

REGULAÇÃO DA F_1 -ATPase DE MITOCÔNDRIAS DE *Vigna unguiculata*
(L.) Walp cv. pitiuba por Na^+ , K^+ , Mg^{2+} e POLIAMINAS.

MOEMA RODRIGUES PINHEIRO

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários
à obtenção do grau de
MESTRE EM BIOQUÍMICA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CENTRO DE CIÊNCIAS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA - 1980

Esta dissertação foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A transcrição do material contido nesta dissertação é permitida desde que se faça a citação necessária.

Moema Rodrigues Pinheiro

Horst Wolfgang Peter
Orientador da Dissertação

data

Maria da Guia Silva Lima

data

Renato de Azevedo Moreira

data

Aos meus pais,
meu marido,
e meus filhos.

AGRADECIMENTOS

De modo especial sou grata aos professores Maria da Guia Silva Lima e Horst Wolfgang Peter, pela orientação e estímulo na execução deste trabalho.

Agradeço ao professor Renato de Azevedo Moreira pelas sugestões e esclarecimentos.

Ao professor Jan Ahlers sou grata pelos conhecimentos recebidos.

Aos professores, colegas e demais funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, agradeço pelo ambiente de trabalho e cooperação.

Este trabalho foi realizado graças a cooperação das seguintes instituições:

Universidade Federal do Ceará, através de financiamento do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, dentro do Projeto Nordeste da Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, em cujos laboratórios foram realizados trabalhos experimentais desta dissertação.

Serviço Alemão de Intercâmbio Acadêmico (Deutscher Akademischer Austauschdienst DAAD), através de convênio com o Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Departamento de Farmácia do Centro de Ciências da Saúde, através da concessão de liberação para realização deste estudo.

ÍNDICE

LISTA DE DIAGRAMAS.....	IV
LISTA DE TABELAS.....	V
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	VI
DEFINIÇÕES E ABREVIATURAS.....	VIII
SUMÁRIO.....	IX
I. INTRODUÇÃO.....	1
Mitocôndrias.....	1
Diferenças e semelhanças entre mitocôndrias de ani- mais e vegetais.....	2
ATPase mitocondrial.....	2
Estrutura.....	2
Função.....	5
ATPase em plantas.....	6
Poliaminas.....	8
Objetivo do Trabalho.....	10
II. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
A - Material.....	11
1. Sementes.....	11
2. Reagentes.....	11
B - Métodos.....	12
1. Condições de germinação.....	12
2. Preparação mitocondrial.....	12
3. Dosagem de proteínas.....	14
4. Lise das mitocôndrias.....	14
5. Determinação da atividade ATPásica.....	15
6. Dosagem de fósforo inorgânico.....	15
7. Determinação das condições do estado estacio- nário da F_1 -ATPase mitocondrial.....	16

8. Preparações das soluções de poliaminas.....	16
9. Influência do tempo de pré-incubação da fração mitocondrial sobre a atividade ATPásica em presença e ausência de espermina.....	16
10. Cálculos para a determinação da concentração do MgATP e Mg ²⁺ livre.....	16
11. Determinação das poliaminas nas mitocôndrias.	19
12. Solubilização da ATPase.....	23
13. Dosagem de Na ⁺ e K ⁺	25
III. RESULTADOS.....	26
1. Determinação do conteúdo de poliaminas nas mitocôndrias.....	26
2. Determinação do conteúdo de Na ⁺ e K ⁺ nas mitocôndrias.....	26
3. Efeito da concentração do substrato MgATP na velocidade da reação ATPásica.....	26
4. Efeito da concentração de proteína da fração mitocondrial sobre a atividade ATPásica.....	31
5. Influência da concentração de proteínas mitocondriais no efeito exercido pelas poliaminas sobre as mitocôndrias de <i>Vigna unguiculata</i>	31
6. Efeito do Na ⁺ na atividade ATPásica.....	31
7. Efeito do K ⁺ na atividade ATPásica.....	35
8. Influência das poliaminas sobre a atividade ATPásica.....	35
9. Influência do Mg ²⁺ e MgATP na atividade ATPásica.	42
10. Efeito competitivo da espermina com o substrato MgATP da ATPase.....	47
11. Efeito competitivo da espermina com Mg ²⁺	47
12. Comparação dos rendimentos de solubilização da ATPase após diferentes tentativas de solubilização da enzima.....	47
13. Efeito do Mg ²⁺ livre sobre a ATPase solubilizada	51
14. Efeito das poliaminas sobre a ATPase solubilizada	

de <i>Vigna unguiculata</i>	51
IV. DISCUSSÃO.....	54
V. CONCLUSÕES.....	60
VI. LITERATURA CITADA.....	61
VII. PUBLICAÇÕES.....	68

LISTA DE DIAGRAMAS

DIAGRAMA

- I. Morfologia do complexo da ATPase mitocondrial..... 4
- II. Esquema de centrifugação para o isolamento de mitocôndrias de hipocôtilo de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. pitiuba..... 13
- III. Representação gráfica da inibição pseudo-competitiva 58

LISTA DE TABELAS

TABELA	Página
I Esquema de combinação das concentrações de Mg^{2+} total e de ATP_{total} que possibilitam a obtenção de diferentes valores de Mg^{2+} livre e de $MgATP$.	20
II Concentração de poliaminas na fração mitocondrial de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp cv. pituiba	28
III Determinação da concentração de Na^+ e K^+ nas mitocôndrias	29
IV Influência da concentração de proteínas mitocondriais na ativação da ATPase ligada à membrana mitocondrial, pelas poliaminas	33
V Comparação dos rendimentos obtidos em 5 diferentes tentativas de solubilização da ATPase mitocondrial	50
VI Efeito das poliaminas sobre a ATPase solubilizada de <i>Vigna unguiculata</i>	53

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA		Página
1	Liberação de Pi dependente do tempo de incubação da fração mitocondrial	17
2	Influência do tempo de pré-incubação sobre a atividade ATPásica da fração mitocondrial de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp cv. pitiuba em presença de espermina	18
3	Curva padrão para a determinação quantitativa das poliaminas	24
4	Determinação qualitativa das poliaminas presentes nas mitocôndrias de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp cv. pitiuba	27
5	Efeito da concentração do substrato MgATP na atividade ATPásica de mitocôndrias lisadas de <i>Vigna unguiculata</i>	30
6	Efeito da concentração de proteína mitocondrial sobre a atividade ATPásica	32
7	Efeito da concentração de Na ⁺ sobre a atividade de F ₁ -ATPase ligada à membrana mitocondrial de <i>Vigna unguiculata</i> , em ausência e presença de K ⁺	34
8	Efeito da concentração do K ⁺ sobre a atividade da F ₁ -ATPase ligada à membrana mitocondrial de <i>Vigna unguiculata</i> , em ausência e presença de Na ⁺	36
9	Influência da espermina em concentrações variáveis sobre a atividade ATPásica de mitocôndrias de <i>Vigna unguiculata</i> , na ausência e presença de Na ⁺ e de K ⁺	37
10	Influência da espermidina em concentrações variáveis sobre a atividade ATPásica de mitocôndrias de <i>Vigna unguiculata</i> , na ausência e presença de Na ⁺ e de K ⁺	38

11	Influência da putrescina em concentrações variáveis sobre a atividade ATPásica de mitocôndrias de <i>Vigna unguiculata</i> , na ausência e presença de Na^+ e de K^+	39
12	Representação gráfica de $1/v$ residual versus $1/(\text{Espermina})$ análoga à representação gráfica de Dixon	40
13	Gráfico de Hill para expressar a cinética de ativação da ATPase pela espermina	41
14	Influência de Mg^{2+} livre sobre a atividade de F_1 -ATPase da membrana mitocondrial de <i>Vigna unguiculata</i> , em presença de diferentes concentrações de MgATP	43
15	Gráfico de Lineweaver-Burk para a determinação do tipo de inibição da atividade ATPásica pelo Mg^{2+} livre em mitocôndrias de <i>Vigna unguiculata</i>	44
16	Gráfico de Dixon, para determinar o tipo de inibição da atividade ATPásica e para determinação do K_i em mitocôndrias de <i>Vigna unguiculata</i>	45
17	Determinação do verdadeiro valor de K_m	46
18	Gráfico de Lineweaver-Burk mostrando o efeito competitivo entre espermina e MgATP em mitocôndrias de <i>Vigna unguiculata</i>	48
19	Reversão do efeito inibitório do Mg^{2+} livre sobre a atividade de F_1 -ATPase ligada à membrana de mitocôndrias de <i>Vigna unguiculata</i>	49
20	Efeito do Mg^{2+} livre sobre a ATPase solubilizada.	52

DEFINIÇÕES E ABREVIATURAS

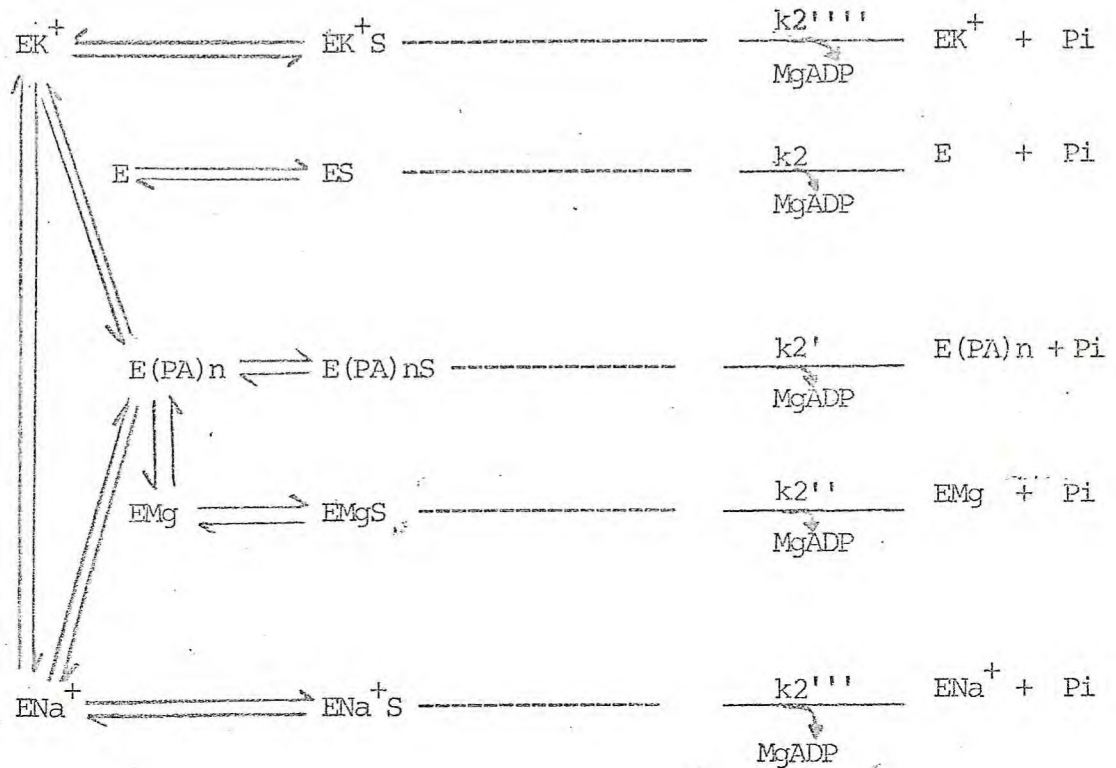
ATP	- Adenosina-5'-Trifosfato
ADP	- Adenosina-5'-Difosfato
(ATP) _t	- Adenosina-5'-Trifosfato total
BSA	- Albumina sérica bovina
2,4DNP	- 2,4 dinitrofenol
EDTA	- Ácido etilenodiamino-tetracético
F ₁ -ATPase	- ATPase ligada à membrana mitocondrial
(Mg ²⁺)	- Concentração de Magnésio livre
(Mg ²⁺) _t	- Concentração de Magnésio total
OSCP	- Fator que confere sensibilidade a oligomicina
PA	- Poliaminas
SDS	- Dodecil-sulfato de sódio
TCA	- Ácido Tricloroacético
TRIS	- Tris-(hidroximetil)-aminometano
Triton X-100	- p-isooctilfenoxipolietoxietanol

SUMÁRIO

- A influência das poliaminas e dos íons Na^+ , K^+ e Mg^{2+} sobre a ATPase de mitocôndrias de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. pitiubá foi estudada na enzima associada à membrana e na enzima solubilizada;

- Os efeitos exercidos pelos íons Na^+ , K^+ e Mg^{2+} e pelas poliaminas em presença e ausência destes íons inorgânicos foram verificados por análise cinética;

- O esquema simplificado abaixo, sumariza os resultados obtidos com a ATPase mitocondrial ligada à membrana de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. pitiuba.



$k2' > k2 > k2''$ na região de concentrações elevadas de Mg^{++}

$k2''' > k2$

$k2'''' > k2$

n = no mínimo igual a dois (2)

E = F_1 ATPase ligada à membrana

PA = Poliaminas (espermina, espermidina, putrescina)

S = substrato (MgATP)

k2 = constante de velocidade para a decomposição do complexo ES

k2' = " " " " " " " " " E(PA)nS

k2'' = " " " " " " " " " EMgS

k2''' = " " " " " " " " " ENa⁺S

k2'''' = " " " " " " " " " EK⁺S

- As experiências preliminares realizadas com a ATPase solúvel não mostraram influência de Mg^{2+} livre e poliaminas sobre esta enzima.

I - INTRODUÇÃO

Mitocôndrias

As mitocôndrias são organelas do citoplasma presentes em todas as células aeróbicas de animais e vegetais. Nelas está a sede do transporte de elétrons, das reações do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, da fosforilação oxidativa e da oxidação dos ácidos graxos. As mitocôndrias possuem formas variadas, dependendo do tipo de células de onde são isoladas. Na célula íntegra de fígado de rato, elas são elipsóides e têm 2µm de comprimento e aproximadamente 1µm de largura. Elas são formadas por um sistema de dupla membrana, sendo que a membrana externa plana envolve a membrana interna que por invaginação se distribui na matriz das organelas em forma de cristas (Lehninger 1973). As membranas mitocondriais e o espaço entre elas possuem enzimas marcadoras, que estão presentes somente nestas partes da mitocôndria. Assim, a monoamino-oxidase é uma enzima marcadora, que indica a presença da membrana externa; analogamente, os citocromos a e a_3 são usados como marcadores para a membrana interna; a malato desidrogenase e a glutamato desidrogenase, para matriz mitocondrial e a adenilato-quinase para o espaço entre as membranas (Lehninger 1976). A membrana externa é permeável a moléculas pequenas, enquanto a membrana interna tem permeabilidade seletiva permitindo a passagem de água, fosfato, ADP, ATP e substratos tais como piruvato, sendo impermeável para K^+ , Na^+ , sacarose e outras moléculas polares (Lehninger 1973). Na membrana mitocondrial interna estão localizadas tanto as enzimas do transporte de elétrons quanto as proteínas transportadoras de elétrons. Fernández-Moran em 1962, observou por meio de micrografia eletrônica, na superfície interna da membrana mitocondrial interna, partículas esféricas que se projetavam na matriz mitocondrial.

O diâmetro destas partículas foi determinado como sendo de 85A°. Estas partículas esféricas se ligam através de hastes à superfície interna da membrana mitocondrial interna (Kagawa e Racker 1966) e são destituídas de componentes da cadeia respiratória (Chance e col. 1964). Racker e Horstman em 1967, evidenciaram que as partículas esféricas ligadas à membrana mitocondrial interna por hastes são representações morfológicas do fator de acoplamento F_1 da ATPase. A matriz mitocondrial contém cerca de 50% de proteína nela estando presente as enzimas do ciclo do ácido tricarboxílico, e da oxidação dos ácidos graxos, como também DNA e ribosomas (Lehninger 1976).

Diferenças e semelhanças entre mitocôndrias de animais e vegetais.

Numerosas características de mitocôndrias de plantas têm sido comparadas com as de mitocôndrias de animais, tendo por base critérios estabelecidos por experiências realizadas com mitocôndrias de animais (Ikuma 1972). Diversos trabalhos (Ashwell e col. 1970 - Ikuma 1972 - Bonner 1973) indicam que em termos de estrutura fundamental e função as mitocôndrias de plantas e de animais são semelhantes. Embora Ikuma em 1972 relate várias semelhanças entre mitocôndrias de plantas e animais no que diz respeito à transferência de elétrons, várias diferenças neste mesmo aspecto são também por ele relacionadas. Existem algumas diferenças marcantes entre as mitocôndrias de plantas e animais quanto às propriedades da ATPase mitocondrial, quanto à natureza do sistema de transporte de elétrons, quanto à atividade do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e mesmo quanto à morfologia das membranas mitocondriais mais recentemente referidas (Palmer 1976).

ATPase mitocondrial

Estrutura

A ATPase mitocondrial sendo a enzima que se coloca em

especial evidência no metabolismo energético, devido à sua condição de catalisar a síntese e a hidrólise de ATP, vem sendo estudada há muito tempo sob diferentes aspectos (Pullman e col. 1960 - Stoner e col. 1964 - Fisher e Hodges 1969 - Jung e Hanson 1973 - Malhotra e Spencer 1974 - Tuppy e Sperk 1976 - Jung Laties 1976 - Silva Lima e Peter - 1980).

Pullman e col. em 1960, forneceram evidências de que o fator de acoplamento denominado F_1 era a própria ATPase e a seguir Penefsky e col. em 1960 mostraram que F_1 era necessário ao desempenho da fosforilação oxidativa. Em 1970 Racker postulou a necessidade F_1 para todas as reações parciais que constituíam o esquema do mecanismo de fosforilação oxidativa, segundo a teoria química. Os trabalhos iniciais com ATPase solubilizada foram feitos com mitocôndrias de coração de boi, submetidas a um processo de disrupção em um agitador de Nossal (Pullman e col. 1960). Foi verificado que esta ATPase ao se religar à membrana mitocondrial ou a partículas reconstituídas readquire a capacidade de sintetizar ATP ou de realizar outras funções identificadas com o processo de conservação de energia (Penefsky e col. 1960). Este foi o motivo de chamar a ATPase solúvel de fator de acoplamento e também de F_1 . Na realidade F_1 é identificado com as partículas esféricas inicialmente demonstradas por Fernández-Moran (1962) e confirmado de modo irrecusável por Racker e Horstman em 1967. Posteriormente, foi verificado que F_1 era lábil ao frio, não era inibido por oligomicina nem por mercuriais nem por diclohexil-carbodiimida (DCCD), bem como tinha especificidade variável diante de nucleotídeos trifosfatos. Os trabalhos posteriores revelaram porém que F_1 quando reassociado à membrana mitocondrial interna ou a vesículas reconstituídas passava a ser resistente ao frio, sensível a oligomicina e outros inibidores (Senior 1973) e possui a mesma especificidade por nucleotídeos trifosfatados. Ficou então patente que F_1 ao ser dissociado da membrana mitocondrial passava a ter características bem distintas das da enzima que realmente age associada à membrana no processo de conservação de energia. Com base

nos resultados obtidos com F_1 solubilizado e associado à membrana, foi feita uma descrição morfológica do complexo de ATPase. Esta morfologia está assim descrita na revisão feita por Senior em 1973. (Diagrama I): a parte referente a F_1 projeta-se na matriz mitocondrial e é admitida como a porção realmente esférica das partículas de Fernández Moran cujo peso molecular é admitido como sendo 360.000 em mitocôndria de coração de boi. Ela é constituída de 5 subunidades (α , β , γ , δ , ϵ) e uma sexta subunidade que é um inibidor específico da ATPase mitocondrial. As partículas esféricas foram descritas como sendo ligadas à membrana mitocondrial através de uma haste cuja composição hoje se admite ser uma proteína que confere sensibilidade à oligomicina. Embora esta composição seja controversa (Senior 1973) é contudo atualmente aceite (Racker 1976) o fato de que na haste estaria o fator que confere à F_1 -ATPase, sensibilidade a oligomicina (OSCP). Possivelmente, a haste é ainda composta de outras proteínas como o F_{C2} (Senior 1973) que é admitida (Knowles e col. 1971) como a proteína que estabelece a união de F_1 à membrana. Além da parte esférica e da haste, o complexo da ATPase está associado a uma parte da membrana interna, provavelmente constituída por quatro ou mais subunidades protéicas cujo arranjo não está totalmente definido (Senior 1973).

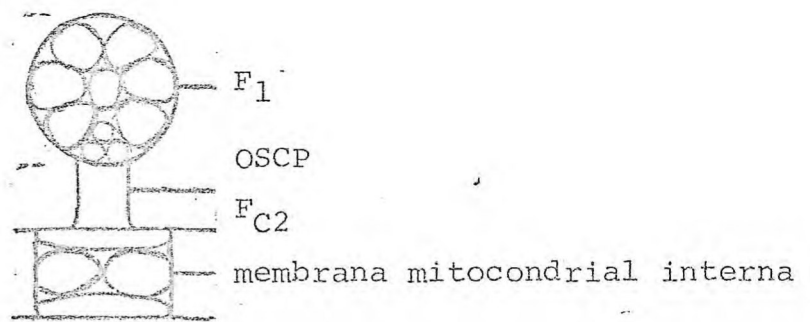


Diagrama I - Morfologia do complexo ATPase mitocondrial.

Função

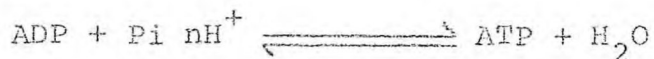
A função da ATPase na fosforilação oxidativa já está bem estabelecida (Pullman e col. 1960). O processo de fosforilação oxidativa consiste na transferência de elétrons do NADH até o oxigênio, formando CO_2 e H_2O . Simultaneamente, ocorre a formação de grupos de fosfatos de alta energia na forma de conservação de ATP a partir de ADP e Pi (Lehninger 1976).

Segundo Senior (1973), o complexo ATPásico mitocondrial funciona normalmente como uma unidade completamente integrada. As funções desempenhadas por este complexo podem ser definidas da seguinte maneira:

- 1 - Translocação de prótons através da membrana mitocondrial interna.
- 2 - Catálise da hidrólise e da síntese de ATP e a regulação destas reações enzimáticas.

Mitchell em 1961, propôs um mecanismo para a fosforilação oxidativa, conhecido como hipótese de quimiosmótica. Ele postulou que a transferência de elétrons na cadeia respiratória acoplada às reações de armazenamento ou consumo de energia através de síntese ou hidrólise de ATP poderia ser explicada por um estado intermediário rico em energia. Segundo Mitchell o veículo de acoplamento é um gradiente eletroquímico de íons H^+ (força próton-motriz que é a soma do potencial de membrana mais a diferença de pH). O gradiente de íons H^+ é usado para formação de ATP com remoção de água a partir de ADP e Pi sendo envolvido o complexo $\text{F}_1\text{-Fo-ATPase}$ da membrana mitocondrial.

A ATPase mitocondrial é pois uma enzima terminal na fosforilação oxidativa que cataliza a reação seguinte:



onde n é dependente de pH sendo aproximadamente igual a 0,7 quando o pH é neutro (Senior 1973).

ATPase em plantas

A atividade da ATPase ou F_1 -ATPase de mitocôndrias tem sido pesquisada em mitocôndrias de origem animal e vegetal. Em mitocôndrias intactas de animal a atividade ATPásica endógena é baixa, sendo induzida por desacopladores como 2,4 DNP, em presença da qual há hidrólise de ATP na ausência de Mg^{2+} (Slater 1963). Em mitocôndrias intactas de plantas a atividade ATPásica, diferentemente da ATPase de origem animal vem se mostrando bastante variada no que diz respeito à influência do 2,4 DNP (Stoner e col. 1964, Reid e col. 1964, Takeuchi e col. 1969). A atividade ATPásica, ainda em mitocôndrias intactas de plantas, vem sendo explorada sob diferentes aspectos. Já foi constatada a influência de fatores extrínsecos tais como atividade de translocação de adenina (Silva Lima e col. 1977), transporte elétrons (Wiskisch 1977) e fosfato endógeno (Jung e Hanson 1973). Outro aspecto que vem sendo explorado atualmente é o efeito dos íons sobre a ATPase de mitocôndrias de plantas. Existem poucos e contraditórios dados a este respeito (Brown e col. 1965 - Fisher e Hodges 1969 - Malhotra e Spencer 1974 - Silva Lima e Peter 1980). Ao contrário da ATPase mitocondrial de animais e leveduras, a atividade da ATPase de mitocôndrias de trigo (monocotiledônea), mostrou-se insensível a oligomicina e resistente ao frio e tem peso molecular baixo (Tuppy & Sperk 1976). Em plantas dicotiledôneas, como mamona e couve flor, a ATPase foi inibida por oligomicina, tem peso molecular elevado e é lábil ao frio. Estas diferenças foram explicadas tomando por base a origem da preparação mitocondrial, seja ela de plantas monocotiledôneas, seja de plantas dicotiledôneas (Sperk e Tuppy 1977).

A despeito das diferenças referidas, não só entre mitocôndrias de origem vegetal e de origem animal, como entre mitocôndrias de vegetais de diferentes fontes (Sperk e Tuppy 1977), semelhanças têm sido observadas quando comparadas as propriedades da ATPase associada a mitocôndrias de vegetais como *Phaseolus aureus* e de animais (Blackmon e Moreland 1971).

A atividade da ATPase de *Phaseolus aureus* foi induzida por 2,4 DNP e foi inibida por oligomicina, por substratos oxidáveis e por altas concentrações de sacarose. Já nas partículas submitocondriais ocorre uma hidrólise de ATP endógeno muito elevada e foi também manifestado um requerimento de Mg^{2+} pela ATPase. Todavia, a estimulação por 2,4 DNP e a inibição por sacarose da ATPase nestas partículas foi eliminada, permanecendo apenas a sensibilidade à oligomicina.

Jung e Laties em 1976, trabalhando com mitocôndrias de batata, evidenciaram que a atividade ATPásica endógena apresentou-se em baixos níveis, não sendo estimulada por Mg^{2+} nem por 2,4 DNP na presença de substratos oxidáveis, mesmo quando as mitocôndrias eram submetidas à ação de ultra-som ou tratadas com Triton X-100. A atividade ATPásica dependente de Mg^{2+} e sensível a oligomicina das mitocôndrias de batata só foi evidenciada rompendo as mitocôndrias por ação de ultra-som e submetendo-as a tratamento com tripsina. A ATPase neste caso foi estimulada de 10 a 15 vezes, sugerindo a presença de um inibidor protéico da ATPase que se manteve ativo nas mitocôndrias íntegras ou rompidas mas sem digestão provocada pela tripsina. A atividade ATPásica estimulada por tripsina não foi modificada por desacopladores.

A continuação dos trabalhos com ATPase de mitocôndrias vegetais (Grubmeyer e Spencer 1978 e 1980) tem fortalecido a conclusão de que as diferenças apontadas entre as ATPases de diferentes fontes vegetais parecem residir apenas no método de preparação da ATPase, isto é, métodos em que a enzima se apresenta ligada a fração particulada ou na forma solúvel. Assim, as diferenças correriam por conta da interação da enzima com os elementos constitutivos da membrana mitocondrial. Embora o efeito dos íons sobre ATPase de plantas varie consideravelmente como está descrito na literatura (Brown e col. 1965, Fisher e Hodges 1969, Malhotra e Spencer 1974, Silva Lima e Peter 1980), em vários tipos de tecidos de plantas foi detectada atividade ATPásica sensível a íons inorgânicos (Na^+ , K^+ e Mg^{2+}), os quais são capazes de estimular ou inibir a ativi-

dade desta enzima (Malhotra e Spencer 1974, Fischer e Hodges 1969, Brown e col. 1965, Kylin e col. 1974, Lindberg e col. 1974, Lindberg 1976, Lai e col. 1971).

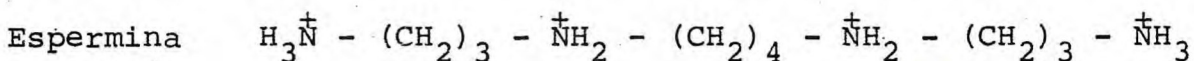
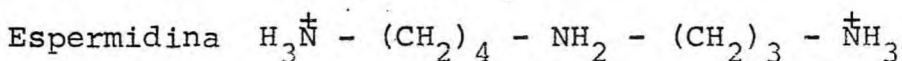
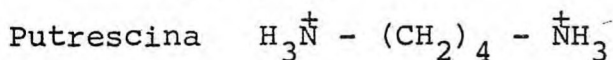
Fisher e Hodges 1969, encontraram em raiz de aveia uma ATPase estimulada por íons K^+ , ligada à fração mitocondrial, microsomas e parede celular. Esta estimulação por íons foi dependente da presença de Mg^{2+} . Brown e col. 1965, caracterizaram uma ATPase de cotilédone de *Arachis hypogaea* que foi ativada por Mg^{2+} e sensível a Na^+ e K^+ .

Em mitocôndrias de cotilédones de ervilha, com 4 dias de germinação, Malhotra e Spencer 1974, trabalhando com uma ATPase mostraram que esta enzima era estimulada em condições ótimas por Na^+ e K^+ na proporção de 5:1, e era dependente de Mg^{2+} . Uma outra ATPase de homogenato de folhas de *Avicennia nitida* também foi estimulada por Na^+ e K^+ , sendo dependente da força iônica do meio de reação e da presença de Mg^{2+} para exercer atividade. Altas concentrações destes sais revelaram-se inibidoras da atividade ATPásica (Kylin, e Gee 1970).

O mecanismo da influência exercida por íons inorgânicos com ATPase microsomal de beterraba foi estudado exaustivamente por Lindberg e col. 1974 - Lindberg 1976.

Poliaminas

As poliaminas foram descobertas em 1677, a partir do esperma do homem de onde foi cristalizada uma substância então denominada de espermina (Cohen 1971). Existem várias poliaminas, porém as mais importantes são espermina, espermidina, e seu precursor biológico, a putrescina, cujas estruturas são as seguintes:



As poliaminas são policatiões em pH fisiológico, encontrados em quase todas as bactérias e nas células animais e vegetais (Tabor e Tabor 1964). Estas aminas policatiônicas são encontradas em altas concentrações em todos os processos de crescimento. Este crescimento pode ser normal durante os processos de desenvolvimento, mas também pode ser patológico, como em tumores cancerígenos (Russel 1973). Presume-se que estes compostos tenham um importante papel metabólico, por causa de sua ampla distribuição e alta concentração, na ordem de milimolar, nos seres vivos. Embora já exista uma quantidade considerável de trabalhos a respeito das poliaminas, suas funções não estão ainda totalmente esclarecidas. Com objetivo de determinar as funções destes compostos era necessário o conhecimento da biossíntese da putrescina, que é a unidade básica das poliaminas. A biossíntese da putrescina foi estudada em vários tecidos tendo sido concluído que ela é geralmente originada de ornitina e arginina (Jänne e col. 1978, Cohen 1971), tendo as enzimas responsáveis por esta síntese a meia vida mais baixa de quantas já são conhecidas nos demais processos biológicos (Jänne e Raina 1975). A putrescina é o precursor metabólico da espermidina e da espermina (Lehninger 1976). Na literatura já está bem estabelecida a função das poliaminas em todos os processos de crescimento e proliferação celular, que é estimular várias etapas da síntese de proteínas (Cohen 1971). As poliaminas são também conhecidas por estimularem a síntese de fosfolipídios em bactérias (Peter e col. 1979), possivelmente por ativarem as enzimas que sintetizam os fosfolipídios (Fukuyama e Yamashita 1976, Jandar 1977). As poliaminas exercem uma grande influência sobre as membranas biológicas podendo agir pelo menos de duas maneiras diferentes: a) por estabilização das membranas (Tabor e Tabor 1972, Tabor e Tabor 1964); b) por atuação em várias enzimas ligadas à membrana, como ATPase (Peter e col. 1973, Heinrich-Hirsch e col. 1977), acetilcolinesterase (Kossorotow e col. 1974, Tashima e col. 1978, Peter e col. 1979), e glicose-6-fosfatase (Nordlie e col. 1979). As poliaminas podem ligar-se

diretamente ao sítio regulador da enzima, como foi descrito no trabalho feito com a acetilcolinesterase (Peter e col. 1979), ou então podem ligar-se às cargas negativas dos fosfolipídios da membrana. Desta maneira, a neutralização das cargas elétricas possivelmente levará a uma mudança de fluidez da membrana causando uma modulação nas enzimas a elas associadas.

Muitos dos efeitos biológicos descritos poderiam ser executados por cátions inorgânicos sem qualquer relação com as poliaminas. Isto torna difícil de decidir entre a relevância fisiológica das poliaminas, por um lado e a dos cátions inorgânicos por outro. Estas dificuldades residem sobretudo no fato de que na metodologia de fracionamento, as estruturas celulares são destruídas e as poliaminas podem se associar a quaisquer estruturas químicas carregadas negativamente como os fosfolipídios, o ácido desoxirribonucleico, proteínas, etc.

Objetivo do trabalho

O presente trabalho é uma investigação sobre a influência das poliaminas e dos íons Na^+ , K^+ e Mg^{2+} na F_1 -ATPase de mitocôndrias de hipocótilos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. pitiuba. Isto representa um avanço no estudo da ATPase de feijão da espécie *Vigna unguiculata* uma vez que já foi demonstrado serem Na^+ , K^+ e Mg^{2+} efetores da ATPase de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. seridô (Silva Lima e Peter 1980).

II - MATERIAL E MÉTODOS

A - MATERIAL

1. Sementes. No presente trabalho foram utilizadas sementes de feijão de corda *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. pitiuba, provenientes do Banco de Sementes do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará. Este feijão era originalmente denominado *Vigna sinensis* (L.) Savi cv. pitiuba e esta denominação foi corrigida segundo Verdcourt 1970. As sementes eram acondicionadas em frascos de vidro e armazenadas a uma temperatura de aproximadamente 4°C.

2. Reagentes. Foram utilizados os reagentes abaixo relacionados com as respectivas procedências:

E. Merck Ag. Darmstadt: Tris, ATP, cromatoplasmas de sílica gel 60: (a) tipo com espessura de 0,25mm e (b) tipo para nanocromatografia, EDTA, TCA, 4-metilaminofenol sulfato (metol) e ácido perclórico.

Nutritional Biochemical Corporation: ácido desoxicolico.

BOH Chemicals Ltd. Pool England: S.D.S.

Sigma Chemical Company: B.S.A., Triton X 100, ATP.

Serva Feinbiochemical Heidelberg: espermina 4.HCl, espermidina 3.HCl, putrescina 99% e cloreto de dan-sil.

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

B - MÉTODOS

1. Condições de germinação

As sementes foram selecionadas para germinação e previamente esterilizadas por imersão em hipoclorito de sódio 5.2%, durante 5 minutos, sendo em seguida lavadas com água destilada, para retirar o excesso de cloro residual. Estas sementes foram semeadas em depósitos de plástico, contendo vermiculite esterilizada (200°C durante 12 horas) e água na proporção de 2:1 (v/v). A germinação, foi realizada na obscuridade, a uma temperatura de aproximadamente 26-28°C, durante 7 dias.

2. Preparação Mitocondrial

A preparação mitocondrial foi realizada segundo a técnica de Ikuma (1970) modificada por Silva Lima e col. (1977). O tecido vegetal utilizado para o isolamento da fração mitocondrial foi o hipocótilo proveniente de plântulas colhidas após 7 dias de semeadura. Os hipocótilos (200 gramas) foram cortados em secções de aproximadamente 3cm de comprimento, lavado duas vezes em água destilada e uma vez com meio de homogeneização e macerados com meio de homogeneização na proporção de 1:1 (p/v) em gral de porcelana. O meio de homogeneização tinha a seguinte composição: manitol 0,3M, EDTA 1mM, BSA 0,1%, cisteína 4mM, fosfato de potássio 2,5mM, em pH final de 7,4. Após a maceração o homogenato foi filtrado em tela de nylon, e o pH ajustado a 7,4 com KOH 6N, sendo posteriormente submetido a centrifugação diferencial em centrífuga refrigerada RC-50 (Sorval), segundo esquema exposto no diagrama II e relatado a seguir. O homogenato foi centrifugado a 500 xg durante 10 minutos. O precipitado resultante desta centrifugação continha amido, restos celulares e núcleos, e o sobrenadante, contendo a fração mitocondrial, foi submetido a uma centrifugação de 12.000 x g por 20 minutos, provocando a sedi-

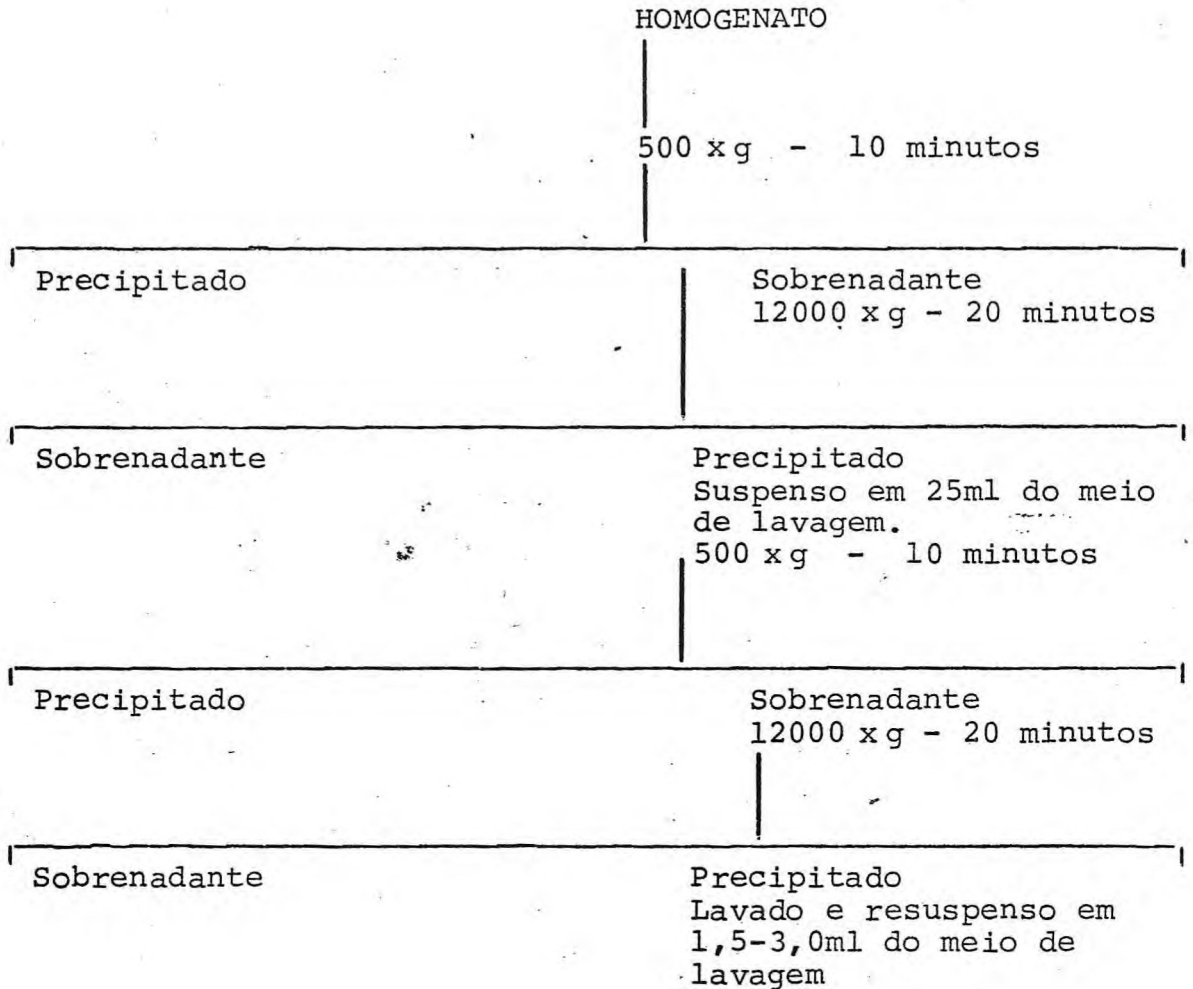


Diagrama II - Esquema de centrifugação para o isolamento de mitocôndrias de hipocótilo de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. pitiuba.

mentação das mitocôndrias. O precipitado mitocondrial foi suspenso em 25ml do meio de lavagem. O meio de lavagem era composto de: manitol 0,3M, BSA 0,1% e fosfato de potássio 2,5mM com pH final de 7,2. A suspensão mitocondrial foi homogeneizada manualmente, em um homogeneizador de Potter-Elvehjem, e centrifugada a 500 x g durante 10 minutos, com a finalidade de eliminar possíveis contaminações de amido ou restos celulares remanescentes. O sobrenadante obtido foi centrifugado a 12.000 x g durante 20 minutos, obtendo-se um precipitado mitocondrial, que foi suspenso em meio de lavagem em volume que variava de 1,5 a 3ml. Todas as etapas do isolamento das mitocôndrias foram realizadas em câmara fria à temperatura de 6°C, usando-se material e meios previamente resfriados.

3. Dosagem de proteínas

A concentração de proteína mitocondrial foi determinada pelo método de biureto modificado por Gornall e col. (1949). A modificação consistiu na adição de colato de sódio o qual solubiliza as proteínas das membranas. Os reagentes foram adicionados sucessivamente, homogeneizando-se após cada adição na seguinte ordem: colato de sódio 0,25%, alíquota da fração mitocondrial, hidróxido de sódio 0,8% e sulfato de cobre 0,1%. Após 15 minutos, necessários para o desenvolvimento da cor violeta característica da reação do biureto, foi feita a leitura da absorbância a 540nm em fotômetro Spekol. A concentração de proteína foi estimada em relação a uma curva padrão de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina, na qual foi determinada que 1mg de proteína tinha uma absorbância média de 0,081.

4. Lise das mitocôndrias

A fração mitocondrial isolada foi diluída em tampão Tris-HCl 60mM pH 8 em volume final de 30ml. A lise foi provocada por adição de 20µl de Triton X-100 0,1v%.

5. Determinação da atividade ATPásica

Modo operatório: o meio de reação para esta determinação era composto de Tris-HCl 3mM, $MgCl_2$, KCl, NaCl e poliaminas foram adicionadas em concentrações variáveis conforme está indicado nas legendas das figuras. A reação foi desencadeada ou com a adição de concentrações variáveis de ATP indicado nas legendas das figuras ou com a adição da alíquota de 1ml de fração mitocondrial lisada contendo 2 ou 3mg de proteína. O volume final em cada tubo de ensaio foi de 10ml. Alíquotas de 1ml foram retiradas no tempo zero e após 15 minutos de incubação a 30°C. As alíquotas de 1ml retiradas nos tempos de 0 a 15 minutos foram rapidamente misturadas a 2ml de TCA/SDS nas concentrações de 0,4% e 6% respectivamente (Arnold e col. 1976). O TCA determinava a parada da reação enzimática por desnaturação protéica, sendo a precipitação de proteína evitada pelo SDS. Alíquotas desta mistura foram retiradas para a determinação de fósforo inorgânico (Fiske e Subbarow 1925) de cujos resultados foi estimada a atividade ATPásica.

A atividade específica, a não ser em caso mencionado, foi medida em mU/mg de proteína. Uma unidade (U) corresponde a um μ mol de MgATP hidrolizado por minuto.

6. Dosagem de fósforo inorgânico (Fiske e Subbarow 1925)

Modo operacional: tomando um volume da alíquota de fração mitocondrial, os seguintes reagentes foram sucessivamente adicionados em tubos de ensaio, na seguinte ordem: molibidato "ácido" 0,6ml (5g $(NH_4)_6 Mo_7 + O_{24} \cdot 4H_2O$, 40ml H_2SO_4 10N e água qsp 1000ml), metol (metol 1g, bissulfito de sódio 3g e água qsp para 100ml) 0,5ml e água qsp 5ml. A coloração desenvolveu-se durante 15 minutos, após os quais as leituras foram feitas em fotômetro Spekol a 660nm contra uma prova em branco dos reagentes sem a fração mitocondrial.

Uma curva de padronização em presença de diferentes concentrações de fosfato inorgânico (Pi) foi feita previamente.

7. Determinação das condições do estado estacionário da F_1 -ATPase mitocondrial

Os dados referente a atividade ATPásica foram obtidos após 15 minutos de incubação. Para que este tempo fosse escolhido foi determinado previamente que neste intervalo havia correlação linear entre tempo de incubação e liberação de fosfato inorgânico conforme está indicado na fig. 1.

8. Preparação das soluções de poliaminas

As poliaminas, espermina, espermidina e putrescina foram preparadas em tampão Tris-HCl 60mM pH 8,0.

9. Influência do tempo de pré-incubação da fração mitocondrial sobre a atividade ATPásica em presença e ausência de espermina.

A fração mitocondrial incubada previamente a 30°C com espermina nos tempos 5, 10, 15, 20, 30 e 40 minutos não modificou o efeito das poliaminas que permaneceu idêntico ao obtido em ausência de incubação prévia. (Figura 2)

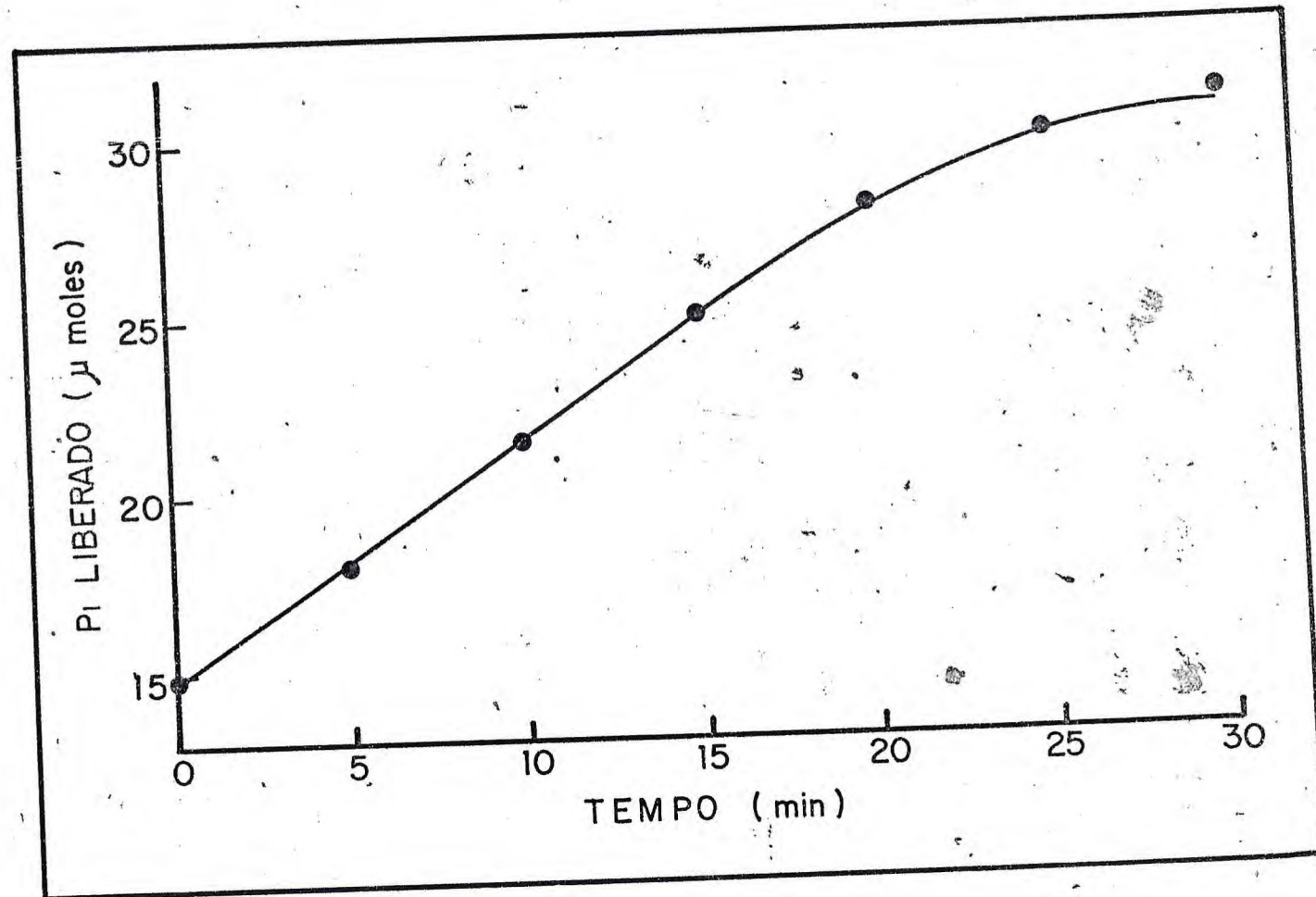
10. Cálculo para a determinação da concentração de MgATP e Mg^{2+} livre

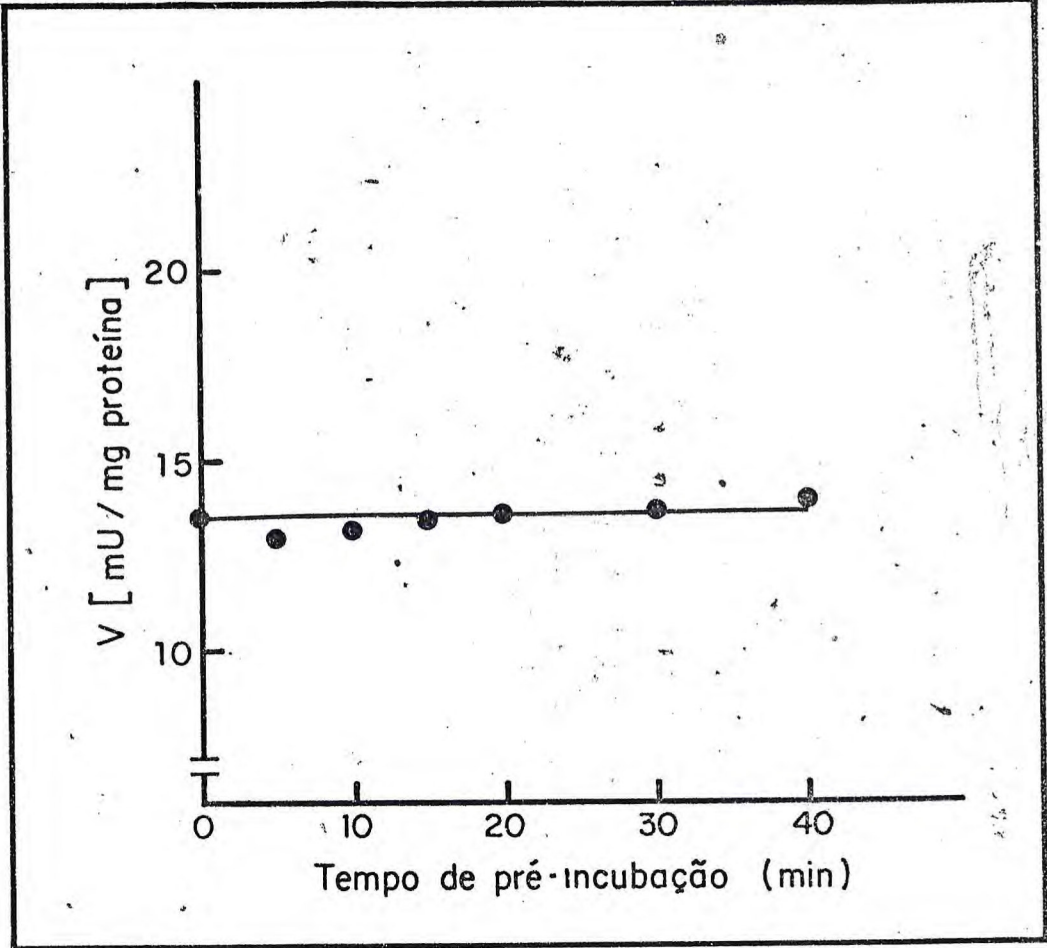
A combinação da equação para a dissociação do complexo MgATP (equação 1) com as equações para a conservação das massas de $(Mg^{2+})_t$ (equação 2) e de $(ATP)_t$ (equação 3) resulta na equação quadrática abaixo expressa:

$$(1) \quad k_d = \frac{(ATP) \cdot (Mg^{2+})}{(MgATP)}$$

$$(2) \quad (Mg^{2+})_t = (Mg^{2+}) + (MgATP)$$

Figura 1 - Liberação de fosfato (P_i) dependente do tempo de incubação da fração mitocondrial. O meio de incubação era composto de NaCl 0,1M, KCl 0,1M; $MgCl_2$ 3mM e Tris-HCl 3mM pH 8 e a este meio eram adicionados 2,5mg da fração mitocondrial previamente incubada a 30°C durante 10 minutos. A reação desenvolveu-se durante 15 minutos e foi iniciada pela adição de ATP em concentração final de 3mM. As demais condições estão indicadas em Material e Método.





$$(3) \quad (\text{ATP})_t = (\text{ATP}) + (\text{MgATP})$$

$$(4) \quad (\text{MgATP}) = \frac{(\text{Mg}^{2+})_t + (\text{ATP})_t + k_d}{2} \pm \sqrt{\left(\frac{(\text{Mg}^{2+})_t + (\text{ATP})_t + k_d}{2}\right)^2 - (\text{ATP})_t}$$

Utilizando-se os valores negativos da raiz na equação (4) foram calculados (calculador programável) os valores das concentrações de MgATP e a partir da equação 2 foram determinadas as concentrações de Mg^{2+} livre baseando-se em dados de ATP total e Mg^{2+} total, como está expresso na Tabela I. (Ahlers e col. 1978).

11. Determinação das poliaminas nas mitocôndrias

As poliaminas foram determinadas qualitativamente e quantitativamente em mitocôndrias liofilizadas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. pitiuba, segundo Seiler 1975. Esta determinação consiste das etapas abaixo descritas:

1. Obtenção da fração contendo poliaminas:

Etapa a) Extração com ácido perclórico: 8mg de mitocôndrias liofilizadas foram suspensas em 1ml de ácido perclórico 0,2N (70%). Em seguida a suspensão foi centrifugada a 3.000rpm (International Clinical Centrifuge (Modelo CLA 4487 x 7) durante 5 minutos sendo desprezado o precipitado (Seiler 1973).

Etapa b) Extração com benzeno: ao sobrenadante, contendo as poliaminas, obtido na Etapa a), foram adicionados 5ml de benzeno. Após uma forte agitação manual, a suspensão foi deixada em repouso durante 5 minutos. Em seguida, a fase benzênica contendo compostos apolares (ácidos graxos de cadeia longa por exemplo) foi removida e

TABELA I - Esquema de combinação das concentrações de Mg^{2+} total e de ATP total que possibilitam a obtenção de diferentes valores de Mg^{2+} livre e de MgATP. A maneira de calcular estes valores está indicada em Material e Métodos.

MgATP (mM)	0,05		0,075		0,1		0,2		0,3		0,5		0,75		1,0		2,0	
	Mg^{2+}_t (mM)	ATP _t (mM)	Mg^{2+}_t (mM)	ATP _t (mM)	Mg^{2+}_t (mM)	ATP _t (mM)	Mg^{2+}_t (mM)	ATP _t (mM)	Mg^{2+}_t (mM)	ATP _t (mM)	Mg^{2+}_t (mM)	ATP _t (mM)	Mg^{2+}_t (mM)	ATP _t (mM)	Mg^{2+}_t (mM)	ATP _t (mM)	Mg^{2+}_t (mM)	ATP _t (mM)
0,01	0,06	1,125	0,085	1,688	0,11	2,25	0,21	4,5	0,31	6,75	0,51	11,25	0,76	16,88	1,01	22,5	2,01	45,0
0,02	0,07	0,59	0,095	0,88	0,12	1,18	0,22	2,35	0,32	3,53	0,52	5,88	0,77	8,81	1,02	11,75	2,02	23,5
0,03	0,08	0,41	0,105	0,61	0,13	0,82	0,23	1,63	0,33	2,45	0,53	4,08	0,78	6,13	1,03	8,17	2,03	16,33
0,05	0,1	0,21	0,125	0,40	0,15	0,53	0,25	1,06	0,35	1,59	0,55	2,65	0,80	3,98	1,05	5,3	2,05	10,6
0,1	0,15	0,16	0,175	0,24	0,2	0,32	0,3	0,63	0,4	0,95	0,6	1,58	0,85	2,36	1,1	3,15	2,1	6,3
0,2	0,25	0,104	0,275	0,156	0,3	0,208	0,4	0,415	0,5	0,65	0,7	1,04	0,95	1,56	1,2	2,08	2,2	4,15
0,3	0,35	0,086	0,375	0,129	0,4	0,172	0,5	0,343	0,6	0,52	0,8	0,86	1,05	1,29	1,3	1,72	2,3	3,45
0,5	0,55	0,072	0,575	0,107	0,6	0,143	0,7	0,286	0,8	0,43	1,0	0,715	1,25	1,073	1,5	1,43	2,5	2,86
1,0	1,05	0,061	1,075	0,091	1,1	0,122	1,2	0,243	1,3	0,365	1,5	0,608	1,75	0,911	2,0	1,215	3,0	2,43
2,0	2,05	0,055	2,075	0,083	2,1	0,111	2,2	0,222	2,3	0,332	2,5	0,554	2,75	0,831	3,0	1,108	4,0	2,215
3,0	3,05	0,54	3,075	0,80	3,1	0,107	3,2	0,214	3,3	0,322	3,5	0,536	3,75	0,804	4,0	1,072	5,0	2,143
4,0	4,05	0,053	4,075	0,079	4,1	0,105	4,2	0,211	4,3	0,316	4,5	0,527	4,75	0,790	5,0	1,054	6,0	2,108
5,0	5,05	0,052	5,075	0,078	5,1	0,104	5,2	0,209	5,3	0,313	5,5	0,522	5,75	0,788	6,0	1,043	7,0	2,086

desprezada.

Etapa c) Dansilação das poliaminas I de acordo com o método desenvolvido por Seiler e Weicham (1966), as poliaminas foram dansiladas. Ao sobrenadante obtido na etapa 2, foram adicionados 2ml de cloreto de dansil 2% em acetona, 10ml de Na_2CO_3 saturado e 6ml de acetona. A mistura foi submetida a uma forte agitação manual e foi deixada em repouso durante 12 horas, no escuro.

Etapa d) Extração das poliaminas dansiladas: a mistura resultante da etapa 3, foram adicionados 5ml de benzeno, que após agitação foi centrifugada a 3.000rpm durante 10 minutos (International Clinical Centrifuge Modelo CL A 4487 x -7).

Etapa e) Evaporação: a fase benzênica resultante da etapa d) (poliaminas dansiladas são solúveis em benzeno) foi submetida a evaporação em evaporador rotatório. (Heidolph, RFA) até a obtenção da fração seca contendo poliaminas.

2. Determinação qualitativa das poliaminas:

A fração obtida da etapa final de evaporação foi dissolvida em 2ml de benzeno. Posteriormente 0,01ml desta solução foi aplicado em placas cromatográficas especiais de sílica gel 60 (tipo b para resolução da ordem de nanograma) para cromatografia de alta resolução (HPTEC: "high performance thin layer chromatography") com um aplicador automático (Desaga Autoliner-Heidelberg, RFA). Estas cromatoplasmas foram reveladas em câmara saturada com o solvente ciclo hexano + acetato de etila 1:1 (v:v). Um controle com as po-

liaminas (espermina, espermidina e putrescina) dansiladas foi aplicado simultaneamente na mesma placa cromatográfica.

3. Determinação quantitativa:

As poliaminas mitocondriais dansiladas obtidas de acordo com a etapa (1) do processo de determinação anteriormente descrito, bem como solução-padrão de poliaminas dansiladas foram aplicadas em cromatoplasmas de sílica gel 60 tipo a (Merck Darmstadt RFA) por intermédio do aplicador automático já referido. As cromatoplasmas foram reveladas em câmara saturada com: ciclo-hexano + acetato de etila 1:1 (v:v) uma vez, ciclo-hexano + acetato de etila 7:5 (v:v) 2 vezes e benzeno + ciclo-hexano + álcool etílico 17:3:3 (v:v:v) 2 vezes. (Seiler e Schimidt-Glenewinkel 1975)

Preliminarmente foram feitas cromatografias com as soluções padrões de poliaminas dansiladas que após revelação foram removidas das placas cromatográficas juntamente com a sílica das mesmas, sendo a remoção controlada por luz ultra violeta para que tal remoção fosse completa. As bandas correspondentes a cada uma das três poliaminas foram dissolvidas em 3ml de acetona e centrifugadas a 3.000rpm (International Clinical Centrifuge Modelo CL A 4487 x -7) durante 3 minutos. O precipitado resultante desta centrifugação foi abandonado e o sobrenadante cetônico foi saturado em evaporador rotatório. A fração seca foi dissolvida em 2ml de benzeno posteriormente diluído convenientemente para obtenção de um padrão de fluorescência determinada em espectrofotômetro Beckman DU, em comprimento de

onda 360nm para cada uma das poliaminas. A concentração das poliaminas da fração mitocondrial obtida pelo processo já descrito, foi medida em comparação com as curvas padrões expressas na Fig. 3.

12. Solubilização da ATPase

Com o objetivo de solubilizar a ATPase ligada à membrana, as mitocôndrias de feijão pitiuba, logo após terem sido isoladas foram submetidas a cinco tipos de tratamento, a saber:

Tratamento 1: a suspensão mitocondrial foi completada a 20ml com um meio contendo Tris-HCl 3mM pH 8,0 e $MgCl_2$ 3mM. Para a lise da preparação, 20 μ l de Triton X-100 0,1v% foram adicionados à suspensão mitocondrial diluída. Esta foi posteriormente centrifugada a 7.500 xg durante 10 minutos seguidos de uma nova centrifugação a 12.000 xg durante 30 minutos. Os testes de atividade ATPásica foram feitos com o sobrenadante onde se supunha encontrar a enzima solúvel e com o precipitado resuspenso para controle da percentagem de solubilização da enzima. (Peter e Ahlers 1975).

Tratamento 2: o volume de 20ml com um meio contendo Tris-HCl 60mM pH 8,0 e centrifugação a 23.500 xg durante 30 minutos em ultra-centrífuga International A 170. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado suspenso em 20ml de Tris-HCl 2mM pH 8,0 foi deixado em repouso durante 30 minutos e recentrifugado a 23.500 xg durante 30 minutos. Os testes de atividade ATPásica foram feitos no sobrenadante e no precipitado.

Tratamento 3: este tratamento é uma variante do tratamento 2 a modificação consistiu na adição de 20 μ l de

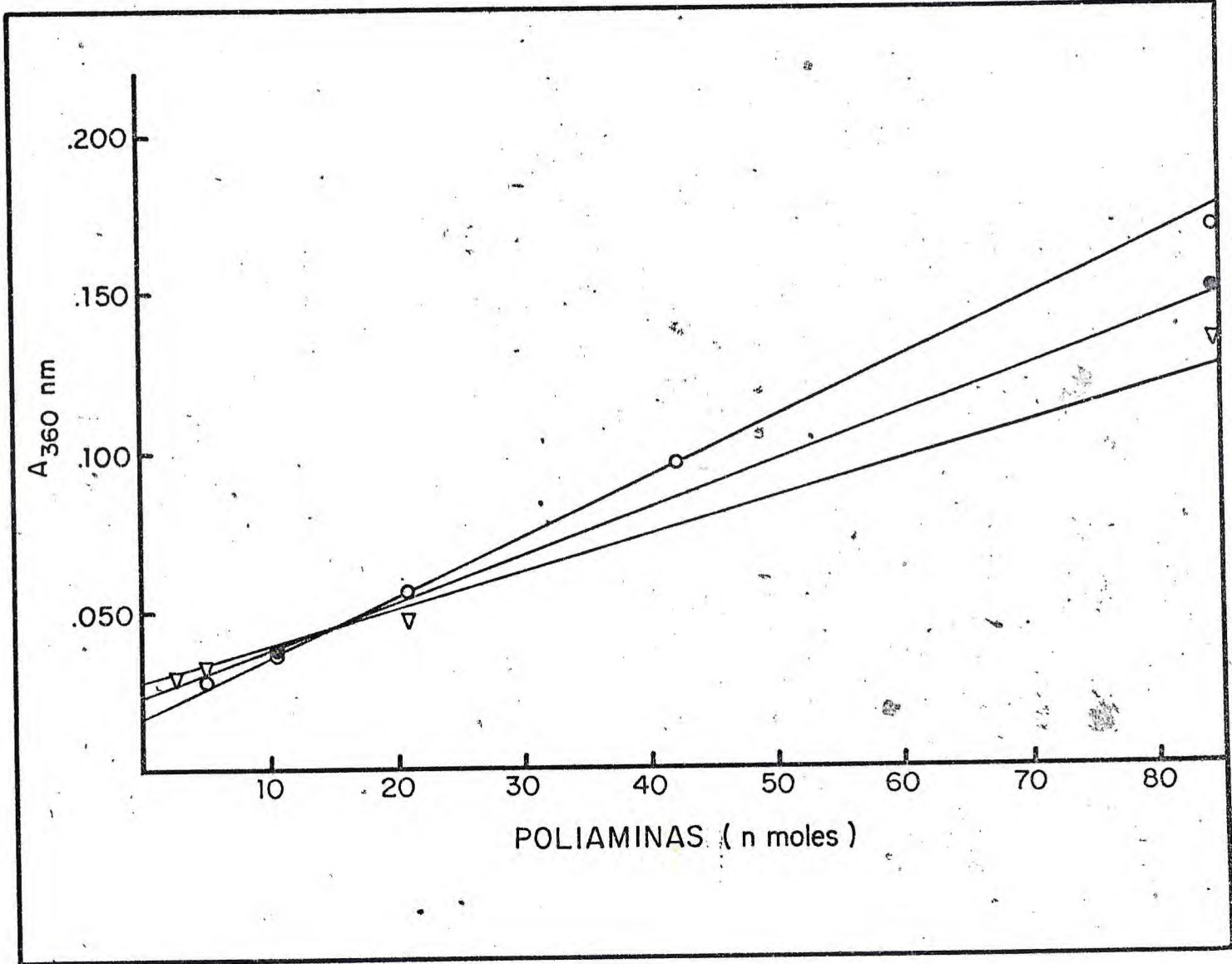
Figura 3 - Curvas padrões para a determinação quantitativa das poliaminas.

Condições experimentais descritas em Material e Métodos.

ESPERMINA (○)

ESPERMIDINA (●)

PUTRESCINA (Δ)



Triton X-100 0,1v% para reforçar a lise mitocondrial. A atividade ATPásica foi igualmente testada no sobrenadante e no controle.

Tamanho 4: a suspensão mitocondrial foi completada a 20ml com Tris HCl 3mM pH 7,8 e a ela foram adicionados 20µl de Triton X-100 0,1v%. Esta suspensão foi centrifugada a 12.000 xg durante 30 minutos. Os testes de atividade ATPásica foram feitos no sobrenadante e no precipitado.

Tamanho 5: a suspensão mitocondrial foi completada a 20ml com Tris-HCl 2mM, pH 7,8. A lise mitocondrial foi provocada por 20µl de ácido desoxicólico 0,1% (Kagawa e Racker 1966), e a suspensão foi homogeneizada manualmente com o homogeneizador de Potter-Elvehjem e centrifugada durante 30 minutos a 12.000 xg. Os testes de atividade ATPásica foram feitos no sobrenadante e no precipitado.

13. Dosagem de Na⁺ e K⁺

A fração mitocondrial foi suspensa em 2 meios diferentes um contendo Tris HCl 3mM pH 8,0 e outro contendo manitol 0,3M ajustado a pH 7,2 com tampão fosfato de potássio 2,5mM. As 2 suspensões foram liofilizadas e alíquotas com peso determinado previamente (50 e 30mg) foram dissolvidas em HNO₃ concentrado. As amostras assim dissolvidas foram incubadas a 100°C durante 1 hora (Günther e Peter 1979). O Na⁺ e o K⁺ intracelulares foram determinados em fotômetro de chama (Tipo K⁺ - Li⁺ - Na⁺ T.M. - Beckman).

III - RESULTADOS

1. Determinação do conteúdo de poliaminas nas mitocôndrias

A presença das poliaminas espermina, espermidina e putrescina na fração mitocondrial de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. pitiuba é mostrada na figura 4 comparada a uma determinação padrão das mesmas poliaminas, bem como à mistura dos padrões com a fração mitocondrial. A análise quantitativa das poliaminas está expressa na Tabela II.

2. Determinação do conteúdo de Na⁺ e K⁺ nas mitocôndrias

A fração mitocondrial foi suspensa em dois meios diferentes e liofilizadas. Os meios foram Tris-HCl 3mM pH 8 e o meio de lavagem contendo manitol tal como foi descrito em Material e Métodos. A determinação (Tabela III) revelou resultados mais elevados de Na⁺ e sobretudo de K⁺ quando as mitocôndrias foram liofilizadas em meio de lavagem. Isto é explicado pela presença de K⁺ neste meio em forma de tampão fosfato. Quanto ao Na⁺ o número de determinações não é suficiente para que se avalie a significância da diferença constatada.

3. Efeito da concentração do substrato Mg ATP na velocidade da reação ATPásica

Preliminarmente foram feitas experiências com concentrações crescentes de substrato no intervalo de 0,1 a 3mM, em presença de quantidades fixas de proteína mitocondrial (3mg), dotadas de atividade ATPásica (Figura 5). A curva é mostrada nesta figura hiperbólica retangular como a curva de Michaelis-Menten. Verificamos um aumento da atividade ATPásica relacio

Figura 4 - Determinação qualitativa das poliaminas presentes nas mitocôndrias de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. pitiuba.

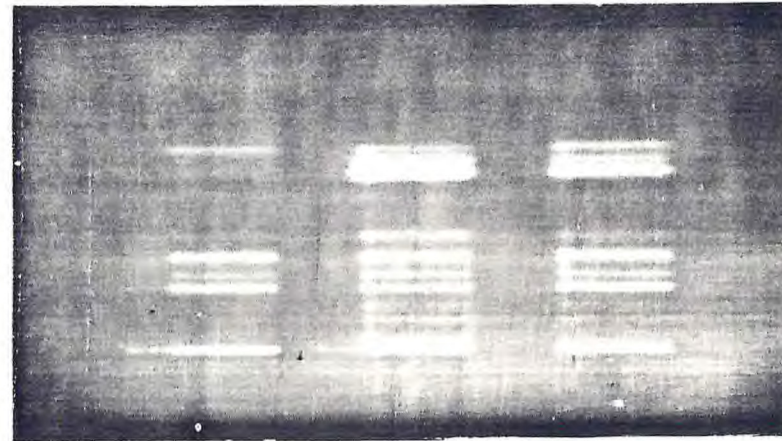
As condições experimentais estão descritas em Material e Métodos.

PADRÃO +

PADRÃO

MITOCÔNDRIAS

MITOCÔNDRIAS



Putrescina —————
Espermidina —————
Espermina —————

TABELA II - Concentração de poliaminas na fração mitocondrial de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. pitiuba.

Poliamina	Concentração nmoles/mg de proteína mitocondrial
Espermina	0,54
Espermidina	0,50
Putrescina	0,40

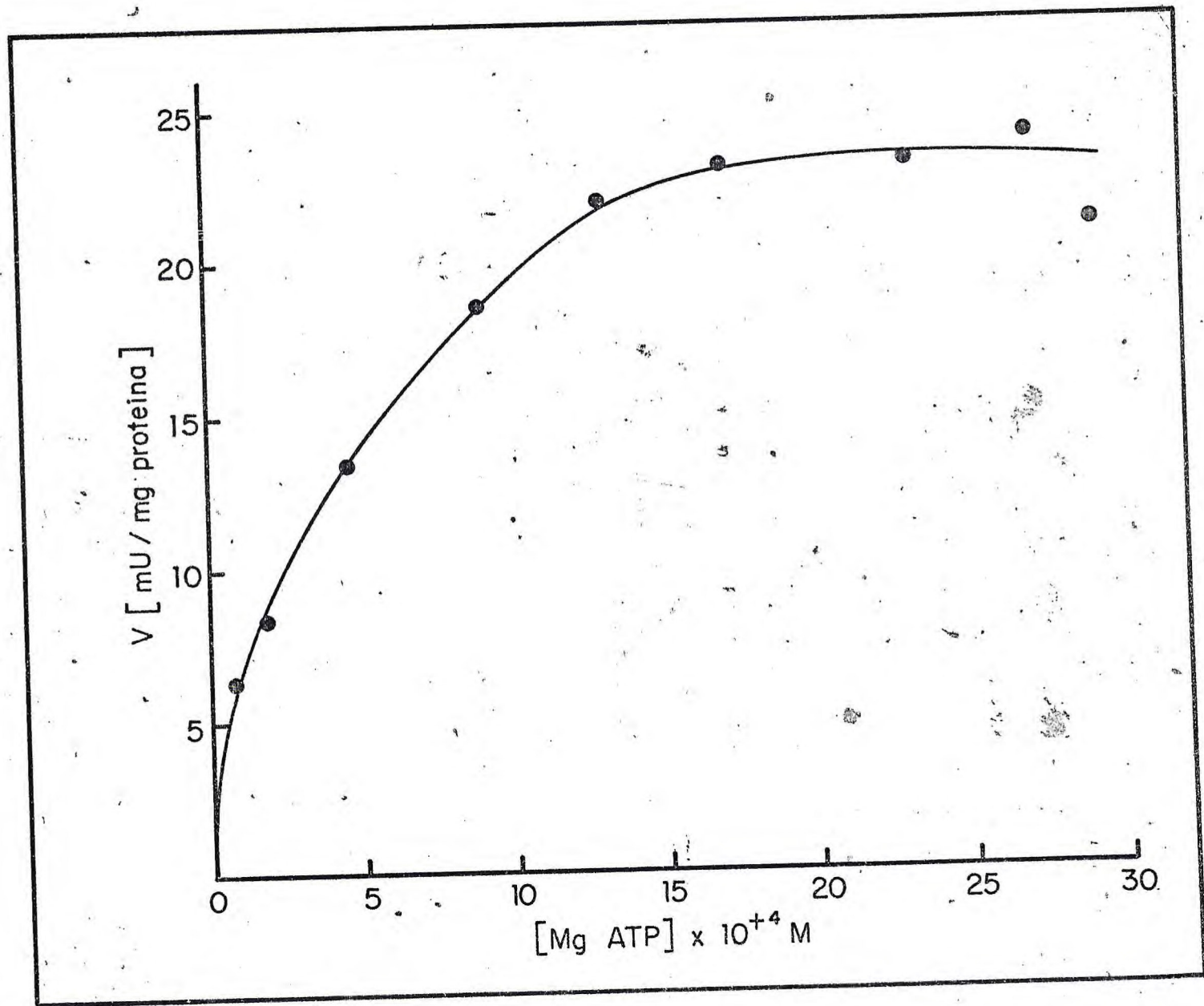
As condições de determinação quantitativa e qualitativa das poliaminas estão descritas em Material e Métodos e nas legendas das figuras 3 e 4.

TABELA III - Determinação do conteúdo de Na⁺ e K⁺ nas mitocôndrias

Meio Tris	0,127 mMoles de Na ⁺ /mg de proteína mitocondrial
	0,292 mMoles de K ⁺ /mg de proteína mitocondrial
Meio manitol e fosfato potássio.	0,215 mMoles de Na ⁺ /mg proteína mitocondrial
	1,74 mMoles de K ⁺ /mg de proteína mitocondrial

A determinação foi feita em espectrofotômetro de chama (tipo Beckman K⁺ - Li⁺ - Na⁺ T.M.), e segundo as condições experimentais descritas em Material e Métodos.

Figura 5 - Efeito da concentração do substrato MgATP na atividade ATPásica de mitocôndrias lisadas de *Vigna unguiculata*. A atividade ATPásica foi determinada em meio contendo Tris-HCl 3mM pH 8 e Mg²⁺ livre 0,8mM. As demais condições experimentais bem como a definição de unidade de atividade ATPásica (U) estão indicadas em Material e Métodos.



nado ao aumento da concentração do substrato até 2mM. O aumento da concentração do substrato acima de 2mM não determinaram aumento da velocidade da reação que aparentemente começa a ser inibida. A concentração ótima da saturação do substrato MgATP foi de $2,3 \times 10^{-3}$ M.

4. Efeito da concentração de proteína da fração mitocondrial sobre a atividade ATPásica

As experiências foram feitas mantendo-se constante a concentração do substrato, MgATP 3mM e variando-se a fração mitocondrial no intervalo compreendido entre 0 e 9 mg. A figura 6 mostra que a atividade ATPásica aumenta linearmente em função de quantidades crescentes da enzima. As demais experiências relatadas no correr do trabalho foram realizadas com 2 e 3 mg de proteína da fração mitocondrial.

5. Influência da concentração de proteínas mitocondriais no efeito exercido pelas poliaminas sobre as mitocôndrias de *Vigna unguiculata*

Variando-se a concentração da proteína mitocondrial nos limites 0,6 a 5,4 mg/ml e mantendo-se a concentração de cada uma das poliaminas isoladamente em 1,2mM, constatou-se que as mesmas ativavam a ATPase quando a concentração de proteína mitocondrial era de 2,5 a 3 mg como está expresso na Tabela IV. A ação das poliaminas não se exerceu em concentrações inferiores ou superiores aos limites protéicos referidos. Todas as demais experiências foram então realizadas em presença de 2,5 a 3 mg/ml de proteína mitocondrial.

6. Efeito do Na^+ na atividade ATPásica

O efeito do sódio na atividade ATPásica foi estudado em presença de concentrações crescentes de Na^+ e em um meio de reação com ou sem K^+ como é visto na figura 7. A ATPase mitocondrial foi ativada pelos íons Na^+ na ausência dos íons K^+

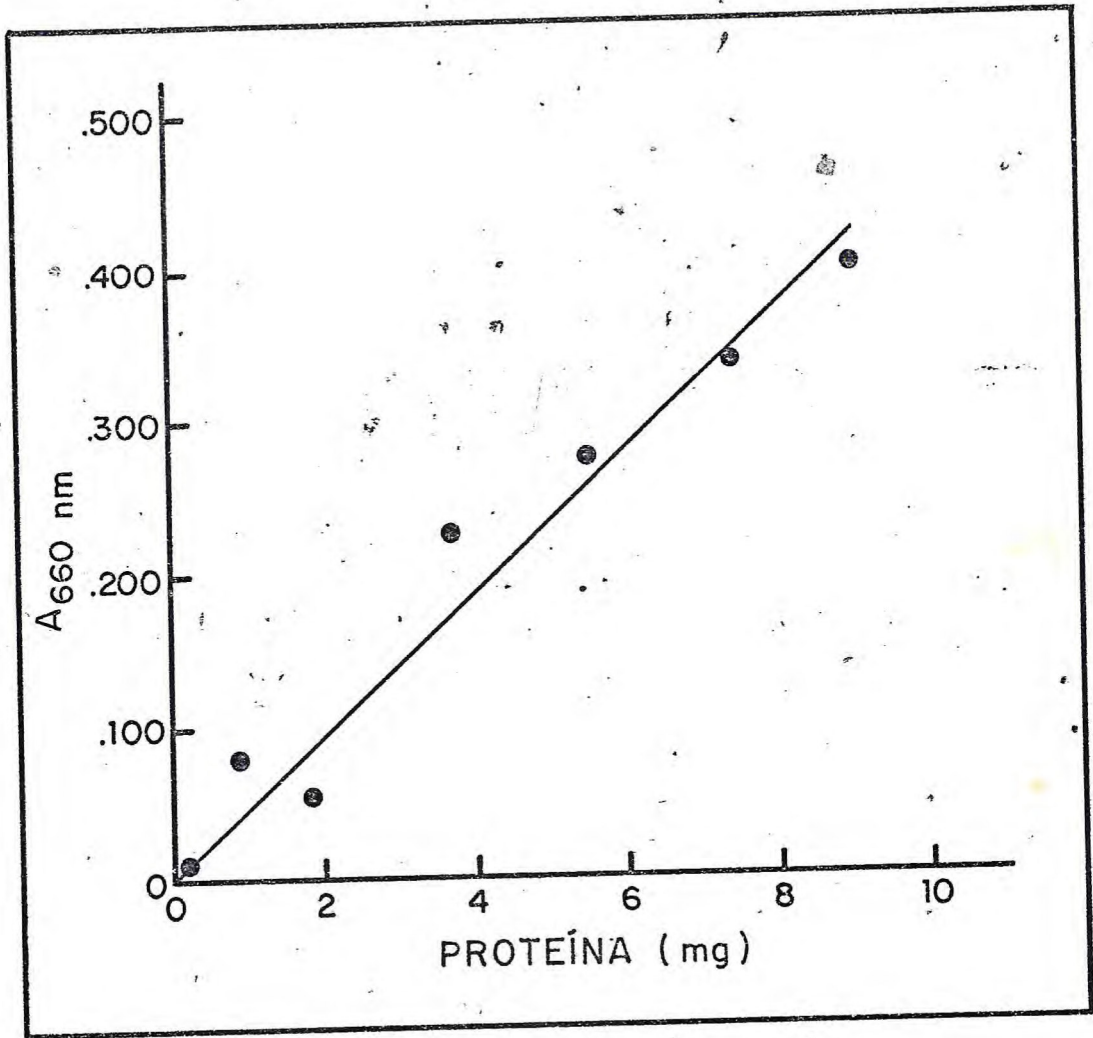


TABELA IV - Influência da concentração de proteínas mitocondriais na ativação da ATPase ligada à membrana mitocondrial, pelas poliaminas

Poliaminas (1,2mM)	Proteína (mg/ml)	% Ativação
ESPERMINA	1,0	41
	2,0	31
	2,5	66 81
	3,0	22 25
	5,4	8 16 18
	ESPERMIDINA	0,8
1,5		15 22
2,0		18 32
2,6		66 85
3,0		25 35
5,0		10
PUTRESCINA	0,6	11 22
	1,2	43
	2,5	35 42
	5,4	7 8

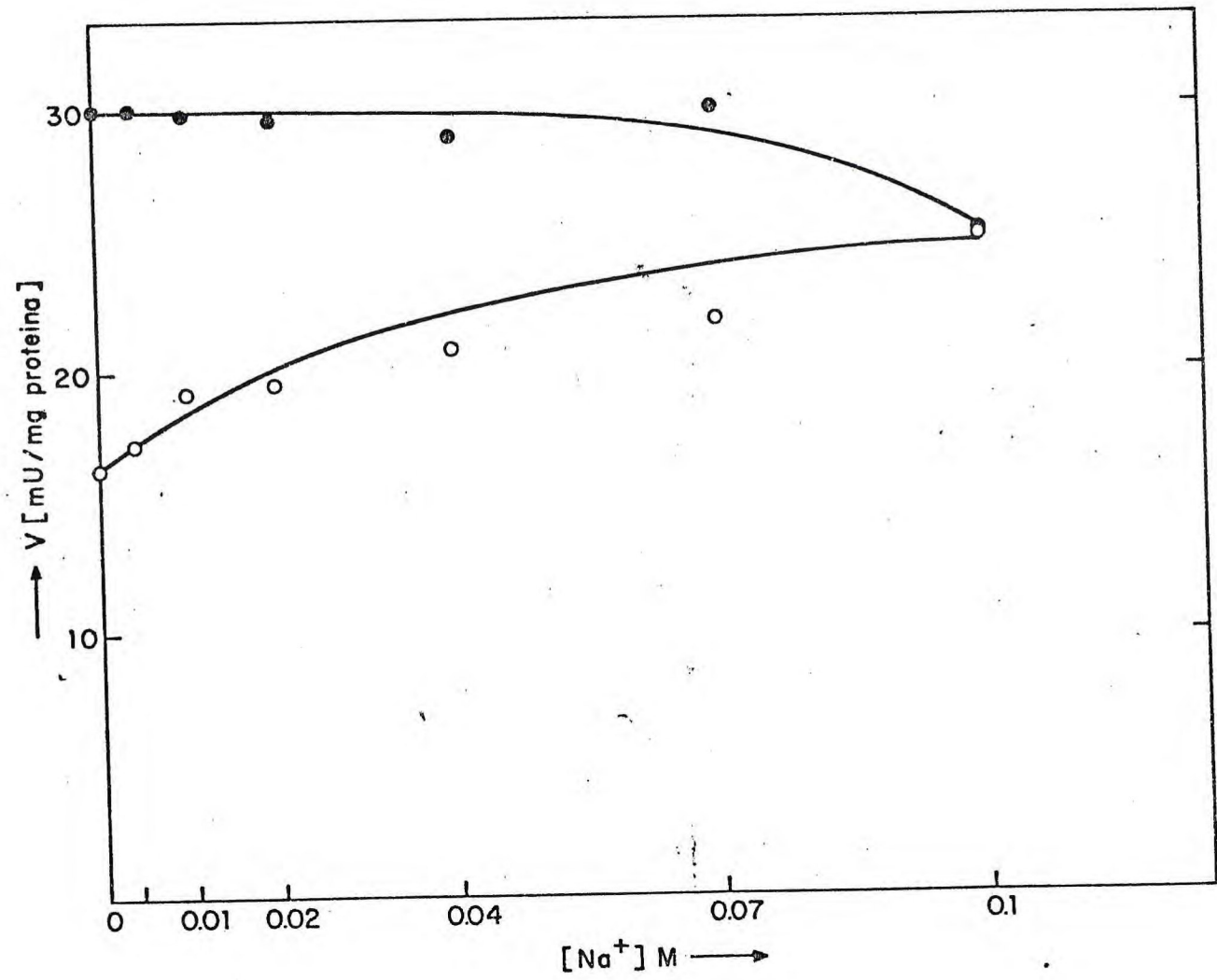
A atividade ATPásica foi determinada em presença de concentração saturante do complexo MgATP, isto é, Mg^{2+} 3mM e ATP 3mM. As demais condições experimentais estão descritas em Material e Método.

Figura 7 - Efeito da concentração de Na^+ sobre a atividade de F_1 -ATPase ligada à membrana mitocondrial de *Vigna unguiculata*, em ausência e presença de K^+ .

O meio da reação continha: Tris-HCl 3mM pH 8, MgATP 2,3 mM e Mg^{2+} 0,8mM. As demais condições experimentais estão descritas em Material e Métodos.

KCl = 0 (●)

KCl = 0,1M (○)



e a ativação máxima foi obtida já com 0,7 M de Na^+ . Em presença de K^+ 0,1 M não houve influência ativadora dos íons Na^+ .

7. Efeito do K^+ na atividade ATPásica

O efeito do potássio na atividade ATPásica foi estudado em presença de concentrações crescentes de K^+ e em meio de reação com ou sem Na^+ como é visto na figura 8. A ATPase mitocondrial foi ativada pelos íons K^+ na ausência de íons Na^+ aparentemente em grau mais elevado do que a ativação provocada pelo Na^+ em ausência de K^+ (figura 7). Em presença de Na^+ 0,1 M não houve influência ativadora dos íons K^+ .

8. Influência das poliaminas sobre a atividade ATPásica

Em meio de reação contendo MgATP na concentração de 2,3mM e Mg^{2+} livre 0,8mM e em ausência de Na^+ e K^+ , foi testada a influência da espermina (Fig. 9), da espermidina (Fig. 10) e da putrescina (Fig. 11) em concentrações variáveis, no intervalo de 0 a 1,2mM. Verificamos que a concentração ótima para ativação da ATPase pelas poliaminas foi de 1mM, sendo 71% para a espermina (Fig. 9), 49% para a espermidina (Fig. 10) e 40% para a putrescina (Fig. 11). Já em presença de Na^+ e K^+ 0,1 M não houve ativação da ATPase pela espermina (Fig. 9) nem pela espermidina (Fig. 10). Contudo a putrescina revelou uma ação ativadora da ATPase quer em presença de Na^+ 0,1M quer em presença de K^+ 0,1 M igualmente (Fig. 11). O gráfico traçado por analogia ao gráfico de Dixon (Fig. 12) expressa em função do inverso da atividade ATPásica estimulada pela espermina versus o inverso da concentração deste ativador não apresentou linearidade. Além disso, o gráfico de Hill (Fig. 13) que expressa $\log \frac{V_{\max} - v}{v}$ versus $-\log(\text{espermina})$, permitiu o cálculo do coeficiente de Hill que teve o valor de n_H igual a 1,3 o que indica a existência de cooperatividade positiva. O valor da velocidade máxima (V) foi determinado a

Figura 8 - Efeito da concentração do K^+ sobre a atividade da F_1 -ATPase ligada à membrana mitocondrial de *Vigna unguiculata*, em ausência e presença de Na^+ .

O meio da reação continha: Tris-HCl 3mM pH 8, MgATP 2,3mM e Mg^{2+} 0,8mM. As demais condições experimentais estão descritas em Material e Métodos.

(●) NaCl 0

(○) NaCl 0,1M

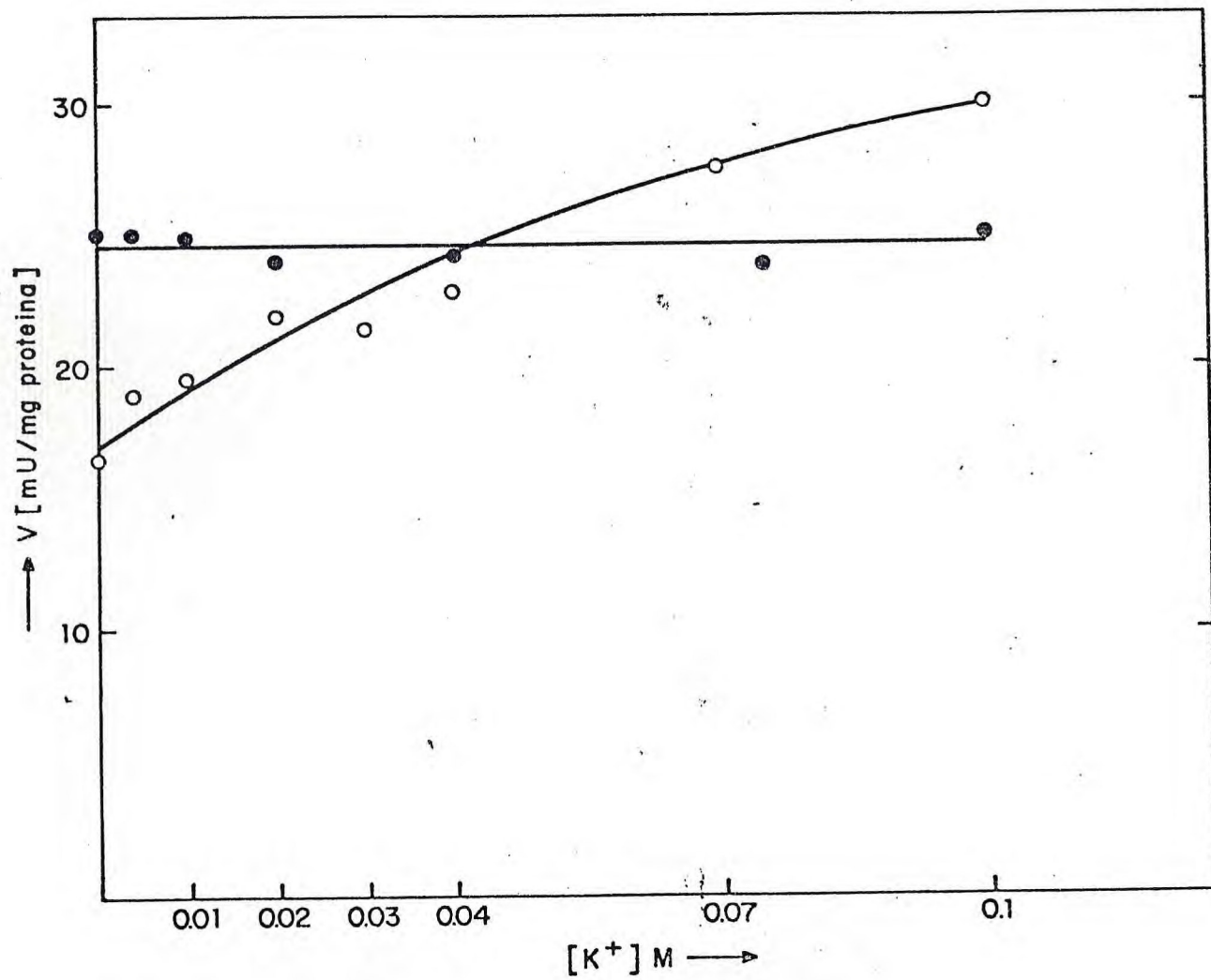


Figura 9 - Influência da espermina em concentrações variáveis sobre a atividade ATPásica de mitocôndria de *Vigna unguiculata*. As condições experimentais estão descritas em Material e Métodos.

(o) NaCl e KCl 0

(Δ) NaCl 0,1M; KCl 0

(●) KCl 0,1M; NaCl 0

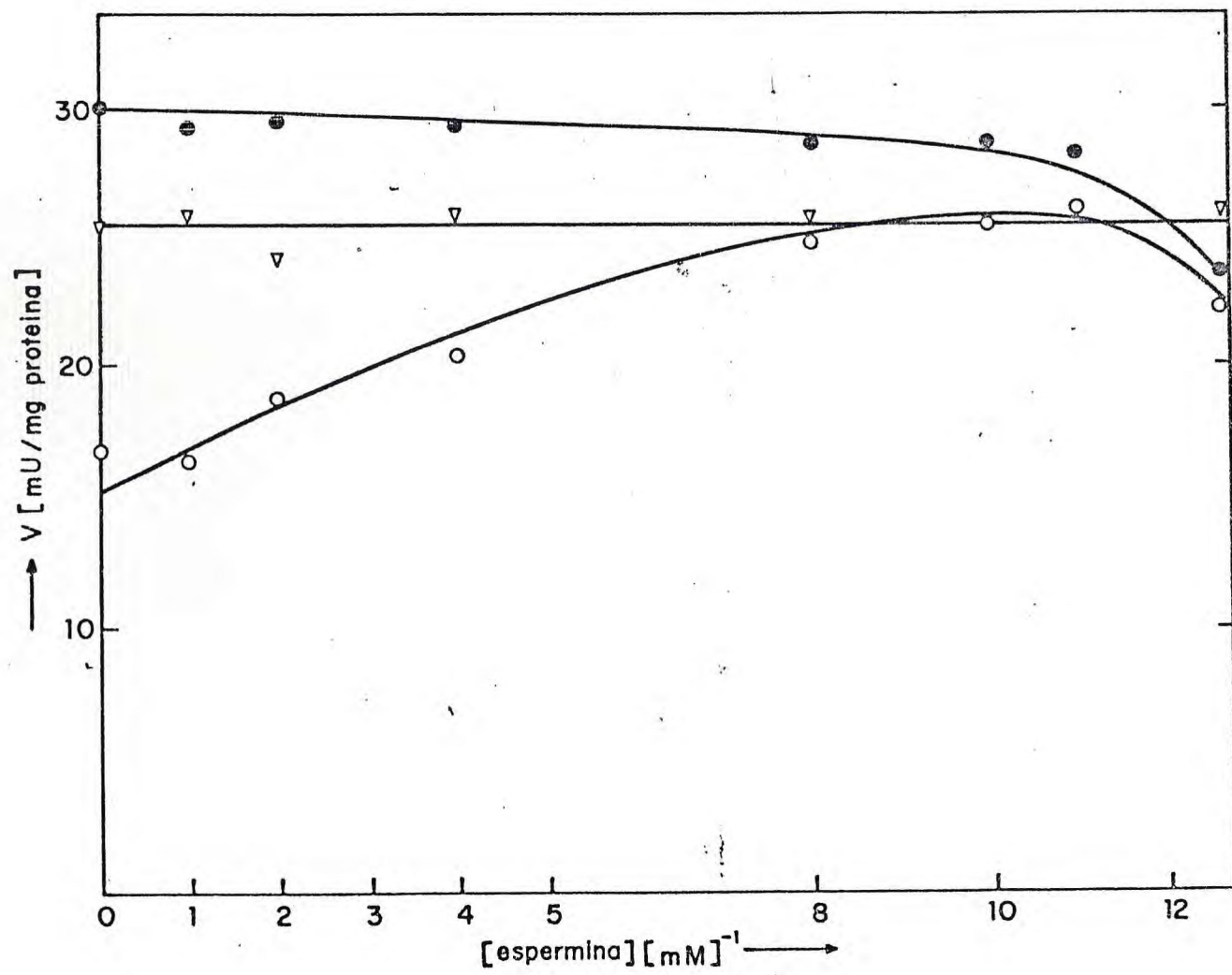


Figura 10 - Influência da espermidina em concentrações variáveis sobre a atividade ATPásica de mitocôndria de *Vigna unguiculata*. As condições experimentais estão descritas em Material e Métodos.

- (o) NaCl e KCl 0
- (Δ) KCl 0 NaCl 0,1M
- (●) KCl 0,1M NaCl 0

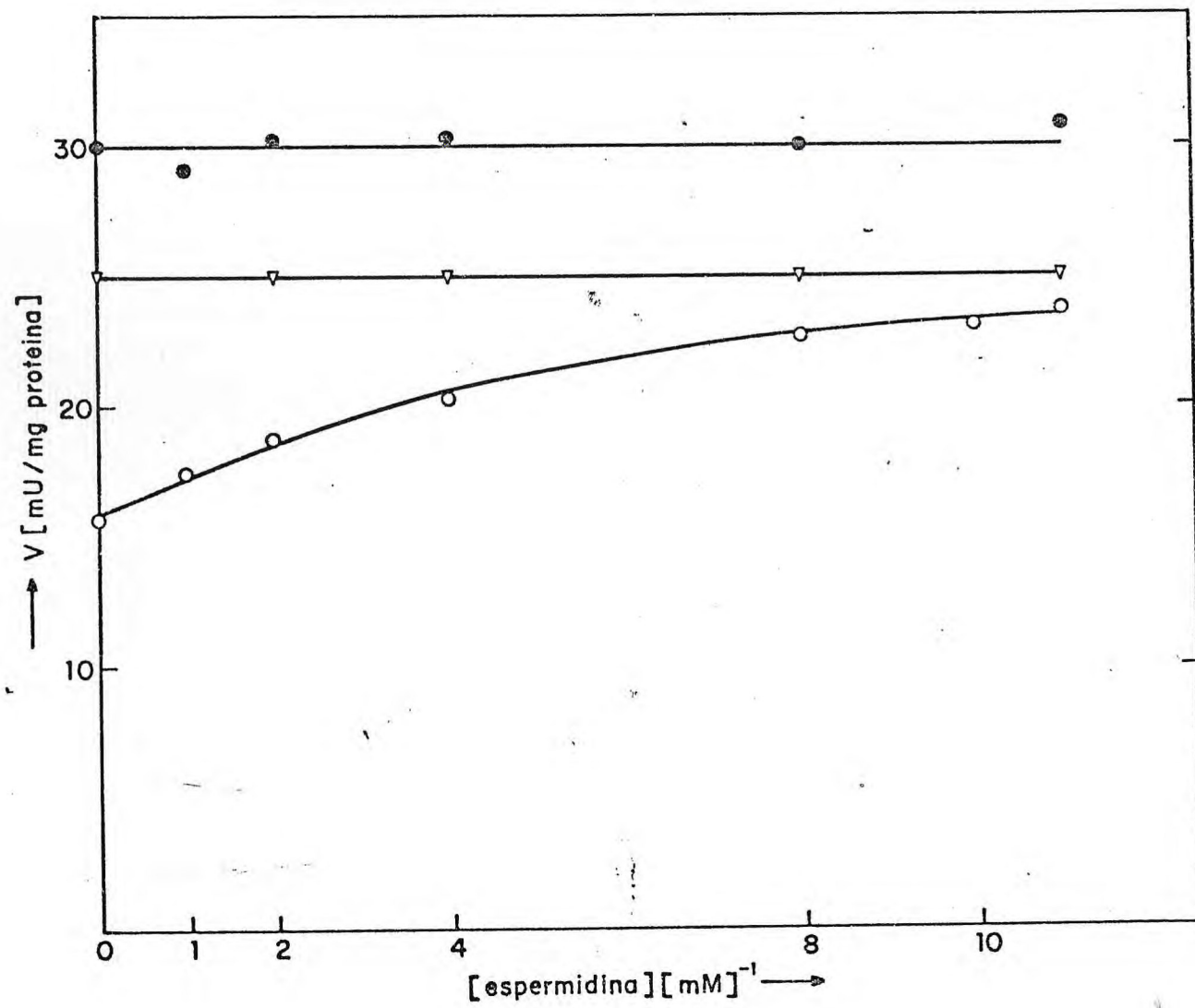


Figura 11 - Influência da putrescina em concentrações variáveis sobre a atividade ATPásica de mitocôndria de *Vigna unguiculata*. As condições experimentais estão descritas em Material e Métodos.

- NaCl e KCl 0 (o)
- KCl 0,1M e NaCl 0 (●)
- NaCl 0,1M e KCl 0 (Δ)

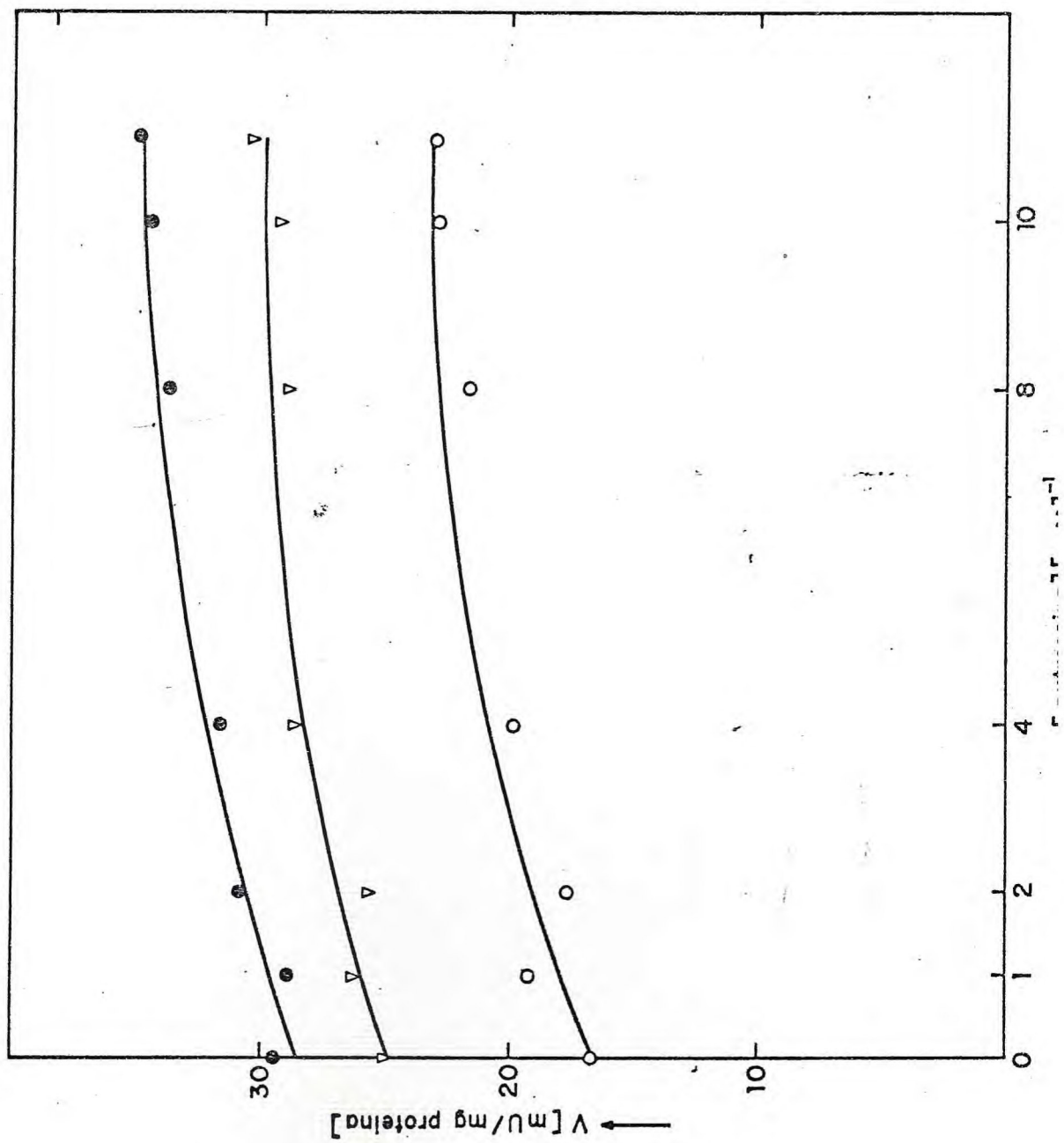


Figura 12 - Representação gráfica $1/v$ residual versus $1/(es-$
permina), análoga à representação gráfica de Dixon. O meio de
reação continha Tris-HCl 3mM pH 8, Mg^{2+} 0,8mM livre e
 $MgATP$ $2,3 \times 10^{-3}$ M em ausência de Na^+ e K^+ . As demais condi-
ções experimentais estão descritas em Material e Métodos.

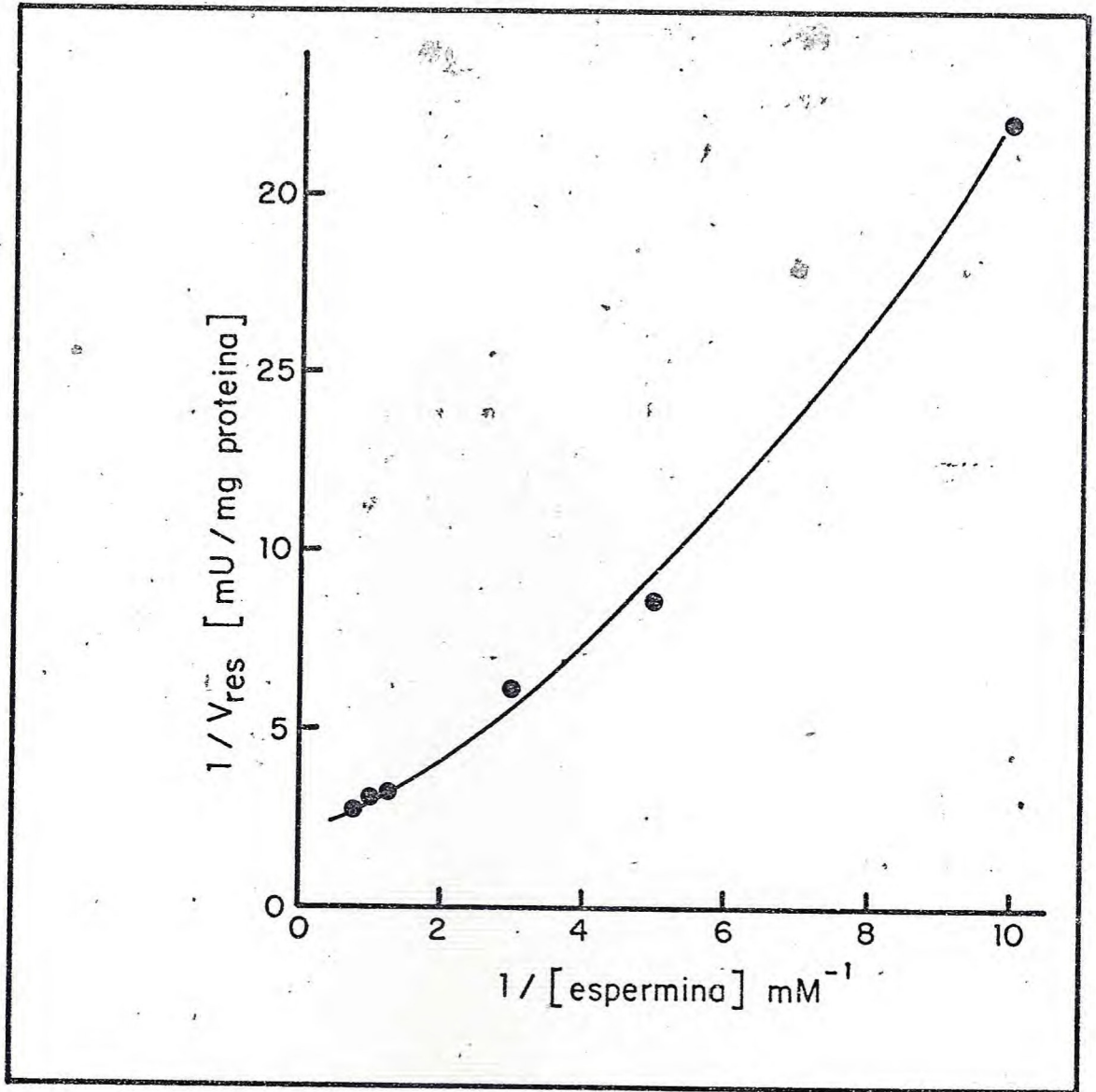
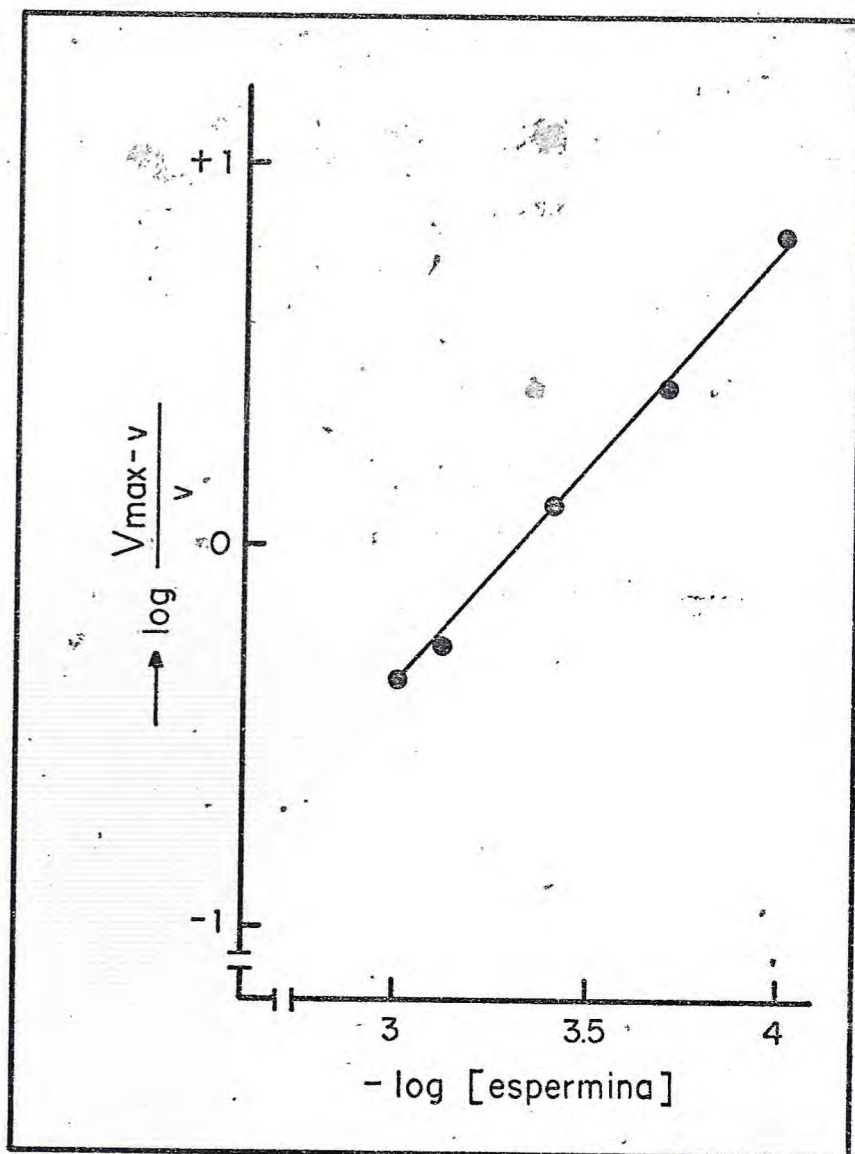


Figura 13 - Gráfico de Hill para expressar a cinética de ativação da ATPase pela espermina, cujos dados foram obtidos do gráfico representado na figura 12.



partir do gráfico análogo ao gráfico de Dixon (Fig. 12).

9. Influência do Mg^{2+} e MgATP na atividade ATPásica

A Figura 14 mostra a atividade ATPásica em função da variação da concentração de Mg^{2+} livre, na presença de concentrações que variaram de $5 \times 10^{-5} M$ a $10^{-2} M$ e o MgATP em concentrações de 0,08mM a 1mM. Os resultados expressos nas diferentes curvas da figura 14 revelam uma ativação de F_1 -ATPase em baixas concentrações de Mg^{2+} livre mostrando-se as altas concentrações inibidoras da atividade ATPásica. A concentração de Mg^{2+} livre, necessária para a obtenção de uma ativação ótima da ATPase aumenta, em presença de concentrações elevadas de MgATP. Como os efeitos inibidores de altas concentrações do Mg^{2+} livre sobre a atividade ATPásica foram mais pronunciados, estes resultados foram mais detalhados e explorados nas figuras 15 e 16. A análise cinética do efeito inibidor do Mg^{2+} livre feita através do gráfico de Lineweaver-Burk (Fig. 15), $1/v$ versus $1/MgATP$ em presença de concentrações constantes de Mg^{2+} livre revelou uma inibição da atividade ATPásica pelo Mg^{2+} livre do tipo competitivo. A análise cinética feita igualmente através da apresentação de Dixon (Fig 16), $1/v$ versus Mg^{2+} mostrou linearidade apenas na região de baixas concentrações de Mg^{2+} livre, dependendo também dos valores da concentração de MgATP. A quebra da linearidade em concentrações mais elevadas de Mg^{2+} livre não é compatível com a indicação de uma inibição competitiva fornecida anteriormente através da análise cinética feita com o gráfico de Lineweaver-Burk (Fig. 15). O gráfico de Dixon permitiu também o cálculo do valor de K_i que se mostrou igual a 1mM (Fig. 16). Os valores de k_m foram calculados com os dados obtidos no gráfico de Lineweaver-Burk (Fig. 15) e são dependentes da concentração de Mg^{2+} , sendo desta maneira valores de k_m aparentes ($k_m^{(Mg^{2+})}$) com base na equação $k_m^{(Mg^{2+})} = k_m + \frac{k_m}{K_i} (Mg^{2+})$. Com o objetivo de conseguir mais um dado para a determinação do verdadeiro valor de k_m (Fig. 17), grafamos também o valor de k_i obtido

Figura 14 - Influência de Mg^{2+} livre sobre a atividade de F_1 -ATPase da membrana mitocondrial de *Vigna unguiculata* em presença de diferentes concentrações de MgATP.

(∇) MgATP 0,08mM; 0,2mM (▼); 0,5mM (○); 0,75mM (●); (□) 1mM; NaCl e HCl ausentes.

As demais condições experimentais estão descritas em Material e Métodos.

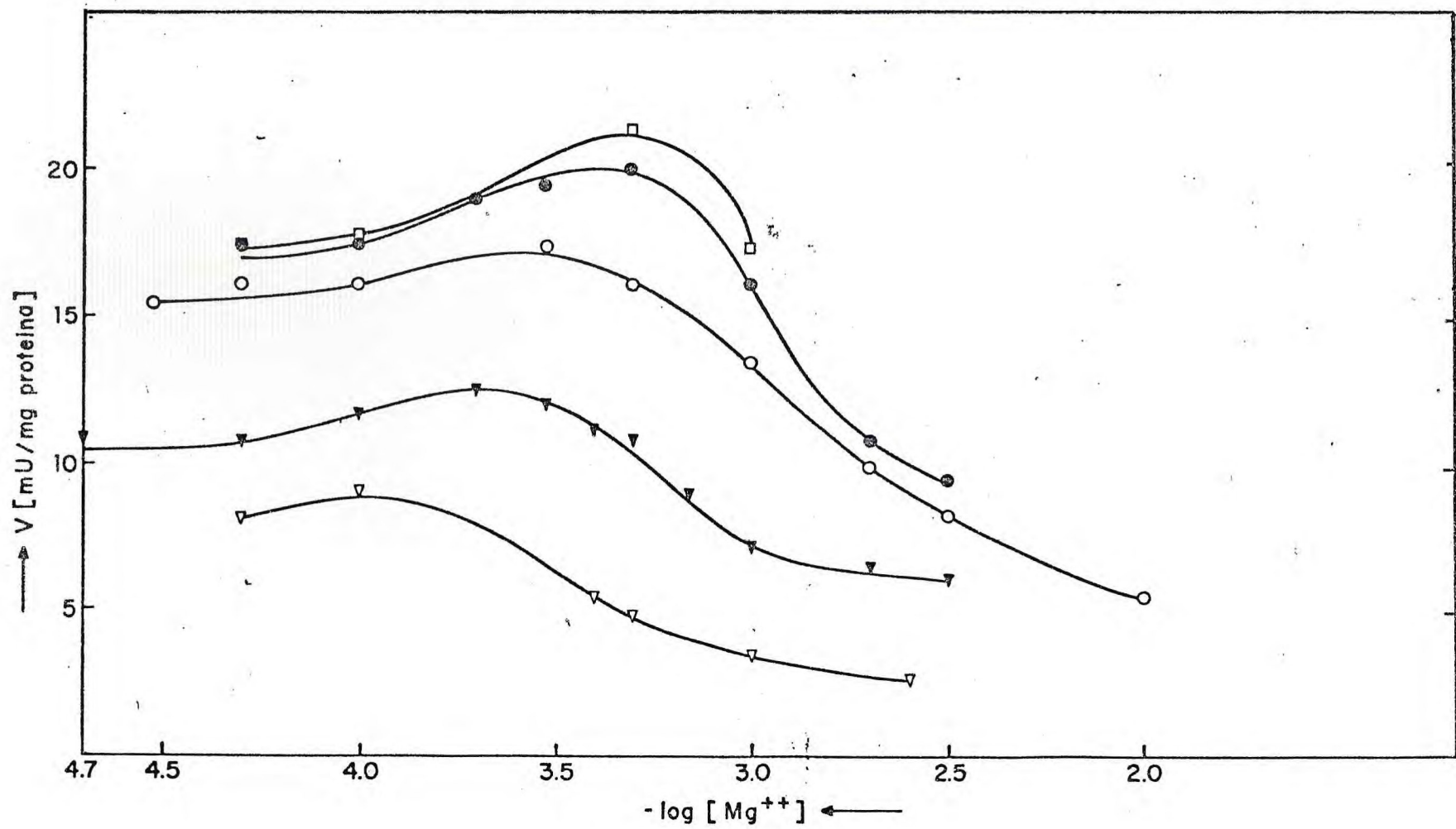


Figura 15 - Gráfico de Lineweaver-Bürk para a determinação do tipo de inibição da atividade ATPásica pelo Mg^{2+} livre em mitocôndrias de *Vigna unguiculata*. As condições experimentais estão descritas na legenda da figura 14 e em Material e Métodos. (o) Mg^{2+} 1mM; (●) Mg^{2+} 0,5mM.

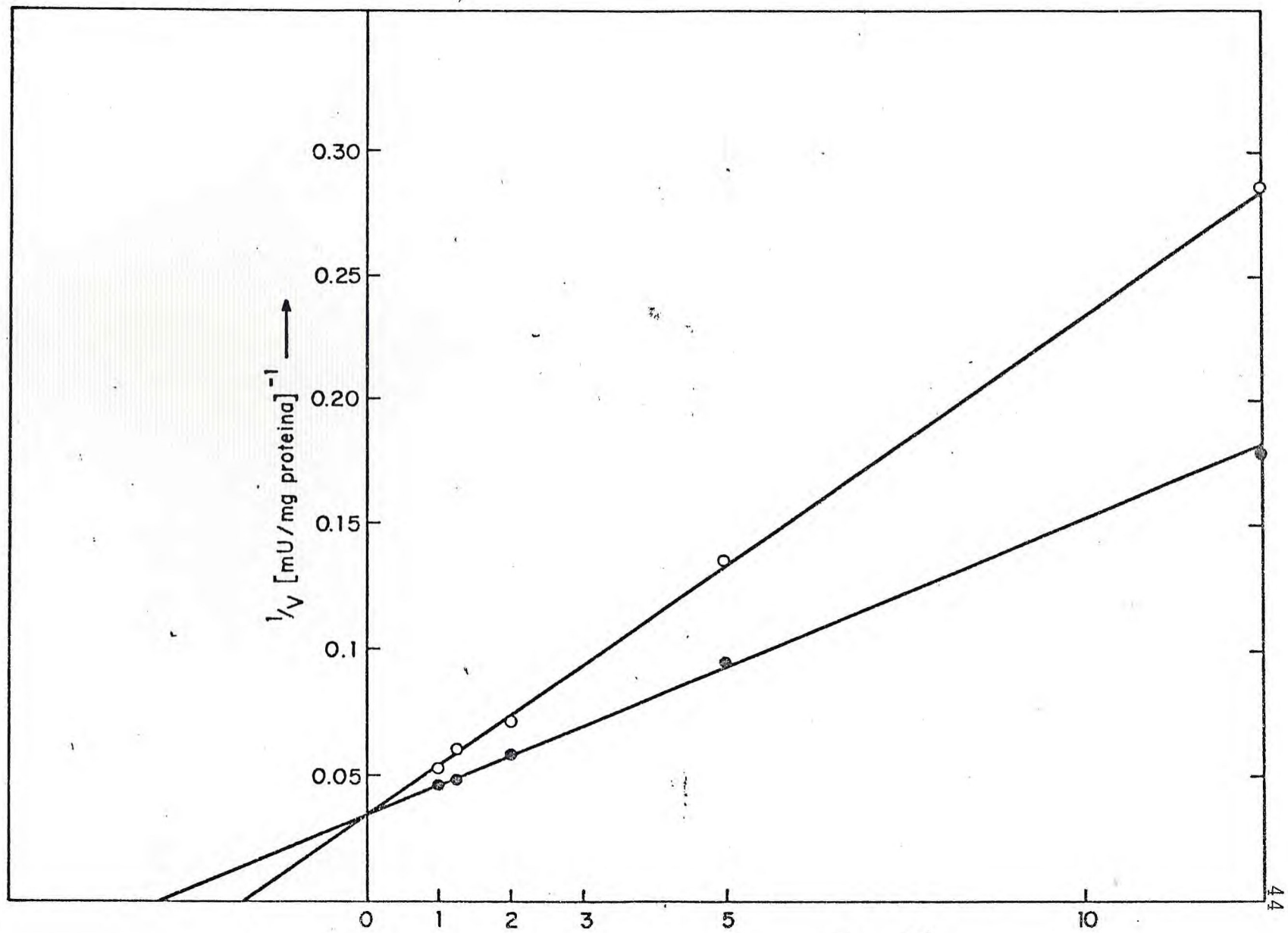


Figura 16 - Gráfico de Dixon para determinar o tipo de inibição da atividade ATPásica e para determinação do K_i em mitocôndrias de *Vigna unguiculata*. Os dados foram retirados da figura 14.

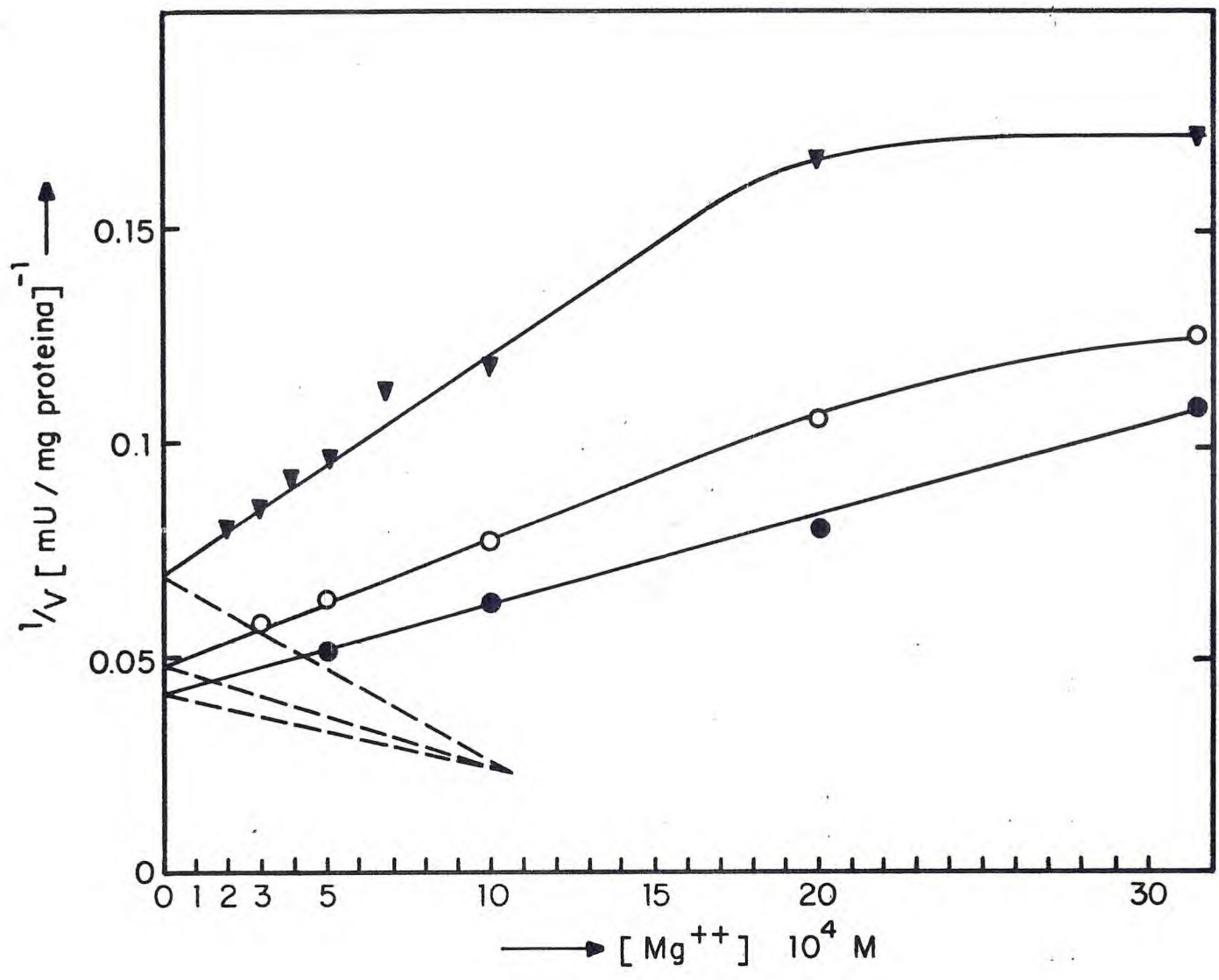
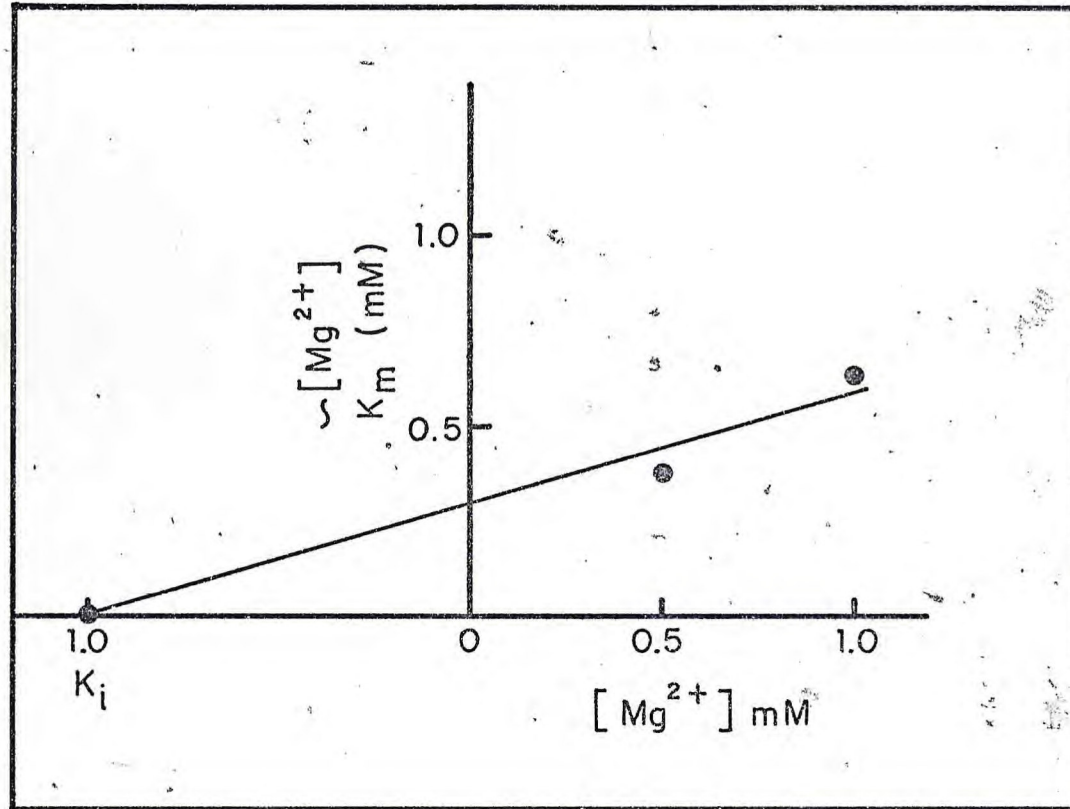


Figura 17 - Determinação do verdadeiro valor de K_m , onde os pontos correspondentes a Mg^{2+} 0,5mM e 1,0mM foram obtidos da figura 15 e o valor de K_i obtido da figura 16.



no gráfico de Dixon (Fig. 16). O verdadeiro valor de k_m (Fig. 17) foi obtido por extrapolação quando admitimos $mg^{2+} = 0$. Este valor foi de 0,3mM.

10. Efeito competitivo da espermina com o substrato MgATP da ATPase

O efeito competitivo da espermina com o substrato da ATPase é mostrado na Fig. 18 através de gráfico de Lineweaver-Burk obtidos em ausência e presença de espermina 1,2mM que se cruzam em ponto comum no eixo das ordenadas.

11. Efeito competitivo da espermina com Mg^{2+}

O efeito competitivo da espermina com Mg^{2+} está indicado na Fig. 19 através de gráfico de velocidade da atividade enzimática determinada em presença de Mg^{2+} 0,05mM e 1mM e de concentrações de espermina variáveis de 0 a 1,2mM. Observa-se em presença de altas concentrações de Mg^{2+} (1mM) que a espermina promove uma reversão da inibição da ATPase provocada pelo Mg^{2+} o que não se constata de modo significativo quando a concentração de Mg^{2+} é baixa (0,05mM).

12. Comparação dos Rendimentos de Solubilização da ATPase após 5 diferentes tentativas de solubilização da enzima

A fração mitocondrial submetida aos 5 tratamentos anteriormente descritos possibilitou uma solubilização indicada na Tabela V. Diante dos resultados obtidos vemos que a percentagem de solubilização não foi muito alta, tendo os tratamentos (4) e (5) proporcionado rendimentos apenas de 33% e 28% respectivamente.

Figura 18 - Gráfico de Lineweaver-Burk mostrando o efeito competitivo entre espermina e MgATP em mitocôndrias de *Vigna unguiculata*. As condições experimentais estão descritas em Material e Métodos.

(o) Mg^{2+} livre 1mM; sem espermina

(V) Mg^{2+} livre 1mM; e espermina (1,2mM)

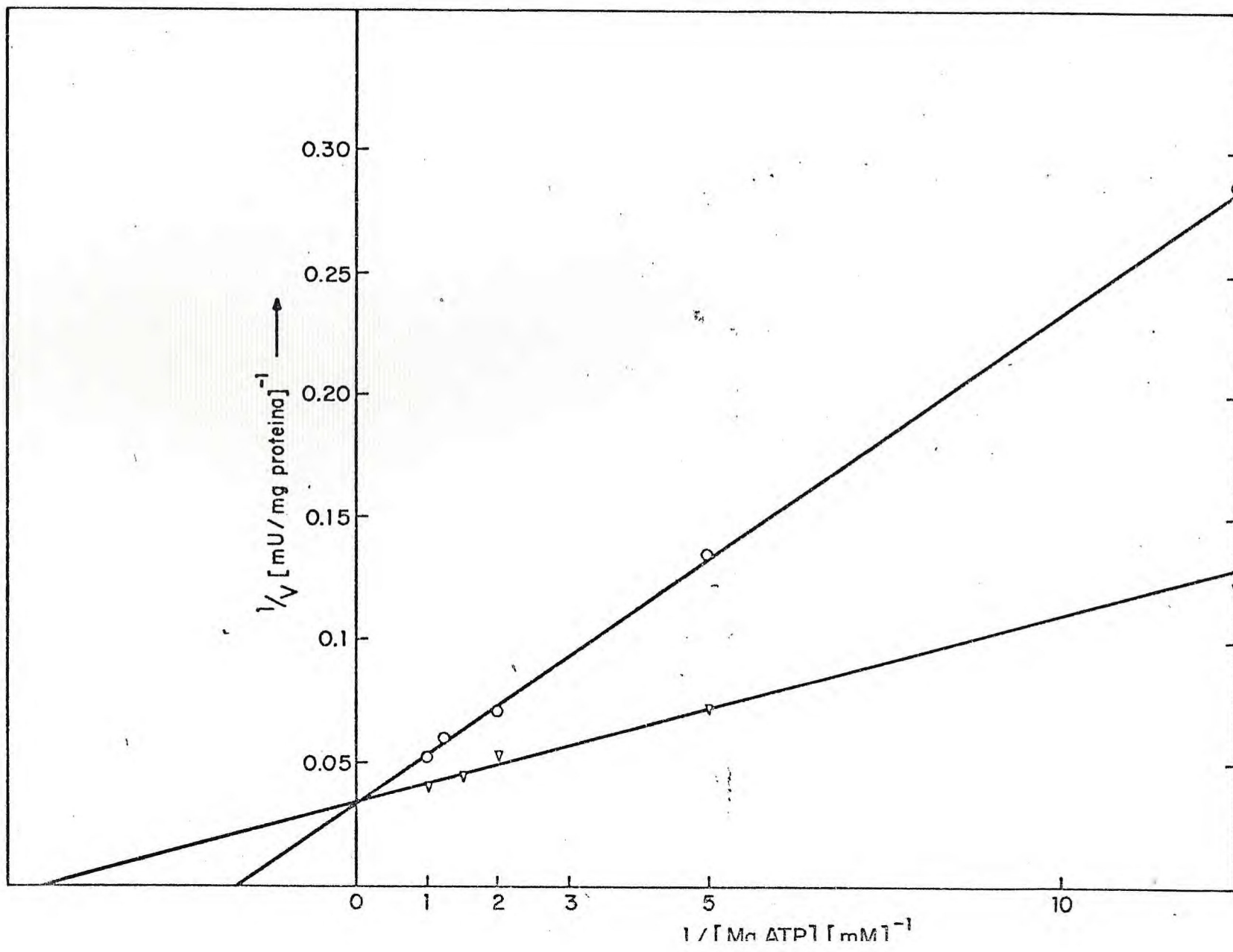
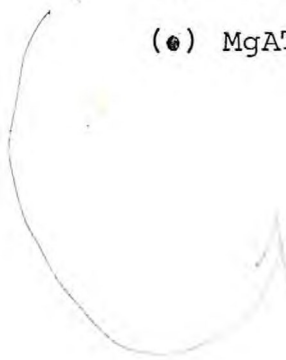


Figura 19 - Reversão do efeito inibitório do Mg^{2+} livre sobre a atividade da F_1 -ATPase ligada à membrana mitocondrial de *Vigna unguiculata*, pela espermina. As demais condições experimentais estão descritas em Material e Métodos.

(o) MgATP 0,2mM; Mg^{2+} livre 1mM

(●) MgATP 0,2mM; Mg^{2+} livre 0,05mM



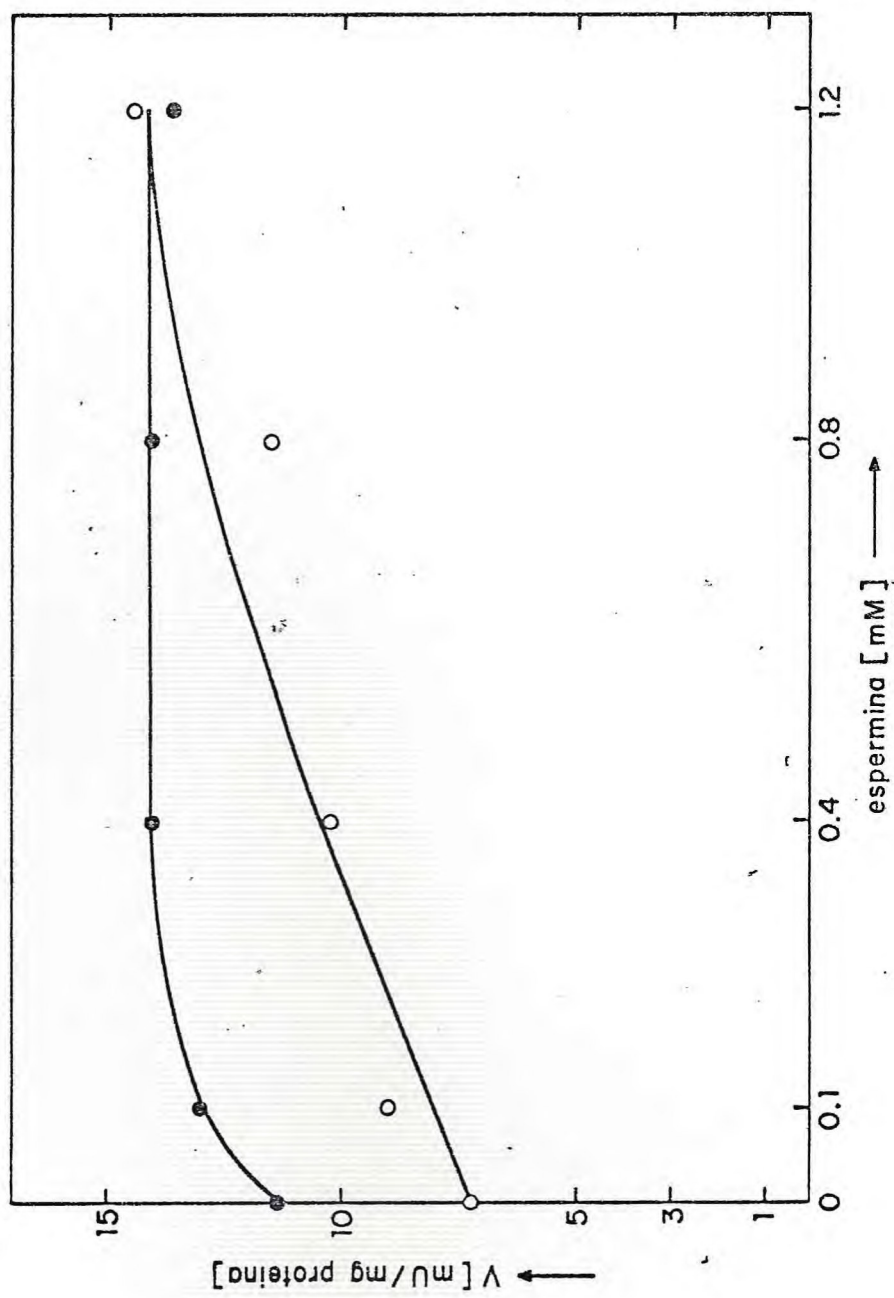


TABELA V - Comparação dos rendimentos, obtidos em 5 diferentes tentativas de solubilização da ATPase mitocondrial.

Tratamento	Atividade Total	
	ATPase - ligada à membrana (%)	ATPase-solubilizada (%)
1	86	14
2	94	6
3	91	9
4	66	33
5	72	28

As tentativas de solubilização da ATPase bem como a determinação da atividade ATPásica estão descritas em Material e Métodos. A concentração de MgATP foi saturante, isto é, Mg^{2+} total 3mM e ATP 3mM.

13. Efeito do Mg^{2+} sobre a ATPase solubilizada de mitocôndria de *Vigna unguiculata*

A ATPase de mitocôndrias de *Vigna unguiculata* solubilizada pelo tratamento (5) não foi inibida por concentrações de Mg^{2+} que variaram de 5×10^{-5} a 3×10^{-3} M conforme está indicado na Fig. 20.

14. Efeito das poliaminas sobre a ATPase solubilizada de *Vigna unguiculata*

Após a solubilização da ATPase mitocondrial de *Vigna unguiculata* com o tratamento (4), as poliaminas não exerceram influência significativa sobre a atividade ATPásica como é mostrado na Tabela VI.

Figura 20 - Efeito do Mg^{2+} livre sobre a ATPase solubilizada com desoxicolato 0,02% (tratamento 5). As condições experimentais foram idênticas as descritas na legenda da figura 14.

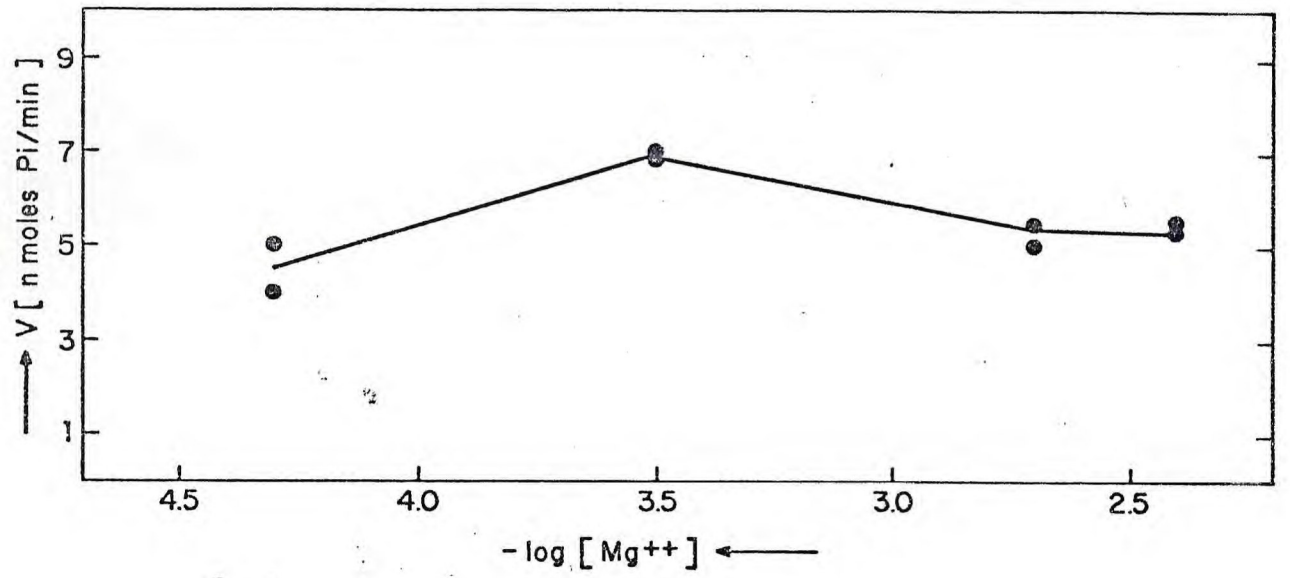


TABELA VI - Efeito das poliaminas sobre a ATPase solubilizada de *Vigna unguiculata*

Poliamina (1,2mM)	Atividade total (D0)
-	0,100
Espermina	0,105
Espermidina	0,115
Putrescina	0,115

A atividade ATPásica foi expressa em leituras de absorbância a 660nm. A concentração de Mg^{2+} total e a de ATP foi de 3mM.

IV - DISCUSSÃO

Em virtude do efeito das poliaminas sobre as mitocôndrias não ser ainda conhecido, foi inicialmente determinado o teor das mesmas (espermina, espermidina, putrescina) na fração mitocondrial de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. pitiuba (Fig. 4). Os valores encontrados das diferentes poliaminas mostraram concentrações decrescentes na seqüência espermina, espermidina e putrescina (Tabela II) revelando-se suficientemente altos para tornar lícita a suposição de que as poliaminas desempenham um papel regulador em processos biológicos da economia celular.

Preliminarmente foram feitas experiências para determinar as concentrações ótimas do substrato MgATP (Fig. 5) e da proteína mitocondrial dotada de atividade ATPásica (Fig. 6) para a realização do presente trabalho. Por este motivo, a concentração de MgATP foi de 2,3mM e a de proteína foi de 2,5 a 3 mg/10ml. Esta concentração de proteína mitocondrial também se revelou ótima para por em evidência a ativação da ATPase pelas poliaminas (Tabela IV). Os resultados mostrados ainda na Tabela IV evidenciaram também que a ativação da ATPase pelas poliaminas não foi significativa nem em presença de baixas concentrações de proteína (0,6 a 1mg/ml) nem em presença de altas concentrações de proteína (5 a 5,4 mg/ml). Até o presente momento estes resultados não foram explicados.

Resultados anteriores já haviam mostrado um efeito dos íons Na^+ e K^+ sobre a atividade ATPásica de mitocôndrias de *Vigna unguiculata* L.) Walp cv. seridó (Silva Lima e Peter 1980). Por este motivo, determinou-se também o conteúdo de Na^+ e K^+ das mitocôndrias de feijão pitiuba (Tabela III). Os valores dosados de Na^+ no meio Tris e no meio manitol, foram diferentes mas não há uma análise estatística suficientemente ampla que permita afirmar a significância da diferença dos resultados. Já os valores de K^+ , foram bastante diferentes sen-

do os do meio manitol bem mais elevados do que os do meio Tris. Isto é facilmente compreendido por ser o meio manitol tamponado com fosfato de potássio. Tentando-se correlacionar o conteúdo das poliaminas (Tabela II) com o dos íons Na^+ e K^+ (Tabela III), verificamos que as concentrações iônicas totais de Na^+ e K^+ são aproximadamente 500 vezes mais elevadas do que a concentração total das poliaminas. Pelo que foi determinado anteriormente (Silva Lima e Peter 1980) e confirmado no presente trabalho (Figura 7 e 8) os íons Na^+ e K^+ exercem um efeito sobre a atividade ATPásica em concentração ótima de 0,1 M (Figuras 7 e 8), enquanto as poliaminas mostraram influência sobre a atividade ATPásica com concentrações da ordem de 0,001 M (Figuras 9, 10 e 11). Isto justifica a correlação feita no presente estudo entre Na^+ e K^+ e poliaminas.

Os resultados mostrados nas figuras (9 e 10) indicam primeiramente que espermina e espermidina estimulam a atividade ATPásica em ausência de Na^+ e K^+ . Além disso, em presença destes íons a enzima já saturada por eles não é mais suscetível de ser estimulada por espermina e espermidina. Tal fato sugere uma competição entre Na^+ e K^+ e poliaminas no efeito ativador exercido por estes efetores, isto é, Na^+ e K^+ de um lado e poliaminas de outro. No que diz respeito à putrescina (Figura 11) ela, como a espermina e a espermidina, estimula a atividade ATPásica em ausência de Na^+ e K^+ . Contudo a putrescina apresentou uma peculiaridade em relação às outras poliaminas, porque mesmo em presença de Na^+ e de K^+ isoladamente continuou exibindo efeito estimulador da atividade ATPásica (Figura 11). Os resultados da ativação da ATPase pela putrescina, mesmo em presença de Na^+ e K^+ permitem sugerir que há sítios diferentes de fixação dos íons Na^+ e K^+ e da putrescina (Figura 11). Além disso, é difícil imaginar um mecanismo de ação diferente para o efeito exercido pela putrescina e para o efeito exercido por espermina e espermidina sobre a atividade ATPásica. Por esta razão, pode-se admitir que haja sítios de fixação dos íons Na^+ e K^+ diferentes dos sítios de fixação das poliaminas e que este deve ser idêntico para as

três poliaminas. A diferença dos resultados obtidos entre putrescina (Figura 11) e espermina e espermidina (Figuras 9 e 10) pode ser explicada por um excesso de cargas elétricas em presença de espermina e espermidina que não se verifica com a putrescina. Este excesso de carga, com o conseqüente aumento da força iônica do meio, dificulta a fixação dos efetores de modo geral, inclusive a do substrato MgATP sobre a ATPase. Ainda com relação aos efeitos exercidos por Na^+ (Figura 7) e K^+ (Figura 8) os resultados parecem indicar uma competição entre Na^+ e K^+ por um mesmo sítio de fixação. Este fato, foi também sugerido anteriormente em trabalho feito com mitocôndrias de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. seridô (Silva Lima e Peter 1980).

Mostramos previamente (Figuras 9, 10, 11) que as poliaminas estimulam, em concentrações admitidas como fisiológicas, a atividade ATPásica. Com os dados de ativação da ATPase; obtidos em presença de espermina, foi feito um gráfico análogo ao gráfico de Dixon (Figura 12) que não se apresentou linear. Além disso, pelo gráfico de Hill (Figura 13) o valor do coeficiente de Hill foi inferior a 1,3. Estes resultados indicam uma cooperatividade positiva com a existência de pelo menos dois sítios reguladores para a espermina e acreditamos, conseqüentemente, para as outras poliaminas.

Além do efeito dos cátions inorgânicos monovalentes Na^+ e K^+ sobre a atividade ATPásica, estudamos ainda o efeito do cátion inorgânico divalente Mg^{2+} (Figura 14, 15 e 16). A influência do Mg^{2+} já fora observada anteriormente sobre a ATPase de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. seridô (Silva Lima e Peter 1980). O efeito do Mg^{2+} , ativando ou inibindo a atividade ATPásica é dependente da concentração de Mg^{2+} livre (Figura 14). O que chama mais atenção é a inibição da atividade ATPásica provocada por altas concentrações de Mg^{2+} , sobretudo quando se observa que Mg^{2+} é sempre citado (Pullman e col. 1960, Ahlers e col. 1978a, Ahlers e col. 1978b) como capaz de estimular a atividade ATPásica, mesmo em mitocôndrias de plantas (Fisher e Hodges 1969, Malhotra e Spencer 1974). Cu-

riosamente, com freqüência não é feita a distinção entre o efeito do Mg^{2+} livre e o efeito do Mg^{2+} necessário à formação do complexo MgATP, verdadeiro substrato da ATPase (Peter e Wolf. 1972, Lindberg e col. 1974, Ahlers e col. 1978).

O estudo cinético da inibição da atividade ATPásica pelo Mg^{2+} feito através da representação gráfica de Lineweaver-Burk (Figura 15) e de Dixon (Figura 16) revelou um tipo de inibição pseudo-competitiva, uma vez que o gráfico de Lineweaver-Burk apresentou-se típico das inibições competitivas, enquanto no gráfico de Dixon houve quebra de linearidade das curvas, fugindo ao tipo padrão clássico de inibição competitiva. Estes resultados indicam a existência de dois sítios diferentes para a fixação de MgATP e de Mg^{2+} . Esta inibição pode ser representada graficamente como está mostrado no Diagrama III.

É óbvio que se pode determinar o valor de k_m a partir do gráfico de Lineweaver-Burk em ausência de inibidor ($I = 0$). Entretanto, isto não foi possível no caso presente, para o Mg^{2+} , porque para se medir a atividade ATPásica na presença do Mg^{2+} era indispensável a formação do complexo MgATP e desta forma sempre havia possibilidade de existir Mg^{2+} livre (equação 1a).

$$(Mg^{2+} \text{ livre}) = 2,15 \cdot 10^{-4} \frac{(MgATP)}{(ATP)_{\text{livre}}} \quad (\text{eq. 1a})$$

Por esta razão, o verdadeiro valor de k_m só pode ser calculado por extrapolação para $(Mg^{2+}) = 0$, como está indicado na Fig. 17 e apresentou um valor de 0,3mM.

Continuando o estudo dos diferentes efetores (Mg^{2+} , poliaminas e MgATP) sobre a ATPase determinamos a influência do substrato MgATP sobre a ativação de ATPase pela espermina. A Fig. 18 mostra de maneira inequívoca uma competição entre os efeitos de MgATP e de espermina. Já a Fig. 19, mostra um efei

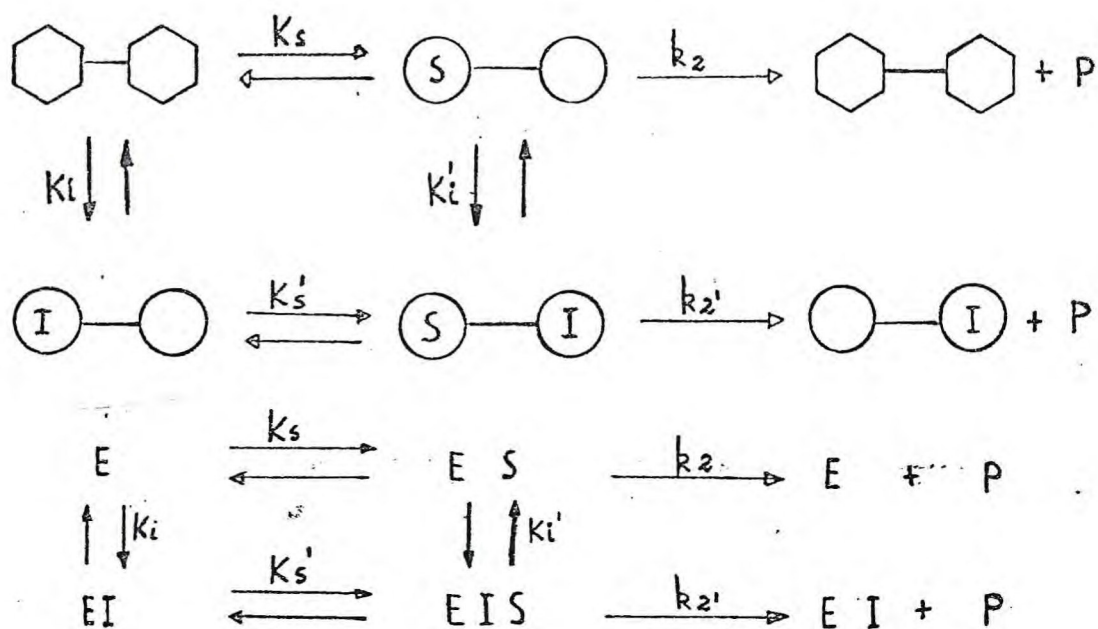
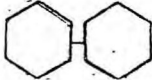



Diagrama III - Representação Gráfica da Inibição pseudo-competitiva. "Os símbolos  e  indicam que existe dois sítios de ligação". A ligação de S ou de I causa uma variação da conformação do outro sítio.

to competitivo entre espermina e Mg^{2+} livre. Na realidade, este efeito é uma reversão da inibição pelo Mg^{2+} da atividade ATPásica causada pela espermina. Com base nos resultados das figs. 18 e 19 pode-se ver que os efeitos mais pronunciados das poliaminas se verificam em presença de concentrações altas de Mg^{2+} livre e concentrações baixas de MgATP. Um exemplo característico desta situação é o seguinte: com MgATP a 0,08mM e Mg^{2+} livre = 1mM, a ativação da ATPase pela espermina 1,2mM foi de 130%. Além do estudo feito com a ATPase ligada à membrana mitocondrial, estudos preliminares foram feitos com a ATPase solubilizada, isto é, destacada da membrana mitocondrial. Para isto 5 diferentes tentativas de solubilização foram feitas (Tabela V) com um rendimento máximo que não ultrapassou a faixa de 30%. Um comportamento muito diferente é observado nos estudos com a ATPase bacteriana (Peter e Ahlers 1975) a qual submetida a tratamentos idênticos, apresentou solubilização da ATPase. Pelos resultados expressos na Fig. 20, a ATPase solubilizada tem propriedades bem diferentes das encontradas na ATPase ligada à membrana. Não existe inibição significativa do Mg^{2+} livre sobre a ATPase solúvel. Igualmente, não houve efeito ativador das poliaminas sobre a ATPase solubilizada, como é demonstrado na Tabela VI.

Diante dos resultados obtidos, sugerimos que os sítios de fixação das poliaminas e Mg^{2+} são idênticos e ambos são localizados na membrana mitocondrial. Por esta razão em muitos estudos de processos biológicos catalisada por enzima, não há interesse em isolar a enzima de sua situação original no sistema biológico. Um exemplo marcante é o da glicose-6-fosfatase cuja atividade catalítica estimulada por poliamina não pôde ser evidenciada quando a enzima estava associada às membranas microsomais (Nordlie e col. 1979).

O efeito das poliaminas e de alguns íons inorgânicos é tentativamente explicado pelo fato de as poliaminas e os íons carregados positivamente se combinarem com fosfolipídios carregados negativamente, como a fosfatidilserina. Esta combinação influencia a fluidez a membrana causando alterações no comportamento catalítico da enzima ligada à membrana.

V - CONCLUSÕES

- 1 - As concentrações das poliaminas revelaram-se suficientemente altas, capazes por conseguinte, de desempenhar um papel fisiológico nas mitocôndrias de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. pitiuba;
- 2 - Os íons Na^+ e K^+ ativam a ATPase mitocondrial de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. pitiuba e parece existir uma competição entre Na^+ e K^+ pelo sítio de fixação;
- 3 - O íon Mg^{2+} é indispensável em concentrações ótimas para a formação do complexo MgATP. As concentrações mais elevadas de Mg^{2+} livre são capazes de provocar uma inibição da atividade ATPásica e esta inibição é do tipo pseudo-competitivo;
- 4 - Os efeitos das poliaminas interagem com os efeitos de Na^+ , K^+ e Mg^{2+} . Em ausência de Na^+ e K^+ e na presença de Mg^{2+} as poliaminas estimulam a atividade de ATPásica;
- 5 - Existe uma competição entre os efeitos de Na^+ e K^+ por um lado e espermina e espermidina por outro pelos diferentes sítios de fixação destes íons;
- 6 - O efeito inibidor do Mg^{2+} livre sobre a atividade ATPásica é revertido pelas poliaminas;
- 7 - Uma competição entre MgATP e poliaminas pelos seus diferentes sítios de fixação foi também verificada;
- 8 - Os sítios de fixação de Mg^{2+} e poliaminas parecem ser os mesmos e estão situados na membrana mitocondrial interna.

VI - LITERATURA CITADA

- Arnold, A., H.U. Wolf., B.P. Ackermann. & H. Bader. 1976 - An automated continuous assay of membrane-bound and soluble ATPases and related enzymes. Analyst. Biochem., 71:209-213.
- Ahlers, J., E. Ahr. & A. Seyfarth. 1978_a - Kinetic characterization of plasma membrane ATPase from *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biochem., 22: 39-49.
- Ahlers, J., T. Günther. & H.W. Peter. 1978_b - Phospholipid composition of plasma membrane and kinetic properties of membrane-bound nucleotidase from Marine bacteria. In. J. Biochem., 9:573-578.
- Aswell, M. & T.S. Work. 1970 - The biogenesis of mitochondria. Ann. Rev. Biochem., 39: 251-290.
- Blackmon, J.W.J. & D.E. Moreland. 1971 - Adenosine triphosphatase activity associated with mung bean mitochondria. Plant Physiol., 47: 532-536.
- Bonner, W.D.Jr. 1973 - Mitochondria and plant respiration. Phytochemistry (Miller, L.P. ed) vol. 3. Van Nostrand-Reinhold. New York.
- Brown, H.D., N.J. Neucere., A.M. Altschul. & J.W. Evans. 1965 - Activity patterns of purified ATPase from Arachis hypogaea. Life Sci., 4: 1439-1447.
- Chance, B., D.F. Parsons. & G.R. Willians. 1964. - Cytochrome content of mitochondria stripped of inner membrane structure. Science., 143: 136-139.
- Cohen, S.S. 1971 - Introduction to the polyamines. pp. 1-166. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Fernández Morán, H. 1962 - Cell-membrane ultrastructure-Low temperature electron microscopy and X-ray-diffraction studies of lipoprotein components in lamellar systems.

Circulation., 26: 1039-1065.

- Fisher, J. & T. Hodges. 1969 - Monovalent ion stimulated adenosine triphosphatase from oat roots. Plant Physiol., 44: 385-395.
- Fiske, C.H. & Y. Subbarow. 1925 - The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem., 66: 375-400.
- Fukuyama, H. & S. Yamashita. 1976 - Activation of rat liver choline kinase by polyamines. FEBS. Lett., 71: 33-36.
- Gornall, A.G., J. Bardawill. & M.M. David. 1949 - Determination of serum proteins by means of the biuret reagent. J. Biol Chem., 17: 751-766.
- Grubmeyer, C. & M. Spencer. 1978 - Oligomycin-sensitive ATPase of submitochondrial particles from corn. Plant Physiol., 61: 567-569.
- _____ 1980 - ATPase activity of pea cotyledon submitochondrial particles. Plant Physiol., 65: 281-285.
- Günther, T. & H.W. Peter. 1979 - Polyamines and osmoregulation in *Escherichia coli*. FEMS. Microbiol. Lett., 5: 29-31.
- Heinrich-Hirsch, B., J. Ahlers & H.W. Peter 1977 - Inhibition of Na, K-ATPase from chick brain by polyamines. Enzyme., 22: 235-241.
- Ikuma, H. 1970 - Necessary conditions for isolation of tightly coupled higher plant mitochondria. Plant Physiol., 45, 773-781.
- _____ 1972 - Electron transport in plant respiration. ANN. Rev. Plant Physiol., 23: 419-436.
- Raina, A. & J. Jänne. 1975 - Physiology of the natural polyamines putrescine spermine and spermidine. Med. Biol., 53: 121-147.
- Jänne, J., H. Pösö. & A. Raina. 1978 - Polyamines in rapid growth and cancer. Biochim. Biophys. Acta., 473: 241-293.
- Jamdar, C.S. 1977 - Glycerolipid biosynthesis in rat adipose tissue. Arch. Biochem. Biophys., 182: 723-731.

- Jung, D.W. & J.B. Hanson. 1973 - Respiratory activation of 2,4-dinitrophenol-stimulated ATPase activity in plant mitochondria. Arch. Biochem. Biophys., 158: 139-148.
- Jung, D.W., G.G. Laties. 1976 - Trypsin induced ATPase activity in potato mitochondria. Plant Physiol., 57: 583-588.
- Kagawa, Y. & E. Racker. 1966 - Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. IX-Reconstruction of oligomycin-sensitive adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem., 241: 2467-2474.
- Knowles, A.F., R.J. Guillory. & E. Racker. 1971 - Partial resolution of enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. XXIX A factor required for the binding of mitochondria adenosine triphosphatase to the inner mitochondrial membrane. J. Biol. Chem., 246: 2672-2679.
- Kylin, A. & R. Gee. 1970 - Adenosine triphosphatase activities in leaves of the Mangrove *avicennia nitida* Jacq. Plant Physiol., 45: 169-171.
- Kossorotow. A., H.U. Wolf. & N. Seiler. 1974 - Regulatory effects of polyamines on membrane-bound acetylcholinesterase. J. Biochem., 144: 21-27.
- Lai. Y.F. & J.E. Thompson. 1971 - The preparation and properties of an isolated plant membrane fraction enriched in $(Na^+ - K^+)$ stimulated ATPase. Biochim. Biophys. Acta., 233: 84-90.
- Lehninger, A.L. 1973 - Mitochondria and their molecular organization. (Lehninger, A.L. ed.) Bioenergética - 2ª edição. Benjamin, W.A. Publ., Califórnia.
- _____ 1976 - Bioquímica - 2ª edição. Editora Edgar Blücher Ltda.
- Lindberg, S., G. Hansson. & A. Kylin. 1974 - Kinetic studies of a $(Na^+ + K^+ + Mg^{2+})$ ATPase in sugar beet roots. I - Mg dependence. Physiol. Plant., 32:103-107.

- Lindberg, S. 1976 - Kinetic studies of a ($\text{Na}^+ + \text{K}^+ + \text{Mg}^{2+}$) ATPase in sugar beet roots. II - Activation by Na^+ and K^+ . Physiol. Plant., 36: 139-144.
- Malhotra, S.S. & M. Spencer. 1974 - Preparation and properties of purified ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) stimulated mitochondrial ATPase from germinating pea seeds. Can. J. Biochem., 52: 491-499.
- Mitchell, P. 1961 - Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. Nature., 191: 144-148.
- Nordlie, R.C., W.T. Johnson., W.E.Jr. Cornatzer. & G.W. Twedell. 1979 - Stimulation by polyamines of carbamylphosphate: glucose phosphotransferase and glucose-6-phosphatase phosphohydrolase activities of multifunctional glucose-6-phosphatase. Biochim. Biophys. Acta., 585:12-23.
- Palmer, J.M. 1976 - The organization and regulation of electron transport in plant mitochondria. Ann. Rev. Plant. Physiol., 27: 133-157.
- Penefsky, H.S., M.E. Pullman., A. Datta. & E. Racker. 1960 - Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. II - Participation of a soluble adenosine triphosphatase in oxidative phosphorylation. J. Biol. Chem. 235: 3330-3336.
- Peter, H.W. & H.U. Wolf. 1972 - Kinetics of (Na^+, K^+) ATPase of human erythrocyte membranes. I - Activation by Na^+ and K^+ . Biochim. Biophys. Acta., 290: 300-309.
- Peter, H.W., H.U. Wolf. & N. Seiler. 1973 - Influence of polyamines on two bivalent-cation activated ATPases. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 354: 1146-1148.
- Peter, H.W., & J. Ahlers. 1975 - Phospholipid requirements of ATPase of *Escherichia coli*. Arch. Biochem. Biophys., 170: 169-178.
- Peter, H.W., A. Gies., M. Neumeier., R. Schädler. & I. Wegener. 1979_a - Influence of the naturally occurring polyamines

- spermine, spermidine and putrescine on the kinetic properties of acetylcholinesterase. Comparative studies with the acetylcholinesterases from the central nervous system of Manduca sexta and of the synaptic plasma membrane of rat brain. Gen. Pharmacol., 10: 133-141.
- Peter, H.W., T. Günther. & N. Seiler. 1979_b - Interrelations between polyamines and phospholipids in Escherichia coli. FEMS. Microbiol. Lett., 5: 389-393.
- Racker, E. 1965 - Mechanisms in bioenergetics. Academic Press. New York.
- Pullman, M.E., H.S. Penefsky., A. Datta. & E. Racker. 1960 - Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. I - Purification and properties of soluble, dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem., 235: 3322-3329.
- Racker, E. & L.L. Horstman. 1967 - Structure and function of submitochondrial particles completely resolved with respect to coupling factor. J. Biol. Chem., 242: 2547-2551.
- Racker, E. 1967 - Resolution and reconstitution of inner mitochondrial membrane. Federation Proc., 26: 1335-1340.
- _____ 1970 - Membranes of mitochondria and chloroplasts. Van Nostrand Reinhold Company. New York.
- _____ 1976 - A new look at mechanisms in bioenergetics. Academic Press, New York.
- Reid, H.B., A.C. Gentile. & R.M. Klein. 1964 - Adenosine triphosphatase activity of cauliflower mitochondria. Plant. Physiol., 39: 1020-1023.
- Russel, D.H. 1973 - Polyamines in normal and neoplastic growth. New York. Raven Press.
- Senior, A.E. 1973 - The structure of mitochondrial ATPase. Biochim. Biophys. Acta., 301: 249-277.

- Seiler, N. & M. Wiechmann. 1966 - Quantitative Bestimmung von Amininen und von Aminosäuren als 1 - Dimethylaminönaphthalin-5-sulfonsaureamide auf Dünnschichtchromatogrammen. Z. Analyst. Chem., 220: 109-127.
- Seiler, N. 1970 - Use of the dansyl reaction in biochemical analysis. Meth. Biochem. Analys., 18: 259-337.
- _____ 1973 - Polyamines in normal and neoplastic growth. Raven Press. New York.
- Seiler, N. & T. Schmidt-Glenewinkel. 1975 - Regional distribution of putrescine, spermidine and spermine in relation to the distribution of RNA and DNA in the rat nervous system. J. Neurochem., 24: 791-795.
- Silva Lima, M., N.D. Denslow, & D.F. De Melo. 1977 - Atractyloside inhibition of adenine nucleotide translocation in mitochondria from hypocotyls of Vigna sinensis cv. seridõ. Physiol. Plant., 41: 193-196.
- Silva Lima, M. & H.W. Peter. 1980 - Effects of Mg^{2+} , Na^+ and K^+ on the F_1 -ATPase of mitochondria of Vigna sinensis (L.) cv. seridõ. Int. J. Biochem., 11: 401-405.
- Slater, E.C. 1963 - Uncouplers and inhibitors of oxidative phosphorylation. In "Metabolic inhibitors" (R.M. Hochster & J.H. Quasrei eds). Vol II Academic Press, New York.
- Stoner, C.D., T.K. Hodges. & J.B. Hanson. 1964 - Chloramphenicol as an inhibitor of energy-linked processes in maize mitochondria. Nature., 203: 258-261.
- Sperk, G. & H. Tuppy. 1977 - Differences between adenosine triphosphatases from monocotylous and dicotylous plants. Plant. Physiol., 59: 155-157.
- Tabor, H. & C.W. Tabor. 1964 - Sp. spd and related amines. Pharmacol. Rev., 16: 245-300.
- Tabor, H. & C.W. Tabor. 1972 - Biosynthesis and metabolism of 1,4 diaminobutane, spermidine, spermine and related amines. Adv. Enzymol., 36: 203-268.

- Takeuchi, Y., Y. Kuniyama. & S. Sato. 1969 - Electron transport dependent adenosine triphosphatase activity in castor bean endosperm mitochondria. Plant Cell Physiol., 10: 733-741.
- Tashima, Y., M. Hasegawa. & H. Mizunuma 1978 - Activation of Na^+ , K^+ adenosine triphosphatase by spermine. Biochem. Biophys. Res. Commun., 82: 13-18.
- Tuppy, H. & Sperk. 1976 - A low-molecular weight ATPase from wheat seedling mitochondria. Eur. J. Biochem., 68: 13-19.
- Verdcourt, B. 1970 - Studies in the Leguminosae-Papilionoideae for the "Flora of tropical east Africa". IV. Kew Bull., 24: 507-569.
- Wiskich, J.T. 1977 - Mitochondrial metabolite transport. Ann Rev. Plant Physiol., 28: 45-69.

VII. PUBLICAÇÕES

C 18

EFEITOS DAS POLIAMINAS E DE Mg^{2+} SOBRE A ATPase MITOCONDRIAL DE Vigna sinensis (L.)
Savi cv. pituba

HORST N. PETER, MOEMA RODRIGUES PINHEIRO & MARIA DA GUIA SILVA LIMA
Deptº de Bioquímica e Biologia Molecular, U.F.Ce., C.P. 1065, Fortaleza, Ceará

As poliaminas, espermina, espermidina e putrescina, têm sido encontradas em todos os tecidos estudados e são capazes de ativar ou inibir enzimas ligadas às membranas, atuando provavelmente como cátions inorgânicos (Peter et al. (1979) Gen. Pharmacol. 10: 133-141). O presente trabalho, mostra a influência das poliaminas e do Mg^{2+} sobre a atividade ATPásica de mitocôndrias de feijão pituba.

A fração mitocondrial foi isolada de hipocótilos de sementes germinadas (Ikuma (1970) Plant Physiol. 45: 113-131). A atividade ATPásica foi medida pelo teor de Pi resultante da hidrólise de ATP. As poliaminas das mitocôndrias foram determinadas segundo Seiler e Wiechmann (Z. Analyt. Chem. 220: 109-127).

As poliaminas, em concentrações fisiológicas, ativaram a ATPase ligada à membrana mitocondrial. Com a ATPase dissociada da membrana não foi detectado nenhum efeito das poliaminas. Assim, as evidências indicam a membrana mitocondrial, no caso presente, como sítio de ação das poliaminas. A análise cinética da ativação provocada pelas poliaminas é dependente da concentração do substrato MgATP. Mg^{2+} inibe a ATPase ligada à membrana e o mecanismo da inibição é do tipo pseudocompetitivo, isto é, Mg^{2+} e MgATP são ligados a sítios diferentes. Além disso, os resultados sugerem uma competição entre os efeitos do Mg^{2+} e os das poliaminas, Mg^{2+} exerce uma ação sobre a ATPase dissociada da membrana mitocondrial, idêntica à das poliaminas.

AUXÍLIOS FINANCEIROS: CAPES, CNPq e DAAD.

IX Reunião Anual da SBBq, Livro de Resumos C 18, 1980.

REGULAÇÃO DA F_1 -ATPase DE MITOCÔNDRIAS DE Vigna unguiculata (L.) Walp. cv. pitiuba PELAS POLIAMINAS

M. R. PINHEIRO, M. SILVA LIMA & H. W. PETER

Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular, UFCe, C.P. 1065, 60.000 - Fortaleza, Ceará.

As poliaminas são encontradas em quase todos os tipos de células e são envolvidas em processos de crescimento e proliferação, estimulando diferentes etapas da síntese de proteínas (Cohen, S.S. Introduction to the Polyamines. Prentice-Hall, N.J. 1971). Outro papel das poliaminas, ainda não bem esclarecido, é o de influírem as enzimas ligadas às membranas.

Com o objetivo de obtermos maiores esclarecimentos sobre o papel das poliaminas, estudamos o efeito por elas exercido sobre a F_1 -ATPase de mitocôndrias de Vigna unguiculata (L.) Walp. cv. pitiuba. A determinação da concentração das diferentes poliaminas em mitocôndrias de hipocótilos revelou os seguintes resultados: espermina, espermidina e putrescina com 24,8, 19,9 e 5,5 ng/g de peso seco respectivamente. A F_1 -ATPase ligada à membrana é ativada pelos tres tipos de poliaminas em concentrações fisiológicas. Assim, espermina 1 mM causa uma estimulação de 71%, espermidina 1 mM de 49% e putrescina 1 mM de 40% na presença de uma concentração ótima de substrato (MgATP). As poliaminas agem alostericamente, tendo sido o coeficiente $n_H = 1,25$ para a espermina, calculado a partir da curva de Hill. A ativação da F_1 -ATPase pelas poliaminas é dependente das concentrações de MgATP, Na^+ , K^+ e Mg^{++} . Os efeitos mais pronunciados foram observados com baixas concentrações de MgATP, na ausência de Na^+ e K^+ . Com MgATP 0,08 μ M a espermina ativa a F_1 -ATPase ligada à membrana em 130%. Na^+ e K^+ ativam a ATPase e o Mg^{++} em concentrações acima dos limites de 0,1 a 1 mM inibe a enzima ligada à membrana, sendo esta inibição dependente da concentração de MgATP. Os resultados sugerem uma competição entre o efeito do Mg^{++} e o das poliaminas. A F_1 -ATPase destacada da membrana não é ativada pelas poliaminas, nem inibida pelo Mg^{++} . Portanto os sítios de ligação do Mg^{++} e das poliaminas estão provavelmente localizados na membrana.

AUXÍLIOS FINANCEIROS: CAPES, CNPq e DAAD.

H.W. Peter, M.R. Pinheiro and M.S. Lima

Regulation of the F₁-ATPase from Mitochondria of Vigna sinensis (L.) Savi cv. pituuba by Polyamines and Inorganic Cations

Mitochondria from *Vigna sinensis* (L.) Savi cv. pituuba contain the polyamines spermine, spermidine and putrescine. The membrane-bound F₁-ATPase (EC 3.6.1.3) from mitochondria of *Vigna sinensis* is activated by these polyamines in physiological concentrations. The effect of polyamines on the membrane-bound F₁-ATPase is dependent on the concentrations of Na⁺, K⁺, MgATP and Mg²⁺. Excess Na⁺ or K⁺ prevents the activation of the membrane-bound F₁-ATPase by spermine and spermidine, but not by putrescine. Most pronounced effects we observed at low MgATP concentrations in the absence of Na⁺ and K⁺. At [MgATP] = 0.08mM spermine activates the membrane-bound F₁-ATPase to 130%.

The membrane-bound F₁-ATPase is slightly activated by Mg²⁺ in lower concentrations and strongly inhibited by Mg²⁺ in higher concentrations. Activation as well as inhibition is dependent on the substrate (MgATP) concentration. Although there is competition between Mg²⁺ and MgATP, the binding sites for these two ligands are different (pseudo-competitive inhibition). The inhibition of the membrane-bound F₁-ATPase can be reversed by polyamines. There is evidence that the binding sites for Mg²⁺ and polyamines are identical.

The F₁-ATPase detached from the membrane is neither activated by polyamines, nor inhibited by Mg²⁺. Therefore, the binding sites for Mg²⁺ and polyamines seem to be localized on the membrane.

Horst W. Peter, Universidade Federal do Ceará, Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular, Caixa Postal, 1065, 60.000 Fortaleza, Ceará, Brazil.

Gemeinsame Herbsttagung
der Gesellschaft für Biologische Chemie (República Federal da
Alemanha)
and der
Österreichischen Biochemischen Gesellschafts
in Innsbruck (Austria)
Sept. Bd 136;1320-1321 (1980)
published in "Hoppe Seyler's Z.f. Physiol. Chemie.

REGULATION OF THE F_1 -ATPase FROM MITOCHONDRIA OF *Vigna sinensis* (L.) Savi cv. pitiuba BY SPERMINE, SPERMIDINE, PUTRESCINE, Mg^{2+} , Na^+ and K^+ .

Horst W. Peter*, Moema Rodrigues Pinheiro and Maria Silva Lima

Universidade Federal do Ceará. Departamento de Bioquímica e
Biologia Molecular, Caixa Postal 1065.

60.000 Fortaleza, Ceará, Brazil

in press Journal Canadian of Biochemistry.

* Present address: Inst. F. Tierphysiologie d. Freier Universita
Grunewald str. 34 - D-1000 Berlin 41 - Germany

SUMMARY

Mitochondria from Vigna sinensis (L.) Savi cv. pitiuba contain the polyamines spermine, spermidine and putrescine. The membrane-bound F_1 -ATPase from mitochondria of Vigna sinensis is activated by these polyamines in physiological concentrations. The effect of polyamines on the membrane-bound F_1 -ATPase is dependent on the concentrations of Na^+ , K^+ , MgATP and Mg^{2+} . Excess Na^+ or K^+ prevents the activation of the membrane-bound F_1 -ATPase by spermine and spermidine, but not by putrescine. Most pronounced effects were observed at low MgATP concentrations in the absence of Na^+ and K^+ . At (MgATP) = 0.08 mM spermine activates the membrane-bound F_1 -ATPase of 130%.

The membrane-bound F_1 -ATPase is slightly activated by Mg^{2+} in low concentrations and strongly inhibited by Mg^{2+} in higher concentrations. Activation as well as inhibition is dependent on the substrate (MgATP) concentration. Although there is competition between Mg^{2+} and MgATP, the binding sites for these two ligands are different (pseudo competitive inhibition). The inhibition of the membrane-bound F_1 -ATPase can be reversed by polyamines. There is evidence that the binding sites for Mg^{2+} and polyamines are identical.

The F_1 -ATPase detached from the membrane is neither activated by polyamines, nor inhibited by Mg^{2+} . Therefore, the binding sites for Mg^{2+} and polyamines seem to be localized on the membrane.

INTRODUCTION

It is generally accepted that polyamines are ubiquitous cell substances. Besides their well documented function in all processes of growth and cell proliferation by stimulating various steps of protein synthesis (1-6) they are also known to stimulate phospholipid synthesis (7), possibly by activating the phospholipid synthesizing enzymes (8,9). Furthermore, polyamines were described to stabilize membranes (10,11) and to affect several membrane-bound enzymes, ATPases (12-14), acetylcholinesterase (15,16) and glucose-6-phosphatase (17).

There are principally two possibilities for the action of polyamines on the membrane-bound enzymes: they may bind directly to the regulatory site of the enzyme, as we described for the acetylcholinesterase (16), or to the negatively charged phospholipids of the membrane, thus neutralizing the charge which could lead to a change in membrane structure causing a modulation of the membrane-bound enzyme. It is quite clear that many of these effects could also be mimicked by inorganic cations, and, therefore, it is difficult to decide between the physiological relevance of polyamines on the one hand and inorganic cations on the other.

We tried to obtain more information about the interrelationships between polyamines and inorganic cations in connection with membrane-bound enzymes. Therefore, we investigated the influence of polyamines, Mg^{2+} , Na^+ and K^+ on the F_1 -ATPase from mitochondria of germinating bean Vigna sinensis (L.) Savi cv. pitiuba. The mitochondrial ATPase from Vigna sinensis is known to be activated by Na^+ and K^+ and inhibited by Mg^{2+} , although Mg^{2+} is essential for forming the substrate $MgATP^{2-}$ (18).

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

ATP was obtained from Boehringer, Mannheim, Germany. Polyamines (hydrochlorids) and the DANS-Cl were from Serva, Heidelberg, Germany. All other chemicals were purchased from Merck, Darmstadt, Germany and were of reagent grade.

Germinating conditions

Pitiuba bean (Vigna sinensis (L.) Savi cv. pitiuba) seeds (1979 crop) were obtained from the seed bank of the Escola de Agronomia Universidade Federal do Ceará, Brazil. These seeds were surface-sterilized with 0.5% NaOCl and germinated at 28°C in vermiculite moistened with distilled water.

Isolation of mitochondria

Mitochondria were isolated from 6 and 7 day-old dark-grown pitiuba bean hypocotyls by the method of Ikuma, (19) modified by Silva Lima et al. (20).

Lysis of the mitochondria

The mitochondria were lysed in a solution of 3 mM Tris pH 8.0 containing 0.01% Triton X 100. After washing with 3 mM Tris pH 8.0 lysed mitochondria were used for measuring the activity of the 'membrane-bound ATPase'.

Solubilization of the F₁-ATPase

The ATPase was solubilized from the disrupted mitochondria with 0.1% deoxycholate on the basis of the method described by Kagawa and Racker (24).

Determination of polyamines

The polyamines were extracted from the freeze-dried mitochondria with perchloric acid as described by Seiler (21). Afterwards, the polyamines were transferred into the DANS-amines according to the method of Seiler and Wiechmann (22). The DANsyl polyamines were applied to silicagel plates from Merck, Darmstadt, Germany, using 'Autoliner' from DESAGA, Heidelberg, Germany. Development was performed in solvent systems described by Seiler and Schmidt-Glenew (23). The separated bands of dansylated polyamines were scraped and extracted with acetone, and measured with a fluorometer at 360 nm.

Determination of enzyme activity

The ATPase activity was determined by measuring the released P described recently (18). The test volume was 10.0 ml throughout; temperature was 30°C. The reaction medium contained 3 mM Tris pH and different amounts of MgCl₂, NaCl, KCl and polyamines as indicated in the legends. Polyamines are known to be completely dissociated pH 8.0. Thus we selected this pH for measurements. The reaction was started by adding ATP or enzyme suspension. After 0 and 15 minutes 1 ml of the test solution was taken immediately and mixed with 2 ml TCA/SDS.

For the evaluation of the MgATP concentration $K_d = 0.215$ mM (2) was used as dissociation constant of the MgATP-complex, this value not being changed in the presence of the polyamine concentrations. The combination of the equations for the dissociation of the MgATP complex

$$(1) \quad K_d = \frac{[ATP][Mg^{2+}]}{[ATPMg]}$$

with the equations describing the equilibrium between the total concentrations $[ATP]_t$ and $[Mg^{2+}]_t$ and the free concentrations $[ATP]$ $[Mg^{2+}]$

$$(2) \quad [ATP]_t = [ATP] + [ATPMg]$$

$$(3) \quad [Mg^{2+}]_t = [Mg^{2+}] + [ATPMg]$$

results in a quadratic equation with the solutions

$$(4) \quad [ATPMg] = \frac{[Mg^{2+}]_t + [ATP]_t + K_d}{2} - \sqrt{\left(\frac{[Mg^{2+}]_t + [ATP]_t + K_d}{2}\right)^2 - [ATP]_t [Mg^{2+}]_t}$$

The Mg^{2+} -concentrations at defined concentrations of MgATP were obtained using eqs. (3) and (4).

The specific activity of the ATPase is given in mU/mg protein. 1 corresponds to 1 μmol MgATP converted in 1 minute.

Determination of protein

Protein was determined by a biuret procedure (26) after solubilization of mitochondria with cholate.

RESULTS

Analysis of the polyamine content in the mitochondria

In isolated mitochondria of germinating Vigna sinensis (L.) Sav. cv. pitiuba we found the polyamines spermine, spermidine and putrescine in the following concentrations, which are related to the dry weight of mitochondria:

spermine: (28.4 ± 3.8) mg/g; spermidine: (19.4 ± 2.8) mg/g; putrescine: (5.3 ± 0.6) mg/g. The data are mean values of 4 measurements \pm S.D.

Effects of polyamines, NaCl and KCl on the ATPase activity

From figs. 1-3 one can see the effects of various concentration of added spermine, spermidine and putrescine on the activity of the membrane-bound ATPase. All these activities were measured in the presence of 2.3 mM MgATP and 0.7 mM free Mg^{2+} . Under these conditions stimulation with 1 mM polyamines is optimal. 1 mM spermine causes a stimulation of 71%, 1 mM spermidine of 49% and 1 mM putrescine 40%. When the enzyme was detached from the membrane with deoxycholate no activation by polyamines was observed (not shown). Therefore, for all following kinetic investigations we used lysed mitochondria for ATPase measurements. We also investigated the influence of polyamines on the membrane-bound F_1F_0 -ATPase when the enzyme had been saturated previously with Na^+ or K^+ . As shown in figs. 4 and 5, the ATPase from pitiuba is activated by Na^+ in the absence of K^+ and to a smaller degree by K^+ in the absence of Na^+ . Furthermore, these figures show that there is competition between Na^+ and K^+ , probably at the same binding site. Figs. 1 and 2 indicate that the ATPase saturated with Na^+ or with K^+ cannot be activated by spermine and by spermidine. However, a further activation of the Na^+ - or K^+ -saturated enzyme can be achieved with putrescine (fig. 3).

Effects of polyamines, MgATP and $MgCl_2$ on the ATPase activity

Mg^{2+} slightly activates the membrane-bound ATPase at concentrations dependent on the MgATP-concentration (fig. 6). When applied at high concentrations, Mg^{2+} exhibits a pronounced inhibitory effect. The pronounced effects enabled us to investigate the mechanism of Mg^{2+} inhibition in detail. The Lineweaver-Burk plots $1/v - 1/(MgATP)$ for different concentrations of Mg^{2+} show straight lines with a common point of intersection on the ordinate (fig. 8), this finding being in accordance with a classical competitive inhibition. However, on the other hand, the Dixon-plots $1/v - (Mg^{2+})$ for different MgATP concen-

trations exhibit straight lines only in the regions of low Mg^{2+} -concentrations, at higher Mg^{2+} -concentrations, there is no linear relationship (inset in fig. 6). If the curves were continued they would be parallel to the abscissa. That means that higher concentrations of Mg^{2+} are not able to cause a further inhibition of the membrane-bound F_1 -ATPase, which is contradictory to the classical mechanism of competitive inhibition. This phenomenon can only be explained assuming two different binding sites for Mg^{2+} and MgATP. Binding of Mg^{2+} would inhibit the splitting of bound MgATP or the binding of MgATP, binding of MgATP would inhibit the binding of Mg^{2+} .

This theory is supported strongly by our finding that the membrane-bound ATPase, but not the solubilized ATPase, is inhibited by Mg^{2+} (fig. 7), indicating that the regulatory site for Mg^{2+} is not situated directly on the ATPase, but on the membrane. The activation by Mg^{2+} at lower concentrations is not influenced by the solubility of ATPase.

From the inset in fig. 6 one can calculate the inhibition constant for Mg^{2+} as $K_i = 1$ mM.

There is also competition between polyamines and MgATP. The Lineweaver-Burk plot $1/v$ versus $1/[MgATP]$ for (spermine) = 0 and for (spermine) = 1.2 mM (fig. 8) show a common point of intersection on the ordinate. This shows that the activation by spermine of the membrane-bound ATPase of Vigna sinensis is strongly dependent on the MgATP-concentration. For $[MgATP] = 0.08$ mM we measured an activation by spermine of 130%, for $[MgATP] = 1$ mM the activation was only 32% (fig. 8). In both measurements the concentration of free Mg^{2+} was 1 mM; no NaCl and KCl had been added.

In order to check, whether or not the binding sites for Mg^{2+} and polyamines could be identical, we varied the spermine concentration in the presence of 1 mM Mg^{2+} and 0.5 mM Mg^{2+} at a rather low substrate concentration (0.2 mM) (fig. 9). In the presence of 1.2 mM spermine the v -values for 0.05 mM Mg^{2+} and for 1 mM Mg^{2+} are identical, showing that a higher concentration of spermine does overcome the Mg^{2+} -inhibition.

DISCUSSION

All of the three polyamines analyzed in the mitochondria from Vigna sinensis (L.) Savi cv. pitiuba are able to activate the membrane-bound F_1 -ATPase, spermine being the most potent activator (figs. 1-3). The F_1 -ATPase detached from the membrane cannot be influenced by polyamines. This indicates that most probably the binding site for spermine, spermidine and putrescine are situated on the membrane and not directly on the enzyme. Similar results were described by Nordli et al. (17) for the membrane-bound glucose-6-phosphatase. These authors observed stimulatory effect by polyamines most pronounced with intact microsomal preparation whereas the deoxycholate dispersed enzyme preparation was only poorly activated. Probably, the positively charged polyamines bind to negatively charged phospholipids, such as phosphatidylserine, thus influencing the fluidity of the biomembrane which leads to alterations of the catalytical behavior of the membrane bound enzyme.

The membrane-bound mitochondrial ATPase from Vigna sinensis is activated by Na^+ and K^+ , these ions competing at the same binding site (figs. 5, 6). Figs 1 and 2 indicate a competition between spermidine and spermine, and Na^+ and K^+ , because the enzyme saturated with Na^+ or K^+ cannot be further activated by spermine and spermidine. However, the activation of the membrane bound ATPase by putrescine is not dependent on the presence or absence of Na^+ and K^+ (fig. 3) It is not very probable that spermine and spermidine on the one hand and putrescine on the other activate the enzyme following different mechanisms. Therefore, most likely, the binding sites for all three polyamines investigated are different from the binding site for Na^+ and K^+ . The concentrations of Na^+ and K^+ needed for optimal activation of the ATPase are relatively high. Therefore, addition of spermidine and especially of spermine cause an extraordinary high ionic strength which possibly could be responsible for the non-appearance of a further activation.

Several authors suggest that polyamines may be able to compete with Mg^{2+} (27-29). We found that the influence of Mg^{2+} and polyamines on the membrane-bound mitochondrial ATPase is quite different. Mg^{2+} activates the ATPase only slightly and at different concentrations depending on the substrate concentration (fig. 6). Nevertheless

Mg^{2+} is essential for the ATPase activity by forming the real substrate MgATP (18). With higher concentrations of Mg^{2+} we observed pronounced inhibitions, which were also dependent on the MgATP - concentration (fig.6). According to the Lineweaver-Burk plots $1/v$ versus $1/[MgATP]$ for different concentrations of Mg^{2+} (fig.8) Mg^{2+} acts as a competitive inhibitor on the membrane-bound ATPase from Vigna sinensis. On the other hand, the Dixon plots $1/v$ versus $[Mg^{2+}]$ for various concentration of MgATP (inset in fig.6) indicate a 'pseudocompetitive inhibition', which includes the possibility that Mg^{2+} and MgATP can be bound simultaneously. Strikingly, the solubilized ATPase is not inhibited by Mg^{2+} (fig.7) the binding site for Mg^{2+} possibly being situated on the membrane. This finding underlines the existence of a 'pseudocompetitive inhibition' with respect to Mg^{2+} and MgATP. As we showed for the membrane-bound F_1 -ATPase from Vigna sinensis(L.) cv. Sêridô, Na^+ and K^+ do not influence the inhibition by Mg^{2+} (18).

The activation of the membrane-bound F_1 -ATPase by polyamines is also dependent on the MgATP concentration. We performed kinetic investigations only with spermine, the results being represented in fig.8. Analogous to the 'competition' between Mg^{2+} and MgATP there is a 'competition' between spermine and MgATP. A similar competition between spermine and MgATP we reported for the Na^+ , K^+ -ATPase from chick brain, in this system spermine acting as inhibitor (18). Comparing the effects of spermine and Mg^{2+} on the kinetic parameters of the F_1 -ATPase from Vigna sinensis one can see that the K_m -value is lowered by spermine but is raised by Mg^{2+} . Neither spermine, nor Mg^{2+} influence the V-value.

There is evidence that the binding sites for inhibitory Mg^{2+} and polyamines are identical, because, firstly, the inhibitory effect of Mg^{2+} can be reversed by spermine (fig.9), and, secondly, we showed that the binding sites for Mg^{2+} as well as for polyamines probably are located on the membrane.

These observations suggest the possibility that polyamines together with inorganic cations are able to regulate the activity of the membrane-bound mitochondrial ATPase from Vigna sinensis. The mechanism of polyamine as well as Mg^{2+} -action is most probably binding to negatively charged phospholipids, this neutralization of charge leading to changes in membrane structure. Thus membrane-bound enzymes such as the F_1 -ATPase could be influenced.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by grants from CNPq and Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Deutsche Akademischer Austauschdienst (DAAD).

REFERENCES

- 1 Cohen, S.S. (1971) in Introduction to the Polyamines. Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J.
- 2 Bachrach, U. (1973) in Function of Naturally Occuring Polyamine Academic Press, New York
- 3 Russel, D.H. (Ed.)(1973) in Polyamines in Normal and Neoplastic Growth. Raven Press, New York
- 4 Morris, D.R. (1978) in Advances in Polyamine Research (ed. by Campbell, R.A., Morris, D.R., Bartos, D., Davies, G.D. and Bartos, F.) Vol.1, pp. 106-115. Raven Press, New York
- 5 Jänne, J., Pörsö, H. and Raina, A. (1978) Biochim. Biophys. Acta 473, 241-293
- 6 Rupniak, H.T. and Paul, D. (1978) in Advances in Polyamine Rese (ed. by Campbell, R.A., Morris, D.R., Bartos, D., Davies, G.D. and Bartos, F.) Vol. 1, pp. 117-126
- 7 Peter, H.W., Günther, T. and Seiler, N. (1979) FEMS Microbiol. Lett. 5, 389-393
- 8 Fukuyama, H. and Yamashita, S. (1976) FEBS-Lett. 71, 33-36
- 9 Jamdar, S.C. (1977) Arch. Biochem. Biophys. 182, 723-731
- 10 Tabor, H. and Tabor, C.W. (1964) Pharmacol. Rev. 16, 245-300
- 11 Tabor, H. and Tabor, C.W. (1972) Adv. Enzymol. 36, 203-268
- 12 Peter, H.W., Wolf, H.U. and Seiler, N. (1973) Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 354, 1146-1148
- 13 Heinrich-Hirsch, B., Ahlers, J. and Peter, H.W. (1977) Enzyme 22, 235-241
- 14 Tashima, J., Hasegawa, M. and Mizunuma, H. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 82, 13-18
- 15 Kossorotow, A., Wolf, H.U. and Seiler, N. (1974) Biochem. J. 142, 21-27
- 16 Peter, H.W., Gies, A., Neumeier, M., Schädler, R. and Wegener, (1979) General Pharmacol. 10, 133-141
- 17 Nordlie, R.C., Johnson, W.T., Cornatzer, W.E. Jr. and Twedell, (1979) Biochim. Biophys. Acta 585, 12-23
- 18 Silva Lima, D. and Peter, H.W. (1980) Intern. J. Biochem., in p
- 19 Ikuma, H. (1970) Plant Physiol. 45, 773-784

- 20 Silva Lima, M., Denslow, N.D. and de Melo, D.F. (1977) *Physiol. Plant* 41, 193-196
- 21 Seiler, N. (1973) in *Polyamines in Normal and Neoplastic Growth* pp. 137-156, Raven Press, New York
- 22 Seiler, N. and Wiechmann, M. (1966) *Z. analyt. Chem.* 220, 109-
- 23 Seiler, N. and Schmidt-Glenewinkel, T. (1975) *J. Neurochem.* 24
791-795
- 24 Kagowa, Y. and Racker, E. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 2467-2474
- 25 Ahlers, J., Ahr, E. and Seyfarth, A. (1978) *Molec. Cellul. Biochem.* 22, 39-49
- 26 Gornall, A.G., Bardawill, C.J. and David, M. (1949) *J. Biol. Chem.* 177, 751-766
- 27 Rosano, C.L. and Hurwitz, Ch. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37, 677-683
- 28 Igarashi, K., Sugawara, K. and Hirose, S. (1975) *J. Biochem.* 77, 753-759
- 29 Bacchi, C.J., Marcus, S.L., Lambros, C., Goldberg, B., Messina and Hutner, S.H. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 58, 776-785

LEGENDS

Fig. 1.

Activity of the membrane-bound F_1 -ATPase as a function of spermine concentration. Conditions for measurements: (MgATP) = 2.3 mM; $(Mg^{2+}) = 0.7$ mM, 3 mM Tris-HCl pH 8.0, $T = 30^\circ C$

○ (NaCl) and (KCl) = 0

△ (KCl) = 8; (NaCl) = 0.1 M

● (NaCl) = 0; (KCl) = 0.1 M

Fig. 2

Activity of the membrane-bound F_1 -ATPase as a function of spermidine concentration. Conditions for measurements are the same as described in Fig. 1

Fig. 3

Activity of the membrane-bound F_1 -ATPase as a function of putrescine concentration. Conditions for measurements are the same as described in Fig. 1

Fig. 4

Plots of v versus (NaCl) in the absence of added KCl (○) and the presence of 0.1 M KCl (●). Conditions for measurements: (MgATP) = 2.3 mM, $(Mg^{2+}) = 0.7$ mM, 3 mM Tris-HCl pH 8.0, $T = 30^\circ C$

Fig. 5

Plots of v versus (KCl) in the absence of added NaCl (○) and the presence of 0.1 M NaCl (●). Conditions for measurements: (MgATP) = 2.3 mM, $(Mg^{2+}) = 0.7$ mM, 3 mM Tris-HCl pH 8.0, $T = 30^\circ C$

Fig. 6

Membrane-bound F_1 -ATPase: plots of v versus $-\log(Mg^{2+})$ for different concentrations of MgATP. (MgATP) = 0.08 mM (▽); 0.2 mM (△); 0.5 mM (○); 0.75 mM (●); 1 mM (□). (NaCl) and (KCl) = 0. Inset: Dixon-plots $1/v$ versus (Mg^{2+}) for different concentrations of MgATP. The extrapolation of the curves have a common intersection point in the second quadrant, this extrapolation is transferred to the first quadrant (dashed lines).

Solubilized F_1 -ATPase: plot of v versus $-\log(Mg^{2+})$. (MgATP) = 0.08 mM; (NaCl) and (KCl) = 0, 3 mM Tris-HCl pH 8.0, $T = 30^\circ C$

Fig. 8

Membrane-bound ATPase: Lineweaver-Burk plots $1/v$ versus $1/(\text{MgATP})$ for $(\text{Mg}^{2+}) = 1 \text{ mM}$ (○) and $(\text{Mg}^{2+}) = 0.5 \text{ mM}$ (●) and Lineweaver-Burk plots $1/v$ versus $1/(\text{MgATP})$ for $(\text{spermine}) = 1.2 \text{ mM}$ (▽), in both cases the Mg^{2+} -concentration being 1 mM .

No NaCl and KCl had been added, 3 mM Tris-HCl pH 8.0, $T = 30^\circ\text{C}$.

Fig. 9

Activity of the membrane-bound F_1 -ATPase as a function of the spermine concentration in presence of 1 mM Mg^{2+} (○) and 0.05 mM Mg^{2+} (●). No NaCl and KCl had been added, $(\text{MgATP}) = 0.2 \text{ mM}$, 3 mM Tris-HCl pH 8.0, $T = 30^\circ\text{C}$.

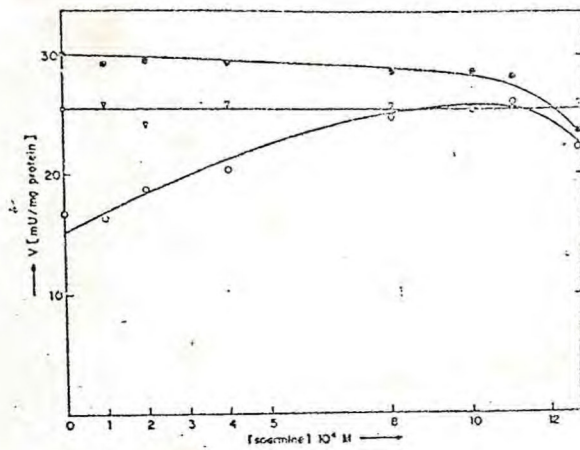


Fig. 1

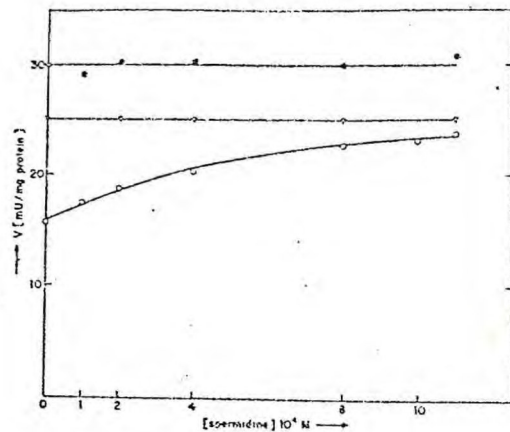


Fig. 2

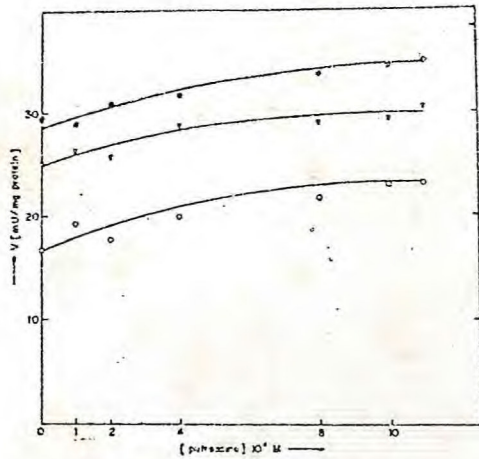


Fig. 3

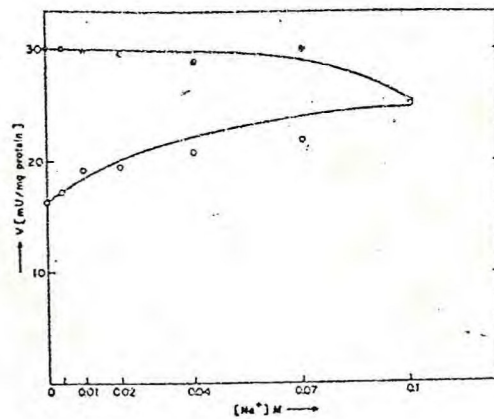


Fig. 4

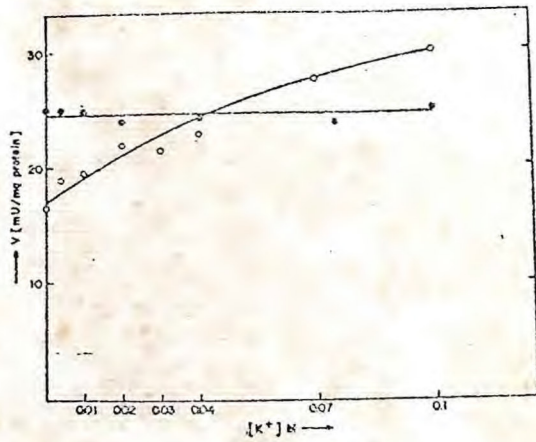


Fig. 5

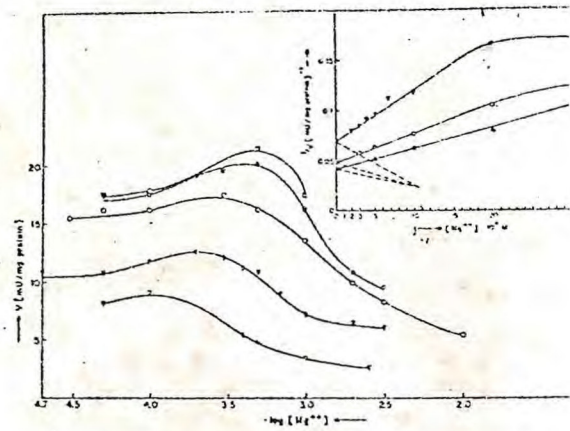


Fig. 6

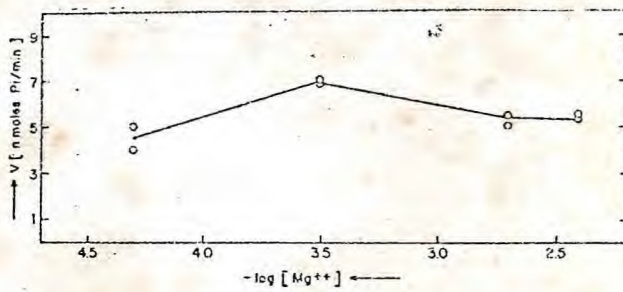


Fig. 7

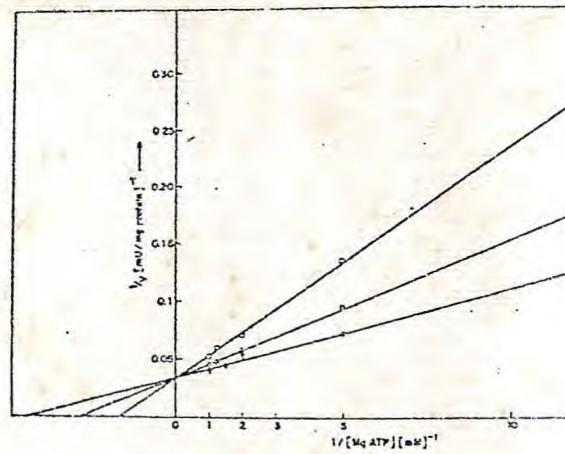


Fig. 8

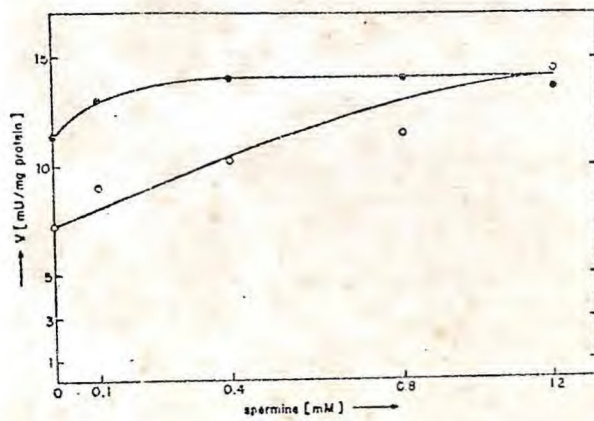


Fig. 9