

La Serie Universitaria de la Fundación Juan March
presenta resúmenes, realizados por el propio autor,
de algunos estudios e investigaciones
llevados a cabo por los becarios de la Fundación
y aprobados por los Asesores Secretarios
de los distintos Departamentos.

El texto íntegro de las Memorias correspondientes
se encuentra en la Biblioteca de la Fundación
(Castello, 77. Madrid-6).

La lista completa de los trabajos aprobados
se presenta, en forma de fichas,
en los Cuadernos Bibliográficos
que publica la Fundación Juan March.

Estos trabajos abarcan las siguientes especialidades:
Arquitectura y Urbanismo; Artes Plásticas;
Biología; Ciencias Agrarias; Ciencias Sociales;
Comunicación Social; Derecho; Economía; Filosofía;
Física; Geología; Historia; Ingeniería;
Literatura y Filología; Matemáticas; Medicina,
Farmacia y Veterinaria; Música; Química; Teología.
A ellas corresponden los colores de la cubierta.

Edición no venal de 300 ejemplares,
que se reparte gratuitamente a investigadores,
Bibliotecas y Centros especializados de toda España.

Este trabajo fue realizado con una Beca de España, 1976, individual.
Departamento de Biología.
Centro de trabajo: Instituto de Inmunología y Biología Microbiana del C. S. I. C. Madrid.

Fundación Juan March



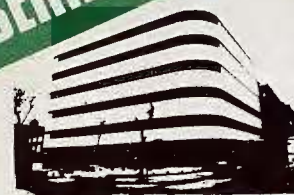
FJM-Uni 65-And
Desnaturalización de una proteína a:
Andréu Morales, José Manuel.
1031624



Biblioteca FJM

Fundación Juan March (Madrid)

SERIE UNIVERSITARIA



Fundación Juan March

Desnaturalización de una proteína asociada a membrana y caracterización molecular de sus subunidades

FJM
Uni-
65
And

Manuel Andréu Morales

65

Unidad: José Manuel Andréu Morales

Una proteína aso.



Fundación Juan March
Serie Universitaria

65

Desnaturalización de una proteína asociada a membrana y caracterización molecular de sus subunidades

El factor de acoplamiento de fosforilación oxidativa
(ATPasa) de *Micrococcus lysodeikticus*; subunidades α y β

José Manuel Andréu Morales



Fundación Juan March
Castelló, 77. Teléf. 225 44 55
Madrid - 6

Fundación Juan March (Madrid)

*La Fundación Juan March no se solidariza
necesariamente con las opiniones de los
autores cuyas obras publica.*

Depósito Legal: M-28630-1978
I.S.B.N. 84-7075-097-6
Ibérica, Tarragona, 34.-Madrid-7

El autor desea expresar su agradecimiento al doctor Emilio Muñoz por su estímulo, ayuda y dirección durante la realización de este trabajo.

INDICE

	Página
1.—Introducción	3
2.—Purificación de ATPasa	5
3.—Polipéptidos constituyentes	7
4.—Composición química. Significado	8
5.—Características físicas	12
6.—Desnaturalización por urea y clorhidrato de guanidina	14
7.—Purificación de las subunidades mayoritarias α y β	17
8.—Composición química de α y β ; justificación de la microheterogeneidad y labilidad	20
9.—Peso molecular de α y β	23
10.—Propiedades de α y β en ausencia de desnaturizante	30
BIBLIOGRAFIA	40

1) Introducción.- Entre los intercambios de energía que se producen en los seres vivos existen varios procesos, como la fosforilación oxidativa, fotofosforilación, transporte activo, contracción muscular, actividad electrogénica y luminiscencia, que implican la transformación directa de unas formas energéticas en otras. El transporte activo y la fosforilación son los más universales entre estos procesos de transducción de energía y se caracterizan por no realizarse en solución, sino a nivel de membranas celulares especializadas. En el caso del transporte activo la energía procedente de la hidrólisis de ATP, catalizada por proteínas de membrana con actividad adenosinatrifosfatasa (ATPasa), es utilizada en la formación de un gradiente iónico a través de la membrana. En la fosforilación, el proceso es en cierto modo inverso; el contenido energético de una distribución asimétrica de protones a través de la membrana, generada por la actuación de la cadena transportadora de electrones, se utiliza para la síntesis de ATP. El eslabón final de este proceso está mediado por proteínas asociadas a la membrana, los factores de acoplamiento de fosforilación F_1 , también conocidos como ATPasas translocadoras de protones (por catalizar la reacción inversa, el transporte de protones acoplado a hidrólisis de ATP) (1). Estas proteínas están localizadas en la membrana mitocondrial interna, en las membranas de cloroplastos y en las membranas plasmáticas de bacterias y presentan todas ellas considerables semejanzas estructurales (1). Su estudio ofrece un doble interés, por sus implicaciones en el mecanismo íntimo de la transducción de energía y por la problemática de la interacción proteína-entorno en el complejo sistema constituido por las membranas biológicas.

Este trabajo se ciñe fundamentalmente al estudio de la molécula del factor de acoplamiento en solución y sus subunidades; pero

aporta, sin embargo, resultados originales de interés más amplio, tanto en el campo de la Bioenergética como en el de las Membranas Biológicas.

Se ha utilizado fundamentalmente un factor de acoplamiento de fosforilación oxidativa bacteriano (BF_1), ATPasa de *Micrococcus lysodeikticus* (3,4). Esta proteína, asociada a la membrana plasmática por su cara interna (5,6), puede ser solubilizada con considerable selectividad (4,7), desplazando la interacción proteína-membrana mediante la utilización de tampón de baja fuerza iónica, desplazamiento que muy probablemente es reversible (8). El enzima asociado a membrana presenta formas interconvertibles con un probable significado regulatorio (9,10), así como características alo-tópicas, esto es, diferencias en estimulación por tripsina y activación por Ca^{++} y Mg^{++} entre los estados asociados a membrana y soluble (4).

A continuación, en los cuatro apartados siguientes, se revisan brevemente la purificación, composición y características quimicofísicas de BF_1 de *M. lysodeikticus*. Después se examina mas detalladamente el objeto del presente trabajo, la desnaturalización de esta proteína por urea y clorhidrato de guanidina, el aislamiento y caracterización de sus polipéptidos mayoritarios α y β como monómeros en estructura desordenada y la capacidad de α y β para agregar y replegar hasta conformaciones similares a la de la proteína oligomérica nativa al retirar el desnaturalizante.

Se ha dado preponderancia a la discusión de los resultados sobre la descripción, posiblemente tediosa, de los métodos experimentales empleados, de los que se dan exclusivamente las referencias bibliográficas; el fundamento de la mayor parte de los métodos quimicofísicos se encuentra en el libro mencionado en la referencia (2).

2) Purificación de ATPasa.- La obtención de BF_1 puro se ha llevado a cabo en un solo paso a partir de la proteína solubilizada cruda, bien mediante cromatografía en gel (Sephadex G200 o Sepharose 4B) (11) o electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida (12); este segundo procedimiento permite la obtención de cantidades relativamente altas de proteína (20-30 mg en una semana de trabajo), de pureza mayor que el 98% de acuerdo con análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida, a varios valores de pH y concentraciones de gel, y homogénea en la ultracentrífuga analítica (velocidad de sedimentación) (figura 1).

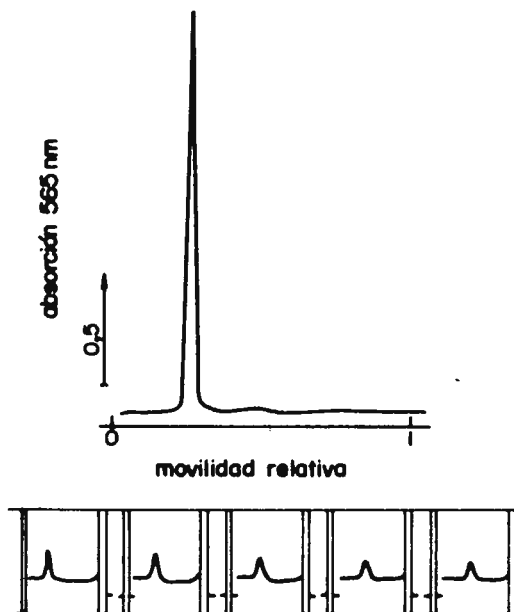


FIGURA 1.- Parte superior: trazado densitométrico de la electroforesis analítica (poliacrilamida 7%, pH 8,7) (11) de 50 μ g de ATPasa purificada mediante electroforesis preparativa. Parte inferior: perfiles de Schlieren de la distribución de la proteína en una experiencia de velocidad de sedimentación; la concentración inicial de proteína fue de 5 mg ml^{-1} y las fotografías se tomaron a intervalos de 4 minutos a partir de los 20 minutos después de alcanzar la velocidad de 56.000 rpm en la ultracentrífuga analítica (11).

La utilización de sistemas electroforéticos de alta resolución permite apreciar microheterogeneidad, consistente en el desdoblamiento en tres bandas. El análisis de los datos mediante la representación de Ferguson (13) aparece en la figura 2. La pendiente de las rectas es función del peso molecular y la ordenada en el origen de la carga neta (14). Las tres especies moleculares poseen cargas muy próximas y diferencias de talla molecular menores que 10.000 d (15); esto no representa impureza, sino que se justifica, como veremos más adelante, en virtud de la naturaleza glucoproteica de BF_1 y sus subunidades.

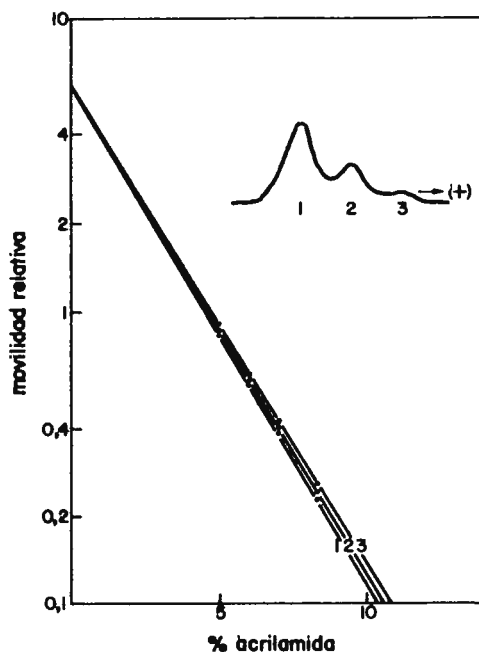


FIGURA 2.- Representación de Ferguson (v.texto) para el comportamiento electroforético de las tres especies moleculares de ATPasa en electroforesis de alta resolución (gel de poliacrilamida de 20 cm, pH 8,7) (15).

3) Polipéptidos constituyentes.— Mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones de disociación y desnaturalización (figura 3), se observa la presencia en ATPasa de varios tipos de cadenas peptídicas que denominamos subunidades α , β y γ , no unidas entre sí por puentes disulfuro (11,12); los pesos moleculares aparentes en el sistema de poliacrilamida-dodecilsulfato sódico son de 52.000 ± 5.000 d, 47.000 ± 4.000 d y 28.000 ± 3.000 d, respectivamente. La proporción relativa aparente (de acuerdo con la intensidad de tinción de las bandas) es de 1 mol de γ por cada 3 de α y 3 de β (11).

Una subcepa de *M. lysodeikticus* (obtenida cambiando el medio de cultivo) produce una forma molecular de BF_1 , designada como ATPasa-B (para distinguirla de la proteína descrita hasta ahora a la que nos referimos como ATPasa-A o simplemente ATPasa), que posee una composición de subunidades ligeramente diferente (16); la presencia del polipéptido ϵ , inhibidor natural de la actividad ATPasa, hace necesaria su separación de la proteína nativa o la digestión por tripsina para expresar completamente la actividad catalítica (17).

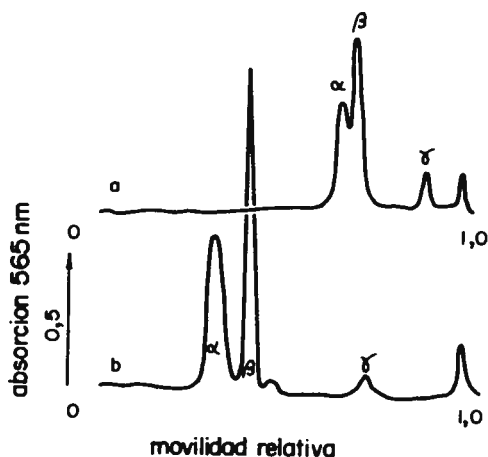


FIGURA 3.- Electroforesis en condiciones de disociación por dodecilsulfato sódico 0,1% (a) (poliacrilamida 7%, pH 1,7) (12) y urea 8 M (b) (poliacrilamida 5%, pH 8,7) (12) de 30 μ g de BF_1 .

4) Composición química. Significado. En la Tabla I se recoge la composición de aminoácidos de BF₁ de *M. lysodeikticus*, comparada con la de BF₁ de *Streptococcus faecalis* y la de F₁ mitocondrial (11); se observa una considerable semejanza, aunque la ATPasa de *M. lysodeikticus* presenta porcentajes mas bajos de cisteína y prolina.

TABLA I.- Composición de aminoácidos de ATPasa de *Micrococcus lysodeikticus*, comparada con la de la proteína de *Streptococcus faecalis* y mitocondrias.

aminoácidos	ATPasa <i>M. lysodeikticus</i>	ATPasa <i>S. faecalis</i> (19)	ATPasa mitocondrial (20)
lisina	3,7 ± 0,2	6,1	6,1
histidina	1,9 ± 0,4	1,7	1,4
arginina	7,0 ± 0,8	4,5	5,4
aspártico	9,6 ± 0,1	10,0	7,9
treonina	6,6 ± 0,6	6,7	5,4
serina	5,6 ± 0,6	6,3	5,0
glutámico	11,5 ± 1,1	13,0	12,5
prolina	2,3 ± 0,3	3,9	4,3
glicocola	10,1 ± 0,4	8,7	9,7
alanina	10,6 ± 0,3	8,4	10,0
cisteína	0,16 ± 0,002	0,325	0,4
valina	9,7 ± 0,8	6,8	8,2
metionina	2,1 ± 0,7	2,3	1,8
isoleucina	4,8 ± 0,5	6,2	7,2
leucina	8,4 ± 0,5	9,3	9,3
tirosina	2,7 ± 0,6	3,3	2,5
fenilalanina	3,0 ± 0,2	3,1	2,9
triptófano	0,4 ± 0,2	-	-
<u>Asp+Glu+Lys+Arg+Ser+Thr (polares)</u>	1,57 ± 0,09	1,68	1,51
<u>Val+Leu+Ileu+Met+Phe (no polares)</u>			
<u>Lys+Arg+His (básicos)</u>	0,60 ± 0,07	0,53	0,63
<u>Asp+Glu (ácidos)</u>			

Los análisis de aminoácidos se realizaron en cuatro preparaciones sobre diferentes tiempos de hidrólisis mediante cromatografía de cambio de ión (11). Los resultados se expresan como moles/100 moles intervalo confidencial para el 95% de probabilidad (de acuerdo con la distribución t de Student).

De acuerdo con ensayos colorimétricos convencionales la proteína de *M. lysodeikticus* contiene aproximadamente 0,15 g de azúcares neutros por g de péptido (21). La forma molecular B tiene una composición de aminoácidos prácticamente idéntica pero posee un contenido menor en azúcar, como ocurre con la ATPasa de cloroplastos (22). Esto ha llevado a examinar la composición de monosacáridos de las dos formas de BF_1 y de la proteína de cloroplastos (CF_1) (22), que aparece en la Tabla II; es de notar el contenido en ramnosa, arabinosa y ribosa, poco usual en otras glucoproteínas (23), así como la diferencia entre las porciones sacarídicas de las dos formas del factor de acoplamiento bacteriano.

TABLA II.- Composición de monosacáridos de ATPasa de dos cepas de *M. lysodeikticus* y cloroplastos

Monosacáridos (moles/mol proteína)*	ATPasas (factores F_1)		
	BF_1 -forma A	BF_1 -forma B	CF_1
ramnosa	32		4
fucosa			5
ribosa	0-1	5	4
arabinosa	39		20
xilosa			
manosa	59	56	
galactosa	6		25
glucosa	83	56	16
glucosamina	6	5-8	3
galactosamina			9
ácido siálico			
Total	226	124	86

* Calculado sobre la base de los valores de peso molecular: 340.000 para BF_1 -A (11), 370.000 para BF_1 -B (16) y 325.000 para CF_1 (16), tomados como los pesos de toda la molécula glucoprotéica. Los análisis fueron realizados mediante cromatografía gas-líquido de los acetatos de alditol (22).

La naturaleza glucoproteica de BF_1 y CF_1 se ha confirmado al obtenerse glucopéptidos digiriendo exhaustivamente con pronasa la parte proteica de la molécula de estas ATPasas (24). Además, ha sido posible la incorporación *in vivo* de ^{14}C -glucosa a la porción sacarídica de BF_1 (25). Con respecto a otros componentes no peptídicos, la proteína soluble y purificada no contiene fosfolípidos; contiene nucleótidos (ATP y ADP) no covalentemente ligados (26). No se ha investigado la posible presencia de otros componentes minoritarios, como por ejemplo ácidos grasos.

Hasta hace poco tiempo se ha abogado por la inexistencia de glucoproteínas en bacterias (27). BF_1 de *M. lysodeikticus* constituye por tanto uno de los primeros ejemplos de glucoproteína bacteriana purificada y caracterizada extensivamente (22). Por otra parte el carácter glucoproteico de esta ATPasa es probablemente generalizable a otros factores de acoplamiento bacterianos (21); se extiende, como hemos visto, a ATPasa de cloroplastos y existen indicios de que F_1 mitocondrial puede ser también una glucoproteína (reacciones colorimétricas para azúcares y reacción positiva previa electroforesis en gel con ácido peryódico-reactivo de Schiff) (22). Se puede, pues, empezar a considerar la naturaleza glucoproteica de gran parte de los factores de acoplamiento de fosforilación. La posible significación funcional, en relación con el mecanismo de la fosforilación oxidativa y fotofosforilación, está por definir (22).

La adición postraducciona1 de cadenas de oligosacáridos a proteínas se considera como un contenido adicional de información (para ensamblaje y/o reconocimiento) propio de proteínas secretadas o de proteínas intrínsecas de membrana en su lado externo (28).

¿Qué significado tiene entonces la existencia de residuos sacarídicos sobre proteínas consideradas como extrínsecas (1) y localizadas en la cara interna de la membrana? Se puede considerar la posibilidad de que las ATPasas aún siendo proteínas asociadas no fuertemente a la membrana, según criterios operacionales (solubilización por procedimientos suaves), puedan penetrar en cierto grado en zonas hidrofóbicas de la bicapa lipídica y dispongan de las cadenas de oligosacáridos, de naturaleza claramente hidrofílica, en contacto con el solvente acuoso para un ensamblaje correcto en la membrana. En este sentido se están llevando a cabo experiencias en este laboratorio para: a) detectar la posible presencia de zonas hidrofóbicas en la superficie de BF₃ en solución (interacción con detergentes suaves, no desnaturalizantes) y b) definir la disposición topológica de las cadenas de oligosacárido sobre la proteína (digestión controlada por proteasas y modificación química o enzimática de los azúcares). En cualquier caso, la posición del hidrato de carbono hacia la cara interna de la membrana es más difícil de explicar (22).

ATPasa de *M. lysodeikticus* no es la única glucoproteína "anómala". Se discute la posible existencia de glucoproteínas (componentes que interaccionan con lectinas) en ribosomas (29a) y cromatina (29b). Quizás se pueda pues comenzar a considerar la adición de cadenas sacarídicas a proteínas como un requisito de sistemas supramoleculares complejos en general, no exclusivamente de membranas.

5) Características físicas. - Se han examinado las propiedades moleculares de la ATPasa utilizando técnicas de densimetría, cromatografía en gel, ultracentrifugación analítica, espectroscopía ultravioleta, dicroísmo circular y fluorescencia (2). En la Tabla III aparecen los valores de coeficiente de sedimentación, peso molecular y radio efectivo. Puede observarse el valor relativamente alto del coeficiente friccional que, si no consideráramos la contribución de hidratación, correspondería a una razón axial de 1:7 para un elipsoide aplanado (30), lo que está de acuerdo con la apariencia asimétrica de la proteína al microscopio electrónico (3).

TABLA III. - Parámetros moleculares de ATPasa
(entre paréntesis se indica el método empleado)

volúmen específico parcial (densimetría de precisión y cálculo a partir de la composición química) (15)	$0,720 \pm 0,005 \text{ ml g}^{-1}$
peso molecular (equilibrio de sedimentación a alta velocidad) (11)	$340.000 \pm 10.000 \text{ d}$
coeficiente de sedimentación (velocidad de sedimentación) (11)	$13,6 \pm 0,2 \text{ S}$
coeficiente friccional relativo (calculado del coef. sedimentación, peso molecular y vol. específico parcial) (15)	1,34
radio de la esfera equivalente (cromatografía en gel) (15)	$75 \pm 2 \text{ \AA}$

El peso molecular 340.000 d es, en principio, consistente con una estructura cuaternaria de fórmula $\alpha_3\beta_3\gamma$ de acuerdo con los pesos moleculares de las subunidades (v. apartado 9) y sus cantidades relativas aparentes; sin embargo las estimaciones preliminares realizadas mediante equilibrio de sedimentación a baja velocidad (31), procedimiento menos influido por la posible existencia de

fragmentos de baja talla molecular (31) procedentes de la degradación de la glucoproteína (32,21), arrojan valores del orden de 430.000 d (15). Teniendo esto en cuenta podemos considerar igualmente probable estequiometrías $\alpha_3\beta_3\gamma$ o $\alpha_3\beta_3\gamma_2$. Existe un considerable desacuerdo con factores de acoplamiento de otros organismos, centrandose las opiniones sobre modelos del tipo $\alpha_3\beta_3$ (33) ó $\alpha_2\beta_2$ (34), inferidos de experiencias de marcaje radiactivo de subunidades, reconstitución parcial, entrecruzamiento covalente de polipéptidos vecinos y microscopía electrónica.

En cuanto a sus propiedades ópticas, BF_1 de *M. lysodeikticus* presenta un máximo de absorción en el ultravioleta cercano a $276 \pm 0,5$ nm y hombros a 251 ± 1 nm, 268 ± 1 nm y 290 ± 1 nm (32); el coeficiente de absorción a 276 nm es de $E \approx 0,85 \text{ l g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (referido, como el resto de las propiedades ópticas, a la concentración de la parte peptídica de la molécula estimada mediante análisis de aminoácidos). El espectro de dicroísmo circular (figura 17) presenta dos extremos negativos a 208 ± 2 nm y 222 ± 2 nm (32); la elipticidad molar del residuo medio es de $(\theta)_{208} \approx -8.300 \text{ grado cm}^2 \text{ decimol}^{-1}$ y $(\theta)_{222} \approx -8.200 \text{ grado cm}^2 \text{ decimol}^{-1}$ y el contenido en hélice α , calculado a partir de estos valores (35), del orden del 20% de los residuos. La proteína excitada en el máximo de absorción de luz presenta fluorescencia con máximos de emisión a 325 ± 1 nm y 336 ± 1 nm (figura 18) correspondientes a, por lo menos, dos familias de triptófanos no libremente expuestos al solvente acuoso (36); la forma del espectro de excitación es muy parecida a la del espectro de absorción de luz.

6) Desnaturalización por urea y clorhidrato de guanidina.- El fenómeno de desnaturalización por urea o por clorhidrato de guanidina es complejo y parcialmente reversible. La caída de actividad enzimática (figuras 4 y 5) que se produce entre concentraciones de urea 0 y 2 M (6 clorhidrato de guanidina 0-1 M) se revierte mediante eliminación del desnaturalizante por dilución ó diálisis (figuras 4 y 5) y concuerda aproximadamente, según experiencias realizadas en este laboratorio (62), con una transición conformacional observable mediante *dicroísmo circular*. En urea 2 M coexisten varias formas moleculares (diferentes estados de despolimerización) cuya separación y caracterización mediante cromatografía en gel y electroforesis resulta problemática debido a la pérdida de capacidad de tinción de algunas de ellas (15). En un segundo proceso, la capacidad de recuperación de actividad enzimática de muestras desnaturalizadas desciende hasta anularse en urea 4 M (6 guanidina 1,5 M); a esta concentración de desnaturalizante coexisten 8-12 especies moleculares (observables mediante electroforesis en gel de poliacrilamida) (15), que al aumentar la concentración de desnaturalizante hasta urea 6 M se reducen a α , β y γ separadas (como en urea 8 M, v. figura 3).

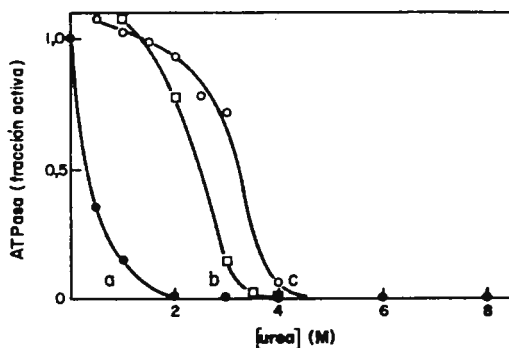


FIGURA 4.- Pérdida de actividad de ATPasa por tratamiento con urea. Las muestras fueron preincubadas durante varias horas y ensayadas a las concentraciones de urea indicadas (a); sobre muestras tratadas en las mismas condiciones, se eliminó el desnaturalizante mediante diálisis (b) o dilución (c) (15).

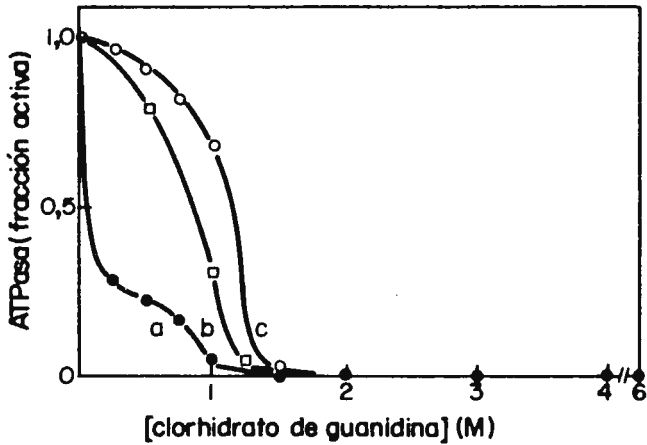


FIGURA 5.- Pérdida de actividad ATPasa por clorhidrato de guanidina (a) y reversión del proceso por diálisis (b) ó dilución (c).

Al seguir la desnaturalización de la proteína mediante fluorescencia se observa un cambio bifásico entre clorhidrato de guanidina 0-1 M y 1-4 M (figura 6), resultado probable de más de un proceso que no es claramente correlacionable con la caída de actividad enzimática.

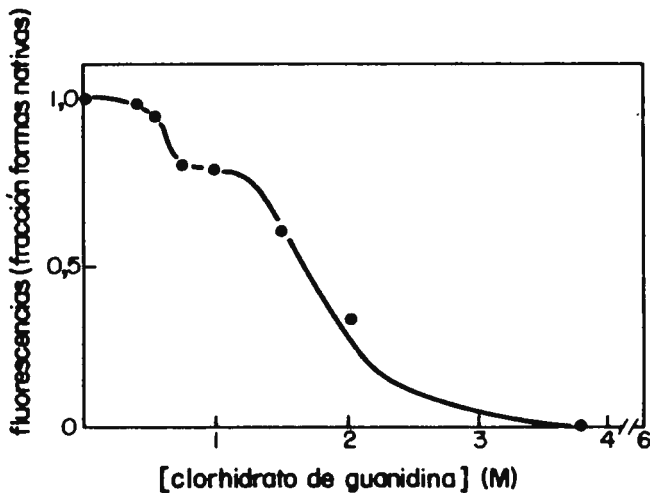


FIGURA 6.- Descenso de la fluorescencia de BF₁ por clorhidrato de guanidina (excitación 275 nm, emisión 330 nm) expresado como fracción de formas nativas (calculada a partir de las intensidades de emisión al principio y final de la transición).

En el estado final de desnaturalización (urea 8 M, guanidina 4-6 M) se observan máximos de emisión a 304 nm y 348 nm, en contraste con la fluorescencia de la proteína nativa (figura 18), que corresponden probablemente a tirosinas y triptófanos, respectivamente, expuestos al medio acuoso como resultado de un desplegamiento completo de las cadenas polipeptídicas (36). Mientras que el estado nativo presenta un espectro de dicroísmo circular característico de una estructura secundaria significativamente ordenada, el estado terminal de desnaturalización tiene un espectro dicróico sin características peculiares entre 220 y 250 nm (figura 17), propio de polipéptidos completamente desplegados, carentes de estructura secundaria ordenada (37).

Resumiendo, la desnaturalización consta de varias etapas en función de la concentración de desnaturalizante. Primero se producen simultáneamente disociación y desplegamiento parciales de las cadenas peptídicas y pérdida completa de la actividad enzimática; esta parte del proceso parece reversible. Posteriormente continúan el desplegamiento y disociación con formación de numerosas especies moleculares. La disociación hasta polipéptidos individuales no se consigue más que en condiciones de desnaturalización completa, que no es directamente reversible. Otros métodos de desnaturalización más suaves, como cambios en fuerza iónica y pH, si bien han revelado interesantes propiedades de la proteína, tampoco permiten la separación de subunidades relativamente nativas (32).

Así pues la desnaturalización completa de ATPasa de *M. lyso-deikticus* por urea y clorhidrato de guanidina no es reversible al eliminar el desnaturalizante, a diferencia de lo que ocurre con

otras proteínas oligoméricas (38-41). Los procedimientos de desnaturalización por dodecilsulfato sódico y posterior eliminación del detergente (42) producen también resultados negativos. Más adelante encontraremos una explicación de estos hechos al estudiar el comportamiento de cadenas peptídicas individuales de ATPasa en presencia y ausencia de desnaturalizante.

7) Purificación de las subunidades mayoritarias α y β . - La carga neta negativa de α es menor que la de β a pH neutro-alcalino (12), lo que permite su separación completa en un sistema de electroforesis en gel de poliacrilamida-urea 8 M (12) llevado a escala preparativa (21) (figura 7).

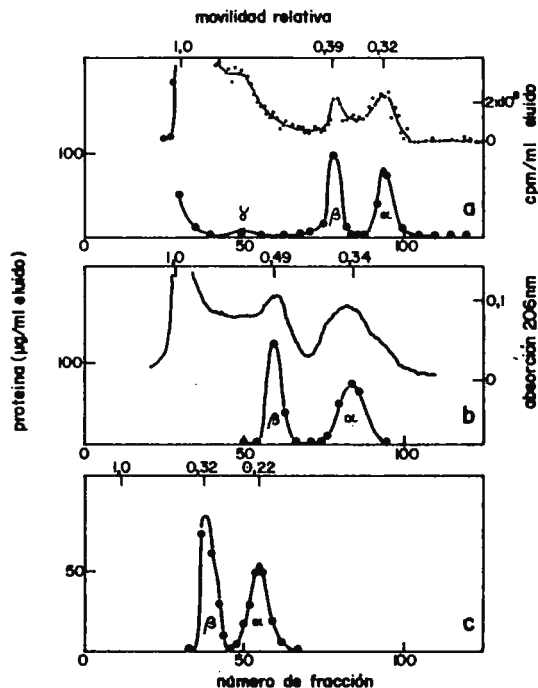


FIGURA 7.- Aislamiento de las subunidades α y β mediante electroforesis preparativa de BF_1 en urea 8 M a pH 8,7 (a) (20 mg de BF_1), pH 8 (b) (30 mg) y pH 7,2 (c) (10 mg) (21). La línea gruesa representa concentración de proteína y las líneas de trazo fino en (a) y (b) radioactividad (de una pequeña cantidad de ^{14}C -acetil-ATPasa (15) añadida como marcador) y absorción a 206 nm respectivamente.

Se obtienen preparaciones que, analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con urea 8 M o dodecilsulfato a diferentes valores de pH y concentraciones de acrilamida, son homogéneas en porcentaje superior al 92% (61). La mayor parte de las bandas de disociación de BF_1 en electroforesis con dodecilsulfato, así como α y β , dan reacción positiva con ácido peryódico-reactivo de Schiff (figura 8), lo cual es una primera indicación de su naturaleza glucoproteica (se comprobó que la reacción era positiva con albúmina de huevo y negativa con tripsina, lisozima y seroalbúmina).

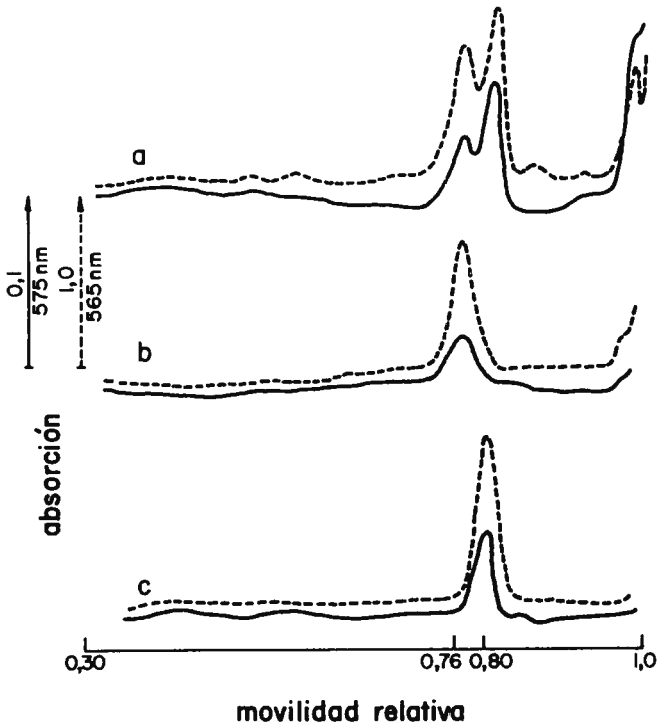


FIGURA 8.- Análisis electroforético de 20 μg de ATPasa (a) 6 μg de α (b) y 6 μg de β (c) (dodecilsulfato 0,1%, acrilamida 7% pH 8) (61). La línea continua representa la tinción para hidratos de carbono y la discontinua la correspondiente a proteína (61).

Cuando se purifica la subunidad α por electroforesis en sistemas alcalinos se obtienen preparaciones microheterogéneas que consisten en 4-5 bandas muy próximas en electroforesis con urea 8 M y al menos 2 componentes en electroforesis con dodecilsulfato (21). Se producen transformaciones similares incubando a pH 9-11 (1h, 37°C) muestras consistentes en: 1) α aislada y estructuralmente integra, 2) mezclas de α y β , 3) ATPasa desnaturalizada por urea o dodecilsulfato y 4) ATPasa nativa, a concentraciones 30-40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de cada subunidad. La extensión de la degradación depende del pH del tratamiento y sigue el orden $\alpha \leq \alpha + \beta < \text{ATPasa desnaturalizada} < \text{ATPasa nativa}$. De forma análoga, el almacenamiento prolongado a -20°C (varios meses) de α a pH 8,4 con urea 8 M produce un aumento en la proporción de formas degradadas, que se minimiza a pH 7,5 con clorhidrato de guanidina 6 M (21).

Probablemente este sistema de electroforesis preparativa en presencia de urea 8 M sea el más sencillo y de comportamiento más predecible de los utilizados hasta ahora para la purificación a escala preparativa de α y β de ATPasas. Constituye además, la primera purificación llevada a cabo con α y β de una ATPasa bacteriana (21).

8) Composición química de α y β ; justificación de la microheterogeneidad y labilidad.- La composición de aminoácidos de α y β y su contenido en hexosas aparecen en la Tabla IV. Puede observarse una semejanza considerable con las correspondientes subunidades de ATPasa mitocondrial y de cloroplastos, aunque éstas no posean triptófano. La subunidad α de BF_1 se diferencia de β por el aumento en el índice de aminoácidos básicos/ácidos (lo que puede justificar su menor movilidad electroforética a pH alcalino), el contenido mas bajo en aminoácidos aromáticos y la doble cantidad de hexosas.

La naturaleza glucoproteica de α y β , además de confirmar la de BF_1 , justifica muy probablemente la microheterogeneidad y la labilidad. En efecto, la microheterogeneidad observada en BF_1 purificado (v.apartado 2) es correlacionable con la de la subunidad α (v.apartado 7); se hace patente un aumento en la degradación de α en preparaciones de BF_1 que poseen un incremento en la proporción de las especies de más alta movilidad relativa en electroforesis y una baja actividad ATPasa. La microheterogeneidad de BF_1 puede estar por tanto causada por la microheterogeneidad de α y esta última, característica de glucoproteínas (23), puede justificarse como resultante de la posible presencia de diferentes porciones oligosacarídicas unidas a polipéptidos con la misma secuencia de aminoácidos.

También se ha observado microheterogeneidad en ATPasas de mitocondrias, cloroplastos y *Alcaligenes faecalis* (43). Por otro lado, parte de la literatura sobre F_1 mitocondrial recoge indicios, más o menos velados, de microheterogeneidad o degradación de α (19,44,45).

TABLE IV.- Composición química de α , β y ATPasa (BF_1) de *Micococcus lysodeikticus* con las correspondientes proteínas de cloroplastos (CF_1) y mitocondrias (F_1)

Aminoácidos (moles/100 moles)	α	β	BF_1	α	β	CF_1	α	β	F_1
lisina	3,6	3,0	3,8	3,8	4,1	4,4	6,3	5,2	6,1
histidina	1,9	1,6	1,8	0,6	1,0	0,8	1,2	1,7	1,4
arginina	7,4	5,3	6,6	5,7	5,8	6,4	5,4	4,1	5,4
aspártico	9,4	11,6	9,6	7,1	8,6	7,6	8,3	7,6	7,9
treonina	5,6	7,8	6,6	6,8	7,2	7,2	5,0	5,9	5,4
serina	7,0	6,6	5,0	6,2	6,0	6,0	7,3	5,2	5,0
glutámico	13,8	12,1	12,1	15,3	11,5	13,9	11,3	12,6	12,5
prolina	2,8	3,1	3,0	3,2	5,2	4,0	3,6	5,2	4,3
glicocola	10,2	10,0	10,1	8,0	9,6	8,4	11,3	10,0	9,7
alanina	9,6	8,7	10,9	13,4	8,5	9,2	9,9	10,5	10,0
cisteína	n.d.	n.d.	0,2	0,3	0,6	0,4	0,6	0,2	0,4
valina	7,7	8,4	8,4	7,0	8,1	7,2	7,9	8,7	8,2
metionina	1,8	1,6	1,5	2,1	2,7	2,8	1,6	2,0	1,8
isoleucina	5,7	5,7	5,1	7,4	5,3	6,3	6,9	6,5	7,2
leucina	9,4	8,9	9,6	9,9	9,9	9,6	8,9	8,9	9,3
tirosina	1,1	1,9	2,2	3,3	2,4	2,8	1,4	2,4	2,3
fenilalanina	2,6	3,6	2,8	2,5	3,2	2,8	2,4	3,0	2,9
triptófano	0,4	0,5	0,7	-	-	-	-	-	-
Asp+Glu(ácidos) Lys+Arg+His(básicos)	1,8	2,4	1,8	2,2	1,9	1,9	1,5	1,8	1,6
Hexosas (g/g péptido)	0,2	0,6	0,12	n.d.	n.d.	0,06	n.d.	n.d.	0,03

Los análisis de aminoácidos de α , β y BF_1 se realizaron sobre los correspondientes hidrolizados (HCl 6 N, 110°C durante 22 h) mediante cromatografía de cambio de ión (21); los contenidos en hexosas se estimaron mediante un procedimiento colorimétrico (21). Las composiciones de aminoácidos de F_1 , CF_1 y subunidades están tomadas de los trabajos de Knowles y col. (22) y Nelson y col. (46), respectivamente.

Nuestro caso (21) es probablemente el primero en el que se ofrece una explicación razonablemente satisfactoria y de aplicación generalizable (22). La degradación en medio alcalino podría justificarse por la naturaleza del enlace glucopeptídico (p.e. enlace O-glucosídico a serina o treonina, susceptible de sufrir una β -eliminación en álcali), (23), aunque las experiencias encaminadas a probar esta hipótesis no han producido todavía resultados concluyentes (22); para explicar la degradación hasta tallas moleculares pequeñas (movilidad relativa cercana a 1.0 en electroforesis en gel de poliacrilamida 7% con dodecilsulfato sódico) (32) habría que recurrir a postular la existencia de puentes sacarídicos entre fragmentos de cadena polipeptídica. Por otra parte, el hecho de que bajo las mismas condiciones y a concentraciones equivalentes de α y β se produzca mayor degradación de α en BF_1 nativo que en α aislada (v. apartado 6) no es fácil de explicar, si tenemos en cuenta que se ha excluido experimentalmente la posibilidad de proteólisis convencional (32). De forma completamente especulativa se puede sugerir la existencia de una intervención catalítica (no necesariamente enzimática) de otros grupos funcionales de BF_1 en la hidrólisis de los enlaces lábiles de α ; esta posibilidad puede no ser improbable en exceso, si tenemos en cuenta que muy recientemente se ha descrito la degradación espontánea de albúmina de huevo y hemoglobina, habiéndose excluido la posible contaminación por proteasas y propuesto un mecanismo de hidrólisis de enlaces peptídicos (47).

9) Peso molecular de α y β .- La determinación de los pesos moleculares de α y β es problemática debido a tratarse, como ya hemos visto, de glucoproteínas susceptibles de degradación. Esto ha obligado a utilizar una variedad de métodos, bien semiempíricos, como electroforesis y cromatografía en gel, o absolutos, como equilibrio de sedimentación.

El comportamiento de α y β en electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico es normal comparado con el de proteínas patrón. En la figura 9 aparece la representación de Ferguson (13) de los datos obtenidos.

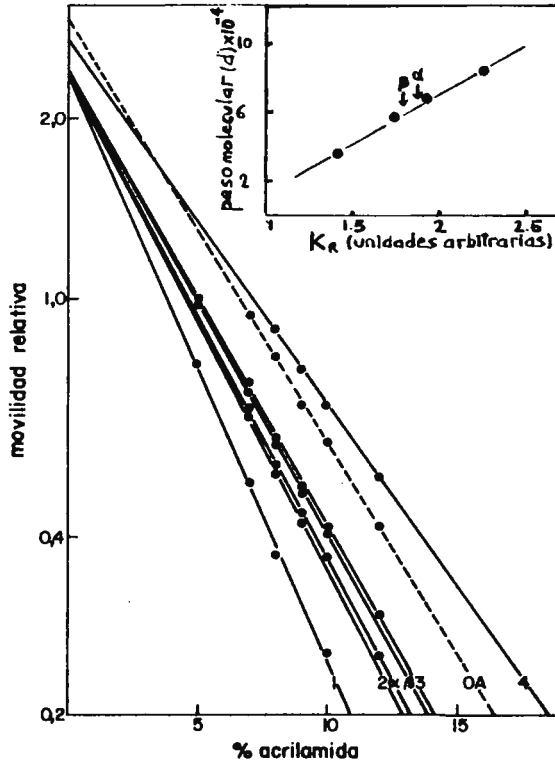


FIGURA 9.- Comportamiento electroforético con dodecilsulfato, pH 7,2 (21); representación de Ferguson para α , β , proteínas patrón (1,2,3 y 4 son respectivamente ureasa, seroalbúmina, catalasa y lacticodehidrogenasa) y la glucoproteína ovoalbúmina (OA). En el recuadro pequeño se representa el calibrado de peso molecular frente a coeficiente de retención (v. el texto).

Puede observarse como las rectas de las proteínas patrón, de α y de β tienden a converger cerca del eje de ordenadas (sus complejos con dodecilsulfato presentan relaciones carga/tamaño hidrodinámico efectivo muy próximas) (51), excepto ovoalbúmina, glucoproteína que se desvía del comportamiento típico. De la relación aproximadamente lineal entre la pendiente de la representación de Ferguson (K_R , coeficiente de retardo) y el peso molecular (figura 9) se obtienen, por interpolación entre los de los patrones, valores de peso molecular de 63.000 ± 3.000 d para α y 58.000 ± 3.000 d para β . El tratamiento de los datos mediante el procedimiento usual, es decir, la representación de peso molecular frente a movilidad relativa (48) (figura 10), arroja pesos moleculares de 62.500 ± 2.000 d y 58.000 ± 2.000 d, respectivamente.

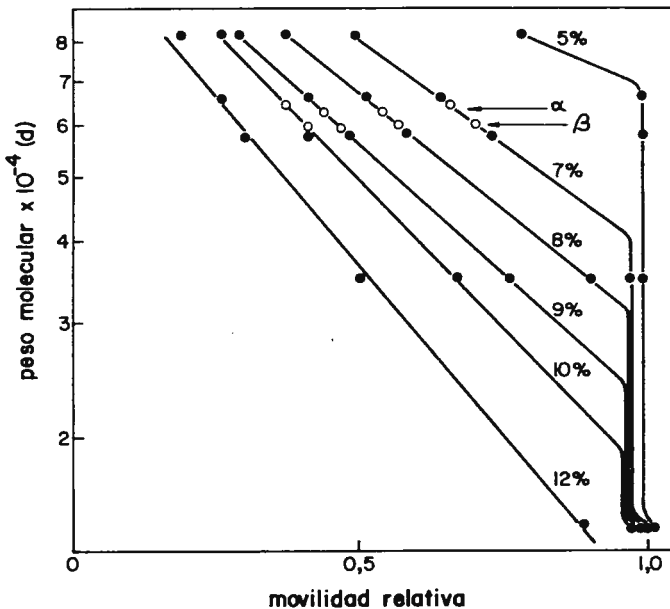


FIGURA 10.- Datos de la figura anterior representados en forma de logaritmo del peso molecular frente a movilidad relativa para la estimación de pesos moleculares aparentes de α y β a diferentes concentraciones de acrilamida (v. el texto).

Este método de electroforesis con dodecilsulfato está basado en suponer que la interacción de todas las proteínas utilizadas con el detergente es prácticamente igual (49,50) y se reconoce que no es fiable con glucoproteínas por interaccionar la parte sacáridica de estas con dodecilsulfato de forma anómala (51); ya que el comportamiento electroforético de los complejos de α y β con dodecilsulfato es normal, podemos inferir que su interacción global con este detergente probablemente también lo sea y por tanto los pesos moleculares calculados no deben estar muy lejos de los reales.

La electroforesis en gel de poliacrilamida-urea 8 M y la cromatografía en gel con clorhidrato de guanidina 6 M se consideran utilizables para la determinación de pesos moleculares de glucoproteínas con un contenido en hidrato de carbono no excesivamente alto (14,51), como es el caso de α y β . El tratamiento de algunos datos de electroforesis en urea 8 M de proteínas patrón, de α y de β (figura 11) permite calcular para estas últimas pesos moleculares de 54.000 ± 10.000 d y 53.000 ± 10.000 d, respectivamente.

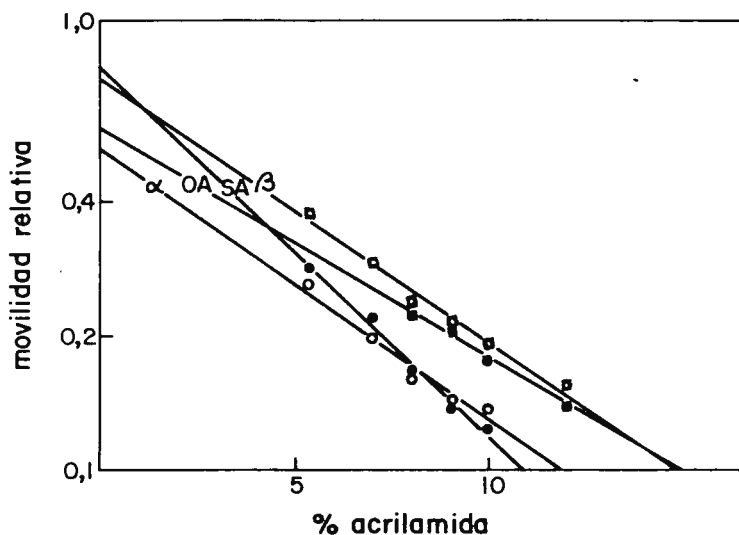


FIGURA 11.- Comportamiento electroforético de α , β , ovoalbúmina (OVA) y seroalbúmina (SA) con urea 8 M pH 7,2 (21) (v. el texto).

En la figura 12 se representan los perfiles de elución en Sepharosa 6B-clorhidrato de guanidina 6 M de las dos subunidades y de ATPasa completa desnaturalizada; a juzgar por la absorción ultravioleta del eluido, α y β aparecen como homogéneas en más del 95% con una cantidad muy pequeña de material de bajo peso molecular ($K_d = 1$). Las posiciones de los máximos de elución de α y β , muy cercanos, indican proximidad de tamaño; el calibrado del sistema con proteínas patrón, utilizadas por separado o como estándares internos de muestras de α y β (figura 13), permite asignar pesos moleculares de 58.000 ± 2.200 d y 53.200 ± 2.200 d, respectivamente, así como 33.500 ± 2.200 d para el componente de BF_1 que eluye a continuación de α y β (probablemente γ).

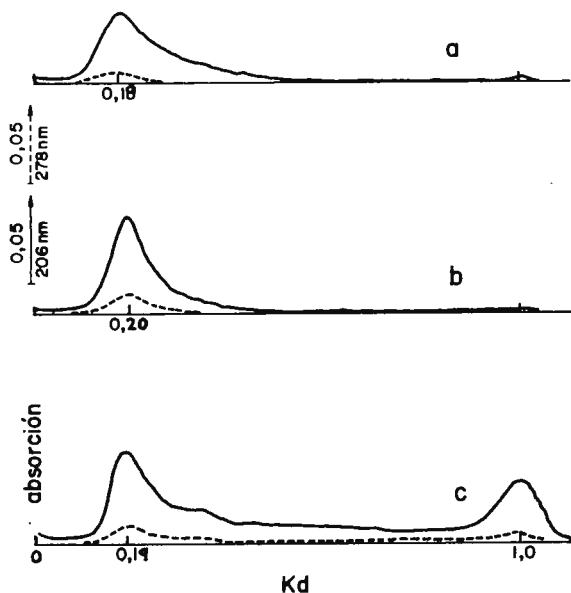


FIGURA 12.- Perfiles de elución de la cromatografía en gel en condiciones de desnaturalización (Sephacrose 6B, clorhidrato de guanidina 6 M) (57) de α (a), β (b) y BF_1 (c) (aproximadamente 300 μ g de cada subunidad y 600 μ g de ATPasa).

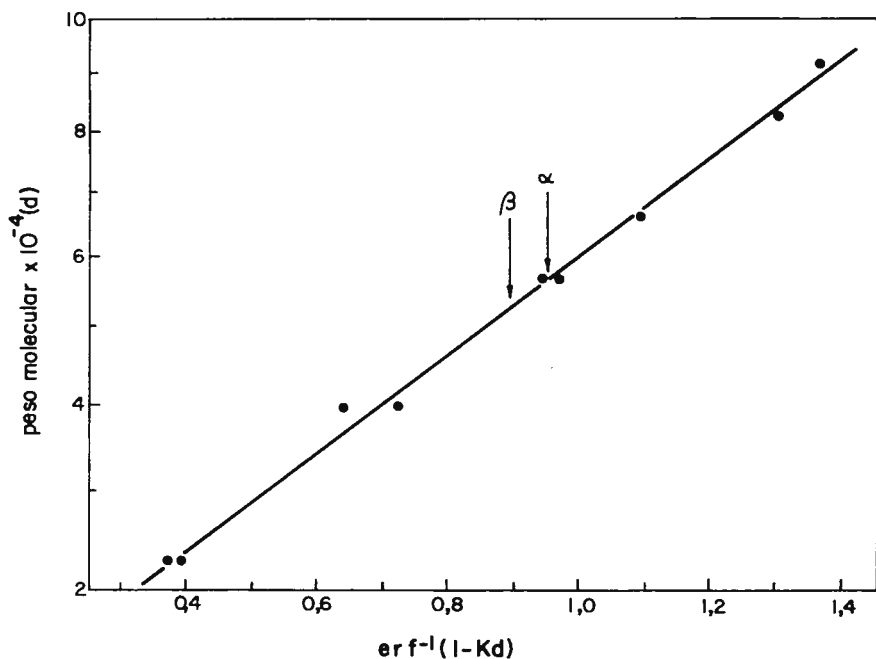


FIGURA 13.- Calibrado del sistema de cromatografía en Sepharose 6B clorhidrato de guanidina 6 M con proteínas patrón (por orden de pesos moleculares: tripsina, aldolasa, catalasa, seroalbumina, ureasa y fosforilasa) para la estimación de los pesos moleculares de α y β . Se representa (peso molecular) 0,595 frente a una función del coeficiente de reparto Kd (51).

La necesidad de contrastar estos números mediante un procedimiento no sujeto a la utilización de patrones de talla molecular, ni influido por la naturaleza química de la muestra ha llevado a utilizar el método de equilibrio de sedimentación a alta velocidad en la ultracentrífuga analítica (52). El análisis directo de los datos en la forma usual ($\ln$ concentración frente a distancia radial al cuadrado) (31) si bien produce representaciones razonablemente lineales, da pesos moleculares dependientes de la velocidad angular utilizada; este hecho es posiblemente debido a la presencia de pequeñas cantidades de componentes de baja talla molecular (probablemente procedentes de la degradación de α y β) que, de acuerdo con las experiencias anteriormente comentadas de electroforesis y cromatografía en gel, no deben exceder del 5-8% de la muestra.

En mezclas de seroalbúmina (67.000 d) u ovoalbúmina (44.500 d) con un 5% en peso de ribonucleasa (13.700 d) se han determinado pesos moleculares aparentes de 20.000-35.000 d mediante este procedimiento (53). Curiosamente, utilizando con α y β de BF_1 velocidades angulares del orden de las utilizadas con α y β de F_1 mitocondrial (20.000-30.000 rpm) (20) se producen distribuciones de material que arrojan pesos moleculares aparentes de aproximadamente 50.000 d; por el contrario, utilizando velocidades angulares probablemente correctas se habían determinado anteriormente pesos moleculares de 30.000 d para las subunidades de ATPasa de *Streptococcus faecalis* (54). En nuestro caso se ha aplicado, a velocidades angulares suficientemente altas, el método de la representación de dos especies (55) que permite determinar en una mezcla el peso molecular aproximado de los dos componentes de pesos claramente diferentes (31). Los resultados aparecen en la figura 14; en abscisas se representa el inverso del peso molecular reducido promedio en número (σ_n) (31) y en ordenadas el peso molecular reducido promedio en peso (σ_w) (31) para varios puntos de la distribución de material en el campo centrífugo (31). Para una muestra consistente en una sola especie molecular ambos valores coincidirían, quedando los puntos sobre la hipérbola que se representa, mientras que para mezclas de dos especies, 1 y 2, la representación queda sobre una recta que corta a la hipérbola en los puntos ($1/\sigma_{n,1}$; $\sigma_{w,1}$) y ($1/\sigma_{n,2}$; $\sigma_{w,2}$) (31). De esta forma se puede concluir que α posee un peso molecular aproximado, según este procedimiento, de 55.400 d y la preparación contiene una pequeña proporción de un componente de unos 7.100 d (figura 14a), mientras que

β posee aproximadamente 53.600 d y su preparación cuenta con una pequeña cantidad de componente de unos 10.200 d (figura 14b).

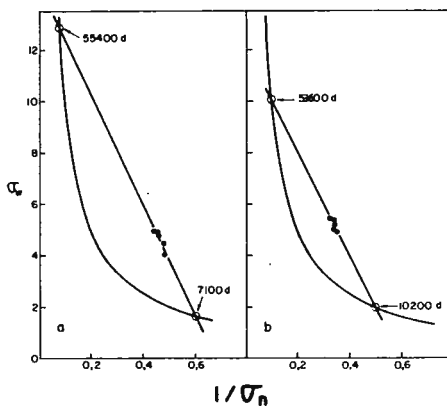


FIGURA 14.- Representación de dos especies (vease el texto) para los equilibrios de sedimentación en la ultracentrifuga analítica de (a) (52.420 rpm) y b) (48.330 rpm) en clorhidrato de guanidina 6 M (concentración inicial de proteína: aproximadamente 0,3 mg ml⁻¹ en ambos casos).

En la Tabla V se resumen los valores de los pesos moleculares de α y β de acuerdo con los diferentes métodos. Se adoptan los valores medios, 58.700 ± 5.400 d para α y 53.800 ± 4.900 para β .

TABLA V. Peso molecular de las subunidades α y β

Método	α	β
electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil-sulfato (coeficiente de retención y movilidad relativa)	62.700 ± 3.000 d	58.000 ± 3.000 d
cromatografía en gel de Sepharose 6B-clorhidrato de guanidina 6 M (coeficiente de reparto)	58.000 ± 2.200 d	53.200 ± 2.200 d
equilibrio de sedimentación (representación de dos especies)	55.400 ± 8.600 d	53.600 ± 7.700 d
Valor medio	58.700 ± 5.400 d	54.900 ± 4.900 d

Los valores son promedios o resultados de ajuste lineal mediante mínimos cuadrados a los datos experimentales. Se indican las desviaciones estándar excepto en el caso de equilibrio de sedimentación, donde, a causa de la considerable extrapolación necesaria, se indican los intervalos confidenciales al 75% de probabilidad de acuerdo con la distribución de Student. No se incluyen en esta tabla los resultados de electroforesis en urea 8M por su baja fiabilidad.

10) Propiedades de α y β en ausencia de desnaturalizante.- Se ha estudiado la posibilidad de obtener formas renaturalizadas a partir de α y β desnaturalizadas en clorhidrato de guanidina 6 M. Para ello, se ha eliminado el desnaturalizante de las soluciones de α y β por dilución en tampón acuoso neutro y examinado sus propiedades físicas (la concentración residual de desnaturalizante es 20-50 mM y el rango de concentraciones de proteína 10-100 $\mu\text{g ml}^{-1}$).

Tanto α como β en tampón acuoso presentan contribución por dispersión de luz (56) en sus espectros ultravioleta. En el caso de α (figura 15) la dispersión de luz es pequeña, independiente de la concentración, se desarrolla lentamente y se evita aumentando la fuerza iónica del medio, lo cual sugiere agregación discreta de las moléculas, posiblemente mediada por interacciones de tipo electroestático (57). Por el contrario β (figura 15) presenta dispersión de luz que crece fuertemente con la concentración, se desarrolla muy rápidamente, aumenta con la fuerza iónica del medio y se evita con detergentes suaves; esto sugiere un proceso de agregación masiva de β mediada por interacciones hidrofóbicas (57). No obstante estos fenómenos de agregación no impiden el estudio de las propiedades ópticas de α y β en soluciones suficientemente diluidas en tampón acuoso sin necesidad de otras adiciones.

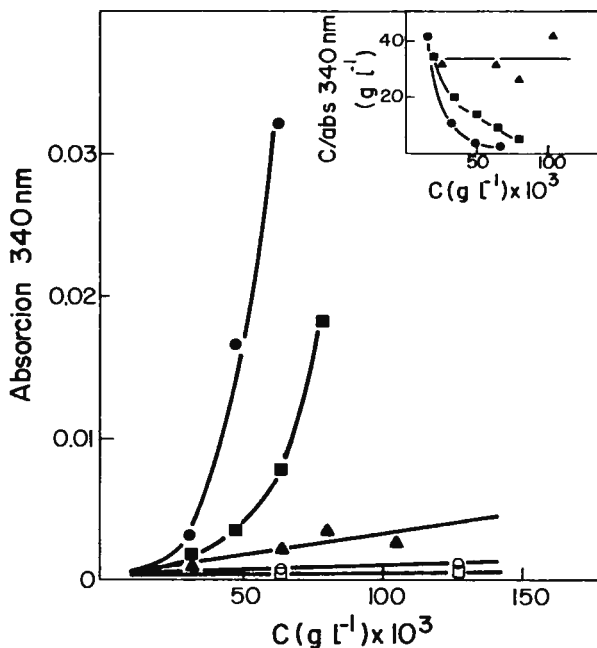


FIGURA 15.- Agregación de α y β en tampón acuoso. Se utiliza la absorción (turbidez) a 340 nm (longitud de onda a la que no absorben los cromóforos proteícos) como una medida de dispersión de luz. En el caso de α los solventes utilizados son tampón acuoso (Tris-hidroximetilaminometano-HCl 50 mM pH 8) (o-o-o) y el mismo tampón más NaCl 0,5 M (-□-□-); los solventes utilizados con β son tampón acuoso (Tris-hidroximetilaminometano 2-50 mM pH 8) (-■-■-) y el mismo tampón más NaCl 0,5 M (-●-●-) o desoxicolato sódico 0,1% (-▲-▲-). En el recuadro pequeño se representan los datos para β en forma usual para dispersión de luz (concentración/turbidez frente a concentración) (56); una representación paralela al eje de abscisas indica solvente termodinámicamente ideal, mientras que concavidad fuerte indica interacción y posible asociación entre moléculas de soluto (56).

Mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de Triton X 100 ó desoxicolato sódico se observa, a diferentes concentraciones de acrilamida, una sola banda para β (que no se detecta en ausencia de detergente), correspondiente probablemente a una única especie molecular monomérica o un oligómero pequeño (57). No ha sido posible visualizar α en electroforesis en gel de poliacrilamida en ausencia de desnaturalizantes.

La interacción de α y β con detergentes suaves se hace patente en electroforesis de desplazamiento de carga (58), al observarse movilidades claramente diferentes en presencia de detergente neutro, detergente neutro-detergente aniónico y detergente neutro-detergente catiónico (57); esto indica que α y β , en tampón acuosos neutro, presentan en su superficie dominios relativamente hidrofóbicos capaces de unir detergente suave, característica propia de proteínas intrínsecas de membrana o de lipoproteínas (58), lo cual apunta en favor de una interacción BF_1 -membrana más estrecha de lo que hasta ahora se ha considerado (v. apartado 4) (59).

Los espectros de absorción ultravioleta (corregidos por dispersión de luz) (60) de α y β se representan en la figura 16.

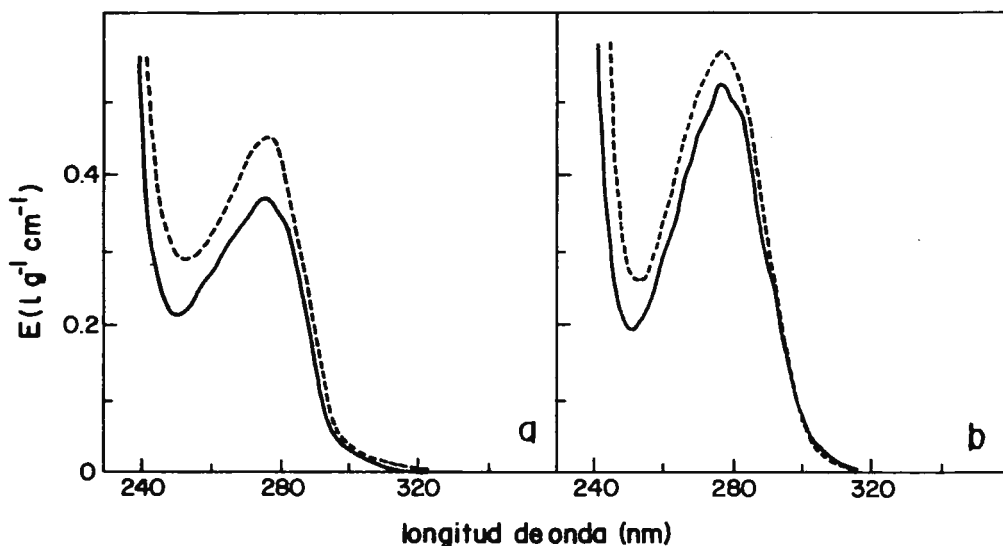


FIGURA 16.- Espectros de absorción ultravioleta de α (a) y β (b) en condiciones de desnaturalización por clorhidrato de guanidina 6 M (línea continua) y en tampón acuoso neutro (línea discontinua).

En clorhidrato de guanidina 6 M se observan máximos a $275,5 \pm 0,5$ nm, mínimos a 250 ± 1 nm y hombros a 258 ± 1 nm, 264 ± 1 nm, 269 ± 1 nm, 282 ± 1 nm y 290 ± 1 nm; en tampón acuoso neutro los máximos se sitúan en $276 \pm 0,5$ nm, los mínimos en 253 ± 1 nm y se detectan hombros a 258 ± 1 nm, 268 ± 1 nm, 282 ± 1 nm y 290 ± 1 nm. Estas características, tanto en condiciones de desnaturalización como nativas, son cualitativamente semejantes a las de ATPasa completa (32). Sin embargo la absorción de α y β no da cuenta cuantitativamente de la de ATPasa, tal como se recoge en la Tabla VI.

TABLA VI. Coeficientes de absorción ultravioleta de α , β y ATPasa

solvente	E ($1 \text{ g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)		
	α	β	ATPasa
clorhidrato de guanidina 6 M	0,37	0,52	0,68
tampón acuoso neutro	0,45	0,54	0,85

Esto mismo ocurría a nivel de la composición química (v. apartado 8), con el bajo contenido en tirosina, triptófano y azúcares de α y β respecto de ATPasa; esto sugiere una fuerte contribución por componentes minoritarios de la molécula de BF_1 , probablemente ricos en aminoácidos aromáticos y azúcares (quizás los componentes de movilidad relativa 1.0 en electroforesis con dodecil-sulfato).

α y β que, según su dicroísmo circular (figura 17), carecen de estructura secundaria ordenada en presencia de guanidina 6 M, repliegan en tampón acuoso a formas de estructura secundaria significativamente ordenada con extremos negativos de elipticidad a 208 ± 2 nm y 222 ± 2 nm, de forma semejante a ATPasa nativa; sin embargo el dicroísmo de α es considerablemente menor que el de β y en ambos casos la intensidad relativa de los extremos es diferente de la de ATPasa nativa.

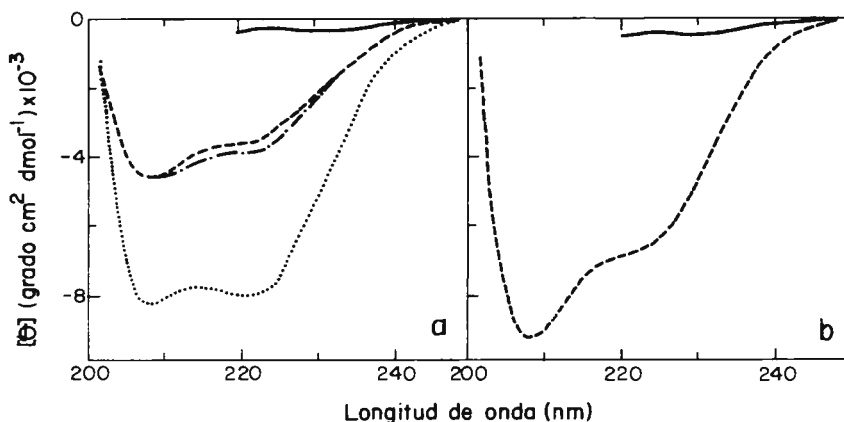


FIGURA 17.- Dicroísmo circular de α (a) y β (b) en condiciones de desnaturalización por clorhidrato de guanidina 6 M (línea continua) y en tampón acuoso neutro (línea discontinua). La línea de puntos y rayas en (a) es el espectro de dicroísmo circular de α en presencia de NaCl 0,5 M y la línea de puntos es el espectro de dicroísmo circular de ATPasa nativa; desoxicolato sódico 0,1% no produce cambios grandes en el dicroísmo circular de β .

En la Tabla VII se recogen los valores de las elipticidades a 222 nm de las tres proteínas; en ninguno de los casos se ha considerado la posible contribución de componentes no proteicos al dicroísmo circular de la molécula. Cabe suponer que la contribución de la parte sacarídica de la molécula no sea significativa, ya que en otras glucoproteínas con contenido mucho mas alto de hidrato de carbono (p.e., la glucoproteína ácida α del suero humano, con un 40%) no representa mas del 10% de la señal y sólo en algunas zonas del espectro (61).

TABLA VII. Dicroísmo circular de α , β y ATPasa

solvente	$[\theta]_{222}$ (grado $\text{cm}^2 \text{ decimol}^{-1}$)		
	α	β	ATPasa
clorhidrato de guanidina 6 M	-300	-400	-400
tampón acuoso neutro	-3.500	-6.350	-8.200

Los espectros de fluorescencia de α y β (figura 18) en clorhidrato de guanidina 6 M presentan máximos de emisión separados, correspondientes a tirosinas (301 ± 1 nm) y triptófanos (348 ± 1 nm) expuestos al solvente (36) de forma parecida a lo que ocurre con BF_1 desnaturalizado (figura 18c); los espectros de excitación de ambos máximos reproducen las características de absorción de tirosina y triptófano respectivamente. El espectro de emisión de β es simulable por una combinación lineal de las emisiones de su contenido en tirosina y triptófano como aminoácidos libres (disminuidas aproximadamente 2,8 y 1,3 veces, respectivamente). Así pues, tirosina y triptófano, perteneciendo a la misma cadena polipeptídica, α o β , presentan fluorescencia relativamente independiente en clorhidrato de guanidina 6 M; por tanto no es necesario postular, como se ha hecho, la presencia de subunidades carentes de triptófano en esta ATPasa (62) para justificar los dos máximos de emisión separados en la proteína desnaturalizada por clorhidrato de guanidina.

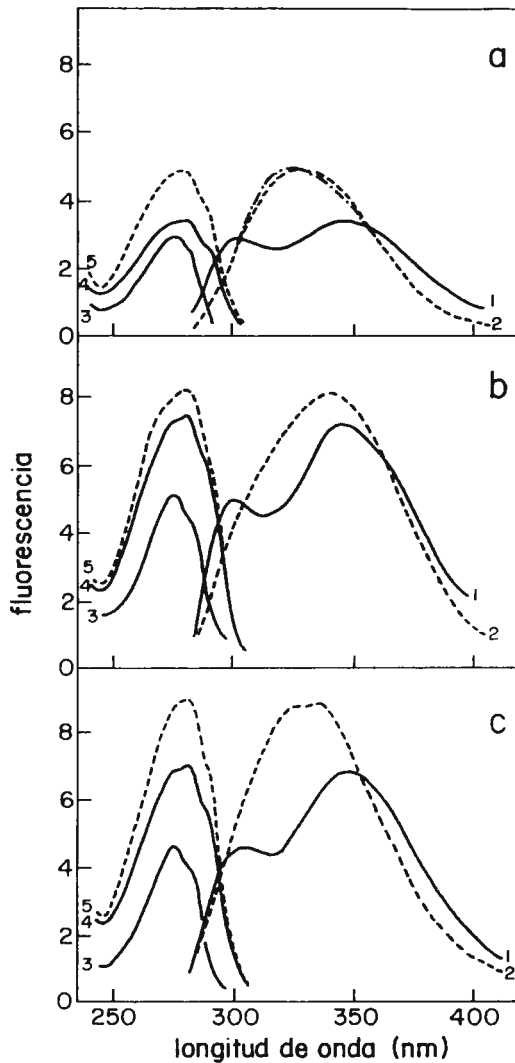


FIGURA 18.- Fluorescencia de α (a) β (b) y ATPase (c) en condiciones de desnaturalización por clorhidrato de guanidina 6 M (línea continua) y en tampón acuoso neutro (línea discontinua). A la derecha se representan los espectros de emisión (excitación a 275 nm, espectros 1 y 2) y a la izquierda los espectros de excitación (análisis de emisión a 301 nm, espectro 3; análisis de emisión a 340 nm, espectro 4; análisis de emisión a 330 nm, espectro 5). La línea de puntos y rayas superpuesta al espectro 2 en (a) representa la fluorescencia de α en presencia de NaCl 0,5 M; la adición de desoxicolato sódico 0,1% no produce cambios significativos en la emisión de β . La escala en ordenadas corresponde a intensidad de emisión normalizada en unidades arbitrarias (57).

En tampón acuoso neutro α (figura 18a) y β (figura 18b) presentan un aumento en la intensidad de emisión del máximo de triptófano, que se desplaza hasta 328 ± 1 nm y 340 ± 1 nm, respectivamente, desapareciendo el máximo individualizado de emisión de tirosina; esto se interpreta como un aumento en el "quenching" de la fluorescencia de tirosina por otros residuos (36) y/o transferencia de energía de excitación de tirosina a triptófano (36), como consecuencia de la colocación de ambos fluoróforos en entornos hidrofóbicos similares a los de ATPasa nativa (v. apartado 6). Las posiciones de las emisiones de α y β en tampón acuoso son cercanas a cada uno de los máximos de ATPasa. En la Tabla VIII se recogen las intensidades relativas de emisión, en donde se observa que α y β no llegan a dar cuenta cuantitativamente de la fluorescencia de ATPasa.

TABLA VIII. Fluorescencia de ATPasa: posición e intensidad relativa de los máximos de emisión (excitación a 275 nm)

solvente	longitud de onda (nm)	Fluorescencia (unidades arbitrarias)		
		α	β	ATPasa
clorhidrato de guanidina 6 M	301	2,8	4,8	
	304			4,4
	348	3,4	6,9	6,7
tampón acuoso neutro	325			8,6
	328	4,9		
	336			8,7
	340		8,0	

En resumen, α y β repliegan en tampón acuoso, en las condiciones ensayadas, a formas moleculares con estructura secundaria y entorno de aminoácidos aromáticos propios de proteínas nativas, si bien no exactamente coincidentes con las propiedades medias de ATPasa. Las diferencias pueden ser causadas, además de por la posible contribución de componentes minoritarios de la molécula de ATPasa, por: a) un repliegamiento incorrecto de las cadenas polipeptídicas (63) (bien por las condiciones experimentales o por la existencia del contenido de información postraducciona constituido por las cadenas oligosacarídicas) ó b) restricciones conformacionales propias del oligómero nativo de partida, causados por interacciones α - β y no presentes por tanto en las subunidades por separado.

Este constituye el primer estudio de las propiedades moleculares de formas seudonativas de subunidades aisladas de un factor de acoplamiento de fosforilación; no se ha observado capacidad para hidrolizar ATP de α o β en tampón acuoso. Posteriormente se piensa ampliar el estudio a la subunidad γ y emprender el examen de las posibles interacciones entre α , β y γ o con otros componentes minoritarios de BF_1 y de la capacidad para fijar ligandos de subunidades aisladas. Muy recientemente el grupo de Kagawa (64) ha descrito la reconstitución funcional de ATPasa/factor de acoplamiento procedente de un microorganismo termofílico; dada la extraordinaria resistencia de esta enzima a condiciones de desnaturalización para la mayor parte de las proteínas (óptimo de actividad enzimática a 75°C, 50% de la actividad en urea 3,52 M ó dodecilsulfato sódico 0,029%), (65) cabe preguntarse si las subunidades

aisladas en clorhidrato de guanidina 6 M presentan estructura secundaria completamente desordenada o por el contrario poseen núcleos residuales de estructura nativa que posibilitan un fácil replegamiento y reasociación al retirar el desnaturalizante. La relativa carencia de datos sobre las propiedades moleculares de las subunidades de esta proteína (64) no permite discernir entre las posibilidades de que se esté efectuando una renaturalización completa o simple reasociación de subunidades. En cualquier caso el mencionado trabajo (64) representa un avance muy considerable en el conocimiento del papel de cada subunidad de los factores de acoplamiento de fosforilación.

Es de esperar que ambos tipos de estudios con subunidades de ATPasa/factor de acoplamiento, los que hemos comentado de restauración de características funcionales (64) y los de recuperación de características físicas propias del estado nativo abordados en el presente trabajo, conduzcan a esclarecer el papel de cada subunidad y a un mejor conocimiento de la estructura molecular, funcionamiento y relación con la membrana de estos complejos sistemas enzimáticos.

Bibliografía básica

- 1.- P.L.Pedersen, "Mitochondrial Adenosine Triphosphatase".
Bioenergetics, 6, 243 (1975).
- 2.- K.E.Van Holde, Physical Biochemistry (Prentice Hall Inc.,
Englewood Cliffs, New Jersey, (1971).

Referencias

- 3.- E.Muñoz, J.M.Freer, D.J.Ellar y M.R.J.Salton, Biochim.Biophys.
Acta 150, 531 (1968).
- 4.- E.Muñoz, M.R.J.Salton, M.H.Ng y M.T.Schor, Eur.J.Biochem. 7,
490 (1969).
- 5.- M.R.J.Salton, M.T.Schor y M.H.Ng, Biochim.Biophys.Acta 290,
408 (1972).
- 6.- J.D.Oppenheim y M.R.J.Salton. Biochim.Biophys.Acta, 298, 297
(1973).
- 7.- E.Muñoz, M.S.Nachbar, M.T.Schor y M.R.J.Salton, Biochem.
Biophys.Res.Comm., 32, 539 (1968).
- 8.- M.R.J.Salton y M.T.Schor, Biochem.Biophys.Res.Comm. 49, 350
(1972).
- 9.- M.Lastras y E.Muñoz, J.Bacteriol. 119, 593 (1974).
- 10.-E.Muñoz, M.Lastras, J.Carreira y J.M.Andreu, Abstracts 1st
Congress for Bacteriology, pp 100 Jerusalem (Israel) (1973).
- 11.-J.M.Andreu, J.A.Albendea y E.Muñoz, Eur.J.Biochem., 37, 505
(1973).
- 12.-J.M.Andreu y E.Muñoz, Biochim.Biophys.Acta 387, 228 (1975).
- 13.-K.K.Ferguson, Metabolism, 13, 985 (1964).

- 14.- D.Rodbard y A.Chrambach, Anal.Biochem., 40, 95 (1971).
- 15.- J.M.Andreu, Tesis doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad Complutense (Madrid, 1976).
- 16.- J.Carreira, J.M.Andreu, M.Nieto y E.Muñoz, Mol.Cell.Biochem. 10, 67 (1976).
- 17.- J.Carreira y E.Muñoz, J.M.Andreu, M.Nieto, Biochim.Biophys. Acta 436, 183 (1976).
- 18.- J.Carreira, J.M.Andreu y E.Muñoz, Biochim.Biophys.Acta, 492, 387 (1977).
- 19.- A.Abrams y J.B.Smith, "Bacterial Membrane ATPase", The Enzymes vol. X, p. 395 (Ed. P.D.Boyer, Academic Press, 1974).
- 20.- A.F.Knowles y H.S.Penefsky, J.Biol.Chem., 247, 6624 (1972).
- 21.- J.M.Andreu, J.Carreira y E.Muñoz, FEBS Lett. 65, 198 (1976).
- 22.- J.M.Andreu, V.Larraga y E.Muñoz "Glycoprotein Nature of Energy Transducing ATPases" en Bioenergetics of Membranes (ed. L.Packer, Elsevier 1977).
- 23.- M.C.Glick, Methods in Membrane Biology, 2, 157 (ed. E.D.Korn Plenum Press, 1974).
- 24.- J.M.Andreu, R.Worth y E.Muñoz, FEBS Lett. 86, 1 (1978).
- 25.- A.Guerrero, J.M.Andreu y E.Muñoz, sometido para publ. (1978)
- 26.- C.Muñoz, P.Palacios y E.Muñoz. J.Bioenergetics, en prensa (1978).
- 27.- M.S.Bretscher y M.C.Raff, Nature 258, 43 (1975).
- 28.- J.E.Rothman y J.Lenard, Science 195, 743 (1977).

- 29a.-G.A.Howard y H.P.Schnebli, Proc.Nat.Acad.Sci.USA 74, 818 (1977).
- 29b.-W.B.Rizzo y M.Bustin, J.Biol.Chem., 252, 7062 (1977).
- 30.- C.Tanford, Physical Chemistry of Macromolecules (Wiley, New York, 1961).
- 31.- D.C.Teller, Methods in Enzymology XXVII, 346 (ed.Hirs y Timasheff Academic Press, 1973).
- 32.- M.Nieto, E.Muñoz, J.Carreira y J.M.Andreu, Biochim.Biophys. Acta, 413, 394 (1975).
- 33.- T.Wahabayashi, M.Kubata, M.Yoshida y Y.Kagawa, J.Mol.Biol. 117, 515 (1977).
- 34.- B.A.Baird y G.G.Hammes, J.Biol.Chem., 252, 4743 (1977).
- 35.- A.J.Adler, N.J.Greefied y G.D.Fasman, "Circular Dichroism and Optical Rotatory Dispersion of **Proteins and Polypeptides**" Methods in Enzymology. XXVII, 675 (ed. Hirs y Timasheff Academic Press, 1973).
- 36.- R.F.Chen, H.Edelhoch y R.F.Steiner "Fluorescence of Proteins" en Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry, parte A, 171 (ed. S.Leach, Academic Press, 1969).
- 37.- C.Tanford "Protein Denaturation" en Advances in Protein Chemistry 23 y 24 (Ed. C.B.Anfinsen, J.T.Edsall, F.M.Richards. Academic Press, 1968, 1970).
- 38.- R.A.Cook y D.E.Koshland, Proc.Nat.Acad.Sci.USA 64, 247 (1969).
- 39.- J.W.Teipel y D.E.Koshland, Biochemistry 10, 792 (1971).
- 40.- M.Tobes, R.T.Kuczenski y C.H.Smetter, Arch.Biochem.Biophys. 151, 56 (1972).

- 41.- A.Ishihawa y K.Ito, J.Mol.Biol.72, 11 (1972).
- 42.- K.Weber y D.J.Kuter, J.Biol.Chem. 240, 4504 (1971).
- 43.- R.Adolfson, J.A.McClung y E.N.Moudrianakis, Biochemistry 14, 1727 (1975).
- 44.- I.A.Kozlov y H.N.Mikelsaar, FEBS Lett. 43, 212 (1974).
- 45.- A.E.Senior y J.C.Brooks, Arch.Biochem.Biophys. 140, 257 (1970)
- 46.- N.Nelson, D.W.Deters, H.Nelson y E.Racker, J.Biol.Chem., 248, 2049 (1973).
- 47.- H.A.Saroff, Arch.Biochem.Biophys. 183, 753 (1977).
- 48.- K.Weber y M.Osborn, J.Biol.Chem., 245, 4400 (1969).
- 49.- J.A.Reynolds y C.Tanford, Proc.Nat.Acad.Sci.USA 66, 1002 (1975).
- 50.- J.A.Reynolds y C.Tanford, J.Biol.Chem., 245, 5161 (1970).
- 51.- W.W.Fish, "Molecular weight of proteins and polypeptides", Methods in Membrane Biology, 4, 189 (Ed.E.D.Korn, Plenum Press, 1975).
- 52.- D.A.Yphantis, Biochemistry 3, 297 (1964).
- 53.- P.D.Jeffrey y M.J.Pont, Biochemistry 8, 4597 (1969).
- 54.- H.P.Schnebli, A.E.Vatter y A.Abrams, J.Biol.Chem. 245, 1122 (1970).
- 55.- D.E.Roark y D.A.Yphantis, Ann.N.Y.Sci., 164, 245 (1970).
- 56.- S.N.Timasheff y R.Townsend "Light Scattering", Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry parte B, 147 (ed.S.Leach, Academic Press, 1970).

- 57.- J.M.Andreu y E.Muñoz, en preparación (1978).
- 58.- A.Helenius y K.Simons, Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 74, 529 (1977).
- 59.- I.A.Kozlov y V.P.Skulachev, " H^+ -Adenosine triphosphatase and membrane energy coupling", Biochim.Biophys.Acta 463, 29 (1977):
- 60.- A.F.Winder y W.L.G.Gent, Biopolymers 10, 1243 (1971).
- 61.- J.P.Aubert y M.H.Loucheux-Léfebvre, Arch.Biochem.Biophys., 175, 400 (1976).
- 62.- M.Nieto y J.Ayala, Biochem.J. 161, 321 (1977).
- 63.- C.B.Anfinsen y H.A.Scheraga "Experimental and theoretical aspects of Protein Folding", Advances in Protein Chemistry 24, 205 (Ed.C.B.Anfinsen, J.T.Edsall y F.M.Richards Academic Press, 1975).
- 64.- M.Yoshida, N.Sone, H.Hirata y Y.Kagawa, J.Biol.Chem., 252, 3480 (1977).
- 65.- N.Yoshida, N.Sone, H.Hirata y Y.Kagawa, J.Biol.Chem., 250, 7910 (1975).



FUNDACION JUAN MARCH
SERIE UNIVERSITARIA

Títulos Publicados:

1. — *Semántica del lenguaje religioso.* / A. Fierro
(Teología. España, 1973)
2. — *Calculador en una operación de rectificación discontinua.* / A. Mulet
(Química. Extranjero, 1974)
3. — *Skarns en el batolito de Santa Olalla.* / F. Velasco
(Geología. España, 1974)
4. — *Combustión de compuestos oxigenados.* / J. M. Santiuste
(Química. España, 1974)
5. — *Películas ferromagnéticas a baja temperatura.* / José Luis Vicent López
(Física. España, 1974)
6. — *Flujo inestable de los polímeros fundidos.* / José Alemán Vega
(Ingeniería. Extranjero, 1975)
7. — *Mantenimiento del hígado dador in vitro en cirugía experimental.* /
José Antonio Salva Lacombe (Medicina, Farmacia y Veterinaria. España, 1973)
8. — *Estructuras algebraicas de los sistemas lógicos deductivos.* / José Plá Carrera
(Matemáticas. España, 1974)
9. — *El fenómeno de inercia en la renovación de la estructura urbana.* /
Francisco Fernández-Longoria Pinazo (Urbanización del Plan Europa 2.000
a través de la Fundación Europea de la Cultura)
10. — *El teatro español en Francia (1935—1973).* / F. Torres Monreal
(Literatura y Filología. Extranjero, 1971)
11. — *Simulación electrónica del aparato vestibular.* / J. M. Drake Moyano
(Métodos Físicos aplicados a la Biología. España, 1974)
12. — *Estructura de los libros españoles de caballerías en el siglo XVI.* /
Federico Francisco Curto Herrero (Literatura y Filología. España, 1972)
13. — *Estudio geomorfológico del Macizo Central de Gredos.* /
M. Paloma Fernández García (Geología. España, 1975)
14. — *La obra gramatical de Abraham Ibn c Ezra.* / Carlos del Valle Rodríguez
(Literatura y Filología. Extranjero, 1970)

15. — *Evaluación de Proyectos de Inversión en una Empresa de producción y distribución de Energía Eléctrica.* / Felipe Ruíz López (Ingeniería. Extranjero, 1974)
16. — *El significado teórico de los términos descriptivos.* / Carlos Solís Santos (Filosofía. España, 1973)
17. — *Encaje de los modelos econométricos en el enfoque objetivos-instrumentos relativos de política económica.* / Gumersindo Ruíz Bravo (Economía. España, 1971)
18. — *La imaginación natural (estudios sobre la literatura fantástica norteamericana).* / Pedro García Montalvo (Literatura y Filología. Extranjero, 1974)
19. — *Estudios sobre la hormona Natriurética.* / Andrés Purroy Unanua (Medicina, Farmacia y Veterinaria. Extranjero, 1973)
20. — *Análisis farmacológico de las acciones miocárdicas de bloqueantes Beta-adrenérgicos.* / José Salvador Serrano Molina (Medicina, Farmacia y Veterinaria. España, 1970)
21. — *El hombre y el diseño industrial.* / Miguel Durán-Lóriga (Artes Plásticas. España, 1974)
22. — *Algunos tópicos sobre teoría de la información.* / Antonio Pascual Acosta (Matemáticas. España, 1975)
23. — *Un modelo simple estático. Aplicación a Santiago de Chile.* / Manuel Bastarache Alfaro (Arquitectura y Urbanismo. Extranjero, 1973)
24. — *Moderna teoría de control: método adaptativo-predictivo. Teoría y realizaciones.* / Juan Manuel Martín Sánchez (Ingeniería. España, 1973)
25. — *Neurobiología (I Semana de Biología. Conferencias-coloquio sobre Investigaciones biológicas 1977)*
26. — *Genética (I Semana de Biología. Conferencias-coloquio sobre Investigaciones biológicas 1977)*
27. — *Genética (I Semana de Biología. Conferencias-coloquio sobre Investigaciones biológicas 1977)*
28. — *Investigación y desarrollo de un analizador diferencial digital (A.D.D.) para control en tiempo real.* / Vicente Zugasti Arbizu (Física. España, 1975)
29. — *Transferencia de carga en aleaciones binarias.* / Julio A. Alonso (Física. Extranjero, 1975)
30. — *Estabilidad de osciladores no sinusoidales en el rango de microondas.* / José Luis Sebastián Franco (Física. Extranjero, 1974)

31. — *Estudio de los transistores FET de microondas en puerta común.*/ Juan Zapata Ferrer. (Ingeniería. Extranjero, 1975).
32. — *Estudios sobre la moral de Epicuro y el Aristóteles esotérico.*/ Eduardo Acosta Méndez. (Filosofía. España, 1973).
33. — *Las Bauxitas Españolas como mena de aluminio.*/ Salvador Ordóñez Delgado. (Geología. España, 1975).
34. — *Los grupos profesionales en la prestación de trabajo: obreros y empleados.*/ Federico Durán López. (Derecho. España, 1975).
35. — *Obtención de Series aneuploides (monosómicas y ditelosómicas) en variedades españolas de trigo común.*/ Nicolás Jouve de la Barreda. (Ciencias Agrarias. España, 1975).
36. — *Efectos dinámicos aleatorios en túneles y obras subterráneas.*/ Enrique Alarcón Alvarez. (Ingeniería. España, 1975).
37. — *Lenguaje en periodismo escrito.*/ Fernando Lázaro Carreter, Luis Michelena Elissalt, Robert Escarpit, Eugenio de Bustos. Víctor de la Serna, Emilio Alarcos Llorach y Juan Luis Cebrián. (Seminario organizado por la Fundación Juan March los días 30 y 31 de mayo de 1977).
38. — *Factores que influyen en el espigado de la remolacha azucarera, Beta vulgaris L.*/ José Manuel Lasa Dolhagaray y Antonio Silván López. (Ciencias Agrarias. España, 1974).
39. — *Compacidad numerable y pseudocompacidad del producto de dos espacios topológicos. Productos finitos de espacios con topologías proyectivas de funciones reales.*/ José Luis Blasco Olcina. (Matemáticas. España, 1975).
40. — *Estructuras de la épica latina.*/ M^a. del Dulce Nombre Estefanía Alvarez. (Literatura y Filología. España; 1971).
41. — *Comunicación por fibras ópticas.*/ Francisco Sandoval Hernández. (Ingeniería. España, 1975).
42. — *Representación tridimensional de texturas en chapas metálicas del sistema cúbico.*/ José Antonio Pero-Sanz Elorz. (Ingeniería. España, 1974).
43. — *Virus de insectos: multiplicación, aislamiento y bioensayo de Baculovirus.*/ Cándido Santiago-Alvarez. (Ciencias Agrarias. Extranjero, 1976).
44. — *Estudio de mutantes de saccharomyces cerevisiae alterados en la biosíntesis de proteínas.*/ Lucas Sánchez Rodríguez. (Biología. España, 1976).

45. — *Sistema automático para la exploración del campo visual.* José Ignacio Acha Catalina. (Medicina, Farmacia y Veterinaria. España, 1975).
46. — *Propiedades físicas de las variedades de tomate para recolección mecánica.* / Margarita Ruiz Altisent. (Ciencias Agrarias. España 1975).
47. — *El uso del ácido salicílico para la medida del pH intracelular en las células de Ehrlich y en escherichia coli.* / Francisco Javier García-Sancho Martín. (Medicina, Farmacia y Veterinaria. Extranjero, 1974).
48. — *Relación entre iones calcio, fármacos ionóforos y liberación de noradrenalina en la neurona adrenérgica periférica.* / Antonio García García. (Medicina, Farmacia y Veterinaria. España, 1975).
49. — *Introducción a los espacios métricos generalizados.* / Enrique Trillas y Claudi Alsina. (Matemáticas. España, 1974).
50. — *Síntesis de antibióticos aminoglicosídicos modificados.* / Enrique Pando Ramos. (Química. España, 1975).
51. — *Utilización óptima de las diferencias genéticas entre razas en la mejora.* / Fernando Orozco y Carlos López-Fanjul. (Biología Genética. España, 1973).
52. — *Mecanismos neurales de adaptación visual a nivel de la capa plexiforme externa de la retina.* / Antonio Gallego Fernández. (Biología Neurobiología. España, 1975).
53. — *Compendio de la salud humana de Johannes de Ketham.* / M^a. Teresa Herrera Hernández. (Literatura y Filología. España, 1976).
54. — *Breve introducción a la historia del Señorío de Buitrago.* / Rafael Flaquer Montequí. (Historia. España, 1975).
55. — *Una contribución al estudio de las teorías de cohomología generalizadas.* / Manuel Castellet Solanas. (Matemáticas. Extranjero, 1974).
56. — *Fructosa 1,6 Bisfosfatasa de hígado de conejo: modificación por proteasas lisosomales.* / Pedro Sánchez Lazo. (Medicina, Farmacia y Veterinaria. Extranjero, 1975).
57. — *Estudios sobre la expresión genética de virus animales.* / Luis Carrasco Llamas. (Medicina, Farmacia y Veterinaria. Extranjero, 1975).
58. — *Crecimiento, eficacia biológica y variabilidad genética en poblaciones de dípteros.* / Juan M. Serradilla Manrique. (Ciencias Agrarias. Extranjero, 1974).

59. — *Efectos magneto-ópticos de simetría par en metales ferromagnéticos.* / Carmen Nieves Afonso Rodríguez. (Física. España, 1975).
60. — *El sistema de Servet.* / Angel Alcalá Galve. (Filosofía. España, 1974).
61. — *Dos estudios sobre literatura portuguesa contemporánea.* / David Mourão-Ferreira y Vergilio Ferreira. (Literatura y Filología, 1977).
62. — *Sistemas intermedios.* / María Manzano Arjona. (Filosofía. España, 1975).
63. — *A la escucha de los sonidos cerca de T_λ en el ^4He líquido.* / Félix Vidal Costa. (Física. Extranjero, 1974).
64. — *Simulación cardiovascular mediante un computador híbrido.* / José Ramón Farré Muntaner. (Ingeniería. España, 1976).

