_{d(NC)}} [Na_2SO_3]}{1 + \frac{[ATP]}{K_{ATP}} + \frac{[Na_2SO_3]}{K_{d(NC)}} + \frac{[ATP][Na_2SO_3]}{\alpha K_{ATP} K_{d(NC)}} + \frac{[Na_2SO_3]}{K_{d(C)}} + \frac{[Na_2SO_3][ATP]}{\beta K_{ATP} K_{d(C)}} + \frac{[Na_2SO_3]^2}{K_{d(C)}^{NC} K_{d(NC)}} + \frac{[Na_2SO_3]^2 [ATP]}{\gamma K_{ATP} K_{d(C)}^{NC} K_{d(NC)}}} \quad (25)$$

Multiplicando numerador y denominador por K_{ATP} y ambos miembros de la ecuación por $[E]_0$:

$$v = \frac{V_{máx}^0 [ATP] + V_{máx}' \frac{[ATP]}{\alpha K_{d(NC)}} [Na_2SO_3]}{K_{ATP} + [ATP] + \frac{K_{ATP} [Na_2SO_3]}{K_{d(NC)}} + \frac{[ATP][Na_2SO_3]}{\alpha K_{d(NC)}} + \frac{K_{ATP} [Na_2SO_3]}{K_{d(C)}} + \frac{[Na_2SO_3][ATP]}{\beta K_{d(C)}} + \frac{K_{ATP} [Na_2SO_3]^2}{K_{d(C)}^{NC} K_{d(NC)}} + \frac{[Na_2SO_3]^2 [ATP]}{\gamma K_{d(C)}^{NC} K_{d(NC)}}} \quad (26)$$

Agrupando en $[Na_2SO_3]$:

$$v = \frac{V_{máx}^0 [ATP] + V_{máx}' \frac{[ATP]}{\alpha K_{d(NC)}} [Na_2SO_3]}{K_{ATP} + [ATP] + \left[\left(\frac{K_{ATP} + \frac{[ATP]}{\alpha}}{K_{d(NC)}} \right) + \left(\frac{K_{ATP} + \frac{[ATP]}{\beta}}{K_{d(C)}} \right) \right] [Na_2SO_3] + \left(\frac{K_{ATP} + \frac{[ATP]}{\gamma}}{K_{d(C)}^{NC} K_{d(NC)}} \right) [Na_2SO_3]^2} \quad (27)$$

Dividiendo numerador y denominador por $(K_{ATP} + [ATP])$:

$$v = \frac{V_{máx}^0 \frac{[ATP]}{(K_{ATP} + [ATP])} + V_{máx}' \frac{[ATP]}{\alpha K_{d(NC)} (K_{ATP} + [ATP])} [Na_2SO_3]}{1 + \frac{\left(\frac{K_{ATP} + \frac{[ATP]}{\alpha}}{K_{d(NC)}} \right) + \left(\frac{K_{ATP} + \frac{[ATP]}{\beta}}{K_{d(C)}} \right) [Na_2SO_3] + \left(\frac{K_{ATP} + \frac{[ATP]}{\gamma}}{K_{d(C)}^{NC} K_{d(NC)}} \right) [Na_2SO_3]^2}{(K_{ATP} + [ATP])}} \quad (28)$$

Esta ley de velocidad es equivalente a la relación entre un polinomio de grado uno y uno de grado dos, compatible con los resultados descritos en los **Capítulos 4, 5 y 6**.

Agrupando en $[ATP]$ la **Ecuación 26**:

$$v = \frac{\left(V_{máx}^0 + V_{máx}' \frac{[Na_2SO_3]}{\alpha K_{d(NC)}} \right) [ATP]}{K_{ATP} \left[1 + \left(\frac{1}{K_{d(NC)}} + \frac{1}{K_{d(C)}} \right) [Na_2SO_3] + \frac{[Na_2SO_3]^2}{K_{d(C)}^{NC} K_{d(NC)}} \right] + [ATP] \left[1 + \left(\frac{1}{\alpha K_{d(NC)}} + \frac{1}{\beta K_{d(C)}} \right) [Na_2SO_3] + \frac{[Na_2SO_3]^2}{\gamma K_{d(C)}^{NC} K_{d(NC)}} \right]} \quad (29)$$

Dividiendo numerador y denominador por $\left[1 + \left(\frac{1}{\alpha K_{d(NC)}} + \frac{1}{\beta K_{d(C)}} \right) [Na_2SO_3] + \frac{[Na_2SO_3]^2}{\gamma K_{d(C)}^{NC} K_{d(NC)}} \right]$:

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x}^0 + V_{m\acute{a}x}' \frac{1}{\alpha K_{d(NC)}} [Na_2SO_3]}{1 + \left(\frac{1}{\alpha K_{d(NC)}} + \frac{1}{\beta K_{d(C)}} \right) [Na_2SO_3] + \frac{[Na_2SO_3]^2}{\gamma K_{d(C)}^{NC} K_{d(NC)}}} \frac{[ATP]}{K_{ATP} + [ATP]} = \frac{V_{m\acute{a}x} [ATP]}{K_m + [ATP]} \quad (30)$$

Por tanto:

$$V_{m\acute{a}x} = \frac{V_{m\acute{a}x}^0 + V_{m\acute{a}x}' \frac{1}{\alpha K_{d(NC)}} [Na_2SO_3]}{1 + \left(\frac{1}{\alpha K_{d(NC)}} + \frac{1}{\beta K_{d(C)}} \right) [Na_2SO_3] + \frac{1}{\gamma K_{d(C)}^{NC} K_{d(NC)}} [Na_2SO_3]^2} \quad (31)$$

$$K_m = K_{ATP} \frac{1 + \left(\frac{1}{K_{d(NC)}} + \frac{1}{K_{d(C)}} \right) [Na_2SO_3] + \frac{1}{K_{d(C)}^{NC} K_{d(NC)}} [Na_2SO_3]^2}{1 + \left(\frac{1}{\alpha K_{d(NC)}} + \frac{1}{\beta K_{d(C)}} \right) [Na_2SO_3] + \frac{1}{\gamma K_{d(C)}^{NC} K_{d(NC)}} [Na_2SO_3]^2} \quad (32)$$

$$\frac{V_{m\acute{a}x}}{K_m} = \frac{V_{m\acute{a}x}^0 + V_{m\acute{a}x}' \frac{1}{\alpha K_{d(NC)}} [Na_2SO_3]}{K_{ATP} \left[1 + \left(\frac{1}{K_{d(NC)}} + \frac{1}{K_{d(C)}} \right) [Na_2SO_3] + \frac{1}{K_{d(C)}^{NC} K_{d(NC)}} [Na_2SO_3]^2 \right]} \quad (33)$$

5. Síntesis de ATP a Pi constante (modelo simplificado)

La ley de velocidad para el modelo presentado en el **Esquema 7.4** es

igual a:

$$\frac{v}{[E]_0} = \frac{k_{cat}^0 [E \cdot ADP \cdot Pi] + k_{cat}' [ENC \cdot ADP \cdot Pi]}{[E \cdot Pi] + [E \cdot ADP \cdot Pi] + [ENC \cdot Pi] + [ENC \cdot ADP \cdot Pi] + [EC \cdot Pi] + [EC \cdot ADP \cdot Pi] + [ECNC \cdot Pi] + [ECNC \cdot ADP \cdot Pi]} \quad (34)$$

Reemplazando las concentraciones de las especies de enzima por su igual, asumiendo que la velocidad de unión y disociación de sustratos, productos y efectores es más rápida que k_{cat} y k_{cat}'

$$\frac{v}{[E]_0} = \frac{k_{cat}^0 \frac{[ADP]}{\alpha_0 K_{ADP}} + k_{cat}' \frac{[ADP][Na_2SO_3]}{\alpha_1 K_{ADP}^{NC} K_{d(NC)}}}{1 + \frac{[ADP]}{\alpha_0 K_{ADP}} + \frac{[Na_2SO_3]}{K_{d(NC)}^{Pi}} + \frac{[ADP][Na_2SO_3]}{\alpha_1 K_{ADP}^{NC} K_{d(NC)}} + \frac{[Na_2SO_3]}{K_{d(C)}^{Pi}} + \frac{[ADP][Na_2SO_3]}{\alpha_2 K_{ADP}^{NC} K_{d(C)}^{Pi}} + \frac{[Na_2SO_3]^2}{K_{d(NC)}^{Pi} K_{d(C)}^{NC, Pi}} + \frac{[ADP][Na_2SO_3]^2}{\alpha_3 K_{ADP}^{NC, C} K_{d(C)}^{NC, Pi} K_{d(NC)}^{Pi}}} \quad (35)$$

Multiplicando numerador y denominador por $\alpha_0 K_{ADP}$ y ambos miembros por $[E]_0$

$$v = \frac{V_{\text{máx}}^0 [ADP] + V'_{\text{máx}} \frac{\alpha_0 K_{ADP}}{\alpha_1 K_{ADP}^{NC} K_{d(NC)}^{Pi}} [ADP] [Na_2SO_3]}{\alpha_0 K_{ADP} + [ADP] + \frac{\alpha_0 K_{ADP} [Na_2SO_3]}{K_{d(NC)}^{Pi}} + \frac{\alpha_0 K_{ADP} [ADP] [Na_2SO_3]}{\alpha_1 K_{ADP}^{NC} K_{d(NC)}^{Pi}} + \frac{\alpha_0 K_{ADP} [Na_2SO_3]}{K_{d(C)}^{Pi}} + \frac{\alpha_0 K_{ADP} [ADP] [Na_2SO_3]}{\alpha_2 K_{ADP}^C K_{d(C)}^{Pi}} + \frac{\alpha_0 K_{ADP} [Na_2SO_3]^2}{K_{d(NC)}^{Pi} K_{d(C)}^{NC, Pi}} + \frac{\alpha_0 K_{ADP} [ADP] [Na_2SO_3]^2}{\alpha_3 K_{ADP}^{NC, C} K_{d(C)}^{NC, Pi} K_{d(NC)}^{Pi}}}$$
 (36)

Agrupando en función de $[Na_2SO_3]$:

$$v = \frac{V_{\text{máx}}^0 [ADP] + V'_{\text{máx}} \frac{\alpha_0 K_{ADP}}{\alpha_1 K_{ADP}^{NC} K_{d(NC)}^{Pi}} [ADP] [Na_2SO_3]}{\alpha_0 K_{ADP} + [ADP] + \alpha_0 K_{ADP} \left[\frac{1}{K_{d(NC)}^{Pi}} \left(1 + \frac{[ADP]}{\alpha_1 K_{ADP}^{NC}} \right) + \frac{1}{K_{d(C)}^{Pi}} \left(1 + \frac{[ADP]}{\alpha_2 K_{ADP}^C} \right) \right] [Na_2SO_3] + \frac{\alpha_0 K_{ADP}}{K_{d(C)}^{NC, C} K_{d(NC)}^{NC, Pi} K_{d(NC)}^{Pi}} \left(1 + \frac{[ADP]}{\alpha_3 K_{ADP}^{NC, C}} \right) [Na_2SO_3]^2}$$
 (37)

Dividiendo numerador y denominador por $(\alpha_0 K_{ADP} + [ADP])$

$$v = \frac{V_{\text{máx}}^0 \frac{[ADP]}{(\alpha_0 K_{ADP} + [ADP])} + V'_{\text{máx}} \frac{\alpha_0 K_{ADP}}{\alpha_1 K_{ADP}^{NC} K_{d(NC)}^{Pi}} \frac{[ADP]}{(\alpha_0 K_{ADP} + [ADP])} [Na_2SO_3]}{1 + \alpha_0 K_{ADP} \left[\frac{1}{K_{d(NC)}^{Pi}} \left(1 + \frac{[ADP]}{\alpha_1 K_{ADP}^{NC}} \right) + \frac{1}{K_{d(C)}^{Pi}} \left(1 + \frac{[ADP]}{\alpha_2 K_{ADP}^C} \right) \right] \frac{[Na_2SO_3]}{(\alpha_0 K_{ADP} + [ADP])} + \frac{\alpha_0 K_{ADP}}{K_{d(C)}^{NC, C} K_{d(NC)}^{NC, Pi} K_{d(NC)}^{Pi}} \left(\frac{1 + \frac{[ADP]}{\alpha_3 K_{ADP}^{NC, C}}}{(\alpha_0 K_{ADP} + [ADP])} \right) \frac{[Na_2SO_3]^2}{(\alpha_0 K_{ADP} + [ADP])}}$$
 (38)

Agrupando **Ecuación 36** en función de $[ADP]$:

$$v = \frac{\left(V_{\text{máx}}^0 + V'_{\text{máx}} \frac{\alpha_0 K_{ADP}}{\alpha_1 K_{ADP}^{NC} K_{d(NC)}^{Pi}} [Na_2SO_3] \right) [ADP]}{\alpha_0 K_{ADP} \left[1 + \left(\frac{1}{K_{d(NC)}^{Pi}} + \frac{1}{K_{d(C)}^{Pi}} \right) [Na_2SO_3] + \frac{[Na_2SO_3]^2}{K_{d(C)}^{NC, C} K_{d(NC)}^{NC, Pi} K_{d(NC)}^{Pi}} \right] + [ADP] \left[1 + \left(\frac{\alpha_0 K_{ADP}}{\alpha_1 K_{ADP}^{NC} K_{d(NC)}^{Pi}} + \frac{\alpha_0 K_{ADP}}{\alpha_2 K_{ADP}^C K_{d(C)}^{Pi}} \right) [Na_2SO_3] + \frac{\alpha_0 K_{ADP} [Na_2SO_3]^2}{\alpha_3 K_{ADP}^{NC, C} K_{d(C)}^{NC, Pi} K_{d(NC)}^{Pi}} \right]}$$
 (39)

Dividiendo por $\left[1 + \left(\frac{\alpha_0 K_{ADP}}{\alpha_1 K_{ADP}^{NC} K_{d(NC)}^{Pi}} + \frac{\alpha_0 K_{ADP}}{\alpha_2 K_{ADP}^C K_{d(C)}^{Pi}} \right) [Na_2SO_3] + \frac{\alpha_0 K_{ADP}}{\alpha_3 K_{ADP}^{NC, C} K_{d(C)}^{NC, Pi} K_{d(NC)}^{Pi}} [Na_2SO_3]^2 \right]$

numerador y denominador se obtiene:

$$v = \frac{V_{\text{máx}}^0 + V'_{\text{máx}} \frac{\alpha_0 K_{ADP}}{\alpha_1 K_{ADP}^{NC} K_{d(NC)}^{Pi}} [Na_2SO_3]}{1 + \left(\frac{\alpha_0 K_{ADP}}{\alpha_1 K_{ADP}^{NC} K_{d(NC)}^{Pi}} + \frac{\alpha_0 K_{ADP}}{\alpha_2 K_{ADP}^C K_{d(C)}^{Pi}} \right) [Na_2SO_3] + \frac{\alpha_0 K_{ADP}}{\alpha_3 K_{ADP}^{NC, C} K_{d(C)}^{NC, Pi} K_{d(NC)}^{Pi}} [Na_2SO_3]^2}$$
 (40)

En consecuencia:

$$V_{\text{máx}} = \frac{V_{\text{máx}}^0 + V'_{\text{máx}} \frac{\alpha_0 K_{ADP}}{\alpha_1 K_{ADP}^{NC} K_{d(NC)}^{Pi}} [Na_2SO_3]}{1 + \left(\frac{\alpha_0 K_{ADP}}{\alpha_1 K_{ADP}^{NC} K_{d(NC)}^{Pi}} + \frac{\alpha_0 K_{ADP}}{\alpha_2 K_{ADP}^C K_{d(C)}^{Pi}} \right) [Na_2SO_3] + \frac{\alpha_0 K_{ADP}}{\alpha_3 K_{ADP}^{NC, C} K_{d(C)}^{NC, Pi} K_{d(NC)}^{Pi}} [Na_2SO_3]^2}$$
 (41)

$$K_m(ADP) = \alpha_0 K_{ADP} \frac{1 + \left(\frac{1}{K_{d(NC)}^{Pi}} + \frac{1}{K_{d(C)}^{Pi}} \right) [Na_2SO_3] + \frac{1}{K_{d(C)}^{NC, Pi} K_{d(NC)}^{Pi}} [Na_2SO_3]^2}{1 + \left(\frac{\alpha_0 K_{ADP}}{\alpha_1 K_{ADP}^{NC} K_{d(NC)}^{Pi}} + \frac{\alpha_0 K_{ADP}}{\alpha_2 K_{ADP}^C K_{d(C)}^{Pi}} \right) [Na_2SO_3] + \frac{\alpha_0 K_{ADP}}{\alpha_3 K_{ADP}^{NC, C} K_{d(C)}^{NC, Pi} K_{d(NC)}^{Pi}} [Na_2SO_3]^2} \quad (42)$$

$$\frac{V_{m\acute{a}x}}{K_m(ADP)} = \frac{\frac{V_{m\acute{a}x}^0}{\alpha_0 K_{ADP}} + \frac{V'_{m\acute{a}x}}{\alpha_1 K_{ADP}^{NC} K_{d(NC)}^{Pi}} - \frac{1}{K_{d(C)}^{Pi}} [Na_2SO_3]}{1 + \left(\frac{1}{K_{d(NC)}^{Pi}} + \frac{1}{K_{d(C)}^{Pi}} \right) [Na_2SO_3] + \frac{1}{K_{d(C)}^{NC, Pi} K_{d(NC)}^{Pi}} [Na_2SO_3]^2} \quad (43)$$

6. Síntesis de ATP a ADP constante (modelo simplificado)

La ecuación de velocidad para el Esquema 7.5 es:

$$\frac{v}{[E]_0} = \frac{k_{cat}^0 [E \cdot ADP \cdot Pi] + k'_{cat} [ENC \cdot ADP \cdot Pi]}{[E \cdot ADP] + [E \cdot ADP \cdot Pi] + [ENC \cdot ADP] + [ENC \cdot ADP \cdot Pi] + [EC \cdot ADP] + [EC \cdot ADP \cdot Pi] + [ECNC \cdot ADP] + [ECNC \cdot ADP \cdot Pi]} \quad (44)$$

Remplazando las concentraciones de las especies de enzima por su igual, asumiendo que la velocidad de unión y disociación de sustratos, productos y efectores es más rápida que k_{cat} y k'_{cat} :

$$\frac{v}{[E]_0} = \frac{k_{cat}^0 \frac{[Pi]}{\alpha_0 K_{Pi}} + k'_{cat} \frac{[Pi][Na_2SO_3]}{\alpha_1 K_{Pi}^{NC} K_{d(NC)}^{ADP}}}{1 + \frac{[Pi]}{\alpha_0 K_{Pi}} + \frac{[Na_2SO_3]}{K_{d(NC)}^{ADP}} + \frac{[Pi][Na_2SO_3]}{\alpha_1 K_{Pi}^{NC} K_{d(NC)}^{ADP}} + \frac{[Na_2SO_3]}{K_{d(C)}^{ADP}} + \frac{[Pi][Na_2SO_3]}{\alpha_2 K_{Pi}^C K_{d(C)}^{ADP}} + \frac{[Na_2SO_3]^2}{K_{d(C)}^{NC, ADP} K_{d(NC)}^{ADP}} + \frac{[Pi][Na_2SO_3]^2}{\alpha_3 K_{Pi}^{NC, C} K_{d(C)}^{NC, ADP} K_{d(NC)}^{ADP}}} \quad (45)$$

Multiplicando numerador y denominador por $\alpha_0 K_{Pi}$ y ambos miembros por $[E]_0$

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x}^0 [Pi] + V'_{m\acute{a}x} \frac{\alpha_0 K_{Pi}}{\alpha_1 K_{Pi}^{NC} K_{d(NC)}^{ADP}} [Pi][Na_2SO_3]}{\alpha_0 K_{Pi} + [Pi] + \frac{\alpha_0 K_{Pi} [Na_2SO_3]}{K_{d(NC)}^{ADP}} + \frac{\alpha_0 K_{Pi} [Pi][Na_2SO_3]}{\alpha_1 K_{Pi}^{NC} K_{d(NC)}^{ADP}} + \frac{\alpha_0 K_{Pi} [Na_2SO_3]}{K_{d(C)}^{ADP}} + \frac{\alpha_0 K_{Pi} [Pi][Na_2SO_3]}{\alpha_2 K_{Pi}^C K_{d(C)}^{ADP}} + \frac{\alpha_0 K_{Pi} [Na_2SO_3]^2}{K_{d(C)}^{NC, ADP} K_{d(NC)}^{ADP}} + \frac{\alpha_0 K_{Pi} [Pi][Na_2SO_3]^2}{\alpha_3 K_{Pi}^{NC, C} K_{d(C)}^{NC, ADP} K_{d(NC)}^{ADP}}} \quad (46)$$

Agrupando en función de $[Na_2SO_3]$:

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x}^0 [Pi] + V'_{m\acute{a}x} \frac{\alpha_0 K_{Pi}}{\alpha_1 K_{Pi}^{NC} K_{d(NC)}^{ADP}} [Pi][Na_2SO_3]}{\alpha_0 K_{Pi} + [Pi] + \alpha_0 K_{Pi} \left[\frac{1}{K_{d(NC)}^{ADP}} \left(1 + \frac{[Pi]}{\alpha_1 K_{Pi}^{NC}} \right) + \frac{1}{K_{d(C)}^{ADP}} \left(1 + \frac{[Pi]}{\alpha_2 K_{Pi}^C} \right) \right] [Na_2SO_3] + \frac{\alpha_0 K_{Pi}}{K_{d(C)}^{NC, ADP} K_{d(NC)}^{ADP}} \left(1 + \frac{[Pi]}{\alpha_3 K_{Pi}^{NC, C}} \right) [Na_2SO_3]^2} \quad (47)$$

Dividiendo numerador y denominador por $(\alpha_0 K_{Pi} + [Pi])$

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x}^0 \frac{[Pi]}{(\alpha_0 K_{Pi} + [Pi])} + V'_{m\acute{a}x} \frac{\alpha_0 K_{Pi}}{\alpha_1 K_{Pi}^{NC} K_{d(NC)}^{ADP}} \frac{[Pi]}{(\alpha_0 K_{Pi} + [Pi])} [Na_2SO_3]}{1 + \alpha_0 K_{Pi} \left[\frac{\left(1 + \frac{[Pi]}{\alpha_1 K_{Pi}^{NC}}\right)}{K_{d(NC)}^{ADP} (\alpha_0 K_{Pi} + [Pi])} + \frac{\left(1 + \frac{[Pi]}{\alpha_2 K_{Pi}^C}\right)}{K_{d(C)}^{ADP} (\alpha_0 K_{Pi} + [Pi])} \right] [Na_2SO_3] + \left[\frac{\alpha_0 K_{Pi} \left(1 + \frac{[Pi]}{\alpha_3 K_{Pi}^{NC,C}}\right)}{K_{d(C)}^{NC,ADP} K_{d(NC)}^{ADP} (\alpha_0 K_{Pi} + [Pi])} \right] [Na_2SO_3]^2} \quad (48)$$

Agrupando la **Ecuación 46** en función de [Pi]:

$$v = \frac{\left(V_{m\acute{a}x}^0 + V'_{m\acute{a}x} \frac{\alpha_0 K_{Pi}}{\alpha_1 K_{Pi}^{NC} K_{d(NC)}^{ADP}} [Na_2SO_3] \right) [Pi]}{\alpha_0 K_{Pi} \left[1 + \left(\frac{1}{K_{d(NC)}^{ADP}} + \frac{1}{K_{d(C)}^{ADP}} \right) [Na_2SO_3] + \frac{1}{K_{d(C)}^{NC,ADP} K_{d(NC)}^{ADP}} [Na_2SO_3]^2 \right] + [Pi] \left[1 + \left(\frac{\alpha_0 K_{Pi}}{\alpha_1 K_{Pi}^{NC} K_{d(NC)}^{ADP}} + \frac{\alpha_0 K_{Pi}}{\alpha_2 K_{Pi}^C K_{d(C)}^{ADP}} \right) [Na_2SO_3] + \frac{\alpha_0 K_{Pi}}{\alpha_3 K_{Pi}^{NC,C} K_{d(C)}^{NC,ADP} K_{d(NC)}^{ADP}} [Na_2SO_3]^2 \right]} \quad (49)$$

Dividiendo numerador y denominador por $\left[1 + \left(\frac{\alpha_0 K_{Pi}}{\alpha_1 K_{Pi}^{NC} K_{d(NC)}^{ADP}} + \frac{\alpha_0 K_{Pi}}{\alpha_2 K_{Pi}^C K_{d(C)}^{ADP}} \right) [Na_2SO_3] + \frac{\alpha_0 K_{Pi}}{\alpha_3 K_{Pi}^{NC,C} K_{d(C)}^{NC,ADP} K_{d(NC)}^{ADP}} [Na_2SO_3]^2 \right]$:

$$\frac{\frac{\alpha_0 K_{Pi}}{\alpha_3 K_{Pi}^{NC,C} K_{d(C)}^{NC,ADP} K_{d(NC)}^{ADP}} [Na_2SO_3]^2}{\left[1 + \left(\frac{\alpha_0 K_{Pi}}{\alpha_1 K_{Pi}^{NC} K_{d(NC)}^{ADP}} + \frac{\alpha_0 K_{Pi}}{\alpha_2 K_{Pi}^C K_{d(C)}^{ADP}} \right) [Na_2SO_3] + \frac{\alpha_0 K_{Pi}}{\alpha_3 K_{Pi}^{NC,C} K_{d(C)}^{NC,ADP} K_{d(NC)}^{ADP}} [Na_2SO_3]^2 \right]} : \quad (50)$$

$$v = \frac{\frac{V_{m\acute{a}x}^0 + V'_{m\acute{a}x} \frac{\alpha_0 K_{Pi}}{\alpha_1 K_{Pi}^{NC} K_{d(NC)}^{ADP}} [Na_2SO_3]}{1 + \left(\frac{\alpha_0 K_{Pi}}{\alpha_1 K_{Pi}^{NC} K_{d(NC)}^{ADP}} + \frac{\alpha_0 K_{Pi}}{\alpha_2 K_{Pi}^C K_{d(C)}^{ADP}} \right) [Na_2SO_3] + \frac{\alpha_0 K_{Pi}}{\alpha_3 K_{Pi}^{NC,C} K_{d(C)}^{NC,ADP} K_{d(NC)}^{ADP}} [Na_2SO_3]^2} \left[\frac{[Pi]}{\alpha_0 K_{Pi} \left[1 + \left(\frac{1}{K_{d(NC)}^{ADP}} + \frac{1}{K_{d(C)}^{ADP}} \right) [Na_2SO_3] + \frac{1}{K_{d(C)}^{NC,ADP} K_{d(NC)}^{ADP}} [Na_2SO_3]^2 \right]} + [Pi] \right]}{1 + \left(\frac{\alpha_0 K_{Pi}}{\alpha_1 K_{Pi}^{NC} K_{d(NC)}^{ADP}} + \frac{\alpha_0 K_{Pi}}{\alpha_2 K_{Pi}^C K_{d(C)}^{ADP}} \right) [Na_2SO_3] + \frac{\alpha_0 K_{Pi}}{\alpha_3 K_{Pi}^{NC,C} K_{d(C)}^{NC,ADP} K_{d(NC)}^{ADP}} [Na_2SO_3]^2}$$

En consecuencia:

$$V_{m\acute{a}x} = \frac{V_{m\acute{a}x}^0 + V'_{m\acute{a}x} \frac{\alpha_0 K_{Pi}}{\alpha_1 K_{Pi}^{NC} K_{d(NC)}^{ADP}} [Na_2SO_3]}{1 + \left(\frac{\alpha_0 K_{Pi}}{\alpha_1 K_{Pi}^{NC} K_{d(NC)}^{ADP}} + \frac{\alpha_0 K_{Pi}}{\alpha_2 K_{Pi}^C K_{d(C)}^{ADP}} \right) [Na_2SO_3] + \frac{\alpha_0 K_{Pi}}{\alpha_3 K_{Pi}^{NC,C} K_{d(C)}^{NC,ADP} K_{d(NC)}^{ADP}} [Na_2SO_3]^2} \quad (51)$$

$$K_{m(Pi)} = \alpha_0 K_{Pi} \frac{1 + \left(\frac{1}{K_{d(NC)}^{ADP}} + \frac{1}{K_{d(C)}^{ADP}} \right) [Na_2SO_3] + \frac{1}{K_{d(C)}^{NC,ADP} K_{d(NC)}^{ADP}} [Na_2SO_3]^2}{1 + \left(\frac{\alpha_0 K_{Pi}}{\alpha_1 K_{Pi}^{NC} K_{d(NC)}^{ADP}} + \frac{\alpha_0 K_{Pi}}{\alpha_2 K_{Pi}^C K_{d(C)}^{ADP}} \right) [Na_2SO_3] + \frac{\alpha_0 K_{Pi}}{\alpha_3 K_{Pi}^{NC,C} K_{d(C)}^{NC,ADP} K_{d(NC)}^{ADP}} [Na_2SO_3]^2} \quad (52)$$

$$\frac{V_{m\acute{a}x}}{K_{m(Pi)}} = \frac{\frac{V_{m\acute{a}x}^0 + V'_{m\acute{a}x} \frac{1}{\alpha_1 K_{Pi}^{NC} K_{d(NC)}^{ADP}} [Na_2SO_3]}{\alpha_0 K_{Pi}}}{1 + \left(\frac{1}{K_{d(NC)}^{ADP}} + \frac{1}{K_{d(C)}^{ADP}} \right) [Na_2SO_3] + \frac{1}{K_{d(C)}^{NC,ADP} K_{d(NC)}^{ADP}} [Na_2SO_3]^2} \quad (53)$$