



1 de enero de 2015 | Vol. 16 | Núm. 1 | ISSN 1607 - 6079

# ARTÍCULO

## LA ATP SINTASA, UN VIEJO AMOR DEL DOCTOR GÓMEZ POYOU

*Georges Dreyfus (Instituto de Fisiología Celular, UNAM)*

## LA ATP SINTASA, UN VIEJO AMOR DEL DOCTOR GÓMEZ PUYOU

### Resumen

El artículo relata un episodio científico ocurrido durante la década de los años ochenta, cuando tuve la oportunidad de estudiar la proteína inhibidora de la ATP sintasa mitocondrial en el laboratorio de los doctores Armando y Marietta Gómez Puyou.

**Palabras clave:** ATP sintasa, bioquímica, enzima, Armando Gómez Puyou.

“  
La ATP sintasa es la enzima responsable de la síntesis de una molécula, que equivale a la moneda de cambio de energía del metabolismo celular: el adenosíntrifosfato o ATP.  
”

*The ATP synthase, Professor Gómez Puyou's old love*

### Abstract

*This article describes a scientific episode during the early eighties, when I had the opportunity to work on the natural inhibitor protein of the mitochondrial ATP synthase in Professors Armando and Marietta Gómez Puyou's laboratory.*

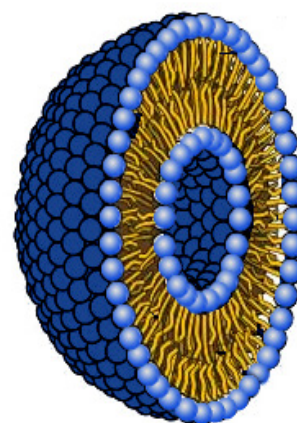
**Keywords:** ATP synthase , biochemistry, enzyme, Armando Gómez Puyou

## LA ATP SINTASA, UN VIEJO AMOR DEL DOCTOR GÓMEZ PUYOU

### Introducción

Uno de los campos de intensa actividad académica del doctor Armando Gómez Puyou, fue el de la bioenergética y las membranas biológicas. A continuación describo una de las muchas experiencias de más de tres décadas de convivencia con el doctor, a quien conocí en la década de los setenta, cuando yo era estudiante de la carrera de Medicina en esta Universidad y él ya era una leyenda de la bioquímica. Años después, en un día en el que por razones diversas el proyecto, que en aquel momento estaba desarrollando, requería hacer uso de vesículas lipídicas artificiales, también conocidas como liposomas (Figura 1); acudí con el experto en el tema, nada menos, que el doctor Armando Gómez Puyou, quien tenía su laboratorio en el Departamento de Biología Experimental del Instituto de Biología de la UNAM. Esta fue la primera vez tuve la oportunidad de interactuar con él.

Figura 1. Liposoma.



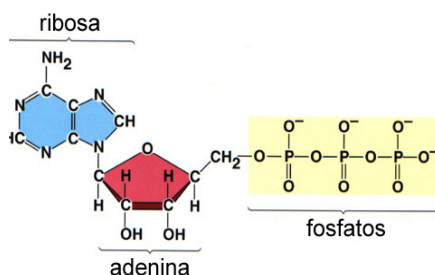
El doctor me enseñó a hacer estas vesículas, razón por la cual volví a verlo varias veces. Lo que llamó mi atención fue la especial dedicación por la investigación científica que se percibía en su labo-

ratorio. Luego de discusiones sobre el uso más apropiado de los liposomas e interesado por las membranas biológicas, llegué a trabajar como estudiante de posgrado a su laboratorio en 1980. En el laboratorio del Dr. Puyou, como lo llamabamos quienes lo conocíamos, se trabajaba con la mitocondria, un orgánulo celular dedicado a la producción de energía química. En particular su interés estaba enfocado en la regulación de la actividad de un constituyente

muy importante de las mitocondrias: la ATP sintasa, que es lo que en bioquímica se denomina una *enzima*, es decir, un catalizador, entidad constituida por proteínas que permite que se lleve a cabo una reacción química con alta eficiencia y precisión.

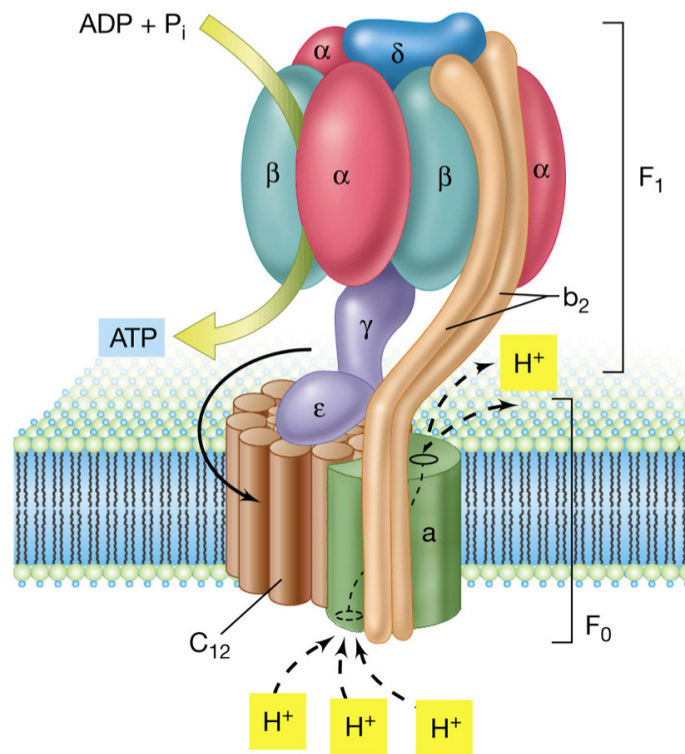
La ATP sintasa es la enzima responsable de la síntesis de una molécula, que equivale a la moneda de cambio de energía del metabolismo celular: el adenosíntrifosfato o ATP. El ATP está compuesto por una ribosa, una adenina y tres grupos fosfato (Figura 2). Además es la molécula que proporciona energía química a la célula al convertirse en adenosindifosfato (ADP) por medio de su hidrólisis.

Figura 2. ATP



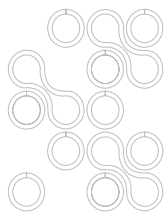
Este compuesto es fundamental para las células vivas, pues es muy abundante y constantemente se repone en el interior de las mitocondrias. Las mitocondrias, como se mencionó, contienen a la ATP sintasa, que es la enzima responsable de llevar a cabo la síntesis de ATP (Figura 3). Esta enzima, de gran complejidad, ha sido tema de estudio por más de cuatro décadas. Incluso se otorgó un premio Nobel en Química (1997) a Paul Boyer (EUA) y John Walker (Reino Unido) por haber descifrado el mecanismo de biosíntesis del ATP.

Figura 3. ATP sintasa



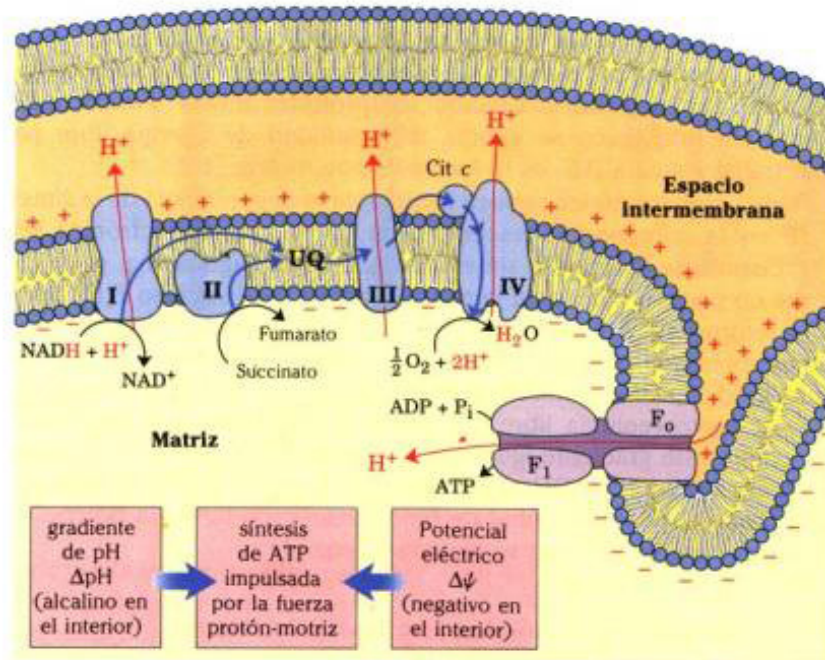
La ATP sintasa consta de dos sectores o dominios bien definidos, uno que está embebido en la membrana interna de la mitocondria y que se conoce como  $F_0$  y otro que está en contacto con el medio interior o matriz de la mitocondria, conocido como  $F_1$  (Figura 3).

En el esquema de la Teoría Quimiosmótica, formulada por el premio Nobel de Química en 1978, Peter Mitchell (Reino Unido)<sup>1</sup>, la ATP sintasa era un actor preponderante en el concierto de las reacciones de transferencia de energía. La enzima tiene la propiedad de acoplar en sus sitios catalíticos la energía química acumulada en la membrana interna de la mitocondria, sitio donde se le agrega el último fosfato al ADP para formar ATP (Figura 3 y 4). Esta membrana está densamente poblada por proteínas; entre ellas destacan las que bombean o transportan protones ( $H^+$ ) de la matriz hacia el espacio intermembranal mediante diferentes reacciones químicas. Estas proteínas funcionan en forma secuencial y son las responsables de mantener, entre otras cosas, la síntesis de ATP. De esta forma, se genera una diferencia en la concentración de protones ( $H^+$ ) entre la matriz mitocondrial y el espacio intermembranal. Los  $H^+$ , por tener una carga positiva, no se pueden difundir libremente a través de la membrana, por lo que se ven obligados a circular por un canal que se localiza en el sector  $F_0$  de la ATP sintasa (Figura 4).



[1] Ya en 1978 se había otorgado el premio Nobel de Química a Peter Mitchell (Reino Unido), por su contribución al entendimiento de la transferencia de energía en los sistemas biológicos a través de la formulación de la Teoría Quimiosmótica.

Figura 4. Sección de una mitocondria.



El flujo continuo de  $H^+$ , a través de la ATP sintasa, impulsa la rotación de un eje interno y éste, a su vez, activa secuencialmente los tres sitios activos de la enzima, dando como resultado la síntesis del ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (Pi). Este proceso ha sido objeto de estudio de muchos grupos de investigación ya que su comprensión ha revelado cómo es que las máquinas biológicas hacen uso de la energía de la cual disponen para desarrollar trabajo. Se podría decir que la ATP sintasa es una nano-máquina que fabrica ATP a partir de  $ADP+P_i$  empleando como combustible el flujo de  $H^+$ , el cual pasa a través de un canal especializado que se encuentra en la porción  $F_0$  de la membrana interna mitocondrial (Figura 3).

Las subunidades de las que está compuesta la ATP sintasa varían dependiendo de la especie de organismo del que se trate, pero sus componentes básicos son invariables; además, sobre esta estructura básica se han añadido componentes adicionales en algunos organismos. Las subunidades básicas que conforman a la ATP sintasa bacteriana se identifican como  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , a, b, y c. En algunos organismos se han encontrado subunidades adicionales llamadas súper-numerarias que, en algunos casos, son exclusivas para cada organismo. Por ejemplo, la subunidad delta de bacterias equivale, en organismos superiores, a una proteína denominada OSCP y la subunidad b en la levadura se ha denominado Su4.

A continuación se describe un aspecto relacionado con la regulación de la catálisis de la ATP sintasa. Dentro del laboratorio de los doctores Armando y Marietta Gómez Puyou, en 1980, uno de los aspectos que se estaban estudiando era la acción de una proteína que tiene la función de regular la actividad de la ATP sintasa a través de un mecanismo que la hace funcionar en un sentido de síntesis y no de hidrólisis, puesto que la reacción de síntesis de ATP es reversible, es decir, la enzima es también una ATP hidrolasa.

Las mitocondrias, como se mencionó, son esencialmente fábricas de ATP y son la principal fuente de energía del organismo, por lo que la reposición constante del ATP es fundamental para la vida. Dado que la reacción de síntesis es reversible, se requiere de un seguro que evite la hidrólisis del ATP sintetizado. En este sentido es que actúa la proteína  $IF_1$ , un inhibidor natural de la ATP sintasa presente en mitocondrias de corazón de bovino. Asimismo esta proteína es un ejemplo de una subunidad súper-numeraria que no está conservada en todos los organismos vivos. Hoy se sabe que la proteína  $IF_1$  actúa como un seguro que previene la hidrólisis de ATP cuando la presión ejercida por el gradiente electro-químico disminuye o simplemente cesa.

La forma en la que se estudió el mecanismo de acción de la proteína  $IF_1$  fue, como se describe más adelante, a través del uso de anticuerpos (gammaglobulinas) producidos para unirse específicamente a dicha proteína.

Se trata de una técnica muy precisa que permite determinar la presencia de ATP sintasa en diferentes preparaciones de la enzima en las que se presentaban diversos grados de actividad de hidrólisis de ATP. A continuación, se explican las características de las diferentes preparaciones de ATP sintasa con las que se contaba en aquella época. Se hizo uso de diferentes métodos para aislar buenas cantidades de mitocondrias que provenían de corazones frescos de bovino adquiridos en el rastro. Durante el día, se aislaban las mitocondrias almacenadas en pequeñas porciones en un congelador a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Esas mitocondrias contenían, entre muchas otras proteínas y compuestos, a la ATP sintasa con la porción  $F_1$  orientada hacia el interior (Figura 4 y 5). Sin embargo, para llevar a cabo ciertos estudios bioquímicos, era necesario tener acceso directo a la porción de la enzima que contiene los sitios catalíticos. Para esto, las mitocondrias fueron sometidas a sonicación (ondas de choque por ultrasonido), lo que permite romper a las membranas que envuelven a la mitocondria. Con este método se obtienen unas vesículas más pequeñas denominadas partículas submitocondriales (PSM), caracterizadas por tener la porción  $IF_1$  orientada hacia afuera (Figura 5). La ruptura de las mitocondrias se llevaba a cabo en un medio que semeja las condiciones en que se encuentra la porción  $F_1$  cuando está orientada hacia el interior de la matriz mitocondrial, es decir, con una alta concentración de ADP y  $P_i$ . Las partículas submitocondriales obtenidas así tienen una muy baja actividad hidrolítica, pero cuando se preparaban en un medio pobre en ADP y  $P_i$ , las partículas submitocondriales tenían una elevada actividad hidrolítica, pero cuando el medio en el que se rompían las mitocondrias era pobre en ADP y  $P_i$ , las partículas submitocondriales tenían una elevada actividad hidrolítica.

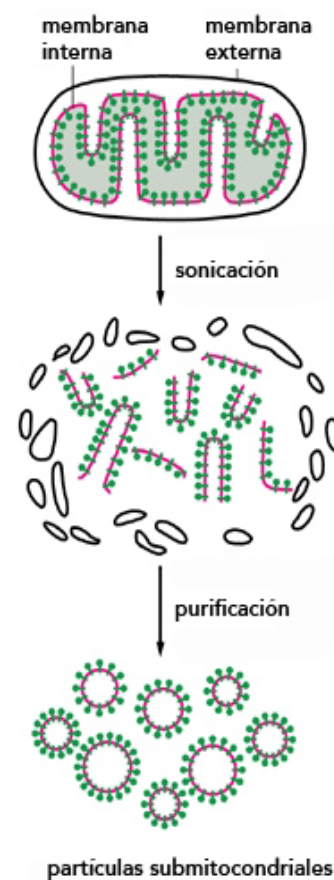


Figura 5. Partículas submitocondriales.

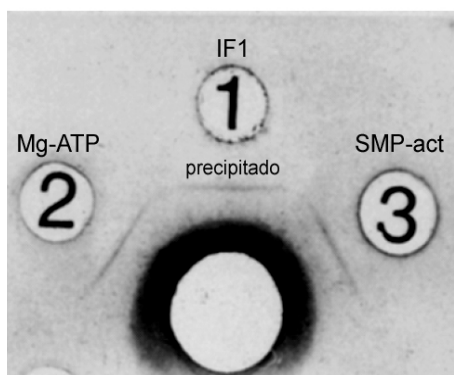


Figura 6. Inmunodifusión

Estos dos tipos de partículas representaban las dos condiciones extremas en las que se podía encontrar a la enzima, por lo que se hicieron varias preguntas sobre el control de la actividad de la ATP sintasa por la  $IF_1$ .

La proteína inhibidora  $IF_1$  juega un papel central en la actividad de la enzima ya que se sabía que inhibía la actividad de la enzima cuando, por alguna razón, el gradiente electroquímico se disipaba. De esta forma, el ATP recién sintetizado no era hidrolizado por la enzima y podía cumplir con la función de conservación de la energía.

vación de la energía.

Se puede exponer aquí una analogía para ilustrar este punto. Imaginemos un pozo más o menos profundo en que la única manera de sacar agua es a través de una cubeta unida por medio de una cuerda a una cremallera. Al subir la cubeta con agua, ésta va acumulando energía. Si por algún descuido olvidamos asegurar la cremallera, la cubeta con el agua caerá nuevamente al fondo del pozo y por lo tanto la energía invertida en subir el agua se disipará. Algo similar ocurriría si la ATP sintasa no tuviese la posibilidad de asegurar que la enzima no opere en sentido opuesto, es decir, hidrolizando el ATP recién sintetizado. La función de  $IF_1$  es justamente la de conservar la energía química contenida en el ATP, evitando que se disipe mediante la reacción reversa de la síntesis. La  $IF_1$  modifica su posición en la enzima, ya que la accesibilidad a los anticuerpos específicos cambia en función del estado catalítico en el que se encuentre la ATP sintasa.

Los anticuerpos son herramientas biológicas muy útiles, pues reconocen con gran especificidad aquello contra lo que están dirigidos. Estos son producidos en el organismo como resultado de un complejo proceso que determina si algo es ajeno o propio al mismo. Una vez que alguna molécula es etiquetada como ajena, ciertas células especializadas producen anticuerpos que reconocen específicamente a dicha molécula.

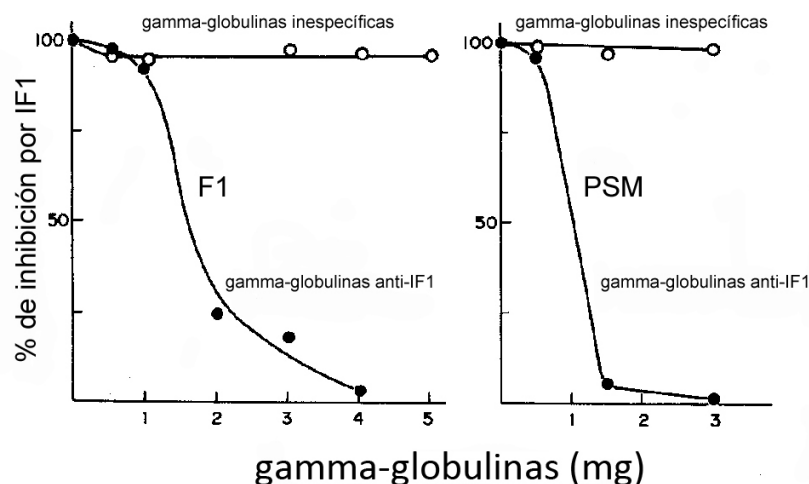
Ya se habían hecho muchos intentos para obtener anticuerpos específicos contra  $IF_1$  sin éxito debido a que, posiblemente, la proteína no era detectada en un conejo como ajena, lo cual podría deberse a que en sus mitocondrias existe la ATP sintasa, y que la proteína que proviene de las mitocondrias de bovino no fuera muy diferente de la del propio conejo. Sin embargo, yo ya tenía cierta experiencia en la producción de anticuerpos y decidí intentarlo llevando a cabo un esquema de inmunización muy particular. Para esto, se inoculó a un par de conejos con el fin de producir anticuerpos dirigidos contra  $IF_1$  en alguno de los dos animales. Eventualmente los sueros de los conejos empezaron a reaccionar con la proteína de interés  $IF_1$ .

Los hallazgos derivados de esta investigación, descritos a continuación, fueron dados a conocer en una publicación muy bien recibida por la comunidad científica internacional que estaba interesada en el tema (DREYFUS, 1981).

Se sabía que la proteína inhibidora  $IF_1$  interactúa con la porción  $F_1$  de la ATP sintasa y más específicamente con la subunidad denominada *beta* (Figura 3). También se conocía, desde hacía varios años, el efecto inhibitor de la proteína  $IF_1$  sobre la reacción de hidrólisis del ATP. Sin embargo, no estaba claro si esta proteína controlaba la síntesis de ATP, que es la actividad esencial de esta enzima.

Había antecedentes de que la síntesis de ATP ocurre hasta que el gradiente electro-químico induce el desplazamiento de  $IF_1$  hacia una posición no inhibitoria. Como la evidencia hasta ese momento era indirecta, nos propusimos demostrar de una forma más directa el desplazamiento de la  $IF_1$ , usando como herramienta anticuerpos específicos. El trabajo (DREYFUS, 1981) mostraba que en partículas submitocondriales que sintetizaban ATP activamente, la unión de anticuerpos específicos contra  $IF_1$  aumentaba varias veces en comparación con partículas que estaban en reposo. Se mostró un ensayo control para demostrar que los anticuerpos reconocían la molécula contra la que iban dirigidos ( $IF_1$ ). El ensayo se denominaba "inmunodifusión" y si la prueba era positiva, se observaba una raya (en términos bioquímicos un *precipitado*) entre los pozos en los que se depositaba la mezcla formada por el anticuerpo y el antígeno ( $IF_1$ ) (Figura 6). El siguiente paso era determinar si los anticuerpos tendrían la capacidad de neutralizar la actividad de la proteína contra la que estaban dirigidos. Para eso se aprovechó el hecho de que la  $IF_1$  es capaz de inhibir la actividad enzimática de la ATP sintasa tanto en su forma soluble como cuando está unida al sector  $F_0$  en la membrana. De tal manera que si se preincubaba a la  $IF_1$  con los anticuerpos específicos, se podría esperar que su capacidad inhibitoria fuera neutralizada al unirse con la molécula del anticuerpo. Y justamente eso fue lo que resultó cuando se llevaron cabo los experimentos (Figura 7). La gráfica muestra un control realizado con un anticuerpo inespecífico (gamma-globulina) que no evita la inhibición que produce la  $IF_1$ , sin embargo, las gammaglobulinas anti- $IF_1$  sí la inhiben y este efecto es proporcional a la concentración del anticuerpo agregado.

Figura 7. Efecto de anticuerpos



Al analizar los resultados, se pudo constatar que la proteína inhibitoria, independientemente de la magnitud de la actividad enzimática, se mantenía unida a la porción  $F_1$  y como en aquel tiempo no se había llegado a un acuerdo sobre el mecanismo de acción de la  $IF_1$ , se intentó resolver al menos parte del problema. Para esto, se usó material radiactivo para marcar los anticuerpos anti- $IF_1$  y poder identificarlos posteriormente. Esto se llevó a cabo con un isótopo radiactivo del yodo (I), el yodo 125 ( $^{125}I$ ) debido a que este método puede detectar cantidades muy pequeñas del material al que está unido el isótopo radiactivo<sup>2</sup>.



Primero se marcaron los anticuerpos con el  $^{125}\text{I}$  mediante una reacción química y posteriormente se separaron aquellos marcados del isótopo libre que no se incorporó. Una vez que se tuvieron los anticuerpos marcados, se analizó cuánta radiactividad habían incorporado. Esto es muy importante, pues mientras más actividad radiactiva tengan, más sensible es el ensayo. El marcaje fue bastante bueno y se logró tener un buen lote de gammaglobulinas, tanto inespecíficas como específicas marcadas con  $^{125}\text{I}$ .

Posteriormente se hicieron ensayos de unión de los anticuerpos a dos tipos diferentes de partículas submitocondriales, unas que presentaban una actividad enzimática de hidrólisis de ATP baja y otras con una actividad diez veces más alta. Estos ensayos mostraron que la unión de los anticuerpos radiactivos era al menos cuatro veces mayor en partículas submitocondriales con alta actividad enzimática, con respecto a las que presentaban baja actividad (Figura 8).

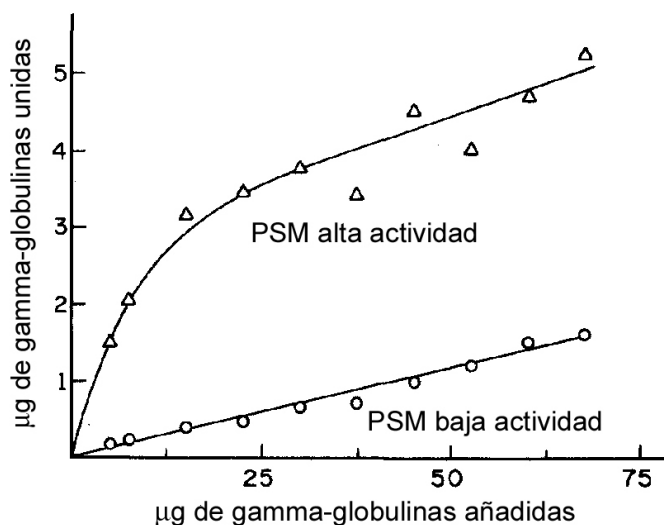
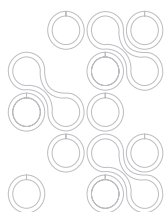


Figura 8. Unión de anticuerpos anti IF1. Efecto de anticuerpos



Los resultados mostraban por primera vez que la proteína  $\text{IF}_1$ , encargada de inhibir la hidrólisis del ATP respondía a la presencia del gradiente electro-químico y que lo hacía a manera de un seguro, el cual permite la síntesis al moverse de un sitio en el que inhibe a la enzima, a otro en el que no lo hace.

Hasta el día de hoy, aquellos resultados han resistido el paso del tiempo: se sostiene el concepto de que  $\text{IF}_1$  regula a la ATP sintasa desplazándose, para permitir que la enzima lleve a cabo la síntesis del ATP sin que se libere de la misma.

El trabajo fue muy novedoso e inició mi camino en el campo de las membranas biológicas, en el que sigo interesado después de tantos años. Esta gran aventura científica pudo llevarse a cabo gracias a la enorme generosidad y al entusiasmo del doctor Gómez Puyou y su esposa Marietta Tuena, quienes, a lo largo del tiempo, han transmitido a muchas generaciones de estudiantes y colegas, su amor y dedicación a la ciencia y con quienes estaré siempre muy agradecido. El doctor Gómez Puyou decidió dedicar su atención a otros problemas, mientras que su esposa y eterna compañera, la doctora Tuena, se mantuvo fiel a aquel viejo amor por membranas y mitocondrias. 🌟

[2] El experimento era delicado porque se tienen que tomar precauciones especiales al trabajar con material radiactivo y el yodo en especial es peligroso, ya que si no se maneja correctamente se puede contaminar la glándula tiroidea con graves consecuencias.

Agradezco la ayuda del Dr. Francisco Javier de la Mora en la preparación de las figuras.

## Bibliografía

- [1] DREYFUS, G., Gómez-Puyou, A. and Tuena de Gómez-Puyou, M., “Electrochemical gradient induced displacement of the natural ATPase inhibitor protein from mitochondrial ATPase as detected by antibodies against the inhibitor protein.” *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1981, 100 (1), 400-406.