

SONIA APARECIDA GURGUEIRA

Este exemplar corresponde a redação final de tese defendida pela candidata Sonia Aparecida Gurgueira e aprovada pela comissão julgadora.

REGULAÇÃO DA ATPase MITOCONDRIAL PELOS SÍTIOS
NÃO CATALÍTICOS E PELA PROTEÍNA INIBIDORA

Ione Salgado Martins
21/02/1991

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Biologia, área de Bioquímica

Orientador

Profa. Dra. IONE SALGADO MARTINS

BC 103073

G962r
13500/BC

Campinas - S. Paulo
1991

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Aníbal Eugênio Vercesi pela oportunidade de ter trabalhado em seu grupo de pesquisa e pelas críticas e sugestões feitas a este trabalho.

À Profa. Dra. Ione Salgado Martins, por ter me aceitado como orientada e pelo muito que me ensinou.

Às profas. Dra. Lúcia Pereira da Silva e Dra. Maria Sumiko Arita Matsuura, pelas críticas e sugestões feitas a este trabalho.

A todos os professores da UNICAMP com os quais eu tive contato, pelo auxílio no aprimoramento e engrandecimento dos meus conhecimentos.

A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica, em especial à Regina Célia Rosseto.

À minha mãe, pelo amor e compreensão dedicados em mais esta etapa da minha vida.

Aos meus irmãos e ao meu sobrinho Pablo, por me ajudarem e me aturarem, em especial nestes últimos dois anos.

À Berenice, minha grande incentivadora.

À Cristina, pela oportunidade concedida.

À Renata, a amiga de todas as horas, e a Lúcia e Ana Lia, as amigas que faltavam, obrigado por TUDO.

Aos meus amigos da UNICAMP, pelos bons e alegres momentos divididos e pelo incentivo nas horas incertas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelos anos de bolsa de estudo, e às Fundações de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) e da UNICAMP (FAP), pelo auxílio financeiro na aquisição de reagentes.

A Deus, por mais esta grande aventura.



ABREVIACOES UTILIZADAS

ADP	- Adenosina-5-Difosfato
AMP-PNP	- Adenilil-Imido-Difosfato
ANP	- Nucleotídeos de Adenina
Ap5A	- Diadenosina-5-Pentafosfato
ATP	- Adenosina-5-Trifosfato
CAT	- Carboxiatractilato
DCCD	- Diciclohexilcarbodiimida
EDTA	- cido Etileno Diamino Tetra Acético
FCCP	- Cianocarbonil p-Trifluormetoxi-Fenilhidrazona
F ₀	- Foro Hidrofóbica integral  membrana da ATPase
F ₁	- Foro Catalítica da ATPase
GNP	- Nucleotídeos de Guanina
GTP	- Guanosina-5-Trifosfato
INP	- Nucleotídeos de Inosina
LDH	- Lactato Desidrogenase
NADH	- Nicotinamina Adenina Dinucleotídeo (forma reduzida)
NbFC1	- 7-Cloro-4-Nitro-Benzofurazam
NTP	- Nucleotídeos-5-Trifosfato
OSCP	- Fator que Confere Sensibilidade a Oligomicina
PEP	- Fosfoenolpiruvato
PI	- Proteína Inibidora
PK	- Piruvato Quinase
PSM	- Partículas Submitocondriais
Tris	- Tris(Hidroximetil)Aminometano
Trisma	- Tris(Hidrozimetil)Aminometano básico
$\Delta\mu\text{H}^+$	- Gradiente Eletroquímico de prótons
μ	- Força iônica



ÍNDICE

INTRODUÇÃO.....	01
Estrutura e Composição.....	02
Mecanismo Catalítico.....	03
Proteína Inibidora.....	04
Sítios de ligação de Nucleotídeos.....	06
Propriedades de Ligação.....	06
Localização.....	08
Ligação de Nucleotídeos na Presença da Proteína Inibidora.....	09
Controle da Catálise pelos Sítios não Catalíticos e pela Proteína Inibidora.....	10
MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
A-Isolamento de Mitocôndrias de Coração Bovino.....	12
B-Preparação de Partículas Submitocondriais.....	13
C-Ligação de Nucleotídeos de Adenina na ATP-sintetase Mitocôndrial.....	14
D-Atividade Hidrolítica da F_1 -ATPase de Partículas Submitocondriais.....	15
1-Método Colorimétrico.....	15
2-Método Espectrofotométrico.....	15
E-Determinação da Concentração de Proteína.....	16
RESULTADOS.....	17
1-Ligação de ADP nos Sítios Não Catalíticos da ATP-sintetase: Efeito da Proteína Inibidora.....	17
2-Efeito do Fosfoenolpiruvato (PEP) na Ligação de ADP nos Sítios Não Catalíticos e na Atividade ATPásica.....	19
3-Ligação de ADP nos Sítios Não Catalíticos Durante a Ativação da ATPase.....	26
4-Correlação Entre a Remoção da Proteína Inibidora e a Ligação de ADP nos Sítios Não Catalíticos.....	30
DISCUSSÃO.....	35
RESUMO.....	40
ABSTRACT.....	41
BIBLIOGRAFIA.....	42



INTRODUÇÃO

A H^+ -ATP-sintetase está diretamente ligada aos principais processos de transdução de energia na célula. Estes processos são a síntese de ATP para conservação de energia química em todos os organismos vivos e a hidrólise de ATP, que libera energia para a ocorrência de processos termodinamicamente desfavoráveis.

Nos organismos procariotos esta enzima encontra-se localizada na membrana plasmática, onde, pela hidrólise de ATP, é gerado um gradiente eletroquímico de prótons que permite o transporte de nutrientes para o interior da célula. Nos organismos eucariotos ela está localizada na membrana interna da mitocôndria ou na membrana tilacóide de cloroplastos, onde, juntamente com os componentes do sistema de transporte de elétrons, é responsável pelas reações de fosforilação oxidativa ou fotofosforilação, respectivamente (SENIOR, 1988).

A utilização do gradiente eletroquímico de prótons ($\Delta\mu H^+$) para impulsionar a síntese de ATP foi proposta por P. MITCHELL (1961) e é conhecida como *hipótese quimiosmótica da fosforilação oxidativa ou fotossintética*. Segundo esta hipótese, o gradiente de prótons, gerado pelo transporte de elétrons nas membranas transdutoras de energia, participaria diretamente na síntese de ATP. A passagem de H^+ através da porção F_0 da ATPase atingiria o sítio catalítico localizado em F_1 , desidratando ADP e P_i para gerar ATP, conforme se vê na seguinte reação reversível:



Atualmente é mais aceita a hipótese de que o $\Delta\mu H^+$ participe indiretamente na síntese de ATP, servindo apenas para provocar



UNICAMP

uma mudança conformacional na enzima, que favoreceria a liberação do ATP sintetizado espontaneamente no sítio catalítico (BOYER, 1979, 1985, 1989). A constatação da ocorrência de síntese espontânea de ATP em meio hidrofóbico, contendo dimetilsulfóxido como solvente e altas concentrações de Pi, pela Ca⁺-ATPase de retículo sarcoplasmático (DE MEIS, *et al.*, 1980) e pela F₁-ATPase mitocondrial de coração bovino (SAKAMOTO & TONOMURA, 1983; GÓMEZ-PUYOU *et al.*, 1986 e KANDPAL, *et al.*, 1987), fortaleceu esta hipótese.

ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO

A H⁺-ATP-sintetase é composta de duas partes funcionalmente distintas. A porção F₀, hidrofóbica e integral à membrana, é responsável pela translocação de prótons em direção ao sítio catalítico situado na porção F₁.

A composição das subunidades da porção F₀ está bem caracterizada somente em *Escherichia coli*. Nestes organismos, ela é formada por três subunidades diferentes, denominadas a, b, e c, com pesos moleculares de aproximadamente 30, 17 e 8 Kda, respectivamente e com a seguinte estequiometria: a₁b₂c₉₋₁₂ (HOPP & SEBALD, 1984). Em mitocôndrias animais, subunidades adicionais são encontradas (F₆, Fator B, A6L e OSCP), que estão possivelmente envolvidas na formação da haste de acoplamento juntamente com as subunidades S e E da F₁ e, portanto, provavelmente relacionadas com a maior complexidade dos organismos superiores (SENIOR, 1988)



UNICAMP

A porção F_1 encontra-se voltada para a matriz mitocondrial. É composta de cinco subunidades diferentes, sendo três cópias das subunidades α e β , com pesos moleculares de aproximadamente 55 e 50 Kda, e uma cópia de γ , δ e ϵ com pesos moleculares de aproximadamente 30, 20 e 15 Kda, ficando estabelecida a seguinte estequiometria: $\alpha_3, \beta_3, \gamma, \delta$ e ϵ (HATEFI, 1985; SENIOR, 1988).

Estudos realizados com inibidores da atividade hidrolítica como DCCD (YOSHIDA *et al.*, 1981 e 1982), NbfCl (ANDREWS *et al.*, 1984) ou com análogos de ATP fotoreativos que se unem covalentemente ao sítio ativo (SENIOR, 1988; BOYER, 1989) tem mostrado que a catálise está associada à subunidade β da porção F_1 .

MECANISMO CATALÍTICO

As três cópias de cada subunidade β são estruturalmente idênticas. Entretanto, estas subunidades parecem ser conformacionalmente heterogêneas devido à interação com as subunidades menores da porção F_1 , que aparecem como cópias únicas. Devido a esta assimetria conformacional, surgiram vários modelos propondo a existência de 1, 2 ou 3 sítios catalíticos funcionais. Dentro destas propostas, o modelo de sítios alternantes com 3 sítios catalíticos equivalentes tem recebido bastante atenção (GRESSER *et al.*, 1982; O NEAL & BOYER, 1984). De acordo com este modelo, a ligação do substrato no sítio catalítico de uma subunidade β induz uma mudança conformacional no sítio catalítico de outra subunidade β , e isso facilita a dissociação do produto. Os sítios



UNICAMP

catalíticos alternariam em sua função e agiriam cooperativamente em cada ciclo catalítico. Controle da atividade enzimática, via mudança conformacional, induzida por ligação de substrato, é um fenômeno bem estabelecido (MONOD, 1965; KOSHLAND, 1966). A idéia de que, a alteração conformacional induzida pela ligação de substrato regula a atividade da F_1 é consistente com estudos cinéticos realizados por GRUBMEYER *et al.* (1982) e com medidas fluorométricas (WANG *et al.*, 1986). Entretanto, ainda são necessários maiores evidências experimentais que demonstrem que os sítios alternantes realmente trocam suas funções em cada ciclo catalítico, durante a hidrólise ou síntese de ATP. Por outro lado, modelos de F_1 com subunidades não equivalentes, são consistentes com dados de difração de raio-X (AMZEL *et al.*, 1982), micrografia eletrônica (BOEKENA *et al.*, 1986), resultados de estudos de desnaturação pelo frio (WILLIAMS *et al.*, 1984) e experimentos com vários tipos de modificadores químicos da F_1 (recentemente revisados por WANG, 1988).

PROTEÍNA INIBIDORA

A porção F_1 da ATP-sintetase mitocondrial apresenta, ligada à subunidade β , em local diferente do sítio catalítico (KLEIN *et al.*, 1980), uma proteína de baixo peso molecular que, por inibir principalmente a atividade hidrolítica da enzima, foi denominada *Proteína Inibidora* por PULLMAN & MONROY (1963).

Como existem 3 moles de subunidades β por mol de F_1 , acredita-se que existam 3 sítios de ligação para a proteína inibido-



UNICAMP

ra (PI), um em cada subunidade β . Entretanto, 1 mol de PI é suficiente para inibir totalmente 1 mol de F_1 (KLEIN *et al.*, 1980). Estes resultados levaram à idéia de que um dos sítios de ligação da PI deve ser de maior afinidade que os outros dois. Foi proposto que este sítio estaria localizado na subunidade β assimétrica (SCHWERZMAN & PEDERSEN, 1986)

A descoberta de que a proteína inibidora não somente inibe a atividade hidrolítica da enzima (PULLMAN & MONROY, 1963), mas também a síntese de ATP (GÓMEZ-PUYOY *et al.*, 1979), evidenciou a importância do papel regulatório desta proteína. Foi observado que a síntese de ATP não se inicia até que a ação inibitória da PI seja abolida pelo estabelecimento de $\Delta\mu H^+$ (GÓMEZ-PUYOY *et al.*, 1979; HARRIS *et al.*, 1979). Em condições onde $\Delta\mu H^+$ através da membrana mitocondrial é baixo e a síntese de ATP ainda está ocorrendo, a PI parece regular a reação de hidrólise, agindo como regulador fisiológico da ATP-sintetase (SENIOR, 1988).

O deslocamento da ação da proteína inibidora de seu sítio de ligação, pode ser feito pela remoção de íons magnésio por EDTA (GÓMEZ-FERNANDES & HARRIS, 1978), pelo aumento do pH, da temperatura ou da força iônica (BELTRAN *et al.*, 1984). Estes tratamentos levam a um aumento de até 20 vezes na atividade hidrolítica da enzima ligada à membrana (BELTRAN *et al.*, 1984, 1986).

Em ATPases isoladas de cloroplastos (CF_1) e de *E. coli* (EF_1), a subunidade ϵ constitui o inibidor natural destas enzimas (McCARTY & ROCKER, 1968; STERNWEIS & SMITH, 1980). Entretanto, à diferença do que ocorre com a ATPase mitocondrial, onde a PI afeta tanto a F_1 solúvel quanto aquela unida à membrana, a subunidade ϵ de CF_1 e de EF_1 afeta somente a enzima solúvel (STERNWEIS



UNICAMP

& SMITH, 1980). Assim, a atividade ATPásica nestas enzimas é latente, podendo estas serem ativadas por tratamentos que afetam a subunidade ϵ de F_1 , como tripsina, calor ou agentes redutores (ver WAGENVOORD *et al.*, 1981).

SÍTIOS DE LIGAÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS

Propriedades de ligação

São características bastante aceitas dos sítios de ligação de nucleotídeos que os sítios não catalíticos são independentes de Mg^{2+} e ligam especificamente nucleotídeos de adenina, enquanto que os sítios catalíticos são dependentes de Mg^{2+} e não específicos para nucleotídeos de adenina, ligando também GMP e INP (PERLIN, 1984; SENIOR, 1979 e 1988; KIRONDE & CROSS, 1986 e 1987).

Os sítios de ligação de nucleotídeos também foram classificados como catalíticos ou não, de acordo com a habilidade destes trocarem nucleotídeos ligados com os do meio durante a catálise (CROSS & NALIN, 1982). Segundo essa definição, os sítios trocáveis seriam catalíticos e os não trocáveis seriam não catalíticos.

HARRIS *et al.* (1973), classificaram os sítios de ligação de nucleotídeos na F_1 como sítios de ligação forte ou fraca, em função da capacidade destes reterem ou não seus nucleotídeos endógenos, após precipitação repetida da F_1 solúvel em solução de sulfato de amônio. Estes nucleotídeos fortemente ligados à enzima também se caracterizam por não serem removidos após filtração em



UNICAMP

colunas de Sephadex G-50 (HARRIS *et al.*, 1973; GARRET & PENEFSKY, 1975).

Inicialmente associou-se que os sítios de ligação forte corresponderiam aos não catalíticos, contendo nucleotídeos endógenos não trocáveis com os do meio, enquanto que os sítios de ligação fraca corresponderiam aos sítios catalíticos que tem capacidade de trocar seus nucleotídeos rapidamente (CROSS & NALIN, 1982).

Entretanto, vários resultados tem mostrado que esta relação não é verdadeira. KIRONDE & CROSS (1987) trabalhando com MF_1 isolada, demonstraram um comportamento assimétrico entre os sítios não catalíticos, onde um deles sofre rápida troca na presença de EDTA. Sítios não catalíticos capazes de trocarem rapidamente seus nucleotídeos com nucleotídeos do meio, foram recentemente observados em CF_1 isolada (XUE & BOYER, 1989).

Para a F_1 mitocondrial, GRIECO *et al.* (1990) e MARTINS *et al.* (1990) puderam demonstrar que os três sítios não catalíticos são capazes de ligar fortemente e trocar rapidamente seus nucleotídeos com os do meio, quando a enzima está ligada à membrana e complexada com a proteína inibidora endógena. Foi observado que, quando estas preparações são incubadas a baixa temperatura, em pH 6,0, na presença de glicerol e EDTA, a velocidade de hidrólise é muito lenta, levando aproximadamente 10 minutos para ocorrer o 1º ciclo catalítico. Nestas condições a enzima é capaz de ligar fortemente e trocar nucleotídeos de adenina nos 3 sítios não catalíticos antes do primeiro *turnover* ter sido completado (MARTINS *et al.*, 1990).

Por outro lado, tanto a ATPase de cloroplastos quanto a mitocondrial apresentam um sítio de alta afinidade que liga ADP



UNICAMP

fortemente, inibindo a atividade da enzima. Foi demonstrado que esta inibição é dependente de Mg^{2+} , originando-se quando ADP se liga fortemente a um sítio catalítico na ausência de Pi (DROBINSKAYA *et al.*, 1985; ZHOU *et al.*, 1988).

O novo conceito que surge desses resultados é que ambos os tipos de sítios podem ligar nucleotídeos fortemente e a velocidade de troca parece depender do tipo de preparação enzimática e das condições prévias de incubação da enzima.

Localização:

A porção F_1 possui seis sítios de ligação para nucleotídeos de adenina (SENIOR, 1988). Medidas de ligação com as subunidades α e β isoladas (FUTAI & KANAZAWA, 1983) e experimentos com marcadores de afinidade (VIGNAIS & LUNARDI, 1985), levaram à idéia de que cada subunidade β apresentaria 1 sítio catalítico, enquanto que os sítios não catalíticos estariam localizados nas subunidades α .

Entretanto, resultados mais recentes de modificação química tem sugerido fortemente que ambos os sítios estariam na mesma subunidade β (XUE *et al.*, 1987; KIRONDE & CROSS, 1987; BULLOUGH *et al.*, 1988). A proposta para explicar resultados anteriores de ligação de nucleotídeos com as subunidades α isoladas, é que os sítios não catalíticos estariam localizados nas interfaces das subunidades α e β (KIRONDE & CROSS, 1987). A variabilidade de marcação encontrada com os diferentes análogos de nucleotídeos, dentro de diferentes condições experimentais, refletiriam então uma orientação específica da porção reativa da molécula com o sítio.



UNICAMP

LIGAÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS NA PRESENÇA DA PROTEÍNA INIBIDORA

A maioria dos estudos sobre as características dos sítios de ligação de nucleotídeos tem sido realizados com F_1 solúvel livre da proteína inibidora. Entretanto, sabe-se que a ativação da síntese de ATP através da energização da membrana mitocondrial, não é acompanhada pela liberação da proteína inibidora no meio de reação (SCHWERZMAN & PEDERSEN, 1981; BELTRAN *et al.*, 1986). Foi sugerido que apenas o deslocamento da proteína inibidora pelo enfraquecimento de sua ligação na superfície da enzima seria suficiente para ativar a enzima (TUENA DE GÓMEZ-PUYOU *et al.*, 1983).

Assim, o estudo das propriedades dos sítios de ligação de nucleotídeos na ATPase complexada com a proteína inibidora parece ser relevante.

Recentemente, contribuições importantes nesta linha de pesquisa tem sido apresentadas pelo grupo de GAUTHERON, em sistemas reconstituídos (DI PIETRO *et al.*, 1988; PENIN *et al.*, 1988).

Nestes trabalhos, a F_1 solúvel é submetida às condições que promovem a ligação de nucleotídeos na enzima. Posteriormente, a proteína inibidora é incorporada e seu efeito nas características de ligação de nucleotídeos é analisado. DI PIETRO *et al.* (1988) mostraram que durante a reconstituição da F_1 solúvel com PI, na presença de diferentes nucleotídeos tri-fosfatados, o complexo reconstituído adquiria 5 nucleotídeos por F_1 . Estes nucleotídeos ligados no complexo solúvel reconstituído, (F_1 -PI), não eram trocados com os do meio. Em experimentos de reconstituição com a F_1 ligada à membrana (partículas submitocondriais), PENIN *et al.* (1988), mostraram que na presença da PI, mais do que três nucleotí-



UNICAMP

tídeos permaneciam fortemente ligados na F_1 e não eram capazes de trocar com nucleotídeos do meio.

Estes resultados diferem de recentes observações de GÓMEZ-PUYOU e colaboradores, mostrando que os sítios não catalíticos trocam rapidamente seus nucleotídeos firmemente ligados, com nucleotídeos do meio, quando se trabalha com a F_1 ligada à membrana contendo a proteína inibidora endógena (MARTINS *et al.*, 1990).

Aparentemente, e de acordo com observações já realizadas (VALDEZ & DREYFUS, 1987), diferenças importantes parecem existir entre a enzima reconstituída e aquela de ocorrência natural. Se isto se deve à existência de proteínas que, no sistema particulado original estão envolvidas na ligação da proteína inibidora à F_1 (OKADA *et al.*, 1986) ou a outro(s) fator(es), é algo que ainda precisa ser esclarecido.

CONTROLE DA CATÁLISE PELOS SÍTIOS NÃO CATALÍTICOS E PELA PROTEÍNA INIBIDORA

A ocupação dos sítios não catalíticos por nucleotídeos de adenina tem sido há muito sugerida como tendo um papel regulatório na função catalítica da ATP-sintetase. Entretanto, quando experimentos diretos foram realizados para investigar esta possibilidade, os resultados foram negativos. A fosforilação oxidativa em *E. coli* (WISE & SENIOR, 1985) ou a fotofosforilação em cloroplastos (LECKBAND & HAMMES, 1988) não foram alteradas pela ocupação de sítios não catalíticos com nucleotídeos. Estes resultados, mais a constatação de que na F_1 solúvel a troca de nucleotídeos nestes sítios é normalmente induzida sob condições não fi-



UNICAMP

siológicas (HARRIS *et al.*, 1978; KIRONDE & CROSS, 1986), levaram à idéia de que os sítios não catalíticos teriam apenas função estrutural.

Entretanto, recentemente XUE & BOYER (1989) puderam demonstrar que a velocidade de hidrólise de GTP pela F_1 solúvel de cloroplastos era bastante aumentada pela ocupação dos sítios não catalíticos por ATP. Estes resultados abrem novas perspectivas no estudo do papel regulatório dos sítios não catalíticos na atividade da ATP sintetase.

Como anteriormente mencionado, para F_1 mitocondrial, a troca de nucleotídeos nos sítios não catalíticos foi observada apenas na enzima ligada à membrana e complexada com a PI endógena (MARTINS *et al.*, 1990). Assim, é plausível supor que a ATP sintetase mitocondrial seja regulada simultaneamente pelos sítios não catalíticos e pela proteína inibidora. PENIN *et al.*, (1988) demonstraram que a retenção de nucleotídeos de adenina em partículas submitocondriais reconstituídas é maior na presença da proteína inibidora. Neste sistema, dos nucleotídeos retidos na presença da PI, 1 mol/mol F_1 devem ser liberados para que a enzima alcance a velocidade de *steady-state* de síntese de ATP, velocidade esta obtida imediatamente na ausência da PI.

O presente trabalho teve como objetivo estudar o papel dos sítios não catalíticos e da proteína inibidora no controle da atividade catalítica da ATP-sintetase mitocondrial.



MATERIAIS E MÉTODOS

A - ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE CORAÇÃO BOVINO

Mitocôndrias foram isoladas segundo LOW & VALLIN (1963). Um coração de boi de aproximadamente 1Kg, após remoção de tecido adiposo, artérias e nervos, foi triturado em moedor de carne e dissolvido em 4 litros de meio contendo 250mM de sacarose, 5mM de EDTA, 20mM de Tris-HCl pH 7,4 (meio A). Esta suspensão foi homogeneizada em Wary Blendor, por 90 segundos e o pH ajustado para 7,4 com Trisma base e então centrifugado a 750xg por 10 minutos. O sobrenadante resultante foi filtrado em 4 camadas de gase e centrifugado a 12.000xg por 10 minutos. A fase lipídica aderida à parede do tubo foi removida com gase e o sobrenadante foi descartado. O sedimento resultante foi ressuspense em 500ml de meio contendo 250mM de sacarose, 20mM de Tris-HCl pH 7.4 (meio B). Este homogeneizado foi centrifugado a 750xg por 10 minutos e o sobrenadante obtido centrifugado a 12.000xg por 10 minutos. O sedimento resultante foi ressuspense com quantidade mínima de meio B, obtendo-se uma suspensão mitocondrial com cerca de 50mg de proteína/ml. Todo o procedimento foi realizado entre 0°C e 4°C.



UNICAMP

B - PREPARO DE PARTÍCULAS SUBMITOCONDRIAIS

Partículas Mg-ATP, ricas em proteína inibidora, foram preparadas segundo LEE & ERNSTER (1967). 15mg/ml de mitocôndrias de coração de boi foram suspensas em meio contendo 6mM de ATP, 6mM de MgCl₂, 250mM de sacarose e o pH ajustado para 6,9. Aliquotas de 10 ou 25ml foram sonicadas 4 vezes por 20 segundos, com intervalos de 1 minuto para resfriamento, num sonicador tipo Lab Line Ultratip. A suspensão sonicada foi centrifugada a 27.700xg por 15 minutos, para sedimentação de mitocôndrias não rompidas. O sobrenadante foi centrifugado a 150.000xg por 45 minutos em ultracentrífuga. O sedimento resultante foi ressuspense em meio contendo 250mM de sacarose e centrifugado a 150.000xg por 45 minutos, por duas vezes, para remoção do Mg-ATP. O sedimento final foi ressuspense em quantidade mínima de sacarose 250mM, para uma concentração final de 20 a 30mg/ml de proteína. O preparo das partículas submitocondriais (PSM) foi realizado entre 0 e 4°C. As PSM obtidas foram distribuídas em alíquotas de 50 a 200ul e congeladas em N₂ líquido.

PSM ativadas pela remoção da PI foram preparadas segundo (BELTRAN *et al.*, 1984). Partículas Mg-ATP (0,5mg/100ul) foram incubadas com 50mM Pi a 38°C. Após duas horas estas preparações apresentaram uma atividade hidrolítica de aproximadamente 6umol ATP hidrolizado/min.mg.



UNICAMP

C - LIGAÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS DE ADENINA NA ATP-SINTETASE MITOCONDRIAL

As partículas submitocondriais foram incubadas com 250mM sacarose, 25mM Tris/HCl pH 7,4, 1mM MgCl₂ ou 1mM EDTA, 100uM [³H]ADP, 50 uM Ap5A (diadenosina 5 pentafosfato) e 50uM CAT (carboxiatractilosídeo). Ap5A e CAT foram adicionados ao meio para inibir a adenilato-quinase e impedir a ligação de nucleotídeos de adenina à translocase de nucleotídeos, respectivamente (LIENHARD & SECENSKI, 1973; WEIDEMAN *et al.*, 1970; VIGNAIS, 1986). [³H]ADP foi incluído no meio com atividade específica de 2 x 10⁵ cpm/nmol. Outras adições ao meio básico de reação estão especificadas em Resultados.

Os ensaios foram realizados à temperatura ambiente, sendo iniciados pela adição de 0,5mg de PSM à 100ul de meio de incubação. Nos tempos determinados as misturas foram aplicadas em colunas de Sephadex G-50 (7,5cm X 0,5cm), previamente equilibradas com 250mM sacarose, 25mM Tris/HCl pH 7,4 e 1mM MgCl₂ e centrifugadas duas vezes à 4000 rpm, como descrito por PENEFSKY (1977).

O volume final obtido após a segunda centrifugação (60 a 80ul) foi utilizado para determinação da proteína e radioatividade. A proteína total recuperada após as centrifugações esteve em torno de 50%. A eficiência do método em reter nucleotídeos livres é dada pela radioatividade total dos brancos após as centrifugações, que foi cerca de 0,05%. A razão de nucleotídeos ligados por F₁ foi calculada assumindo-se o valor de 0,44nmol ATPase/mg de PSM, obtido por MARTINS *et al.* (1990), e que está próximo do valor de 0,42 encontrado por HARRIS *et al.* (1977) para este tipo



UNICAMP

de preparação.

D - ATIVIDADE HIDROLÍTICA DA F₁-ATPASE DE PARTÍCULAS SUBMITOCONDRIAIS

1-Método Colorimétrico

As atividades iniciais de hidrólise de ATP e GTP das partículas submitocondriais foram determinadas incubando-se 20 a 30ug destas PSM em meio de reação contendo 250 mM sacarose, 25 mM Tris-HCl pH 7,4, 1uM FCCP, 1mM EDTA e as concentrações indicadas de ATP ou GTP. A reação foi iniciada pela adição de 2mM MgCl₂.

A quantidade de NTP hidrolisado durante um determinado intervalo de tempo foi estimada pelo aparecimento de fosfato no meio de reação através do método descrito por FISKE-SUBBAROW, modificado por GRINDEY & NICHOL (1970).

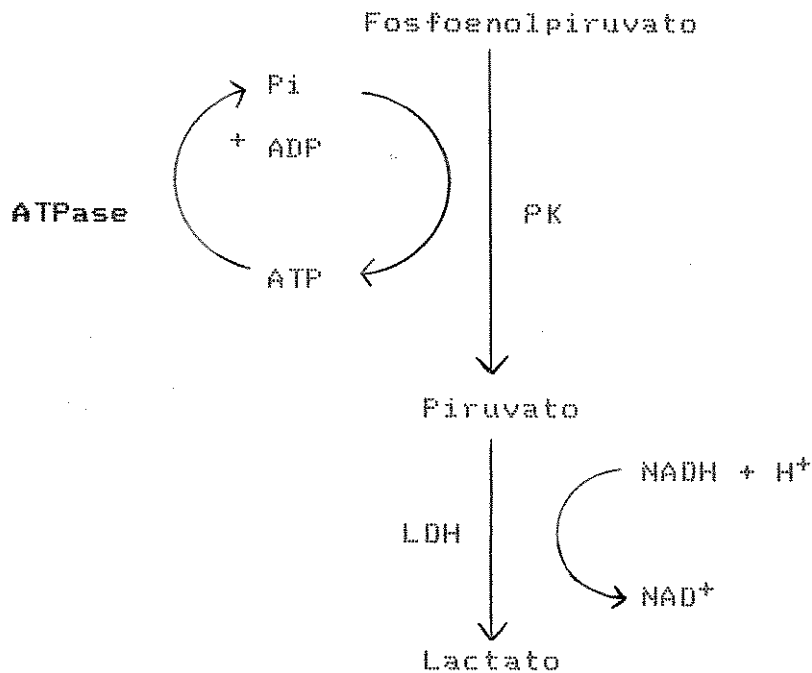
2-Método Espectrofométrico

As atividades ATPase ou GTPase, em *steady-state*, foram medidas espectrofotometricamente pela oxidação do NADH a 340nm à temperatura ambiente, em um sistema regenerador de nucleotídeos trifosfatados como descrito por PULLMAN *et al.*, (1960). As partículas (20 a 30ug/ml) foram incubadas em 3 ml de meio de reação contendo: 250mM sacarose, 25mM Tris-HCl pH 7,4, 1mM acetato de magnésio, 20mM acetato de potássio, 5uM rotenona, 1uM FCCP, 1mM PEP (fosfoenolpiruvato), 0,2mM NADH, 60U/ml LDH (lactato desidrogenase), 60U/ml PK (piruvato quinase), 1mM ATP ou GTP. Após adição



UNICAMP

das partículas a oxidação do NADH foi monitorada e a atividade de hidrólise de NTP estimada, uma vez que 1 mol NADH oxidado corresponde a 1 mol de NTP hidrolisado. O esquema a seguir ilustra a sequencia de reações na presença do sistema regenerador de ATP:



E - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA

A concentração de proteína das suspensões de mitocôndrias e de PSM foram determinadas segundo o método de biureto modificado por GORNAL *et al* (1949).

Dosagens de proteína de PSM nos experimentos de medida de hidrólise e de ligação de nucleotídeos foram feitas segundo LOWRY (1951).



RESULTADOS

1 - *Ligação de ADP nos sítios não catalíticos da ATP-sintetase: efeito da proteína inibidora.*

A Tabela I mostra o número médio de nucleotídeos que permaneceram ligados à F_1 de partículas submitocondriais de coração bovino depletadas ou não da PI, sob diferentes condições experimentais. PSM com baixa atividade ATPásica (0,15-0,30 μmol ATP hidrolisado/min.mg), devido à presença da PI endógena, foram incubadas em meio básico, como descrito em Materiais e Métodos, acrescido de 100 μM [^3H]ADP e 1mM EDTA. Após dois minutos, os nucleotídeos livres do meio foram removidos pela centrifugação das suspensões em colunas de Sephadex G-50 (PENEFSKY, 1977). Um total de 3,2 moles de [^3H]ADP/mol de F_1 permaneceram fortemente ligados à enzima (experimento 1), mostrando que a ligação de ADP nestes sítios é independente de Mg^{2+} . Praticamente todo o [^3H]ADP previamente ligado foi liberado pela subsequente exposição do filtrado a um excesso de Mg-ATP ou Mg-AMP-PNP (experimentos 2 e 3). Estes resultados sugerem que o [^3H]ADP foi trocado pelo ATP por um processo independente de hidrólise, uma vez que, AMP-PNP que é um análogo não hidrolizável do ATP, também foi capaz de remover [^3H]ADP previamente ligado à F_1 . Além disso, subsequente incubação dos filtrados, obtidos como no experimento 1, com excesso de Mg-GTP (experimento 4), não resultou na liberação do [^3H]ADP anteriormente ligado, indicando que estes sítios são específicos para nucleotídeos de adenina. Quando Mg-GTP foi substituído por PPI a maior parte do [^3H]ADP previamente ligado



Tabela I: LIGAÇÃO DE [³H]ADP À F₁-ATPase DE PSM DE CORAÇÃO BOVINO.

EXPERIMENTO INCUBAÇÃO mol [³H]ADP/mol F₁

COM PI ENDÓGENA

01	[³ H]ADP	//	//	3,2 ± 0,4
02	[³ H]ADP	// Mg-ATP	//	0,2 ± 0,1
03	[³ H]ADP	// Mg-AMP-PNP	//	0,5 ± 0,1
04	[³ H]ADP	// Mg-GTP	//	3,0 ± 0,4
05	[³ H]ADP	// PPI	//	2,9 ± 0,3

APÓS REMOÇÃO DA PI

06	[³ H]ADP	//	//	1,0 ± 0,2
07	[³ H]ADP	// Mg-ATP	//	0,2 ± 0,2
08	[³ H]ADP	// Mg-GTP	//	0,9 ± 0,2

PSM (0,5mg/100ul) preparadas como indicado em Materiais e Métodos, foram incubadas em meio de reação contendo 250mM sacarose, 25mM Tris-HCl pH 7,4, 1mM EDTA, 50uM CAT, 50uM Ap5A e 100uM [³H]ADP. Após 2 minutos de incubação, os nucleotídeos livres do meio foram removidos por centrifugação em colunas Sephadex (//). Os filtrados obtidos foram tratados com 1mM Mg-ATP, 1mM Mg-AMP-PNP, 1mM Mg-GTP ou 5mM PPI pH 7,4, conforme indicado. Após 5 minutos as misturas foram centrifugadas novamente (//). Os filtrados resultantes foram utilizados para determinação da razão [³H]ADP/F₁. Média de três determinações experimentais.



UNICAMP

permaneceu na F_1 (experimento 5). Segundo KIRONDE & CROSS (1986) e ISSARTEL (1987), o PPI interage com os sítios catalíticos e, portanto, não deve remover nucleotídeos ligados aos sítios não catalíticos. Para PSM ativadas pela remoção da PI, com atividade hidrolítica de 6 μmol ATP hidrolisado/min.mg, submetidas às mesmas condições de incubação do experimento 1, o valor médio de nucleotídeos fortemente ligados à F_1 foi de 1 mol [^3H]ADP/mol F_1 (experimento 6). O [^3H]ADP ligado foi removido pela posterior incubação com Mg-ATP (experimento 7), mas não por Mg-GTP (experimento 8).

Estes resultados confirmam observações anteriores de que os sítios não catalíticos da F_1 de PSM complexadas com a PI endógena ligam fortemente nucleotídeos de adenina (MARTINS *et al.*, 1990; GRIECO *et al.*, 1990). Os resultados da Tabela I também mostram que após a ativação da ATPase, pela remoção da proteína inibidora, a capacidade de ligação de ADP nos sítos não catalíticos da F_1 está diminuída.

2 - Efeito de fosfoenolpiruvato (PEP) na ligação de ADP nos sítios não catalíticos e na atividade ATPase.

Quando partículas submitocondriais, contendo a F_1 -ATPase complexada com a proteína inibidora endógena, são incubadas na presença de [^3H]ATP, estas são capazes de ligar fortemente 3-4 moles de nucleotídeos de adenina por mol de F_1 nos sítios não catalíticos (MARTINS *et al.*, 1990). Entretanto, observou-se que a ligação de ATP não se mantém com o tempo, como ocorre para a ligação de ADP, sugerindo, a princípio, a ocorrência de ligações



UNICAMP

diferentes para esses nucleotídeos de adenina. A investigação dos componentes do meio de reação utilizado para tais experimentos, revelou que fosfoenolpiruvato (PEP) do sistema regenerador de ATP, utilizado para se ter ligação efetiva de [^3H]ATP nos sítios não catalíticos, era o responsável pela queda dos valores de ligação de 3 para 1 mol [^3H]ANP/mol F_1 ; a adição de PEP no meio de reação utilizado para medir a ligação de ADP, provocava o mesmo efeito de queda de ligação (GRIECO *et al.*, 1990).

Na Tabela II, tem-se a reprodução do efeito de PEP na ligação de ADP à F_1 . Partículas submitocondriais (0,5mg/100ul), foram incubadas com 100uM [^3H]ADP na presença ou ausência de 20mM de PEP, mais os componentes básicos do meio de reação, como descrito em Materiais e Métodos. Após 10 minutos de incubação e tratamento por centrifugação em colunas Sephadex, observou-se que a presença de PEP no meio de reação provocou queda dos valores de ligação de 3,1 para 1,2 mol [^3H]ADP/mol de F_1 .

Como mostrado anteriormente (MARTINS *et al.*, 1988 e Tabela I), PSM com alta atividade hidrolítica, devido a remoção da proteína inibidora, ligam apenas 1 mol [^3H]ANP/mol F_1 . Estas constatações, nos levaram a investigar se PSM que tem sua capacidade de ligação de nucleotídeos diminuída pela ação do PEP, também teriam sua atividade hidrolítica aumentada. Estes resultados poderiam suportar a idéia de que a ativação da ATPase estaria correlacionada com a queda na capacidade dos sítios não catalíticos da F_1 de ligarem fortemente nucleotídeos de adenina.

Como controle, obteve-se uma curva de saturação para hidrólise de ATP e GTP, (Figura 1). Nesta figura pode-se observar que o ATP é o substrato preferencial da ATPase (SENIOR, 1988).



Tabela II: EFEITO DO PEP NA LIGAÇÃO DE [3 H]ADP À F_1 DE PSM.

INCUBAÇÃO	mol [3 H]ADP/mol F_1
[3 H]ADP	3,1 \pm 0,4
[3 H]ADP-PEP	1,2 \pm 0,2

PSM (0,5mg/100ul) foram incubadas em meio contendo 250mM sacarose, 25mM Tris-HCl pH 7,4, 1mM EDTA, 50uM CAT, 50uM Ap5A, 100uM [3 H]ADP na presença ou ausência de 20mM PEP. Após 10 minutos de incubação as misturas foram centrifugadas duas vezes em colunas Sephadex. O filtrado resultante foi utilizado para determinação da proteína e radioatividade. Média de três determinações

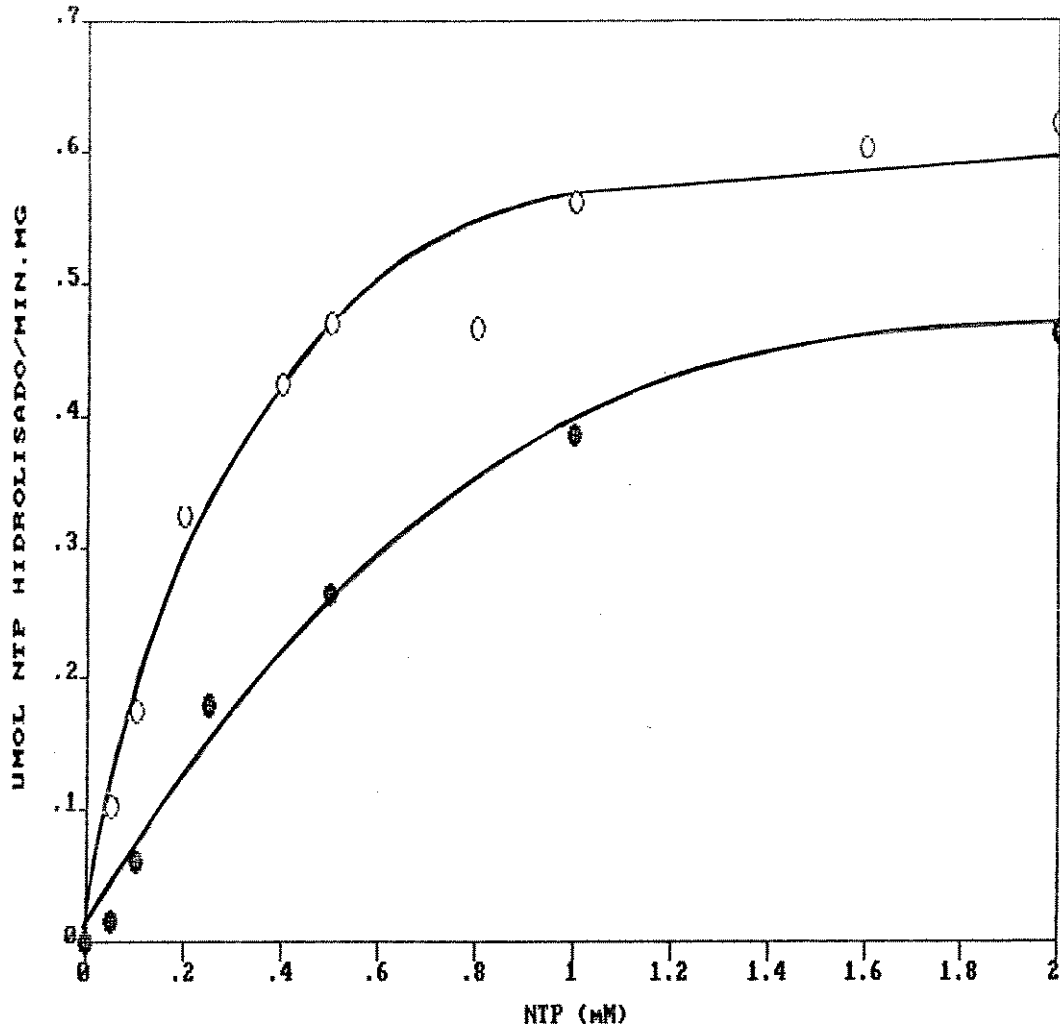


Figura 1: CURVA DE SATURAÇÃO PARA HIDRÓLISE DE NTP.

Partículas submitocondriais (20 a 30ug/ml) foram incubadas em meio contendo 250mM sacarose, 25mM Tris-HCl pH 7,4, 1mM EDTA, 1uM FCCP e ATP ou GTP nas concentrações indicadas. Após 5 minutos mediu-se a produção de Pi colorimetricamente, conforme descrito em Materiais e Métodos. (● - ●) velocidade de hidrólise de GTP; (○ - ○) velocidade de hidrólise de ATP. Cada ponto do gráfico representa a média de dois experimentos.



UNICAMP

Partículas submitocondriais foram tratadas com ADP ou ADP e PEP, como mostrado na Tabela II. O filtrado resultante foi utilizado para se medir a velocidade inicial de hidrólise, na presença de 1mM de ATP ou GTP, colorimetricamente, pela produção de fosfato (P_i). Os resultados da Figura 2 mostram os valores de velocidade de hidrólise obtidos nos diferentes tratamentos. PSM contendo $3\text{ADP}/\text{F}_1$ fortemente ligados nos sítios não catalíticos hidrolisam $0,76\text{ umol ATP}/\text{min.mg}$ ou $0,46\text{ umol GTP}/\text{min.mg}$. PSM tratadas com ADP e PEP, contendo portanto, $1\text{ADP}/\text{F}_1$ nos sítios não catalíticos hidrolizam $0,67\text{ umol ATP}/\text{min.mg}$ ou $0,49\text{ umol GTP}/\text{min.mg}$. Este resultado mostra que a queda na ligação de $[\text{C}^3\text{H}]\text{ADP}$, provocada pelo PEP (Tabela II), não resulta em aumento da atividade inicial de hidrólise da F_1 , sugerindo que a proteína inibidora não é deslocada do seu sítio de inibição por este tratamento.

A atividade hidrolítica de partículas submitocondriais previamente tratadas com ADP e PEP foi também determinada espectrofotometricamente pela diminuição da absorção do NADH a 340nm , na presença de um sistema regenerador de ATP. É citado na literatura que a velocidade de hidrólise da F_1 pode ser diferente, quando o ADP resultante da catálise não é removido do meio de reação, o que explica o comportamento histerético da ATPase (FENIN, *et al.*, 1988). Os resultados apresentados na Tabela III, confirmam que não há diferenças importantes na atividade NTPásica das PSM previamente tratadas como na Tabela II. XUE & BOYER (1989) mostraram que a hidrólise de GTP é estimulada cinco vezes pela presença de ATP nos sítios não catalíticos de CF_1 .

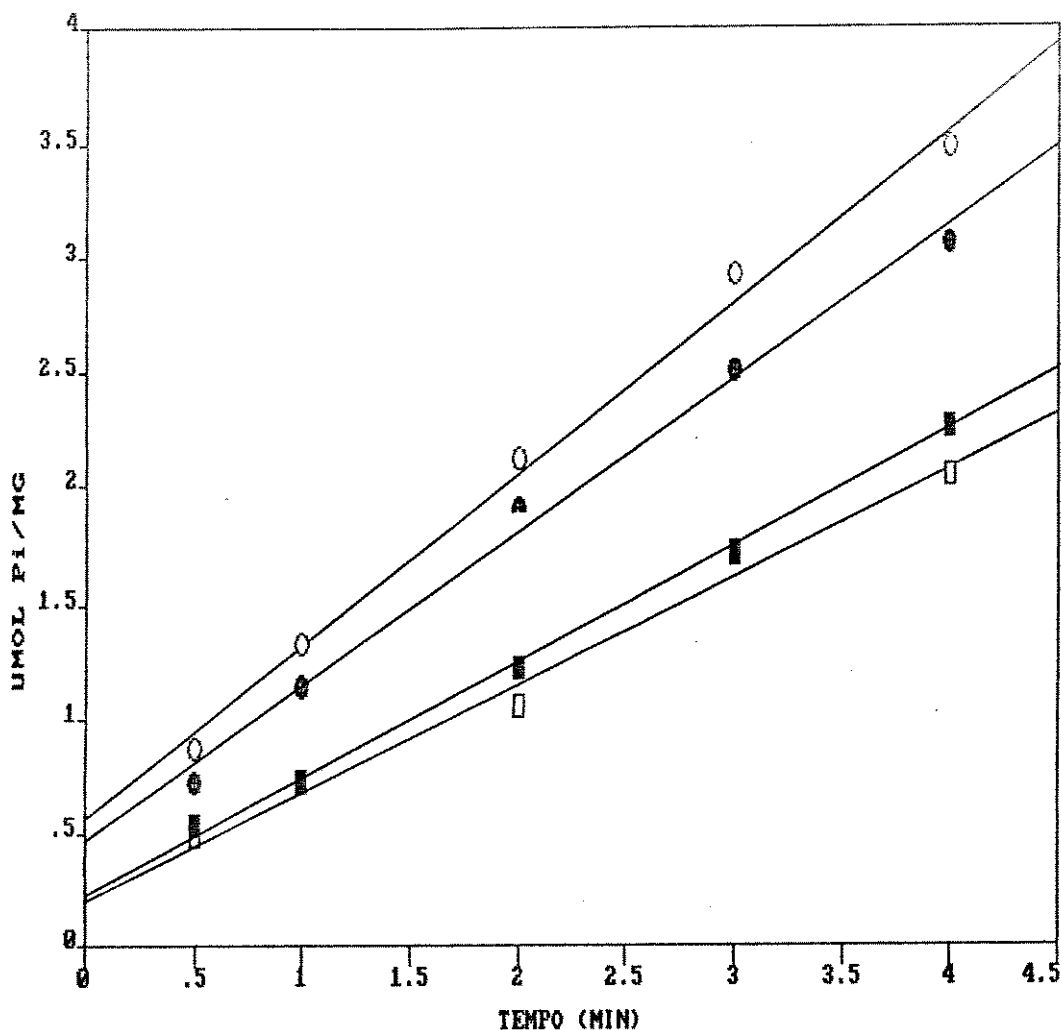


Figura 2: ATIVIDADE INICIAL DE HIDRÓLISE DE NTP POR PSM APÓS LIGAÇÃO DE ADP À F_1 : EFEITO DE PEP.

Partículas submitocondriais pré-tratadas com ADP ou ADP-PEP, conforme descrito na Tabela II foram utilizadas para medida da atividade hidrolítica de NTP. Foram adicionados 20 a 30ug de proteína/ml de meio de reação contendo 250mM de sacarose, 25mM Tris-HCl pH 7,4, 1mM EDTA, 1uM FCCF, 1mM NTP. A reação foi iniciada com 2mM $MgCl_2$ e o aparecimento de Pi determinado colorimetricamente. (○ - ○) Partículas pré-tratadas com ADP, hidrólise de GTP; (■ - ■) partículas pré-tratadas com ADP-PEP, hidrólise de GTP; (○ - ○) partículas pré-tratadas com ADP, hidrólise de ATP; (● - ●) partículas pré-tratadas com ADP-PEP, hidrólise de ATP. Cada ponto do gráfico representa a média de dois experimentos.

Tabela III: ATIVIDADE DE HIDRÓLISE DE NTP POR PSM, APÓS LIGAÇÃO DE ADP À F₁: EFEITO DE PEP.

TRATAMENTO	ATIVIDADE HIDROLÍTICA ($\mu\text{mol NTP}/\text{min. mg}$)	
	ATPase	GTPase
ADP	0,646	0,151
ADP-PEP	0,719	0,200

Partículas submitocondriais (20 a 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) pré-tratadas com ADP ou com ADP-PEP como na Tabela II, foram incubadas em meio de reação contendo 250mM sacarose, 25mM Tris-HCl pH 7,4, 1mM acetato de magnésio, 20mM de acetato de potássio, 5 μM rotenona, 1mM de PEP, 1 μM FCCP, 10U/ml de lactato desidrogenase (LD), 10U/ml de piruvato quinase (PK), 0,2mM NADH e 1mM de ATP ou GTP. A reação foi iniciada pela adição das partículas. A atividade hidrolítica foi estimada espectrofotometricamente pela oxidação de NADH a 340nm.



Uma vez que o PEP, apesar de agir na capacidade de ligação de nucleotídeos de adenina pelos sítios não catalíticos, não promoveu ativação da ATPase, resolveu-se então verificar se esta inibição seria reversível. PSM (0,5mg/100ul) foram incubadas com 20mM de PEP. Após 10 minutos, as suspensões foram centrifugadas em colunas Sephadex G-50, para remoção do PEP do meio. O filtrado resultante foi então incubado na presença de 100uM [³H]ADP. Aliquotas foram retiradas nos tempos indicados na Figura 3 e a razão mol ADP/mol F₁ determinada. O resultado obtido mostra que, após a remoção do PEP do meio de reação, a capacidade da F₁ ligar ADP fortemente aos sítios não catalíticos é recuperada.

3 - Ligação de ADP nos sítios não catalíticos durante a ativação da ATPase.

A literatura cita vários métodos que são utilizados para remoção da ação da proteína inibidora, resultando em aumento da atividade hidrolítica da ATPase (SCHWERZAM & PEDERSEN, 1986; SENIOR, 1988; BELTRAN *et al.*, 1984, 1986). Por exemplo, a proteína inibidora pode ser removida de seu sítio inibitório por um processo que parece ser dependente da força iônica do meio e da temperatura (BELTRAN *et al.*, 1984). Um dos tratamentos mais eficientes já descritos, parece ser a incubação com tampão fosfato (Pi) a 38°C (BELTRAN *et al.*, 1984).

PSM com F₁ complexada com PI endógena foram incubadas com 50mM Pi, pH 7,4 ($\mu=0,15$) a 30°C ou a 38°C. Como controle, também foi feita incubação das PSM com 5mM Tris-HCl, pH 7,4 a 30°C. Aliquotas foram retiradas nos tempos indicados na Figura 4A, e a

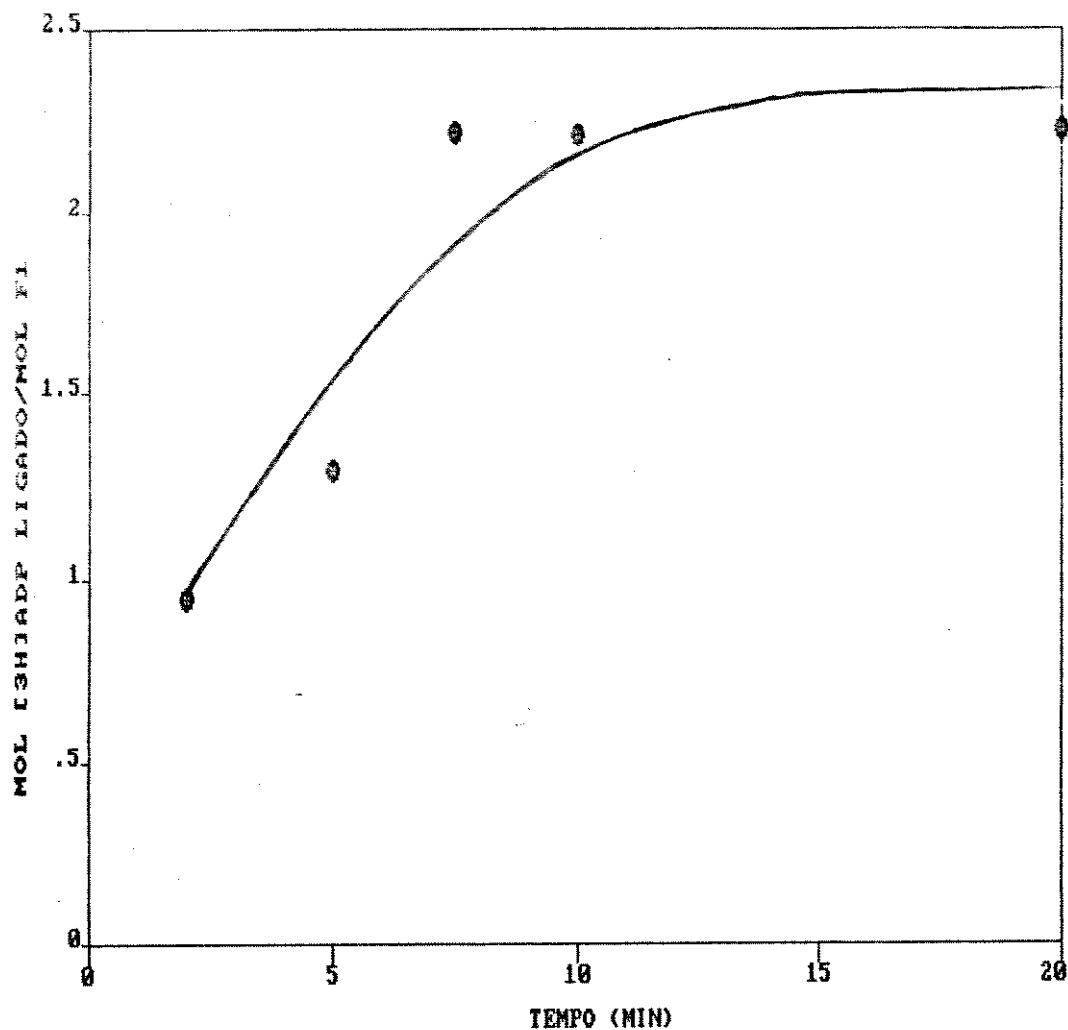


Figura 3: LIGAÇÃO DE $[^3\text{H}]\text{ADP}$ À F_1 DE PSM, APÓS INCUBAÇÃO COM PEP.

Partículas submitocondriais (0,5mg/100ul) foram incubadas em meio contendo 250mM sacarose, 25mM Tris-HCl pH 7,4, 1mM EDTA, 50uM CAT, 50uM Ap5A, 10mM PEP. Após 10 minutos de incubação a temperatura ambiente as misturas foram centrifugadas uma vez em colunas Sephadex. O filtrado obtido foi incubado novamente com meio de reação sem PEP, acrescido de 100uM $[^3\text{H}]\text{ADP}$. Após incubação nos tempos indicados as misturas foram centrifugadas duas vezes em colunas Sephadex. Os filtrados resultantes foram utilizados para determinação da razão $[^3\text{H}]\text{ADP}/\text{F}_1$. Cada ponto representa a média de três experimentos

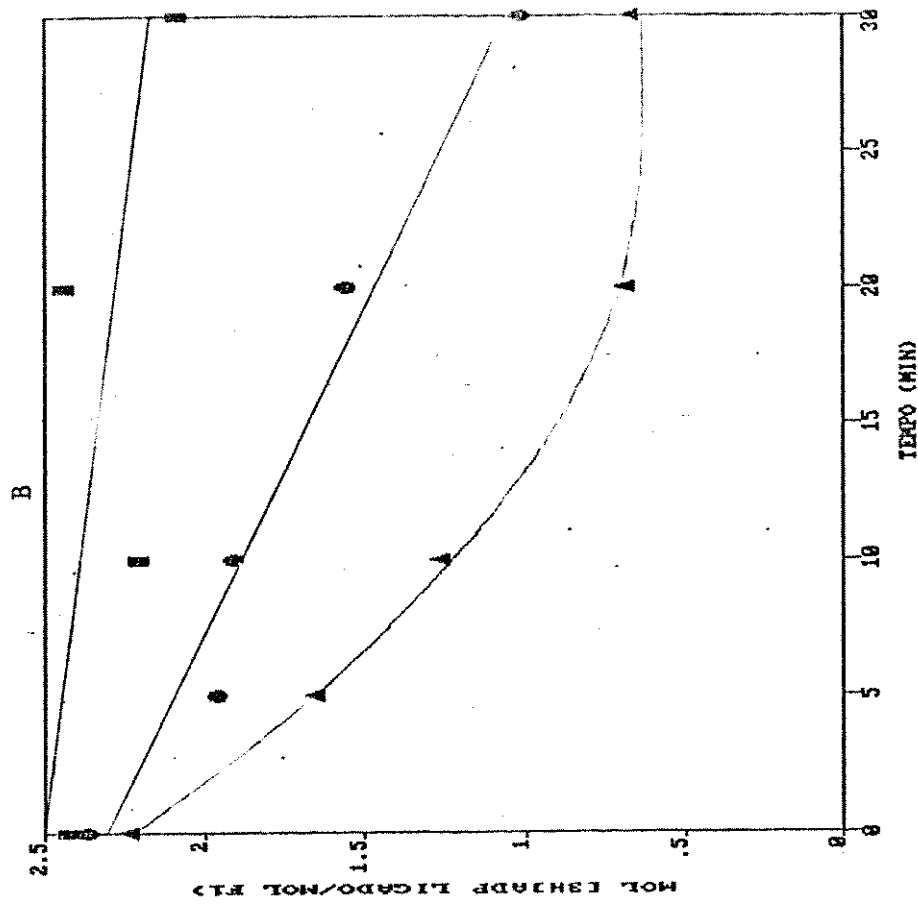
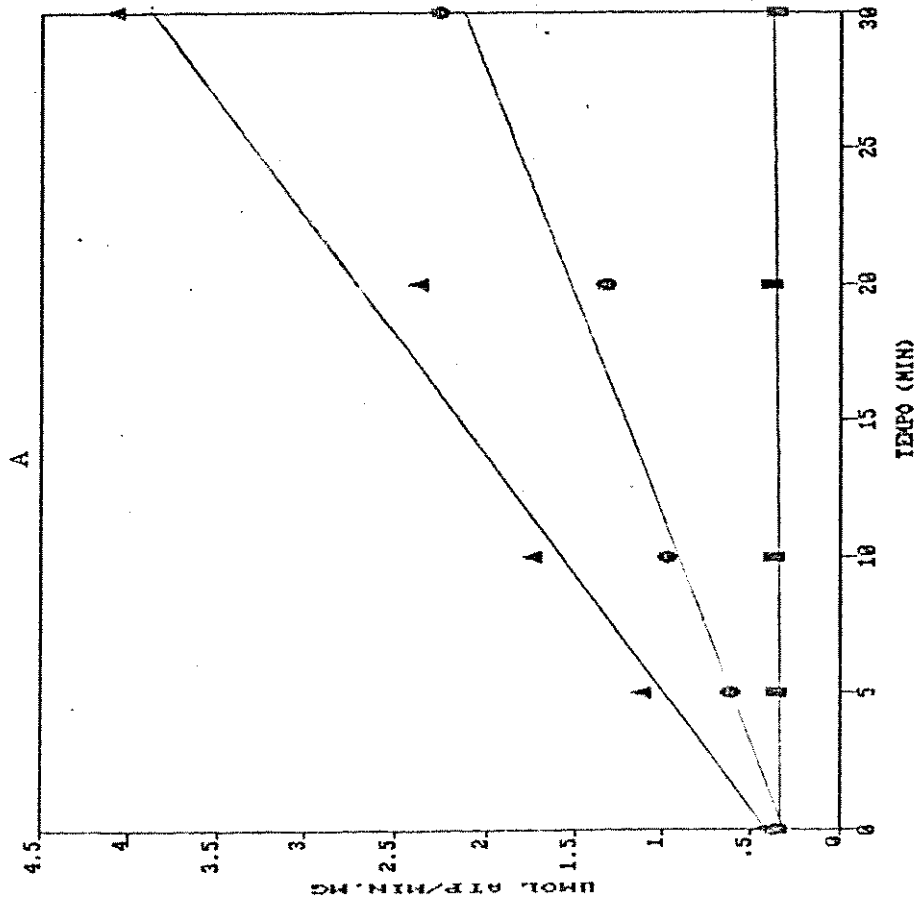


Figura 4: EFEITO DE FOSFATO E TEMPERATURA NA LIGAÇÃO DE [3H]ADP E NA ATIVIDADE ATPase DE PARTICULAS SUBMITOCONDRIAS.

PSM (0,5mg/100ul) foram incubadas na presença de 250mM de sacarose e: (■ - ■) 5mM Tris-HCl pH 7,4 a 30°C; (● - ●) 50mM Pi pH 7,4 a 30°C; (▲ - ▲) 50mM Pi pH 7,4 a 38°C. Aliquotas foram retiradas nos tempos indicados e utilizadas para medir: (A) atividade ATPase ou (B) ligação de [3H]ADP. (A) A atividade de hidrólise de ATP foi estimada espectrofotometricamente pela oxidação de NADH. (B) A ligação de ADP foi realizada em meio contendo 250mM sacarose, 25mM Tris-HCl pH 7,4, 1mM EDTA, 50uM CAT, 50uM Ap5A e 100uM [3H]ADP. Após 2 minutos as misturas foram centrifugadas uma vez em colunas Sephadex. O filtrado obtido foi incubado por 5 minutos com 200uM Mg-GTP e centrifugado novamente. Do filtrado final determinou-se a razão [3H]ADP/F_i. Ca- da ponto do gráfico representa a média de 3 determinações experimentais.



UNICAMP

atividade hidrolítica determinada espectrofotometricamente, como descrito em Materiais e Métodos. Conforme esperado, a Figura 4A mostra um aumento na atividade ATPase de PSM tratadas com P_i , que é maior a $38^{\circ}C$ ($6,84 \text{ } \mu\text{mol ATP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}/H$) que a $30^{\circ}C$ ($3,60 \text{ } \mu\text{mol ATP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}/H$). PSM controle não tiveram sua atividade hidrolítica aumentada. Estes resultados indicam que, de acordo com a literatura (BELTRAN *et al.*, 1984), a temperatura potencializa o efeito da força iônica na remoção da P_i .

Paralelamente, mediu-se a capacidade de ligação de $[^3H]ADP$ à F_1 das PSM submetidas aos diferentes tratamentos citados. Nos tempos indicados na Figura 4B, alíquotas foram removidas e incubadas com $100 \mu M$ $[^3H]ADP-EDTA$, para se avaliar a capacidade de ligação de nucleotídeos na F_1 durante a ativação da ATPase. Após 2 minutos as misturas foram centrifugadas duas vezes em colunas Sephadex. Entre a primeira e a segunda centrifugação, o filtrado foi tratado com $200 \mu M$ $Mg-GTP$ por 5 minutos. Assim, a ligação obtida refere-se aos sítios não catalíticos da ATPase. A Figura 4B mostra que a capacidade de ligação diminui com o tempo nas PSM tratadas com P_i , sendo a queda mais rápida em PSM tratadas com P_i a $38^{\circ}C$ ($5,70 \text{ mol } [^3H]ADP/\text{mol } F_1 \cdot H$) do que a $30^{\circ}C$ ($2,70 \text{ mol } [^3H]ADP/\text{mol } F_1 \cdot H$). A capacidade de ligação de $[^3H]ADP$ nos sítios não catalíticos de PSM controle não diminuiu significativamente (Figura 4B).

A incubação com Tris-acetato também é um tratamento descrito na literatura como eficiente para remoção da proteína inibidora (BELTRAN *et al.*, 1984). PSM foram incubadas com este tampão a $38^{\circ}C$ e, tanto a atividade hidrolítica, quanto a capacidade de ligação de $[^3H]ADP$ nos sítios não catalíticos foram determinadas



UNICAMP

nos tempos indicados na Figura 5. Como esperado (Figura 5A), o tampão Tris-acetato à 100mM pH 7,4 ($\mu=0.08$), provocou um aumento na atividade hidrolítica das partículas (1,22 $\mu\text{mol ATP}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}/\text{H}$), porém a uma velocidade menor que aquela obtida com P_i (4,91 $\mu\text{mol ATP}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}/\text{H}$). No tratamento controle observa-se que apenas a incubação das partículas a 38°C não resulta em aumento na hidrólise de ATP. Paralelamente, a capacidade de ligação de ADP nos sítios não catalíticos diminuiu (0,90 mol [^3H]ADP/mol $\text{F}_1\cdot\text{H}$), porém com velocidade menor em relação a PSM tratadas com P_i a 38°C (3,45 mol [^3H]ADP/mol $\text{F}_1\cdot\text{H}$), (Figura 5B). No controle a 38°C não se observou queda na capacidade de ligação de ADP à F_1 . Os resultados das Figuras 4 e 5 sugerem que, tanto o incremento na atividade ATPásica como a queda na capacidade de ligação de nucleotídeos nos sítios não catalíticos da F_1 , são processos dependentes da força iônica do meio e da temperatura

4 - *Correlação entre remoção da proteína inibidora e ligação de ADP nos sítios não catalíticos.*

Os resultados das Figuras 4 e 5 mostram que os tratamentos mais eficientes na ativação da hidrólise de ATP provocaram também uma queda mais rápida na capacidade de ligação forte de ADP à F_1 .

Ainda, para um mesmo tratamento, observam-se velocidades de ativação de hidrólise diferentes, conforme a preparação de PSM. Paralelamente, as velocidades de queda de ligação de ADP à F_1 também variaram. Assim, na Figura 5 observa-se que tanto o tempo de ativação, quanto o de queda de ligação para se obter o mesmo perfil do tratamento com P_i a 38°C da Figura 4, foram aumentados de

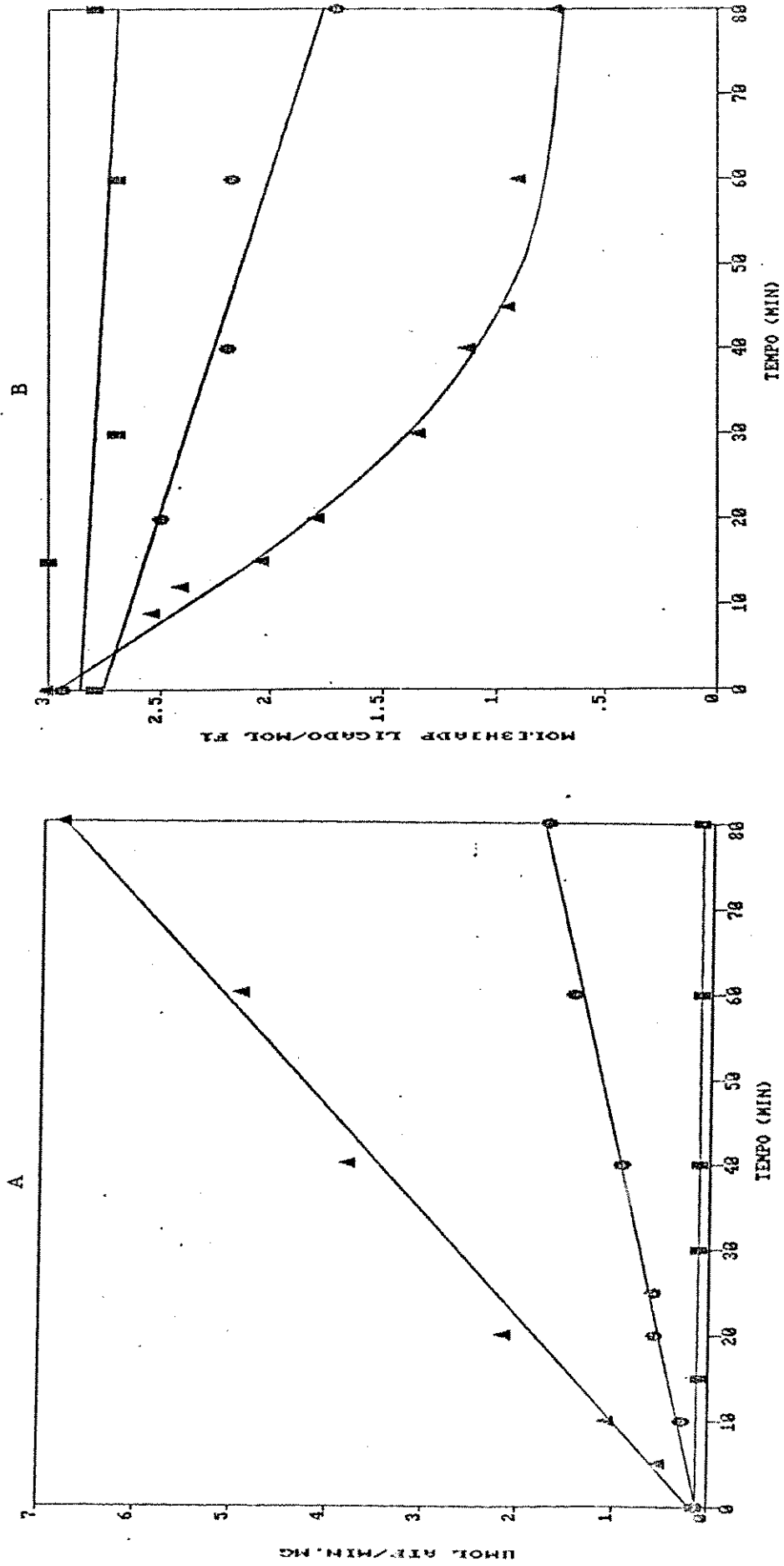


Figura 5: EFEITO DA FORÇA IÔNICA NA LIGAÇÃO DE $[^3H]ADP$ E NA ATIVIDADE ATPase DE PARTÍCULAS SUBMITOCONDRIAIS.

(■ - ■) 5mM Tris-HCl pH 7,4; (▲ - ▲) 50mM Tris-HCl pH 7,4; (● - ●) 100mM Tris-HCl pH 7,4. Altas quotas foram retiradas nos tempos indicados e utilizadas para medir: (A) atividade ATPase ou (B) ligação de $[^3H]ADP$ à F₁, conforme descrito na Figura 4. Os pontos do gráfico representam a média de três determinações experimentais.



UNICAMP

30 para 80 minutos. Isto mostra que estas preparações de PSM necessitaram de um tempo maior para se observar ativação e queda de ligação de nucleotídeos de adenina nos sítios não catalíticos da ATPase.

A análise deste conjunto de resultados nos levou a verificar o grau de correlação entre estes dois parâmetros em estudo. Os incrementos nas velocidades de hidrólise de ATP e as velocidades iniciais de queda de ligação de ADP à F_1 , agrupados na Tabela IV, foram utilizados na construção da Figura 6. Uma correlação linear ($r=0,9933$) foi observada entre os valores obtidos, indicando que cada tratamento tem uma eficiência na remoção da ação da proteína inibidora, que se relaciona diretamente com a velocidade de queda de ligação de nucleotídeos nos sítios não catalíticos da ATPase.

Tabela IV: VELOCIDADES DE QUEDA DE LIGAÇÃO DE ADP NOS SÍTIOS NÃO CATALÍTICOS E DE AUMENTO DA ATIVIDADE ATPase, PELA REMOÇÃO DA PI.

	QUEDA DE LIGAÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS (mol ADP/mol $F_1.H$)	AUMENTO DA ATIVIDADE HIDROLÍTICA ($\mu\text{mol ATP}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}/H$)
1-Pi 38°C (Fig 4)	5,70	6,84
2-Pi 38°C (Fig 5)	3,45	4,91
3-Pi 30°C (Fig 4)	2,70	3,60
4-Tris 38°C (Fig 5)	0,90	1,22
5-Controle (Fig 4,5)	0,00	0,00

As velocidades iniciais de queda na ligação de [3H]ADP, representam os intervalos dos eixos Y, em relação as retas derivadas obtidas graficamente nos momentos iniciais de queda das Figuras 4B e 5B. As atividades hidrolíticas representam os valores de inclinação das retas plotadas nas Figuras 4A e 5A, extrapolados por hora.

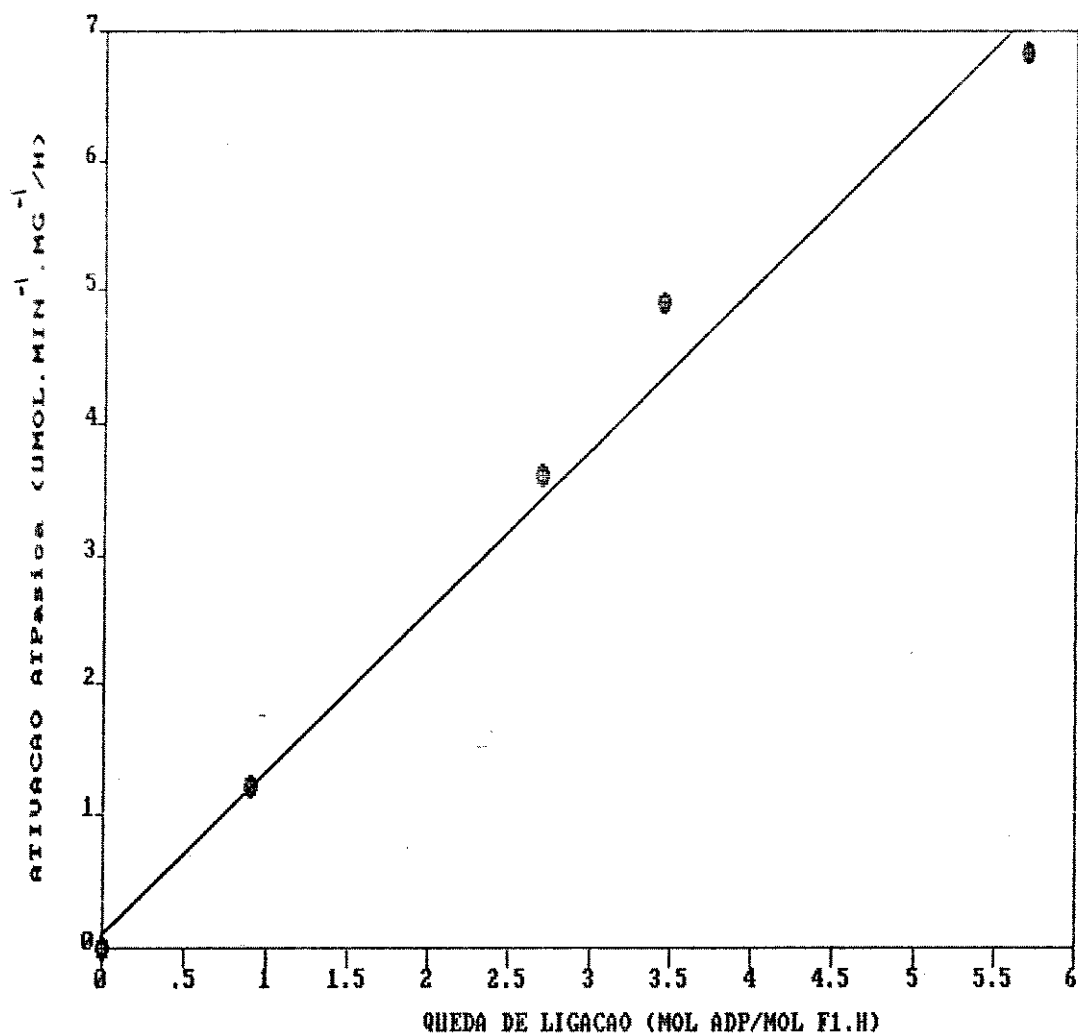
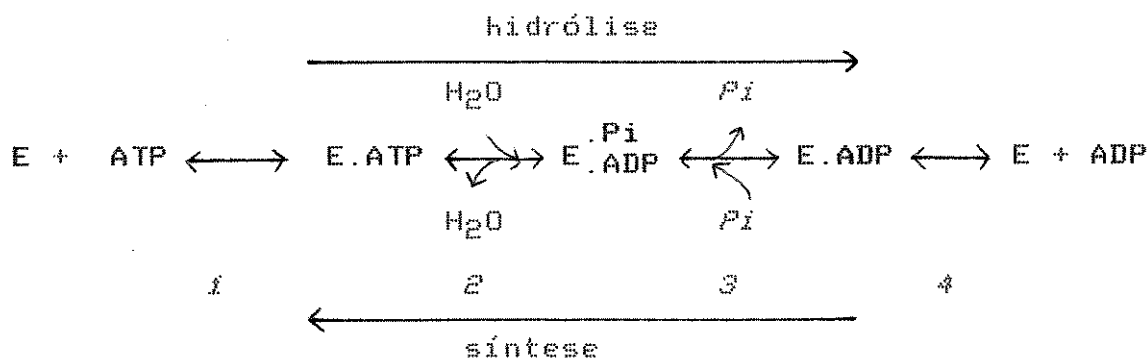


Figura 6: CORRELAÇÃO ENTRE A ATIVAÇÃO DA HIDRÓLISE DE ATP E A QUEDA NA LIGAÇÃO DE ^3H ADP À F_1 .

Os valores de velocidades de ativação da ATPase de PSM foram plotados contra os correspondentes valores de velocidade inicial de queda na ligação de ^3H ADP à F_1 , conforme apresentado na Tabela IV. Uma correlação linear de 0,9933 foi obtida.

DISCUSSÃO

O esquema abaixo apresenta, de maneira simplificada, os passos envolvidos na síntese e hidrólise de ATP pela F_1 -ATPase, proveniente de evidências já bem estabelecidas que indicam que, durante a hidrólise de ATP, o fosfato é liberado antes do ADP (GÓMEZ-PUYDU *et al.*, 1983; BAR-ZVI & SHAVIT, 1983; SELMAN & SELMAN-REIMER, 1981; TUENA DE GÓMEZ-PUYDU *et al.*, 1983.)



Na sequência de reações proposta, a razão entre as velocidades relativas entre os passos 1 a 3 e o passo 4, pode determinar a extensão com que o ATP se torna marcado em experimentos de troca $\text{ATP} \leftrightarrow {}^{32}\text{P}_i$, em relação ao ATP que sofre hidrólise líquida.

Se o passo 4 é mais rápido que os passos 1 a 3, a hidrólise irá predominar; em contraste, se a velocidade do passo 4 é menor do que a dos passos 1 a 3, a incorporação de ${}^{32}\text{P}_i$ no ATP será favorecida, uma vez que a probabilidade de ocorrer a reação reversa nos passos 1 a 3 estará aumentada.

Estudos cinéticos de TUENA DE GÓMEZ-PUYDU *et al.* (1983) mostraram que a velocidade de troca $\text{ATP} \leftrightarrow {}^{32}\text{P}_i$, em partículas sub-



UNICAMP

mitocondriais complexadas com a PI, era maior do que em partículas depletadas de PI. Este resultado foi considerado como uma indicação de que a proteína inibidora atuaria no passo 4 diminuindo a velocidade de liberação do ADP formado através da hidrólise. Em condições experimentais similares, foi observado que a F_1 -ATPase ligada à membrana contendo endogenamente a PI apresentava uma maior capacidade de ligar fortemente nucleotídeos (GRIECO *et al.*, 1990), do que partículas depletadas de proteína inibidora (MARTINS *et al.*, 1988). Experimentos posteriores mostraram que estes sítios de ligação forte eram não catalíticos, uma vez que eram específicos para nucleotídeos de adenina, independentes de magnésio e não removidos pelo *turnover* da enzima (GRIECO *et al.*, 1990; MARTINS *et al.*, 1988 e 1990). Os dados da Tabela I apresentam evidências adicionais de que a ligação forte de [3 H]ADP nos sítios não catalíticos da ATPase está diminuída após a ativação da F_1 . Este conjunto de resultados sugere que as diferenças na cinética da ATPase particulada, pela liberação da proteína inibidora, são acompanhadas por alterações nas propriedades de ligação de nucleotídeos nos sítios não catalíticos da F_1 .

A observação de que, durante o processo de ativação da ATPase de partículas submitocondriais pela remoção da PI, ocorre queda paralela na capacidade de ligação forte de ADP nos sítios não catalíticos da ATPase (Figuras 4 e 5), fortalecem esta idéia.

Mais ainda, a análise dos resultados destas figuras demonstraram claramente a existência de uma correlação linear entre a ativação da ATPase e a diminuição na capacidade de ligação forte de nucleotídeos de adenina nos sítios não catalíticos da F_1 (Fi-



UNICAMP

gura 6).

Da interpretação destes resultados é sugerido que a velocidade de liberação do ADP resultante da hidrólise no sítio catalítico da ATPase mitocondrial seria controlada pela ocupação dos sítios não catalíticos por nucleotídeos de adenina. Na presença da proteína inibidora a ligação forte de ADP nos sítios não catalíticos, limitaria a velocidade de liberação de ADP nos sítios catalíticos. A remoção da proteína inibidora alteraria as propriedades dos sítios não catalíticos, que passariam a ser de menor afinidade, resultando em um incremento no *turnover* dos sítios catalíticos.

Uma das mais surpreendentes constatações a partir de experimentos de modificação química, foi a de que os sítios catalíticos e não catalíticos estão muito próximos um do outro, na mesma subunidade β . Sabe-se hoje que a Tyr- β 311 e a Tyr- β 345 fazem parte do sítio catalítico, enquanto que a Tyr- β 368 e a Hys- β 427 fazem parte do sítio não catalítico (KIRONDE & CROSS, 1987; BULLOUGH *et al.*, 1988). Entretanto, até agora somente as interações entre as subunidades de F_1 tem sido apresentadas na literatura. Como discutido por BULLOUGH *et al.* (1988), se o polipeptídeo compreendido entre a Tyr- β 345 (do sítio catalítico) e a Tyr- β 368 (do sítio não catalítico) estivessem em uma α -hélice não interrompida, a distância entre estes dois sítios seria de 34,5 Å. Entretanto, existem três resíduos de prolina no interior deste polipeptídeo, onde a α -hélice está quebrada, de modo que a distância entre estes dois resíduos terminais deve ser bem menor. Conseqüentemente, os sítios não catalíticos e catalíticos devem estar o suficientemente próximos para que as mudanças conforma-



UNICAMP

cionais provocadas pela ocupação de um sítio por nucleotídeos seja transmitida para o outro.

Assim, a ligação forte de ADP nos sítios não catalíticos pode representar um estado da enzima onde as alterações conformacionais induzidas pela ligação do substrato devem estar dificultadas. Após a remoção da PI, a ligação fraca de nucleotídeos nos sítios não catalíticos pode representar um estado da enzima com maior capacidade de sofrer alterações conformacionais que resultam, em última análise, numa maior velocidade de catálise.

A reversibilidade da inibição pelo PEP na ligação forte de ADP nos sítios não catalíticos (Figura 3) bem como sua não interferência na atividade de hidrólise da ATPase (Figura 2 e Tabela III), apoiam esta hipótese. Provavelmente, o PEP compete com o ADP, ligando-se fortemente e reversivelmente aos sítios não catalíticos da ATPase. Como neste caso, não ocorre modificação dos sítios não catalíticos de ligação forte para sítios de ligação fraca, a atividade catalítica da enzima não é alterada.

Ainda não foi determinado o sítio de ligação da PI na subunidade β de F_1 . Nossos resultados sugerem que este sítio deve estar próximo da região que compreende os sítios não catalíticos.

Uma importante questão que tem sido levantada, em relação ao mecanismo catalítico da ATP-sintetase proposto por BOYER (1979) é a de que, como podem os 3 sítios catalíticos serem funcionalmente equivalentes durante a catálise, se uma das subunidades β é estruturalmente assimétrica, devido à sua interação com as subunidades menores de F_1 ?

Um mecanismo rotatório foi sugerido, propondo que as subunidades β (e talvez, também as α) se moveriam em relação às sub-



unidades menores durante a catálise. Desta forma, após 1 ciclo catalítico ter se completado, todas as β teriam experimentado as interações possíveis com as outras subunidades menores de F_1 (GRESSER *et al.*, 1982; COX *et al.*, 1984, 1986; MELESE & BOYER, 1985). Este movimento rotatório seria dirigido pelo gradiente eletroquímico de H^+ e as alterações conformacionais em β resultariam na liberação do produto e ligação do substrato, como proposto por BOYER (1979). Entretanto, até hoje, experimentos que comprovem esta hipótese, ainda não foram obtidos. Ao contrário, na F_1 solúvel foi demonstrado que os 3 sítios não catalíticos se comportam assimetricamente, uma vez que um deles é capaz de trocar nucleotídeos rapidamente na presença de EDTA. Mais ainda, foi observado que após cerca de 1000 ciclos catalíticos por F_1 , o mesmo sítio não catalítico retém a capacidade de trocar nucleotídeos, induzida por EDTA (KIRONDE & CROSS, 1987). Isto indica que, na F_1 solúvel a assimetria é permanente e os três sítios não catalíticos não passam por estados equivalentes durante a catálise.

A observação de que a remoção da PI resulta na alteração das propriedades de ligação de dois dos três sítios não catalíticos sugere que a assimetria funcional entre as subunidades β da F_1 também seja mantida na enzima ligada à membrana. É provável que o sítio não catalítico que permanece inalterado deva estar localizado na subunidade β assimétrica que, segundo SCHWERZMANN & PEDERSEN (1986) contém o sítio de maior afinidade para a PI.

RESUMO

ATPase mitocondrial ligada à membrana e complexada com a proteína inibidora endógena é capaz de ligar fortemente e trocar até 3 moles de ADP por mol de F_1 . A maior parte desta ligação ocorre nos sítios não catalíticos da F_1 . Quando estas preparações são submetidas a condições que removem a PI ocorre uma queda na capacidade de ligação de ADP nos sítios não catalíticos que está linearmente correlacionada com o incremento na atividade hidrolítica da ATPase. Também, na presença de fosfoenolpiruvato (PEP) existe uma queda na ligação de ADP nos sítios não catalíticos. Entretanto, a inibição na ligação de ADP, provocada pelo PEP, não resulta em ativação da catálise.

Sugere-se que a ação primária da proteína inibidora seria manter os sítios não catalíticos como sítios de ligação forte e estes por sua vez controlariam a velocidade de liberação de nucleotídeos nos sítios catalíticos. A remoção da proteína inibidora alteraria as propriedades dos sítios não catalíticos tornando-os sítios de ligação fraca o que resultaria em um aumento na atividade da enzima. Os resultados obtidos com PEP suportariam esta ideia, uma vez que a inibição provocada pelo PEP na ligação de ADP nos sítios não catalíticos é abolida após sua remoção do meio.



ABSTRACT

The membrane bound mitochondrial ATPase complex with its endogenous inhibitor protein (IP) has the capacity to bind tightly and exchange up to three mols of ADP per mol of F_1 , most of the binding occurring at noncatalytic sites. When these preparations are submitted to conditions known to remove IP action there is a decrease of ADP binding at noncatalytic sites that is linearly correlated with an increase on the ATPase activity. In the presence of phosphoenolpyruvate there is also a decrease on the binding of ADP at noncatalytic sites. However, the ADP binding inhibition evoked by PEP did not result in an activation of the enzyme.

It is suggested that the primary action of the inhibitor protein is to maintain the noncatalytic sites as tightly binding sites and these in turn would control the rate of nucleotide release at catalytic sites. Inhibitor protein remotion would alter the properties of noncatalytic sites changing them into loosely binding sites, resulting in a turnover increment of the enzyme. The results obtained with PEP support this idea since the inhibition by PEP of the ADP binding at noncatalytic sites is abolished after its remotion from the medium.



BIBLIOGRAFIA

ANZEL, L.M.; MCKINNEY, M.; NARAYANAN, P. & PEDERSEN, P.L.
Structure of the Mitochondrial F_1 -ATPase at 9Å resolution
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 79:5852-6, 1982.

ANDREWS, W.W.; HILL, F.C. & ALLISON W.S. Identificacion of
the Essential Tyrosine Residue in the Subunit of Bovine
Heart Mitochondrial F_1 -ATPase that is Modified by 7-Chloro-
4-nitrobenzofurazan *J. Biol. Chem.*, 259:8219-25, 1984

BAR-ZVI, D & SHAVIT, N. Differential Inhibition of $P_i \leftrightarrow$ ATP
exchange in Relation to ATP Synthesis and Hydrolysis by
Modification of Chloroplast Thylacoid Membranes with
Glutaraldehyde *Biochim. Biophys. Acta.*, 724:299-308, 1983.

BELTRAN, C.; TUENA DE GÓMEZ-PUYOU, M.; GÓMEZ-PUYOU, A. &
DARSZON, A. Release of the Inhibitory Action of the Natural
ATPase Inhibitor Protein on the Mitochondrial ATPase *Eur. J.
Biochem.*, 144:151-7, 1984.

BELTRAN, C.; TUENA DE GÓMEZ-PUYOU, M.; DARSZON, A. & GÓMEZ-PU-
YOU, A. Simultaneous Synthesis and Hidrolysis of ATP
Regulated by The Inhibitor Protein in Submitochondrial
Particles *Eur. J. Biochem.*, 160:163-8, 1986.



BOYER, P.D. In: **Membrane Bioenergetics** (Lee, C.P.; Schatz, G. & Ernster, L. eds.) Addison-Wesley, Reading, Pennsylvania, 1979, pp 461-79.

BOYER, P.D. In: **Frontiers in Bio-Organic Chemistry and Molecular Biology** (Ovchemikov, Y.A. ed.) Elsevier, Amsterdam, 1985, pp 1-3.

BOYER, P.D. A Perspective of the Binding Change Mechanism for ATP Synthesis **FASEB J.**, 3:2164-78, 1989.

BOEKEMA, E.J.; BERDEN, J.A. & VAN HEEL, M.C. Structure of Mitochondrial F_1 -ATPase Studied by Electron Microscopy and Image Processing **Biochim. Biophys. Acta.**, 851:353-60, 1986.

BULLOUGH, D.A.; BROWN, E.L.; SAARIO, J.D. & ALLISON, W.S. On the Location and Function of the Noncatalytic Sites on the Bovine Heart Mitochondrial F_1 -ATPase **J. Biol. Chem.**, 263:14053-60, 1988.

COX, G.B.; JANG, D.A.; FUMMEL, A.L.; GIBSON, F. & HATCH, L. Mechanism of ATP Synthase. Conformational Change by the β Subunit **Biochim. Biophys. Acta.**, 768:201-8, 1984.

CROSS, R.L. & NALIN, C.M. Adenine Nucleotide Binding Sites on Beef Heart F_1 -ATPase. Evidence for Three Exchangeable Sites that Are Distinct from Three Noncatalytic Sites **J. Biol.**



Chem., 257:2874-81, 1982.

DE MEIS, L.; MARTINS, O.B. & ALVES, E.W. Role of Water, Hydrogen Ion, and Temperature on the Synthesis of Adenosine Triphosphatase by The Sarcoplasmic Reticulum Adenosine Triphosphatase in the Absence of a Calcium Ion Gradient *Biochemistry*, 19:4252-61, 1980.

DI PIETRO, A., PENIN, F. JULLIARD, J.H.; GODINOT, C. & GAUTHERON, D.C. IF_1 Inhibitor of Mitochondrial F_1 -ATPase is Correlated to Intrapment of Four Adenine-or Guanine-nucleotides Including as Least One Thiphosphate *Biochim. Biophys. Res. Commum.*, 152:1319-25, 1988.

DROBINSKAYA, I.Y.; KOZLOV, I.A.; MURATALIEV, M.B. & VULFSON, E.N. Tightly Bound Adenosine Diphosphate, wich Inhibits the Activity of Mitochondrial F_1 -ATPase, is Located at the Catalytic site of the Enzyme. *FEBS Lett.*, 182:419-24, 1985.

FUTAI, M.E. & KAZANAWA, H. Structure and Function of Proton-Translocating Adenosine Triphosphatase (F_0 - F_1): Biochemical and Molecular Biological Approaches *J. Membr. Biol.*, 47: 285-312, 1983

GARRET, N.E. & PENEFSKY, H.S. Interaction of Adenine Nucleotides with Multiple Binding sites on Beef Heart Mitochondrial Adenosine Triphosphatase *J. Biol. Chem.*, 250:6640-47, 1975.



GÓMEZ-FERNANDEZ, J. C. & HARRIS, D. A. A Thermodynamic Analysis of Interaction Between the Mitochondrial Coupling Adenosine Triphosphatase and Its Naturally Occurring Inhibitor Protein *Biochem. J.*, 276:967-5, 1978.

GÓMEZ-PUYOU, A.; TUENA DE GÓMEZ-PUYOU, M. & ERNSTER, L. Inactive to Active Transitions of the Mitochondrial ATPase as Controlled by the ATPase Inhibitor *Biochim. Biophys. Acta.*, 547:252-7, 1979.

GÓMEZ-PUYOU, A.; AYALA, G.; MULLER, V. & TUENA DE GÓMEZ-PUYOU, M. Regulation of The Synthesis and Hydrolysis of ATP by Mitochondrial ATPase. Role of Mg^{2+} *J. Biol. Chem.*, 258:13673-13679, 1983

GÓMEZ-PUYOU, A.; TUENA DE GÓMEZ-PUYOU, M. & DE MEIS, L. Synthesis of ATP by Soluble Mitochondrial F_1 -ATPase and F_1 -Inhibitor-Protein Complex in the Presence of Organic Solvents *Eur. J. Biochem.*, 196:1-8, 1986.

GORNAL, A.G.; BARDWILL, C.I. & DAVID, M.M. Determination of Serum Proteins by Means of the Biuret Reaction *J. Biol. Chem.*, 177:751-7, 1949.

GRESSER, M.J.; MYERS, J.A. & BOYER, P.D. Catalytic Site cooperativity of Beef-Heart Mitochondrial F_1 Adenosine Triphosphatase. Correlations of Initial Velocity, Bound Intermediate, and Oxygen Exchange Measurements with an



UNICAMP

Alternating Three-Site Model *J. Biol. Chem.*, **257**:12030-38, 1982.

GRIECO, M.A.; MARTINS, D.B. & MARTINS I.S. Binding of ADP to Noncatalytic sites of F_1-F_0 Mitochondrial ATP Synthase: Effect of Phosphoenolpyruvate. *Resumos VI Congresso PAABS*, 1990.

GRINDEY, G.B. & NICHOL, C.A. Microprocedure for Determination of Pyrophosphate and Orthophosphate *Anal. Biochem.*, **33**:114-9, 1970.

GRUBMEYER, C.; CROSS, R.L. & PENEFSKY, H.S. Mechanism of ATP Hydrolysis by Beef Heart Mitochondrial ATPase. Rate constants for Elementary Steps in Catalysis at a single site *J. Biol. Chem.*, **256**:12092-100, 1982.

HARRIS, D.A.; ROSING, J.; VAN DE STADT, R.J. & SLATER, E.C. Tight Binding of Adenine Nucleotides to Beef-Heart Mitochondrial ATPase *Biochim. Biophys. Acta.*, **314**:149-53, 1973.

HARRIS, D.A.; RADDA, G.K. & SLATER, E.C. Tightly Bound Nucleotides of the Energy-Transducing ATPase, and their Role in Oxidative Phosphorylation II. The Beef Heart Mitochondrial System *Biochim. Biophys. Acta.*, **459**:560-72, 1977.



HARRIS, D.A.; TSCHARNER, V.V. & RADDA, G.K. The ATPase Inhibitor Protein in Oxidative Phosphorylation. The Rate-Limiting Factor to Phosphorylation in Submitochondrial Particles *Biochim. Biophys. Acta.*, 548:72-84, 1979.

HATEFI, Y. The Mitochondrial Electron Transport and Oxidative Phosphorylation System *Annu. Rev. Biochem.*, 54:1015-69, 1985.

HOPPE, J. & SEBBALD, W. The Proton Conducting F_0 -part of Bacterial ATP Synthase *Biochim. Biophys. Acta.*, 1768:1-27, 1984.

ISSARTEL, J.-P.; FAVRE-BULLE, O.; LUNARDI, J. & VIGNAIS, P.V. Is Pyrophosphate an Analog of Adenosine Diphosphate for Beef Heart Mitochondrial F_1 -ATPase *J. Biol. Chem.*, 262:13538-44, 1987.

KANDPAL, R.P.; STEMPEL, K.E. & BOYER, P.D. Characteristics of the Formation of Enzyme-Bound ATP from Medium Inorganic Phosphate by Mitochondrial F_1 Adenosinetriphosphatase in the Presence of Dimetil Sulfoxido. *Biochemistry.*, 26:1512-17, 1987.

KIRONDE, F.A.S. & CROSS, R.L. Adenine Nucleotide-Binding Sites on Beef Heart F_1 -ATPase. Conditions that Affect Occupancy of Catalytic and Noncatalytic Sites *J. Biol. Chem.*, 261:12544-9, 1986.



KIRONDE, F.A.S. & CROSS, R.L. Adenine Nucleotide Binding sites on Beef Heart F_1 -ATPase. Assymetry and Subunit Location *J. Biol. Chem.*, 262:3488-95, 1987.

KLEIN, G.; SATRE, M.; DIANDUX, A. -C. & VIGNAIS, F.V. Radiolabeling of Natural Adenosine Triphosphatase Inhibitor with Phenyl (^{14}C)Isothiocyanate and Study of its Interaction with Mitochondrial Adenosine Triphosphatase. Localization of Inhibitor binding sites and Steichiometry of Binding *Biochemistry*, 19:2919-25, 1980.

KOSHLAND, D.E.Jr.; NERNETHY, G. & EILNER, D. Comparison of Experimental Binding Data and Theoretical Models in Proteins Containing Subunits *Biochemistry*, 5:365-2, 1966.

LECKBAND, D.G. & HANNES, G.G. Function of Tightly Bound Nucleotides on Membrane Bound Chloroplast Coupling Factor *Biochemistry*, 27:3629-33, 1988

LEE, C.P. & ERNSTER, L. Energy-Coupling in Nonphosphorylating Submitochondrial Particles *Methods Enzymol.*, 10:543-548, 1967.

LIENHARD, G. E. & SECESKI, I. I. p_1, p_5 -Di(Adenosine-5') Pentaphosphate, a Potent Multisubstrate Inhibition of Adenylate Kinase *J. Biol. Chem.*, 248:1121-3, 1983.



LOW, H. & VALLIN, J. Succinate-Linked DPN reduction in
Submitochondrial Particles *Biochim. Biophys. Acta.*,
69:361-74, 1963

LOWRY, D.H., ROSEBROUGH, N.J., FURR, A.L. & RANDALL, R.J.
Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent *J. Biol.*
Chem., 193:265-75, 1951

Mc-CARTY, R.E. & RACKER, E. Partial Resolution of the Enzymes
Catalyzing Photophosphorylation. III Activation of Adenosine
Triphosphatase and ^{32}P -Labeled Orthophosphate-Adenosine-
Triphosphate Exchange in Chloroplasts *J. Biol. Chem.*,
243:128-137, 1968.

MARTINS, O.B.; GÓMEZ-PUYOU, M.T. & GÓMEZ-PUYOU, A. Pre-
Steady-State of the Adenosinetriphosphatase. Activity of
Coupled submitochondrial Particles. Regulation by ADP
Biochemistry, 27:7552-8, 1988.

MARTINS, O.B.; MARTINS, I.S.; GÓMEZ-PUYOU, A. & TUENA DE
GÓMEZ-PUYOU, M. Binding of ATP and ADP to F_1 -Inhibitor
Protein Complexes of Submitochondrial Particles. *Eur.*
J. Biochem., 1990 (submetido).

MELESE, T. & BOYER, P.D. Derivatization of the Catalytic
Subunits of the Chloroplast ATPase by 2-Azido-ATP and
Dicyclohexylcarbodiimide *J. Biol. Chem.*, 260:15398-401,
1985.



MITCHELL, P. Coupling of Phosphorylations to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemiosmotic Type of Mechanism *Nature, (Lond)*, 191:144-8, 1961

MONOD, J.; WYMAN, J. & CHANGEAU, J.-P. On the Nature of Allosteric Transitions. A Plausible Modes *J. Mol. Biol.*, 12:88-118, 1965.

O'NEAL, C.C. & BOYER, P.D. Assessment of the Rate of Bound Substrate Interconversion and of ATP Acceleration of Product Release During Catalysis by Mitochondrial Adenosine Triphosphatase *J. Biol. Chem.*, 259:5761-7, 1984.

OKADA, Y.; HASHIMOTO, T.; YOSHIDA, Y & TGAWA, K. Existence of stoichiometric Amounts of an Intrinsic ATPase Inhibitor and two Stabilizing Factors with Mitochondrial ATP Synthase in Yeast *J. Biol. Chem.*, 99:251-6, 1986.

PENEFSKY, H.S. Reversible Binding of Pi by Beef Heart Mitochondrial Adenosine Triphosphatase *J. Biol. Chem.*, 252:2891-9, 1977.

PENIN, F.; DI PIETRO, A.; GODINOT, C. & GAUTHERON, D. Fate of Nucleotides Bound to Reconstituted F_0-F_1 During Adenosine 5-Triphosphate Synthesis Activation or Hydrolysis: Role of Protein Inhibitor and Hysteretic Inhibition *Biochemistry*, 27:8969-74, 1988.



PERLIN, D.S.; LATCHNEY, L.R.; WISE, J.C. & SENIOR, A.E.
Specificity of the Proton-Adenosine Triphosphatase of
Escherichia coli for Adenine, Guanine and Inosine
Nucleotides in Catalysis and Binding **Biochemistry**,
23:4998-5003, 1984.

PULLMAN, M.E. & MONROY, G.C. A Naturally Occurring Inhibitor
of Mitochondrial Adenosine Triphosphatase **J. Biol. Chem.**,
238:3762-9, 1963.

PULLMAN, M.E.; PENEFSKY, H.S.; DATTA, A. & RACKER, E. Partial
Resolution of the Enzymes Catalyzing Oxidative
Phosphorylation. I Purification and Properties of Soluble
Dinitrophenol-Stimulated Adenosine Triphosphatase **J. Biol.**
Chem., 235:3322-29, 1960.

SAKAMOTO, J. & TONOMURA, Y. Synthesis of Enzyme-Bound ATP by
Mitochondrial Soluble F_1 -ATPase in the Presence of
Dimethylsulfoxide **J. Biochem. (Tokyo)**, 93:1601-14, 1983.

SCHWERZMANN, K. & PEDERSEN, P.L. Proton-Adenosinetriphospha-
tase Complex of Rat Liver Mitochondria: Effect of Energy
State on Its Interaction with The Adenosine Triphosphata-
se Inhibitory Peptide **Biochemistry**, 20:6305-11, 1981.

SCHWERZMANN, K. & PEDERSEN, P.L. Regulation of the
Mitochondrial ATP Synthase ATPase Complex **Arch. Biochem.**
Biophys., 250:1-18, 1986.



SELMAN, B.R. & SELMAN-REIMER, S. The Steady-State Kinetics of Photophosphorylation *J. Biol. Chem.*, 256:1722-6, 1981.

SENIOR, A.E. Tightly-Bound Magnesium in Mitochondrial Adenosine Triphosphatase from Beef Heart *J. Biol. Chem.*, 254:11319-22, 1979

SENIOR, A.E. ATP Synthesis by Oxidative Phosphorylation *Physiol. Rev.*, 68:172-231, 1988.

STERNWEIS, P. C. & SMITH, J. B. Characterization of the Purified Membrane Attachment (δ) Subunit of the Proton Translocating Adenosine Triphosphatase from *Escherichia coli* *Biochemistry*, 16:4020-25, 1977.

TUENA DE GÓMEZ-PUYDÓY, M.; MULLER, U.; DREYFUS, G.; AYALA, G. & GÓMEZ-PUYDÓY, A. Regulation of the Synthesis and Hydrolysis of ATP by Mitochondrial ATPase. Role of the Natural ATPase Inhibitor Protein. *J. Biol. Chem.*, 258:13680-4, 1983.

YOSHIDA, M.; POSES, J.W.; ALLISON, W.S. & ESCH, F.S. Identifications of an Essential Glutamic Acid Residue in the β -subunit of the Adenosine Triphosphatase from the Thermophilic Bacterium PS₃ *J. Biol. Chem.*, 256:148-53, 1981.

YOSHIDA, M.; ALLISON, W.S.; ESCH, F.S. & FUTAI, M. The Specificity of Carboxyl Group Modification During the



UNICAMP

- Inactivation of the *Escherichia coli* F_1 -ATPase with Dicyclohexylcarbodiimide *J. Biol. Chem.*, 257:10033-7, 1982.
- VALDEZ, A.M & DREYFUS, G. *Biochem. Int.*, 14:459-66, 1987
- VIGNAIS, P.V. Molecular and Physiological Aspects of Adenine Nucleotide Transport in Mitochondria *Biochim. Biophys. Acta.*, 456:1-38, 1976.
- VIGNAIS, P.V. & LUNARDI, J. Chemical Probes of the Mitochondrial ATP Synthesis and Translocation *Ann. Rev. Biochem.*, 54:977-1014, 1985.
- XUE, Z. & BOYER, P.D. Modulation of the GTPase Activity of the Chloroplast F_1 -ATPase By ATP Binding at Noncatalytic Sites *Eur. J. Biochem.*, 179:677-82, 1989.
- XUE, Z.; ZHOU, J.M.; NELESE, T.; CROSS, R.L. & BOYER, P.D. Chloroplast F_1 -ATPase has More than Three Nucleotide Binding Sites, and 2-Azido-ADP or 2-Azido-ATP at Both Catalytic and Noncatalytic Sites Labels the Beta Subunit *Biochemistry*, 26:3749-53, 1987.
- WAGENVOORD, R.J.; VERSCHOOR, G.J & KEMP, A. Photolabelling with 8-Azido-Adenine Nucleotides of Adenine Nucleotide-Binding Sites in Isolated Spinach Chloroplast ATPase (CF_1) *Biochim. Biophys. Acta.*, 634:229-36, 1981.



WANG, J.H. Chemical Modification of Active Sites in Relation to The Catalytic Mechanism of F_1 J. **Bioenergetics Biomembr.** 20:407-22, 1988.

WANG, J.H.; JOSHI, V. & WU, J.C. Geometric Isomers of Covalently Labeled Mitochondrial F_1 -Adenosine Triphosphatase with Different Properties **Biochemistry**, 25:7996-8001, 1986.

WEIDEMANN, M.J.; ERDELT, H. & KLINGENBERG, M. Adenine Nucleotide Translocation of Mitochondria. Identification of Carrier sites **Eur. J. Biochem.**, 16:313-35, 1970.

WILLIAMS, N.; HULLIHEN, J.M. & PEDERSEN, P.L. The Proton Adenosinetriphosphatase Complex of Rat Liver Mitochondria Temperature-Dependent Dissociation-Resassociation of the F_1 -ATPase **Biochemistry**, 23:780-85, 1984.

WISE, J. & SENIOR, A. Catalytic Properties of the *Escherichia coli* Proton Adenosine Triphosphatase: Evidence that Nucleotide Bound at Noncatalytic Sites is not Involved in Regulation of Oxidative Phosphorylation **Biochemistry**, 24:6949-54, 1985.

ZHOU, J-M; XUE, Z.; DU, Z.; MELESE, T. & BOYER, P.D. Relationship of Tightly Bound ADP and ATP to Control and Catalysis by Chloroplast ATP Synthase **Biochemistry**, 27:5129-35, 1988.