

03062
2ej. 6

RECIBO DE
LIBRERIA
AL 30
470
8/10

Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Fisiología Celular.
(UACP y P del CCH)

**ESTUDIO DE LA INTERACCION DEL CADMIO CON EL SITIO ACTIVO
DE LA DESHIDROGENASA SUCCINICA**

TESIS

Que para Obtener el Título de:
MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

Presenta:

DAVID JOHN JAY GÓMEZ-FARIAS

MEXICO, D.F.

1989

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

I.-	Abreviaturas.....	1.
II.-	Resumen.....	2.
III.-	Introducción.....	3.
IV.-	Materiales y Métodos.....	9.
V.-	Resultados.....	14.
VI.-	Discusión.....	23.
VII.-	Conclusiones y Perspectivas.....	31.
VIII.-	Explicaciones de las Figuras y Tablas.....	32.
IX.-	Figuras.....	36.
X.-	Bibliografía.....	46.

ABREVIATURAS

- 1.- ATP: Adenosin trifosfato.
- 2.- CoQH₂: Coenzima Q reducida.
- 3.- DCIP: 2,6- Dicloroindofenol de sodio.
- 4.- EDTA: Acido etilendiamino tetracético.
- 5.- FAD: Flavin-adenin-dinucleótido.
- 6.- MOPS: Acido 3-[N-morfolino]-2-hidroxiopropanosulfónico.
- 7.- MSF: Metasulfato de fenazina.
- 8.- PSM: Partículas submitocondriales.
- 9.- SH: Grupo sulfhidrilo.
- 10.- SDH: Succinato deshidrogenasa (succinato: (aceptor) oxidorreductasa, EC 1,3,99,1).
- 11.- TRIS: Tris(hidroximetil)aminometano.

RESUMEN

En este trabajo se describe la interacción del cadmio con la SDH. Los resultados del trabajo muestran que, en preparaciones membranales activadas, el cadmio reacciona con la enzima con una constante de velocidad de segundo orden de $10.4 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7.35 a 25° C . El sustrato y el malonato protegen completamente contra la inhibición por Cd^{2+} lo cual sugiere que el metal se une únicamente al sitio activo de la enzima para inactivarla. La enzima modificada por cadmio, sin embargo, retiene su capacidad de unir al malonato aunque ha perdido su capacidad de unir al oxalacetato. Esto último apoyaría la hipótesis de que el grupo $-\text{SH}$ del sitio activo puede unir al modulador negativo formando un tiohemicetal (43,44) y descartaría la hipótesis de que este grupo sea el sitio de unión del sustrato (45). La dependencia de la constante de inactivación de *pseudo* primer orden con respecto al pH muestra que el cadmio se une a un $-\text{SH}$ con pK_a de 7.23. Este valor anormalmente bajo de pK_a se podría explicar si se asume que el $-\text{SH}$ al que se une el cadmio está interactuando con un grupo con carga positiva. Los resultados EPR muestran que la enzima modificada por cadmio no es capaz de mostrar la señal del centro fierro-azufre binuclear aún en partículas reducidas con ditionita. Sin embargo, tanto el succinato como el malonato previenen la desaparición indicada por Cd^{2+} de esta señal lo que sugeriría que este grupo está cerca de el sitio activo o respondiendo de manera directa a los eventos que ahí suceden.

ESTUDIO DE LA INTERACCION DEL CADMIO CON EL SITIO ACTIVO DE LA DESHIDROGENASA SUCCINICA

INTRODUCCION

Desde su descubrimiento inicial hace casi 80 años (1), la deshidrogenasa succinica (succinato: (aceptor) oxidorreductasa, EC 1,3,99,1)(SDH) ha sido una de las enzimas más estudiadas. Como resultado de este esfuerzo, actualmente se dispone de una gran cantidad de información en lo referente a su estructura, composición, propiedades reguladoras y mecanismo de reacción.

En células estrictamente aeróbicas, la deshidrogenasa succinica es una enzima ligada a la membrana interna mitocondrial e integrada a la cadena respiratoria. Cataliza la oxidación del succinato a fumarato la cual esta acoplada a la reducción de la ubiquinona, constituyendo una unidad funcional, denominada por Hatefi, complejo II (2,3).

Estudios con substitutos monohalogenados análogos del succinato han revelado que la deshidrogenación del succinato es en posición trans según la reacción descrita en la figura 1, en donde dos pares de hidrogenos trans son equivalentes a este respecto (4,5).

En lo que se refiere a la naturaleza del segundo componente de la reacción, el aceptor natural de electrones (A_{ox} y AH_2 en la figura 1), estudios recientes de reconstitución han mostrado que la SDH es capaz de reducir a la coenzima Q e integrarse a la membrana sólo en presencia de una proteína compuesta por dos subunidades de pesos moleculares 15.5 y 13.5 K daltones (6). Esta proteína, que sería el aceptor natural de electrones, contiene un grupo hemático que por sus características espectrales se asemeja a un citocromo de tipo b. En su forma reducida presenta máximos de absorción a 560 (α), 526 (β), 424 (soret).

La transferencia de electrones entre la SDH y la coenzima Q es inhibida específicamente por la 2-tenoiltrifluoroacetona y las carboxinas a nivel del citocromo b_{560} (7,8,9).

Por otro lado, la enzima es capaz de donar electrones a aceptores artificiales como el ferricianuro y el metasulfato de fenazina (MSF) (este último como mediador en el paso de electrones hacia el diclorofenolindofenol DCIP), constituyendo una forma para medir la actividad de deshidrogenasa (10,11)

La actividad de la enzima también puede determinarse siguiendo la reacción reversa, es decir, la reducción del fumarato a succinato. La actividad de fumarato reductasa puede llevarse a cabo con donadores electrónicos adecuados como el Flavin mononucleótido reducido (FMNH_2) o el NADH en presencia de cianuro en preparaciones membranales. En células aeróbicas esta actividad representa alrededor del 4% de la reacción de oxidación en preparaciones ligadas a la membrana y el 8% en preparaciones solubles de la enzima (12). Sin embargo, en células anaeróbicas y facultativas (en crecimiento anaeróbico con sustratos no fermentables, (13)), la velocidad de reducción del fumarato excede por mucho a la de oxidación del succinato. En anaerobios obligados, como *Micrococcus lactilyticus* y *Clostridia*, el fumarato reemplaza al O_2 como oxidante terminal. La reducción del fumarato a succinato permite la continua oxidación de los piridín-nucleótidos reducidos. De esta manera la fumarato reductasa sustituye a la citocromo oxidasa de las células aeróbicas (14).

ESTRUCTURA Y COMPOSICION DE LA ENZIMA

Como se menciona arriba, la SDH es una enzima universalmente distribuida tanto entre células procarióticas como eucarióticas. Y aunque no en todos los organismos presenta características cinéticas iguales (lo cual depende de las necesidades fisiológicas de cada especie), al parecer, un patrón básico de estructura es común a todos. A continuación se describen algunas de las características moleculares comunes mejor establecidas.

La (SDH) es una flavo proteína ferrosulfurada compuesta por dos subunidades desiguales. La subunidad mayor tiene un peso molecular

de 70,000 daltones y contiene Flavín Adenín Dinucleótido unido covalentemente (1 mol de 8 α -[N(3)-histidil]-FAD/mol de enzima, ver figura 2), en el sitio de unión del sustrato (15). Como se muestra en la figura 2 el anillo de isoaloxazina es capaz de existir en tres formas redox: una forma oxidada o quinona, una forma semirreducida (por la aceptación de un electrón) o semiquinona y una forma completamente reducida o hidroquinona. En la enzima los tres estados del FAD pueden existir siendo el electrón desapareado de la semiquinona el que se detecta en experimentos EPR (16). Además, la subunidad mayor presenta 4 equivalentes de Fe y de S²⁻.

En lo que se refiere a la subunidad menor de la enzima, ésta tiene un peso molecular de 30,000 daltones y contiene 3-4 equivalentes de Fe y de S²⁻ (15) (los estudios que se mencionan abajo, sin embargo, han puesto en duda el contenido real de Fe y S de la enzima).

Estudios recientes con dicroísmo circular magnético a bajas temperaturas (17), resonancia paramagnética electrónica (EPR) (18,19,20,21) y efecto de campo eléctrico lineal en EPR (22) han demostrado que el fierro y azufre ácido-lábil de la enzima se encuentran formando tres tipos distintos de centros fierro-azufre (para una revisión ver 23,24,25). Actualmente se acepta que la enzima posee como grupos prostéticos además del FAD: a) un centro binuclear [2Fe-2S]¹⁺ (donde el sobreíndice indica la valencia total del grupo, considerando la del S = -2), llamado S-1, que puede ser detectado en experimentos EPR (g = 2.03, 1.94, 1.91)^{*} a 77 K reduciendo a la enzima con succinato (E_m \approx 0mV), b) un centro trinuclear [3Fe-xS]^{3+,2+,1+,0}, donde x puede ser igual a 3 ó 4, llamado S-3, cuya señal se detecta en experimentos EPR (g = 2.015, 2.014, 1.990) a T \leq 20 K con la enzima oxidada (E_m \approx 65mV) y c) un

* Donde $g = hv/\beta H$, h = Constante de Planck, v = frecuencia de las microondas en MHz, β = magnetón de Bohr, H = campo magnético, en gauss, es el factor de escisión; g es un parámetro espectroscópico que relaciona la intensidad del campo magnético con la frecuencia del las microondas y es característico para cada centro paramagnético de una muestra.

centro tetranuclear de bajo potencial $[4\text{Fe-4S}]^{2+,4+}$, llamado S-2, que aparece ($g = 2.25, 2.06, 1.84, 1.74, 1.63$) a $T \leq 20 \text{ K}$ únicamente cuando la enzima es reducida con ditionita ($E_m \approx -400$ en preparaciones solubles y $E_m \approx -260$ en complejo II).

PROPIEDADES REGULADORAS

En la mitocondria la deshidrogenasa succínica está sujeta a un complicado mecanismo de regulación (26). En la mayoría de los procedimientos para obtener la SDH soluble o ligada a la membrana, la enzima es aislada en forma inactiva con oxalacetato fuertemente unido. La SDH puede existir en dos formas: un estado inactivo estabilizado por la unión del oxalacetato (27) y un estado activo estable en presencia de ligandos del sitio activo como el succinato o el malonato (28,29) u otros compuestos como la CoQH_2 (30,31), ATP (32) y algunos aniones inorgánicos (33,34).

Por lo general cualquier tipo de preparación de la enzima, ya sea soluble o ligada a la membrana, contiene entre un 80 y un 90 % de enzimas inactivas con oxalacetato firmemente unido (12). Antes de realizar cualquier experimento cinético es necesario asegurarse de activar a la enzima para no trabajar con una mezcla heterogénea de proteínas.

REACTIVIDAD DE GRUPOS SULFHIDRILO

Desde que se descubrió, hace aproximadamente 50 años, que la enzima era sensible a reactivos para grupos $-\text{SH}$ (35,36) muchas investigaciones se han realizado con la intención de determinar la localización y función de estos grupos en la enzima. A este respecto, la presencia de grupos sulfhidriilo en el sitio activo ha sido cuestionada por autores como Sanborn (37) quien observó inhibición parcial de la enzima por N-etilmaleimida (NETMal) y bromopiruvato y protección parcial por ligandos del sitio activo.

De la misma manera Felberg y Hollocher (38) reportaron que la [¹⁴C] N-etilmaleimida se une a una cisteína crucial para la actividad en la subunidad mayor de la enzima; sin embargo, estos autores llegaron a la conclusión de que esta cisteína no estaba en el sitio activo. Lê-Quôc, et al., (39), en preparaciones activadas con fosfato, encontraron dos tipos de grupos -SH esenciales para la actividad de la enzima. Por otro lado, tres trabajos, con preparaciones completamente activadas de la enzima, mostraron que la alquilación de la SDH por NETMal inhibía completamente a la proteína y podía ser prevenida completamente por ligandos del sitio activo cumpliéndose, de esta manera, todos los criterios para un inhibidor directo del sitio activo (40,41,42). Estos trabajos sugieren que los patrones complejos de inhibición encontrados anteriormente puedan ser parcialmente debidos al tipo de preparaciones utilizadas, inactivadas o no completamente activadas, y que la enzima sólo presenta un grupo -SH esencial para la actividad y que éste se localiza en el sitio activo.

En lo que se refiere al papel de los grupos -SH en la enzima, actualmente se dispone de poca evidencia en favor de una función específica. Ha sido sugerido (43,44) y controvertido (29) que la cisteína del sitio activo pueda estar involucrada en la unión del oxalacetato mediante la formación de un enlace tiohemiacetal. También se ha sugerido que pueda participar en la unión del sustrato (45). Por último, el perfil de actividad frente al pH muestra un posible papel de la cisteína en la activación del sustrato previa a la transferencia intramolecular de electrones (41).

A pesar del avance en el conocimiento acerca de la enzima alcanzado en los últimos años, son muchas las preguntas básicas que aún permanecen sin resolverse totalmente. Por ejemplo, no se sabe cuál es la naturaleza molecular del proceso de activación e inactivación. Tampoco se sabe cual es el mecanismo de acción de la enzima, incluyendo la transferencia intramolecular de electrones. Se desconoce qué grupos participan en la unión del sustrato al sitio activo y cuales en su activación.

En este trabajo se describe la interacción del cadmio con la SDH. Debido a que el cadmio es un reactivo que reacciona preferentemente con grupos sulfhidrilo (46,47) y cuyo radio iónico hidratado es pequeño, $\cong 1 \text{ \AA}$ (48), (lo cual representa una ventaja sobre otros reactivos para sulfhilo), probó ser una herramienta útil para el estudio de la localización y función de los grupos -SH y la posible relación de éstos con algunos de los grupos prostéticos de la enzima. Los resultados del trabajo muestran que, en preparaciones membranales activadas, el cadmio reacciona con la enzima con una constante de velocidad de segundo orden de $10.4 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7.35 a 25° C . El sustrato y el malonato protegen completamente contra la inhibición por Cd^{2+} lo cual sugiere que el metal se une únicamente al sitio activo de la enzima para inactivarla. La enzima modificada por cadmio, sin embargo, retiene su capacidad de unir al malonato aunque ha perdido su capacidad de unir al oxalacetato. Esto último apoyaría la hipótesis de que el grupo -SH del sitio activo puede unir al modulador negativo formando un tiohemiacetal (43,44) y descartaría la hipótesis de que este grupo sea el sitio de unión del sustrato (45). La dependencia de la constante de inactivación de *pseudo* primer orden con respecto al pH muestra que el cadmio se une a un -SH con pKa de 7.23. Similares valores de pKa para este grupo han sido reportados por otros autores (41). Este valor anormalmente bajo de pKa se podría explicar si se asume que el -SH al que se une el cadmio está interactuando con un grupo con carga positiva. Los resultados EPR muestran que la enzima modificada por cadmio no es capaz de mostrar la señal del centro fierro-azufre binuclear aún en partículas reducidas con ditionita. Sin embargo, tanto el succinato como el malonato previenen la desaparición indicada por Cd^{2+} de esta señal lo que sugeriría que este grupo está cerca de el sitio activo o respondiendo de manera directa a los eventos que ahí suceden. El hecho de que el centro S-1 en sí pueda jugar un papel en la unión de ligandos del sitio activo también se discute en este trabajo.

MATERIALES Y METODOS

PREPARACION Y ACTIVACION DE LAS PARTICULAS SUBMITOCONDRIALES

Las mitocondrias de corazón de res se prepararon de acuerdo a la técnica que utiliza el politrón como ha sido reportado previamente (49). Básicamente el método consiste en homogeneizar el músculo cardíaco con el politrón en un medio con 250 mM de sacarosa 1 mM de EDTA-tris pH 7.3. Después de reajustar (con Tris) a 7.3 el pH del homogenado, éste se centrifugó a 800 G durante 10 min y el sobrenadante a 12,000 G durante 10 min. El precipitado se lavó una vez más en el mismo medio de sacarosa. Las partículas submitocondriales (PSM) se prepararon por rompimiento con ultrasonido de la mitocondrias de res. Las mitocondrias fueron expuestas durante tres minutos, en un medio de sacarosa a pH 8.5, a la máxima amplitud de un sonicador Soniprep 150. Las mitocondrias rotas fueron centrifugadas a 12,000 G durante 10 min y el sobrenadante a 120 000 durante 1 h. Las partículas así obtenidas fueron activadas resuspendiéndolas en un medio que contenía 250 mM de sacarosa/ 5 mM de malonato-tris pH 7.4/ 25 mM de HEPES pH 7.4. La suspensión fue incubada a 30°C y pequeñas alícuotas fueron retiradas durante la incubación para medirles actividad de deshidrogenasa. La actividad se incremento entre 5 y 6 veces durante un periodo de incubación de 20 min y permaneció constante durante más de una hora. Las partículas para los experimentos cinéticos normalmente se activaron en estas condiciones durante un periodo de 1 h. Después de la activación las partículas fueron enfriadas y centrifugadas. El precipitado se resuspendido en un medio de sacarosa sin malonato a 25°C y se centrifugó una vez más. El precipitado fue resuspendido en un medio de sacarosa (20 mg de proteína por ml) y guardado a -70°C en pequeñas fracciones. Estas preparaciones no experimentan ninguna pérdida significativa de actividad en un periodo de por lo menos 5 meses. La preparación así obtenida tienen una actividad de succinato: fenazina

metosulfato reductasa de \approx .75-.85 μ moles de succinato oxidado /min·mg de proteína a 25°C (pH 7.35). La curva de velocidad inicial a 3° C de estas preparaciones no mostró ningún retardo con lo que se determinó que las partículas no contenían malonato. A esta temperatura el malonato se disocia muy lentamente de la enzima de tal manera que la curva de velocidad inicial en presencia de succinato muestra un retardo (50). Así mismo, estas partículas no experimentaron ninguna activación al ser preincubadas con succinato por lo que no contenían oxalacetato fuertemente unido (27).

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD

La actividad de deshidrogenasa succínica se midió espectrofotométricamente a 25° C siguiendo la reducción del DCIP a 623 nm mediada por el MSF (51). Para los experimentos de inactivación con Cd^{2+} el medio normalmente contenía: 200 mM de sacarosa, 25 mM de Tris (pH 7.35), succinato o malonato (a las concentraciones indicadas en las figuras), 1 mM de cianuro de sodio, 8.5 μ M de rotenona (disuelta en DMSO), la reacción se inició por la adición de las partículas (41.67 μ g/ml) seguida de la adición de cadmio (a las concentraciones indicadas en las figuras). Alícuotas de estos medios fueron retiradas a los tiempos indicados para medirles la actividad añadiendo 5.0 mM de succinato (o lo que faltaba para completar esta cantidad en el caso de los medios que ya tenían succinato), 0.064 mM DCIP y 1.4 mM de MSF, el volumen final fue de 3 ml. Con el objeto de evitar el efecto de distintas sales a distintos valores de pH, en el caso de la determinación de la dependencia de la constante de inactivación o de la actividad de la enzima con respecto al pH, el medio se amortiguó con una mezcla de 10 mM de MOPS + 10mM de Tris a todos los valores de pH. Para los experimentos cinéticos no se observó ninguna quelación del Cd^{2+} por el succinato o el malonato medido

con arsenazo III (570-610 y 675-685), a las concentraciones usadas de estos aniones. De la misma manera no se observó en ningún caso más de un 1% de quelación por las partículas submitocondriales durante el período de inactivación de la enzima, indicando que el Cd^{2+} libre permanece esencialmente constante durante el ensayo.

Todas las constantes se determinaron por ajuste de los datos experimentales a las ecuaciones respectivas.

La proteína se determino de acuerdo al método de Lowry (52).

UNION DEL MALONATO A LA ENZIMA

En los experimentos de unión de [2-14C] Malonato, las PSM (1 mg prot/ml) se incubaron a 25°C en 1 ml de medio que contenía: 200 mM de sacarosa, 1 mM de cianuro de sodio, 8.5 μ M de rotenona. Después de 1 min de incubación se añadió 74 μ M de [2-14C] Malonato (con una actividad específica de 4.60×10^4 cuentas/min/nmol) y a los 15 segs la muestra fue transferida a un baño con hielo durante 2 min. 15 segs antes de terminar esta incubación las PSM fueron diluidas por la adición de 1 ml de KCl 150 mM a 3°C y una alícuota de 0.5 ml de este medio se tomó para ser filtrada en un filtro millipore de acuerdo a lo descrito en (53). En los caso en que se añadió Cd^{2+} u oxalacetato o Cd^{2+} y oxalacetato esto se hizo después de la primera incubación de las PSM a 25° C (1 min). Después de añadir estos reactivos se adicionó el malonato y se prosiguió como en el ensayo anterior. La adición de los inhibidores se hizo de la siguiente manera: a) Cd^{2+} : se añadió Cd^{2+} (30 μ M) y se dejó incubando a las PSM durante 2 min a 25°C, después se añadió el malonato; b) oxalacetato: se añadió oxalacetato (50 μ M) y se dejó incubando a las PSM 3 min a 25° C, después se añadió el malonato; c) Cd^{2+} y oxalacetato: se añadió el Cd^{2+} y se incubó 2 min después se añadió el oxalacetato y se incubó 3 min por último se adicionó el malonato.

EXPERIMENTOS EPR

Las muestras para EPR se prepararon de la siguiente manera (todas las concentraciones indican la concentración final de la mezcla): a) 0.2 ml de PSM (40 mg/ml) suspendidas en 200 mM de sacarosa, 25 mM tris-HCl pH 7.35 se les añadió: a) reducción por succinato: 1 mM de tenoiltrifluoroacetón (en DMSO) y 40 mM de succinato-Tris pH 7.3 y se incubaron 15 segs, b) reducción por ditionita: se añadió un poco de ditionita sólida; en estos espectros, la intensidad de la señal a $g = 1.94$ proveniente de PSM tratadas con NADH y rotenona fue sustraída para determinar la contribución de la señal de centro S-1 c) reducción por succinato seguida de adición de cadmio: las PSM se trataron como en a) y después se les añadió Cd^{2+} (40 ng átomo/mg de proteína) y se dejaron incubar 3 min, d) adición de cadmio seguida de succinato: se hizo lo mismo que en c) salvo que se invirtió el orden de las adiciones, e) adición de malonato seguida de Cd^{2+} seguida de succinato: se añadió malonato (20 mM) y después se siguieron los mismos pasos que en d), f) adición de Cd^{2+} seguida de malonato y de succinato: se hizo lo mismo que en e) pero se invirtió el orden de adición entre el Cd^{2+} y el malonato. En todos los casos el volumen final se ajustó a 0.25 ml y las incubaciones se hicieron a 25°C. Después de las incubaciones 0.1 ml de las muestras fueron puestas en tubos de cuarzo para EPR y congeladas con nitrógeno líquido inmediatamente antes de que sus espectros fueran trazados. Las muestras se trabajaron en condiciones anaeróbicas, lo cual se consiguió por repetida evacuación del aire y adición de nitrógeno en las partículas y las soluciones y mezclado de estas en una atmósfera de nitrógeno.

El espectrofotómetro utilizado en este trabajo fue un Varian E 112 banda-X. Se usó una cavidad rectangular Varian TE 102, con una amplitud de modulación de 100 KHz. Frecuencias típicas de microondas estuvieron alrededor de 9.2312 GHz. La temperatura de las muestras se controló y monitoreó con un controlador Varian de

temperatura V4540. Todos los espectros fueron trazados a 80 K. En este espectrofotómetro los valores de g se midieron con una prueba de resonancia nuclear. La señal NMR del proton fue procesada con un gaussmetro Magnion y la frecuencia fue mostrada en un contador Hewlitt-Packard. Con la idea de obtener la minima incertidumbre en las mediciones tanto de la señal EPR como de la de NMR, las señales fueron observadas simultaneamente en un osciloscopio de doble rayo. La frecuencia de las microondas también se mostró en un contador digital. Todos los espectros en este trabajo están representados como la primer derivada de la línea de absorción de microondas.

RESULTADOS

INACTIVACION DE LA SDH POR CADMIO

La incubación de las PSM con Cd^{2+} en un medio de sacarosa a pH 7.35 resultó en una pérdida de la actividad enzimática dependiente de tiempo. La representación semilogarítmica de la actividad enzimática residual versus el tiempo fué lineal.

Aunque la cantidad de cadmio requerida para inhibir a la enzima es muy pequeña, la concentración de Cd^{2+} libre no experimenta disminución significativa durante el ensayo (ver materiales y métodos) de tal manera que no fue necesario el análisis de los datos bajo un esquema de segundo orden para un proceso bimolecular (54). La figura 3 muestra los datos obtenidos de experimentos de inactivación de la SDH a distintas concentraciones de cadmio. Las pendientes obtenidas a distintas concentraciones del metal estuvieron linealmente relacionadas con la concentración de éste (recuadro de la Fig. 3). Esto sugiere que no hay la formación de un complejo reversible, entre la proteína y el cadmio previa a la inactivación de la enzima (55). De esta manera, los datos pueden ser analizados según un esquema simple de primer orden para un inhibidor irreversible, donde la velocidad de inactivación de la enzima esta dada por:

$$(1) \quad - \frac{d[\text{Ea}]}{dt} = K_{\text{app}} [\text{Ea}]$$

en donde $[\text{Ea}]$ es la concentración de enzima activa al tiempo t y K_{app} (constante observada de pseudo primer orden) = $K_1[\text{Cd}^{2+}]$, siendo K_1 la constante de velocidad de segundo orden que puede ser calculada de la pendiente de la grafica mostrada en el recuadro de la figura 3 ($K_1 = 10.4 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

PROTECCION DE LA SDH CONTRA LA INHIBICION

La inactivación de la SDH por el cadmio no implica directamente que un residuo específico esté siendo modificado o que este residuo esté en el sitio activo. Sin embargo, la protección de la enzima por el sustrato o por inhibidores competitivos contra la inactivación sugeriría que los residuos de aminoácidos que son protegidos de la modificación están en el sitio activo o cerca de él. La inhibición de la enzima por un inhibidor irreversible en presencia del sustrato o de un inhibidor competitivo puede ser descrita por la siguiente ecuación (56):



en donde A representa al sustrato o al inhibidor competitivo, K_e es su constante de disociación y el inhibidor irreversible (I o Cd^{2+} en este caso) sólo se unirá a la forma libre de la enzima. En el equilibrio, la concentración de la enzima que puede reaccionar con el inhibidor irreversible depende de la concentración de sustrato o de inhibidor competitivo presentes. En estas condiciones la velocidad de inhibición puede ser descrita por:

$$(3) \quad - \frac{d[Enz]}{dt} = K_{app} [Enz]$$

en donde,

$$(4) \quad K_{app} = \frac{K_i [Cd^{2+}] \times K_e}{K_e + A}$$

es la constante aparente de *pseudo* primer orden en presencia del sustrato o del inhibidor competitivo que puede ser determinada de la gráfica del logaritmo de la actividad remanente *versus* el

tiempo a distintas concentraciones de sustrato o de inhibidor competitivo. En su forma recíproca la ecuación 4 da:

$$(5) \quad \frac{1}{K'_{app}} = \frac{1}{K_s [Cd^{2+}]} + \frac{A}{K_s [Cd^{2+}] K_e}$$

de tal manera que una gráfica de $1/K'_{app}$ contra A dará una línea recta (si el sustrato o el inhibidor competitivo protegen completamente de la inactivación por el inhibidor irreversible) con una intercepción en el eje de A de $-K_e$.

Los resultados de los experimentos llevados a cabo de acuerdo a estas consideraciones se muestran en las figuras 4 y 5. En la figura 4a se muestra que concentraciones crecientes de succinato disminuyen progresivamente, a partir de un valor inicial de $6.9 \times 10^{-3} \times s^{-1}$, la velocidad de inactivación por cadmio. El gráfico de K'_{app} versus [succinato] fue descendiente, de acuerdo con la ecuación 4 (Fig. 4b). El regráfico de $1/K'_{app}$ versus [succinato] fue lineal, de acuerdo a la ecuación 5, obteniéndose una K_e de $267 \mu M$ (Fig. 4c). En la figura 5 se muestran resultados similares para el malonato obteniéndose una K_e (K_i) de $1.7 \mu M$. Ambos valores de K_e y K_i están de acuerdo con los valores de K_e de $300 \mu M$ y K_i de $1.3 \mu M$ previamente reportados para estas constantes (39,40).

CARACTERIZACION DEL GRUPO MODIFICADO POR EL CADMIO

Aunque se ha demostrado que el cadmio reacciona preferentemente con grupos $-SH$ en las proteínas (46,47) y que hay por lo menos un grupo sulfhidrilo esencial para la actividad en el sitio activo de la SDH (40,41,42), otros residuos, como carboxilo e imidazol pueden ser modificados (57). Por lo tanto, con la idea de obtener mayor información del grupo que está siendo alterado por el cadmio se decidió estudiar las propiedades ácido-base del sitio de unión del metal. Si un residuo de cisteína es requerido para la unión del sustrato o para la catálisis, la velocidad de inactivación de la enzima dependerá del grado de protonación del $-SH$ siempre y

cuando el sulfhidrilo desprotonado reaccione a una velocidad sustancialmente mayor que el sulfhidrilo protonado. La figura 6 muestra que la velocidad de inhibición de la SDH por cadmio aumenta al aumentar el pH de 6.5 a 8.5. La relación entre la constante observada de *pseudo* primer orden y el pH puede ser expresada según la ecuación:

$$(6) \quad \frac{1}{K_{app}} = \frac{[H^+]}{K_{max}K_a} + \frac{1}{K_{max}}$$

que es análoga a la ecuación 5 y en donde K_{max} es la constante de velocidad máxima (o constante de inactivación de *pseudo* primer orden independiente del pH) y K_a es la constante de ionización del grupo involucrado. La gráfica de $1/K_{app}$ contra $[H^+]$ debe de dar una línea recta con un intercepto de $1/K_{max}$ y una pendiente de $1/K_{max}K_a$ (recuadro de la figura 6). El hecho de que no ocurra ninguna desviación apreciable de la linealidad a ningún valor de pH sugiere que sólo la forma desprotonada del grupo involucrado es modificada por el Cd^{2+} y que sólo este grupo reacciona con el metal. De los datos de esta figura se obtiene un valor de pK_a de 7.23. Este valor está de acuerdo con los valores de pK_a cercanos a 7.0 que han sido encontrados, para el grupo sulfhidrilo del sitio activo en la SDH, por otros autores utilizando NETMal (41). El hecho de que la constante de ionización para este sulfhidrilo sea anormalmente mayor que el de la cisteína libre se podría explicar por la interacción de un grupo con carga positiva localizado cerca del sulfhidrilo (41).

Una posibilidad atractiva es que el hierro de la enzima sirva como componente activador del grupo sulfhidrilo. Para analizar esta posibilidad y obtener mayor información del grupo que está siendo modificado por el Cd^{2+} , se decidió estudiar los espectros EPR de PSM tratadas con cadmio y sin cadmio bajo distintas

condiciones. En la figura 7a se muestra el espectro de las PSM reducidas con succinato en presencia de TTFA para evitar la reducción de componentes de la cadena respiratoria posteriores al complejo II. El espectro está compuesto principalmente por señales a $g = 2.0236, 2.0028, 1.9347, 1.9171$. El juego de señales a $g = 2.0236, 1.9347, 1.9171$, corresponde al centro Fe-S binuclear reducido consistente de dos átomos de hierro antiferromagnéticamente acoplados mostrando un espín efectivo de $S = 1/2$ en un campo cristalino con distorsión rómbica (18,19). Este centro, llamado normalmente S-1, es del tipo de las ferredoxinas (58). La otra señal importante con $g = 2.0028$ ha sido asignada al radical libre de la semiquinona del FAD (16).

En la figura 7b se muestra que la adición de Cd^{2+} a las PSM seguida por la reducción con succinato resultó en una pérdida prácticamente total de las dos señales descritas arriba. Aunque las condiciones de tratamiento por Cd^{2+} para estos experimentos se alejan mucho de las condiciones cinéticas de inactivación de la enzima (ver materiales y métodos), la adición de EDTA, restauró completamente las señales EPR y la actividad (datos no mostrados). Esto muestra que tanto en los experimentos EPR como cinéticos, la acción del Cd^{2+} sobre la enzima es comparable. La pérdida de la señal del centro S-1 no fue revertida por reducción con ditionita lo cual sugiere una acción directa del metal sobre el centro Fe-S o que la unión del Cd^{2+} a la enzima provoca un cambio en la conformación de ésta que resulta en una pérdida de la señal paramagnética del grupo Fe-S. Recientemente Krishnamoorthy *et al.* (59) en un estudio EPR sobre el efecto de distintos inhibidores sobre el complejo I en la cadena respiratoria encontraron que la señal a $g = 1.94$ de la SDH era abolida por el p-cloromercuriobenzenosulfonato y que la pérdida de esta señal no era revertida por reducción con ditionita. Estos resultados sugieren un sitio de acción similar para los dos reactivos de sulfhidrilos.

Por otro lado, el espectro EPR de las PSM tratadas con cadmio y

reducidas con ditionita mostró una señal típica de un radical libre en la zona del FAD. Sin embargo, en este tipo de preparaciones membranales se reconoce la presencia de varias especies moleculares capaces de generar radicales libres por reducción y por lo tanto generar señales EPR en la zona de g cercana a 2. De esta manera, el estudio de la señal es complicada por lo que en este trabajo no se hizo más esfuerzo por interpretarla.

La pregunta que surge es si la unión del cadmio en el sitio activo de la enzima es la responsable de la desaparición de las señales EPR o si ésta se debe a la unión del metal a otro sitio en la proteína. En la figura 7c se muestra el espectro EPR de las PSM reducidas con succinato antes de ser tratadas con Cd^{2+} . En esta figura se aprecia que la presencia del sustrato previa a la adición del Cd^{2+} previene en cierta medida la desaparición de las señales de la enzima. Resultados similares se muestran en la figura 7e en donde la adición de malonato previa a la de Cd^{2+} previene la desaparición total de ambas señales. En presencia de malonato se observó un aumento de la relación entre las intensidades de la señal del radical libre y el centro S-1 (Fig. 7d). En estas condiciones el tratamiento por cadmio disminuyó sobre todo la intensidad proveniente del radical libre ($g = 2$). El significado de estos resultados no es claro. En este momento no se puede descartar una modificación de la estructura de la enzima, por acción del malonato o el malonato y el cadmio, que origine un cambio en las intensidades relativas de las distintas señales paramagnéticas. Aunque el comportamiento de la señal del radical libre no es claro, en conjunto estos resultados sugieren que la desaparición de la señal del centro S-1 por acción del Cd^{2+} se debe a la unión del metal al sitio activo de la enzima.

PROPIEDADES DE LA ENZIMA MODIFICADA POR EL CADMIO

La pérdida de la actividad en las enzimas modificadas por cadmio podría deberse a un cambio en la afinidad de la proteína

por el sustrato y/o a una alteración en la capacidad catalítica, incluyendo la activación del sustrato y/o la transferencia intramolecular de electrones. Para determinar si la enzima modificada por cadmio es capaz de seguir uniendo al sustrato o a los inhibidores competitivos se hicieron dos tipos de análisis, cinéticos y de unión de ligandos.

En la figura 8 se muestra el gráfico de Dixon de $1/V_0$ versus [malonato] a diferentes concentraciones fijas de cadmio (añadidas antes del malonato) y a una concentración constante de succinato. En estas condiciones, cuando ambos inhibidores están presentes, el grado de inhibición es siempre mayor que el observado a la misma concentración específica total de cadmio o malonato por separado. Este efecto sinérgico resulta de la formación del complejo E-Cd²⁺-malonato. El hecho de que la unión del Cd²⁺ no impida que el malonato (y por lo tanto el succinato) se una también a la enzima se muestra en la representación de Dixon en donde las pendientes de los trazos dependen de la concentración de cadmio y el grupo de líneas se interceptan a la izquierda del eje $1/V_0$ (60).

Un análisis similar fue llevado a cabo en presencia de oxalacetato (Fig. 9). Aquí el sistema se comporta de manera diferente. Aunque adiciones de Cd²⁺ más oxalacetato no rindieron el mismo grado de inhibición que daría la misma concentración específica total de cada uno por separado, los gráficos de Dixon fueron paralelos. Esto se debe al hecho de que no hay la formación del complejo adicional E-Cd²⁺-oxalacetato que podría modificar el valor de las pendientes. Estos resultados muestran que el cadmio y el oxalacetato son competitivos entre sí, o en otras palabras, que la unión del Cd²⁺ excluye la unión del oxalacetato (60).

Es interesante notar que el cadmio es capaz de remover al oxalacetato unido a la enzima, lo cual está de acuerdo con el análisis cinético. El hecho de que la inhibición de la enzima inducida por cadmio pueda ser revertida por EDTA (como se mencionó arriba) puede ser utilizado para probar este punto.

Los resultados presentados en la tabla I muestran que una

actividad casi total puede ser recuperada cuando las PSM son centrifugadas y tratadas con EDTA (2 mM) después de haber sido preincubadas con oxaloacetato (.4 mM) seguido por la adición de cadmio (.1 mM). El nivel de actividad alcanzado en estas condiciones es comparado con el que se obtiene cuando las PSM son centrifugadas y activadas con succinato más fosfato para remover el oxaloacetato añadido en exceso.

Para confirmar los resultados de estos estudios se determinó la capacidad de la enzima para unir [2-¹⁴C]-malonato bajo distintas condiciones. En la figura 10 se muestran los niveles de [2-¹⁴C]-malonato unido (expresados como porcentaje, tomando la cantidad de cpm unidas por las partículas control sin cadmio (3862 ± 94.5) como el 100 %) a las PSM según los experimentos de filtración descritos en materiales y métodos. Para determinar la unión no específica del malonato en estas condiciones se adicionó a las partículas un exceso de oxaloacetato (50 μM, $K_i = .017-.3 \mu M$ (41,42). El oxaloacetato desplazó 1925.25 ± 56 cpm ($\approx 50 \%$). Esta cantidad de cpm unidas puede ser tomada como 0 % de unión específica. Tomando en cuenta la unión específica y la actividad específica del malonato se obtiene un valor de 0.167 nmol de SDH/mg de proteína de PSM, valor que es inferior al reportado para el del contenido de flavina no extraíble por ácido en preparaciones similares (61,62). Sin embargo, es ligeramente superior a la cantidad de SDH encontrada por otros autores (0.1 nmol/mg de proteína) según resultados por ajuste en computadora (42). Según este criterio el Cd^{2+} (30 μM 2 min), añadido antes que el malonato, desplazó únicamente un $12 \pm 0.6 \%$ de malonato unido de manera específica, por lo que según este tipo de experimentos la unión del cadmio no excluye de manera importante la unión del malonato lo cual está de acuerdo con los experimentos cinéticos mostrados en la figura 8. Por otro lado, con la adición de Cd^{2+} seguida de oxaloacetato, previa a la adición del malonato, sólo se logró desplazar un $78.3 \pm 0.3 \%$ de malonato específicamente unido. Este resultado sugiere que la unión del cadmio a la enzima de

alguna manera altera la capacidad del oxalacetato de desplazar al malonato. Esto apoyaría los resultados cinéticos (Fig. 9) y los datos de la tabla I en el sentido de que la unión del cadmio a la enzima excluye la unión del oxalacetato, es decir que el cadmio y el oxalacetato compiten entre sí para unirse a la proteína.

DISCUSION

En el presente trabajo se muestra que la deshidrogenasa succínica activada y ligada a la membrana es inhibida por el cadmio a una velocidad de $K_i = 10.4 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 7.35, 25°C). Aunque la inhibición por el metal puede ser revertida por EDTA, cinéticamente el Cd^{2+} se comporta como un inhibidor irreversible (Fig. 3b). Si un inhibidor de este tipo actúa reaccionando con un grupo en el sitio activo, la presencia del sustrato o de algún inhibidor competitivo protegerá contra la inhibición disminuyendo la velocidad a la cual la inhibición ocurre. En la figura 4 se muestra que concentraciones crecientes de succinato disminuyen progresivamente la velocidad de inactivación de la enzima por Cd^{2+} . El gráfico de K_{app} contra [succinato] fue hiperbólicamente descendiente de acuerdo con la ecuación 4. El gráfico de $1/K_{app}$ contra [succinato] fue lineal (ecuación 5). Resultados similares, de protección hiperbólica total, se muestran en la figura 5 para el caso del malonato. Del efecto protector por los ligandos del sitio activo se determinaron las constantes de disociación del succinato ($K_s = 267 \mu\text{M}$) y del malonato ($K_l = 1.7 \mu\text{M}$). En general se puede decir que bajo estas condiciones, el Cd^{2+} se comporta, por lo menos cinéticamente, como un inhibidor directo del sitio activo. Por lo tanto los resultados del análisis cinético de protección por succinato y malonato, en conjunto sugieren que el cadmio inhibe a la enzima reaccionando exclusivamente en el sitio activo. Cabe mencionar que este análisis no considera el número real de grupos -SH que deben ser modificados para que ocurra la inactivación.

Durante mucho tiempo se ha conocido que la deshidrogenasa succínica es sensible a reactivos para grupos sulfhidrilo y que los sustratos e inhibidores competitivos protegen a la enzima contra la acción de éstos (35,36,37,40,41,42). Sin embargo, la presencia de grupos -SH en el sitio activo ha sido cuestionada por autores como Sanborn et al. (37) quienes observaron inhibiciones

complejas de la enzima soluble por agentes alquilantes y protección parcial por ligandos del sitio activo. Como se mencionó en la introducción, resultados similares han sido encontrados por otro grupo de autores, que muestran que además del -SH del sitio activo puede existir en la enzima otro grupo sulfhidrilo esencial para la actividad. Por otro lado Kenney (40) y Vinogradov *et al* (41,42) han encontrado que la alquilación de la SDH soluble por NETMAL cumple los criterios para un inhibidor directo del sitio activo. Las discrepancias encontradas en la literatura pueden deberse, por un lado, al distinto tipo de agentes alquilantes o formadores de mercáptido utilizados para inactivar a la enzima. Otra explicación sería el grado distinto de activación de las preparaciones utilizadas en estos trabajos. En preparaciones que no estén completamente libres de oxalacetato es factible encontrar patrones complejos de inhibición por reactivos para grupos -SH. El oxalacetato unido a la enzima protege al -SH del sitio activo contra la alquilación (41) y la velocidad de disociación del oxalacetato es lenta (42,63,64). Es de esperarse que si se utilizan concentraciones de agentes alquilantes elevadas que rindan cinéticas de *pseudo* primer orden, la velocidad de alquilación será mayor que la de disociación del oxalacetato de tal manera que se observará una inhibición bifásica con una saturación aparente de la velocidad de inactivación. En el caso del presente estudio, la inactivación por Cd^{2+} y la protección total por ligandos del sitio activo, en preparaciones completamente activadas de la enzima membranal no apoyan la idea de que existe un grupo -SH esencial para la actividad fuera del sitio activo.

Una cuestión importante es el número real de grupos con los que reacciona el Cd^{2+} en el sitio activo para inactivar a la enzima. Se sabe que el cadmio forma compuestos estables al reaccionar preferentemente con ditiolos aunque también puede reaccionar con monotioles (46,47). La gráfica lineal de la figura 3b sugiere una estequiometría de 1 Cd^{2+} /enzima. Sin embargo, dos o más grupos,

esenciales para la actividad, que reaccionen simultáneamente con una molécula de inhibidor darían esta misma estequiometría. La secuencia de aminoácidos de la subunidad mayor de la SDH y de la fumarato reductasa de *E. coli*, muestra un sólo residuo de cisteína en posición conservada (65). Este residuo no se encuentra en la flavo proteína de *B. subtilis* (66). Sin embargo, la SDH de este organismo no presenta el residuo de cisteína esencial para la actividad que está presente en *E. coli* y SDH de corazón de res (66). Es probable que este residuo sea el grupo que está siendo modificado por el cadmio. Kenney *et al* han mostrado que la incorporación de [¹⁴C]MalNet a un residuo de cisteína, esencial para la actividad, localizado en la subunidad de 70,000 daltones disminuye en presencia de succinato o malonato (44). Aunque en la secuencia de aminoácidos de un péptido de 23 residuos alrededor del FAD no aparece ninguna cisteína (67), es probable que por plegamiento de la cadena polipeptídica, la cisteína en posición conservada quede próxima al FAD en el sitio activo. Por el momento, sin embargo, se carece de evidencia experimental concluyente que permita determinar el número real de residuos que participan en la unión del cadmio durante el proceso de inactivación de la enzima.

Aunque se ha reportado que el Cd²⁺ se puede unir a grupos carboxilo e imidazol (57), o sulfhidrilo (46,47), las constantes de estabilidad muestran que el Cd²⁺ se une de manera más selectiva a los grupos -SH (46,47). A partir de los datos de la figura 6 se obtiene un valor de pK_a de 7.23 para el grupo que está siendo modificado por el Cd²⁺. Este valor no prueba de manera definitiva que un grupo -SH sea el blanco del Cd²⁺. El pK_a de los grupos sulfhidrilo en las proteínas normalmente presenta valores más elevados. Sin embargo, en el caso de la SDH otros autores han reportado valores similarmente bajos de pK_a para el -SH del sitio activo (41). Se ha sugerido que la "activación" del grupo sulfhidrilo localizado en el sitio activo podría deberse a la presencia de una carga positiva localizada cerca del -SH (41). Por

otro lado, el hecho de que la señal del centro Fe-S S-1 sea destruida por el Cd^{2+} y por el p-cloromercuriobenzenosulfonato de manera similar (59), sugiere que ambos reactivos actúan en residuos similares. Además, la desaparición de esta señal por ambos reactivos no es revertida por ditionita (Fig. 7b) lo que sugiere una relación estrecha entre el grupo que une a estos reactivos para sulfhidrilo y el centro paramagnético. Durante mucho tiempo se ha discutido la posible localización de los centros Fe-S en la enzima. A este respecto, Ohnishi ha propuesto que los centros S-1 y S-2 se encuentran en la subunidad mayor y el centro S-3 en la subunidad menor (68). Albracht ha sugerido que el centro S-3 se encuentra en la subunidad mayor y el centro S-1 en la subunidad menor (69). Más recientemente se han identificado los ligandos del centro S-1 en *B. subtilis*. Estos son un grupo de cuatro cisteínas localizadas en posiciones conservadas en el extremo N terminal de la subunidad menor (70). Una posibilidad es que el grupo -SH del sitio activo, por plegamiento de la cadena polipeptídica, se encuentre muy próximo al centro S-1 de tal manera que una modificación en este residuo de cisteína origine una alteración de las propiedades paramagnéticas del centro Fe-S. De esta manera, la carga positiva del Fe del centro S-1 sería la que estuviera alterando las propiedades ácido-base del grupo -SH. A este respecto Ohnishi encontró que las propiedades magnéticas (realce del tiempo de relajación del espín) del FAD estaban alteradas por la proximidad del centro S-1 (16). Una interacción espín-espín de este tipo involucra distancias no mayores a 1.5-2 nm. Sin embargo, en este momento no se puede descartar que la desaparición de la señal del centro S-1 se deba a una modificación de la conformación de la enzima por la unión del Cd^{2+} al sitio activo y que la alteración encontrada en las propiedades ácido-base del -SH del sitio activo se deba a la proximidad de otro grupo con carga positiva como histidina (71). Una modificación de este tipo alteraría muy probablemente las propiedades paramagnéticas de los grupos prostéticos restantes.

Sin duda, una imagen más clara de la relación entre el -SH del sitio activo y los grupos prostéticos de la enzima vendrá con el estudio EPR a temperaturas más bajas del efecto del cadmio sobre la SDH.

La inhibición de la SDH por Cd^{2+} podría deberse a que el metal se está uniendo a un grupo importante para la catálisis y/o a un grupo involucrado con la unión del sustrato. Basado en estudios de protección por succinato y malonato contra la inhibición por agentes alquilantes, Kenney ha propuesto que el grupo -SH del sitio activo podría jugar un papel en la unión del sustrato (45). En el presente trabajo, sin embargo, se muestra que la unión del Cd^{2+} al sitio activo no excluye la unión del malonato y por lo tanto tampoco la del succinato. En este momento es importante destacar la importancia que juega el orden de adición de los inhibidores. Cuando el malonato (o el succinato) es añadido antes que el Cd^{2+} (o que la NEtMal), forma un complejo con el sitio activo y previene que el inhibidor irreversible alcance su sitio de unión en una fracción determinada de las moléculas de enzima (probablemente por el impedimento debido a la estructura espacial molecular)(Figs. 4 y 5). En el caso contrario, una vez que la inhibición por Cd^{2+} ha ocurrido, la adición de malonato no revierte la inhibición, más aún, ésta es incrementada por la formación del complejo adicional E-Cd^{2+} -Malonato (Fig 8). Conclusiones similares se obtienen de los datos de la figura 10. Aquí, la adición de cadmio a las PSM no desplaza la marca de [2- ^{14}C]-malonato. De esta manera, la unión del cadmio al -SH del sitio activo no altera a la enzima en tal forma que ésta se vuelva incapaz de unir al malonato (o al succinat) al sitio activo.

De estos resultados se puede asumir que en el mecanismo de oxidación del succinato, el grupo -SH del sitio activo jugaría un papel importante sólo después de la unión del sustrato a un grupo cercano en el sitio activo. A este respecto, recientemente se ha propuesto que el sitio activo de la SDH posee, además del FAD y del grupo -SH, un(os) residuo(os) de arginina, el(los) cual(es)

podría(n) participar en una interacción electrostática con los grupos carboxilo del sustrato (72).

Por otro lado, cuando el Cd^{2+} es añadido a la enzima antes que el oxalacetato, evita que este último se una al sitio activo (Fig. 9). Más aún, cuando la enzima está en el estado inactivo, estabilizado por la unión del oxalacetato, ésta puede ser activada por tratamiento con un exceso de Cd^{2+} seguido por la remoción del metal por EDTA. Estos resultados se muestran en la tabla I junto con el hecho conocido de que el oxalacetato también puede ser desplazado por ligandos del sitio activo como succinato o malonato (28,29). Aunque el oxalacetato protege al -SH del sitio activo (41,42), en condiciones de exceso de Cd^{2+} , el metal termina por entrar al sitio activo y desplazar al oxalacetato. En la figura 10c se muestra que el Cd^{2+} añadido a las PSM antes que el oxalacetato en cierta medida dificulta que el segundo siga siendo capaz de desplazar eficazmente la marca de [2- ^{14}C]-malonato. Tomando en cuenta que: a) la razón molar de oxalacetato/flavina unida a histidil es 1 (26,73) y que b) el oxalacetato puede ser desplazado de la enzima tanto por succinato y malonato como por cadmio, una hipótesis atractiva es que el oxalacetato necesita dos grupos en el sitio activo para unirse a la enzima. Uno de estos grupos sería el grupo que une malonato o succinato y el otro el -SH que une al Cd^{2+} .

La interacción del oxalacetato con la enzima ha recibido mucha atención. Durante mucho tiempo se ha conocido que el oxalacetato es un potente inhibidor de la SDH (27). Además de actuar como un inhibidor competitivo, el oxalacetato se une de una manera extremadamente fuerte a la enzima inactiva y es removido de ésta por activación (28,29,30,31,32,33,34). Wojtczak *et al* fueron los primeros en considerar a este inhibidor como un inactivador (27). Gutman reportó que el oxalacetato se une a un sitio regulador en la enzima induciendo un cambio de conformación que oculta al sitio activo (26). Esta hipótesis ha sido expuesta para explicar el efecto protector del oxalacetato contra la alquilación por

maleimidadas N-sustituidas. Otra hipótesis para explicar este efecto protector ha sido que el oxalacetato se une al -SH del sitio activo formando un tiohemiacetal (43,44). Los resultados de este trabajo muestran que el cadmio y el oxalacetato son competitivos entre sí lo que estaría de acuerdo con la última hipótesis. Además, el hecho de que la unión del cadmio al sitio activo excluya la unión del oxalacetato a la enzima no apoya la idea de que exista un sitio regulador de unión de dicarboxilatos distinto del sitio activo.

Si se asume que el -SH del sitio activo participa en la unión del oxalacetato, y que el centro S-1 puede estar interactuando con el sulfhidrilo, es posible esperar que una modificación del centro Fe-S se vea reflejada en una alteración de algún tipo en la unión del oxalacetato a la enzima. En 1975 Ackrell *et al* reportaron que la reducción de la enzima por ditionita resultaba en la disociación del oxalacetato fuertemente unido con la consiguiente activación de la enzima (74). La activación de la enzima durante la titulación redox, sin embargo, ocurre con la incorporación del segundo par de electrones a un potencial de -90 a -60 mv. Por lo que la activación coincidiría con la reducción de la flavina a su forma de hidroquinona. Por otro lado, Kotlyar *et al* encontraron una diferencia de más de 10 veces entre las afinidades relativas de la SDH reducida y oxidada por el succinato, fumarato y oxalacetato (42). Estos autores, sin embargo, no definieron con precisión el término "enzima reducida". Por lo tanto aún queda por establecerse si el estado de reducción del FAD y no el de los restantes centros redox es el único factor involucrado en los cambios de afinidad de la enzima por los ligandos durante la reducción de la SDH. Además, no se ha determinado el mecanismo por el cual la reducción de los componentes redox de la enzima modifica la afinidad. Una posibilidad es que al reducirse la enzima sufra un cambio de conformación que exponga al sitio activo al ambiente acuoso. Se sabe que la unión por tiohemiacetal es inestable en solución acuosa y que su descomposición se da por una

reacción ácido-base (75). Sin embargo, la confirmación de cualquier hipótesis a este respecto requiere de un estudio más detallado de la función de todos los centros redox en la enzima.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se mostró que el Cd^{2+} es una herramienta útil para estudiar las propiedades del -SH del sitio activo de la deshidrogenasa succínica. Los resultados del trabajo sugieren que este grupo está involucrado en la unión del modulador negativo oxalacetato y abren la posibilidad de que otro(s) residuo(s) estén participando en la unión del sustrato y de los inhibidores competitivos. Además, se muestra que las propiedades ácido-base del sulfhidrilo están modificadas y se sugiere que esta alteración se podría deber a la proximidad del centro binuclear S-1.

Sin embargo, son muchas las preguntas que permanecen sin respuesta y cuya solución ayudará a dar una interpretación más completa de los resultados experimentales. Por ejemplo, no se sabe la naturaleza química de la unión entre el cadmio y el grupo esencial para la actividad. Sería deseable tener una estimación de las fuerzas de enlace entre el ion metálico y el(los) ligandos. Una manera conveniente para determinar estas energías de enlace incluye la medición calorimétrica directa del calor de formación o, quizás menos directamente, la medición de la energía de formación de Gibbs (ΔG°). Estas mediciones explicarían la alta afinidad (estabilidad termodinámica) de la enzima por el cadmio y la alta labilidad cinética gracias a la cual el metal puede ser fácilmente retirado por EDTA. Tampoco se sabe si la unión del cadmio al -SH sólo modifica al centro S-1. El estudio EPR de la interacción del cadmio con la enzima, a temperaturas de 30 K o menores, ayudará a resolver este punto. Esto permitirá conocer con menos ambigüedad la causa de la modificación de las propiedades ácido-base del sulfhidrilo y proporcionará información de la función de los grupos prostéticos de la enzima en lo que se refiere a su papel en los cambios de afinidad por los ligandos del sitio activo durante la titulación redox y a la transferencia intramolecular de electrones.

EXPLICACIONES DE LAS FIGURAS Y TABLAS

- Fig. 1** REACCION CATALIZADA POR LA DESHIDROGENASA SUCCINICA. A_{ox} y A_{Hz} representan al aceptor oxidado y reducido, respectivamente.
- Fig. 2** ESTRUCTURA DE LAS FORMAS REDOX NEUTRAS DE LA MOLECULA DE FLAVINA. R = ribitol para la riboflavina.
- Fig. 3** INACTIVACION DE LA SDH POR CADMIO. a), representación semilogarítmica de la actividad remanente porcentual *versus* el tiempo a diferentes concentraciones de cadmio. b), constante aparente de velocidad de inactivación (K_{app}) *versus* [cadmio]. La K_{app} fue calculada multiplicando el valor de las pendientes en a) por 2.303. Las condiciones de incubación y de medición de la actividad se detallan en materiales y métodos.
- Fig. 4** EFECTO DEL SUCCINATO SOBRE LA INACTIVACION POR CADMIO DE LA SDH. a), representación semilogarítmica de la actividad remanente porcentual *versus* el tiempo a distintas concentraciones de succinato. En ausencia de cadmio la actividad fue perfectamente estable con o sin succinato. b), constante aparente de velocidad de inactivación (K_{app}) *versus* [succinato]. c) Gráfica de $1/K_{app}$ *versus* [succinato]. Las condiciones de incubación y de medición de la actividad se detallan en materiales y métodos.
- Fig. 5** EFECTO DEL MALONATO SOBRE LA INACTIVACION POR CADMIO DE LA SDH. a), representación semilogarítmica de la actividad remanente porcentual *versus* el tiempo a distintas concentraciones de malonato. En ausencia de cadmio la actividad fue perfectamente estable con o sin malonato. b), constante aparente de velocidad de

inactivación (K_{app}) versus [malonato]. c) Gráfica de $1/K_{app}$ versus [malonato]. Las condiciones de incubación y de medición de la actividad se detallan en materiales y métodos.

Fig. 6 **INACTIVACION DE LA SDH POR EL CADMIO EN FUNCION DEL pH.**
a) constante aparente de velocidad de inactivación (K_{app}) versus pH ($1 \mu\text{M Cd}^{2+}$). b) Gráfica de $1/K_{app}$ versus $[\text{H}^+]$. Las condiciones de incubación y de medición de la actividad se detallan en materiales y métodos.

Fig. 7 **ESPECTROS EPR DE LAS PSM A 80 K.** a) partículas control reducidas con succinato. b) PSM tratadas con cadmio y reducidas con succinato. c) PSM reducidas con succinato y tratadas con cadmio. d) PSM en presencia de succinato y malonato. e) PSM incubadas con malonato, tratadas con cadmio y reducidas con succinato. f) PSM tratadas con cadmio e incubadas con succinato y malonato. Las condiciones de incubación y de medición EPR se detallan en materiales y métodos.

Fig. 8 **NO EXCLUSIVIDAD DEL MALONATO Y EL CADMIO.** 125 μg de PSM fueron añadidos a un medio de sacarosa, como el que se describe en materiales y métodos, que además contenía la concentraciones indicadas de CdCl_2 . Después de 1 minuto de incubación, se añadieron las concentraciones indicadas de malonato y la reacción se inició con la adición de succinato-tris 833 μM (pH 7.40) seguida por la adición de los colorantes.

Fig. 9 **EXCLUSIVIDAD DEL OXALACETATO Y EL CADMIO.** Las condiciones fueron las mismas que las descritas en la figura 8 con la excepción de las concentraciones de oxalacetato y cadmio añadidas.

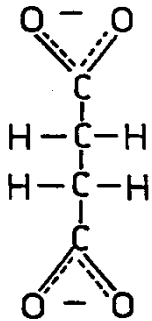
TABLA I ACTIVACION DE LA SDE POR CADMIO Y SUCCINATO. 9.36 mg de proteína de PSM fueron incubados en un medio que contenía sacarosa-tris 250 mM, pH 7.4 y oxalacetato 400 μ M. Después de 5 minutos de tiempo de preincubación, 4.68 mg de proteína fueron retirados añadiéndoseles 100 μ M de CdCl₂. 10 minutos después ambas fracciones fueron centrifugadas. Cada pastilla fue resuspendida y dividida en tres fracciones como sigue: la primera fracción (control) fue resuspendida en un medio de sacarosa. La segunda fracción (activadas) fue activada por incubación de las PSM durante 40 minutos a 35° C en un medio de sacarosa que además contenía fosfato 10 mM, succinato 2.5 mM, cianuro 1 mM y rotenona 8.5 μ M. La tercera fracción (EDTA) fue resuspendida en un medio de sacarosa y EDTA 2 mM fue añadido 1 minuto antes de iniciarse el ensayo. De cada fracción se tomaron alícuotas de 125 μ g de proteína para determinar su actividad.

TABLA I

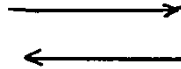
PREINCUBACIONES	n mol de DCIP red \times mg ⁻¹ \times min ⁻¹		
	CONTROL	ACTIVADAS	EDTA
OXALACETATO	81	499	82
OXALACETATO, SEGUIDO DE CdCl ₂ (10 min)	25	14	417

Fig. 10 UNION DEL [2-14C]-malonato A LAS PSM. Se muestran los niveles de [2-14C]-malonato unido de manera específica a las PSM expresados como porcentaje, tomando la cantidad de cpm unidas por las partículas control sin cadmio (3862 ± 94.5) como el 100 % y la cantidad de cpm unidas a las partículas tratadas con oxalacetato $50 \mu\text{M}$ (1925.25 ± 56) como el 0 %. Las condiciones de incubación se detallan en materiales y métodos.

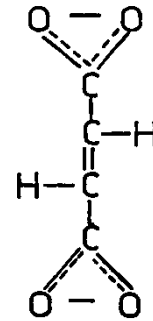
SUCCINATO



+ A_{ox}



FUMARATO

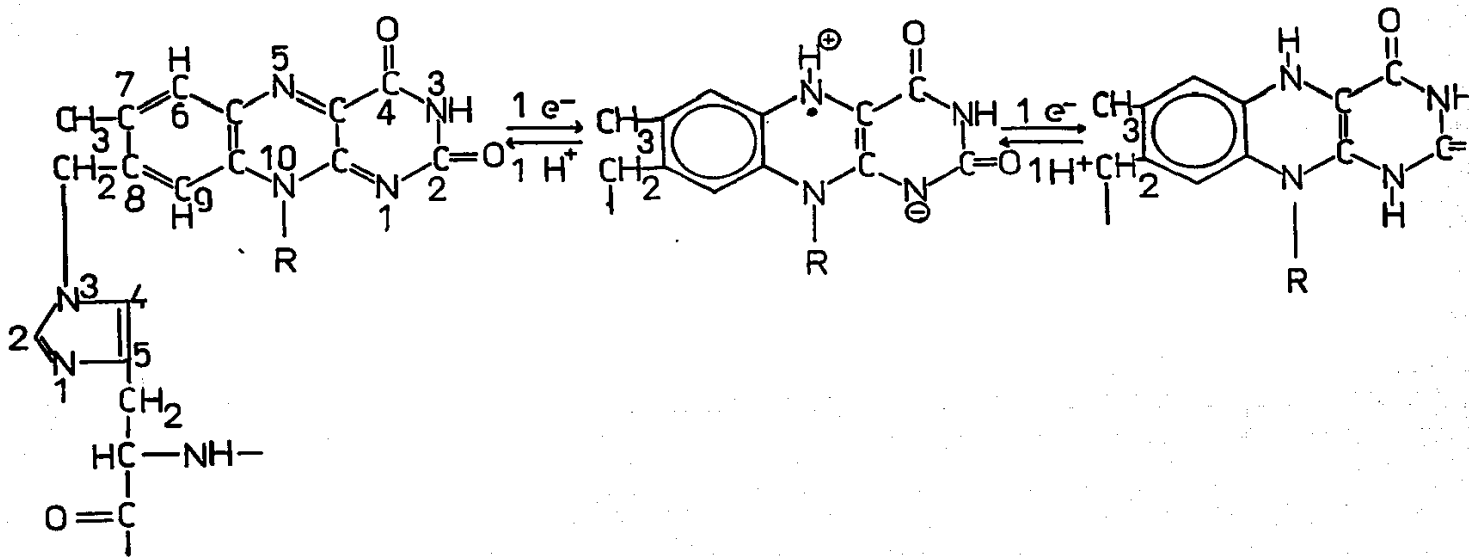


+ AH₂

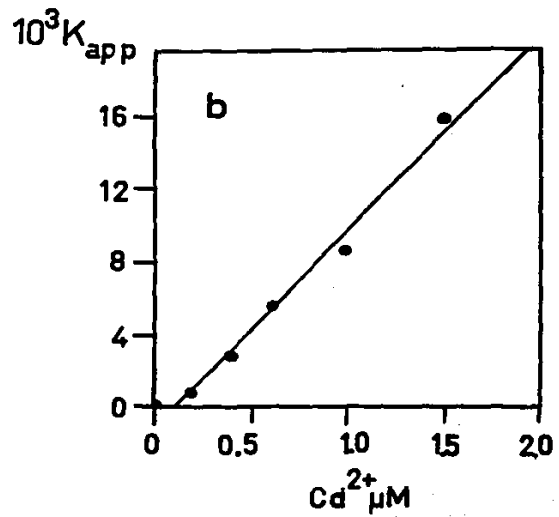
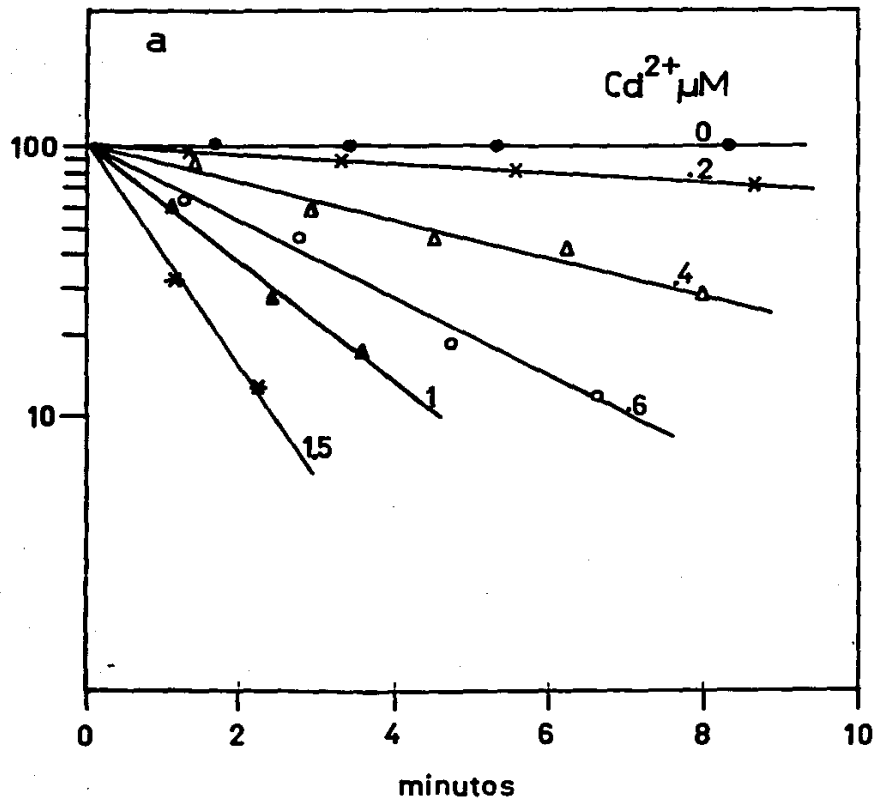
quinona

semi quinona

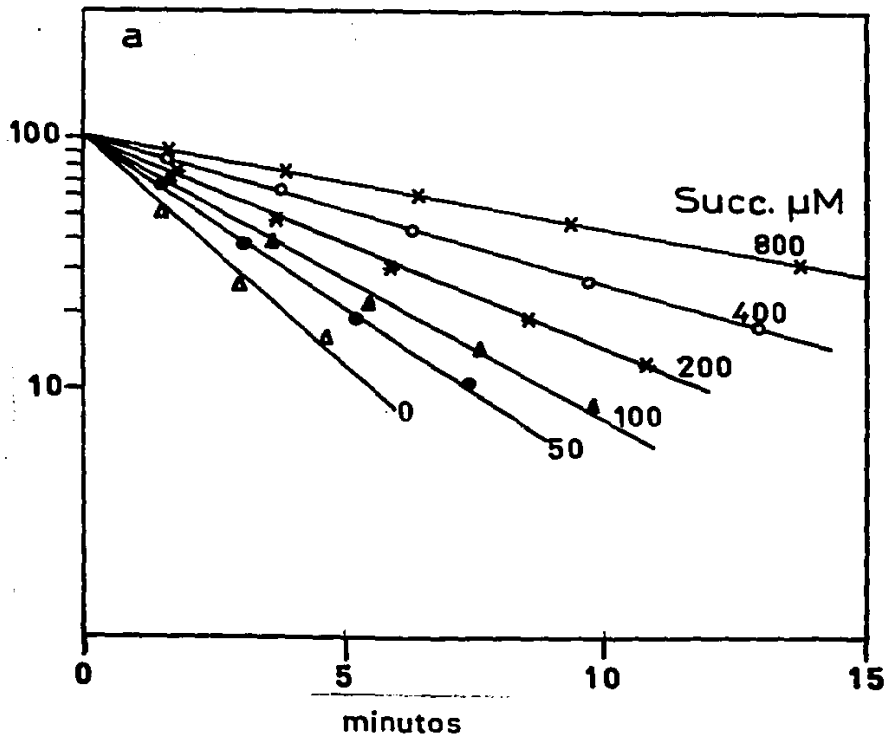
hidroquinona



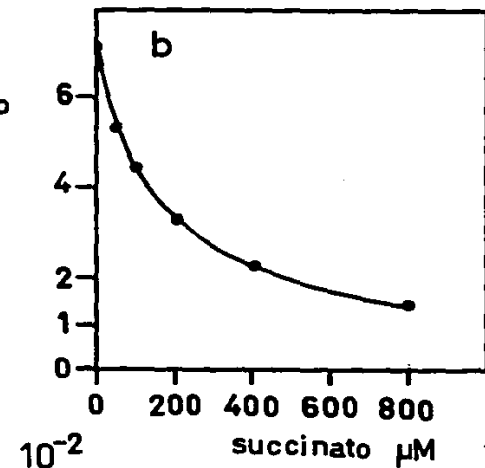
%Actividad remanente (escala Log)



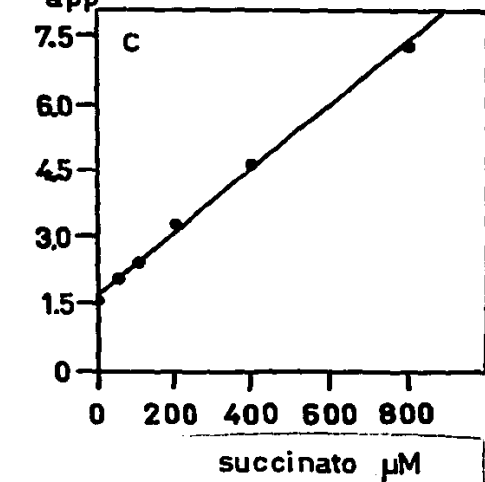
% Actividad remanente (escala Log)



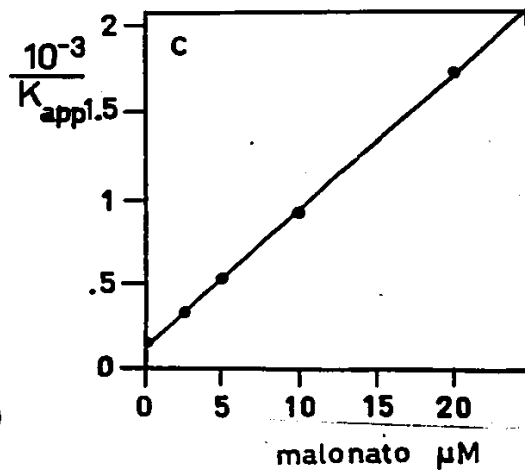
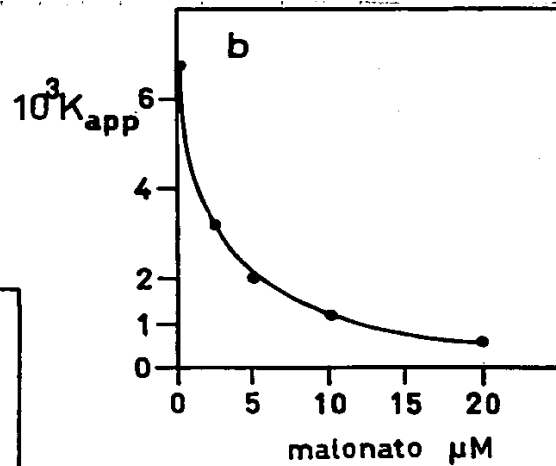
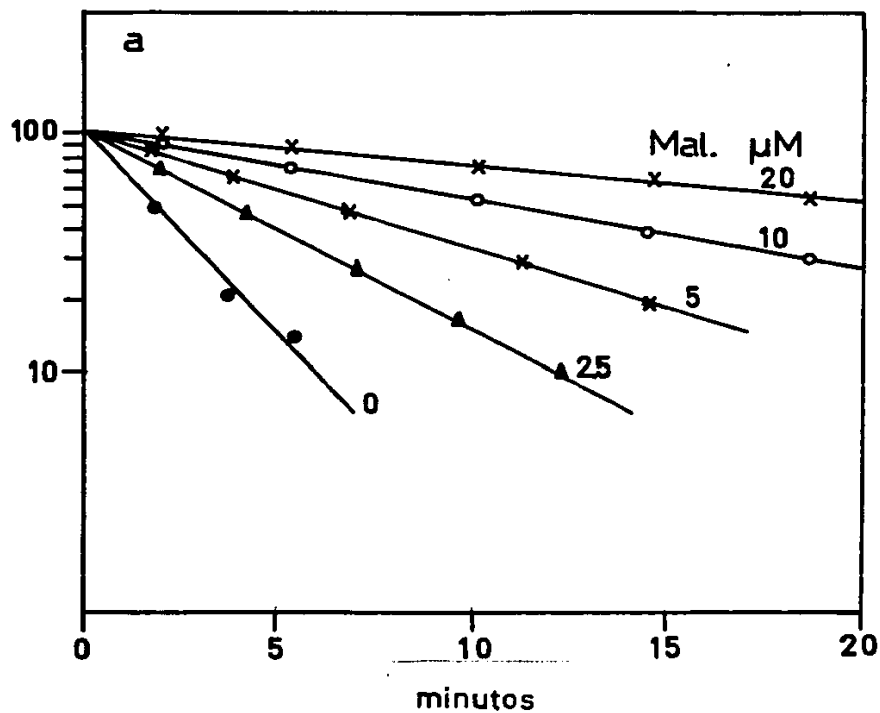
$10^3 K_{app}$

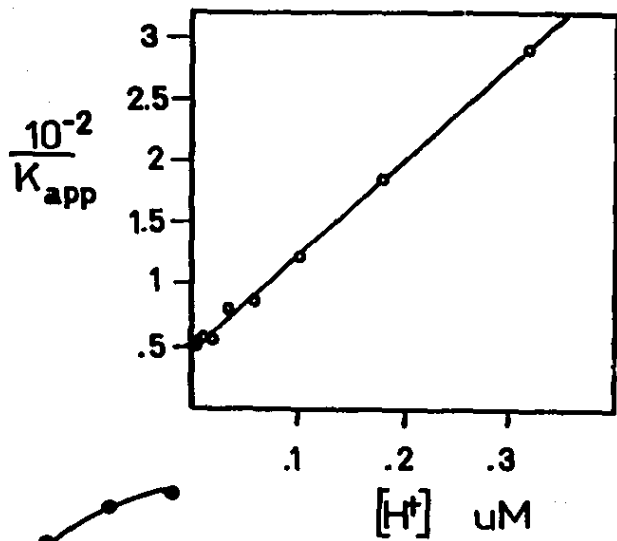
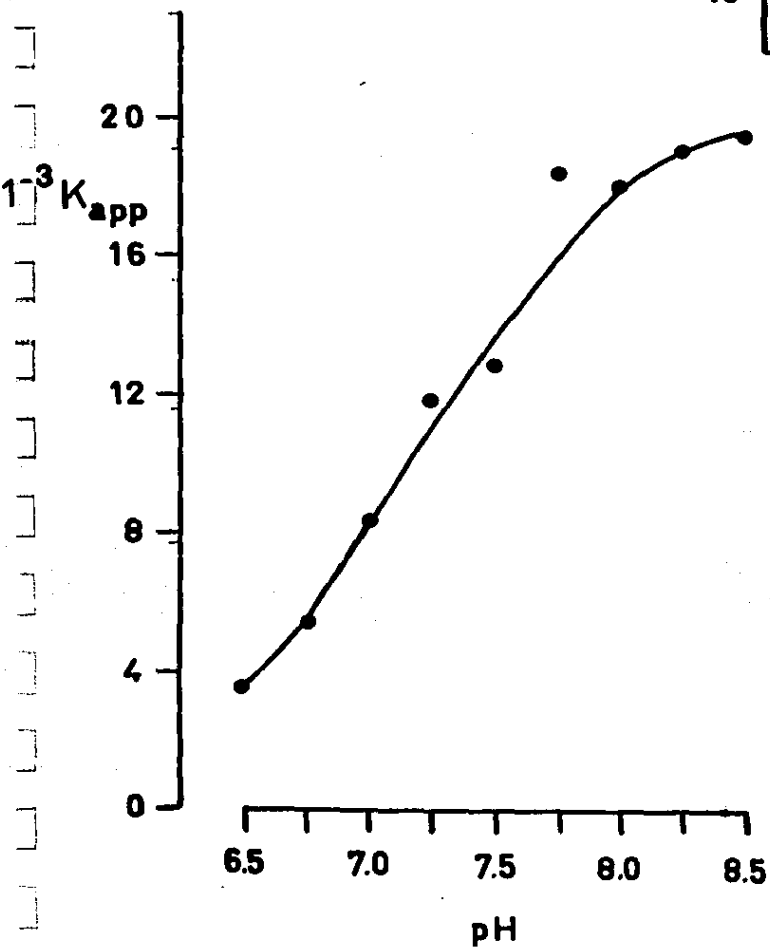


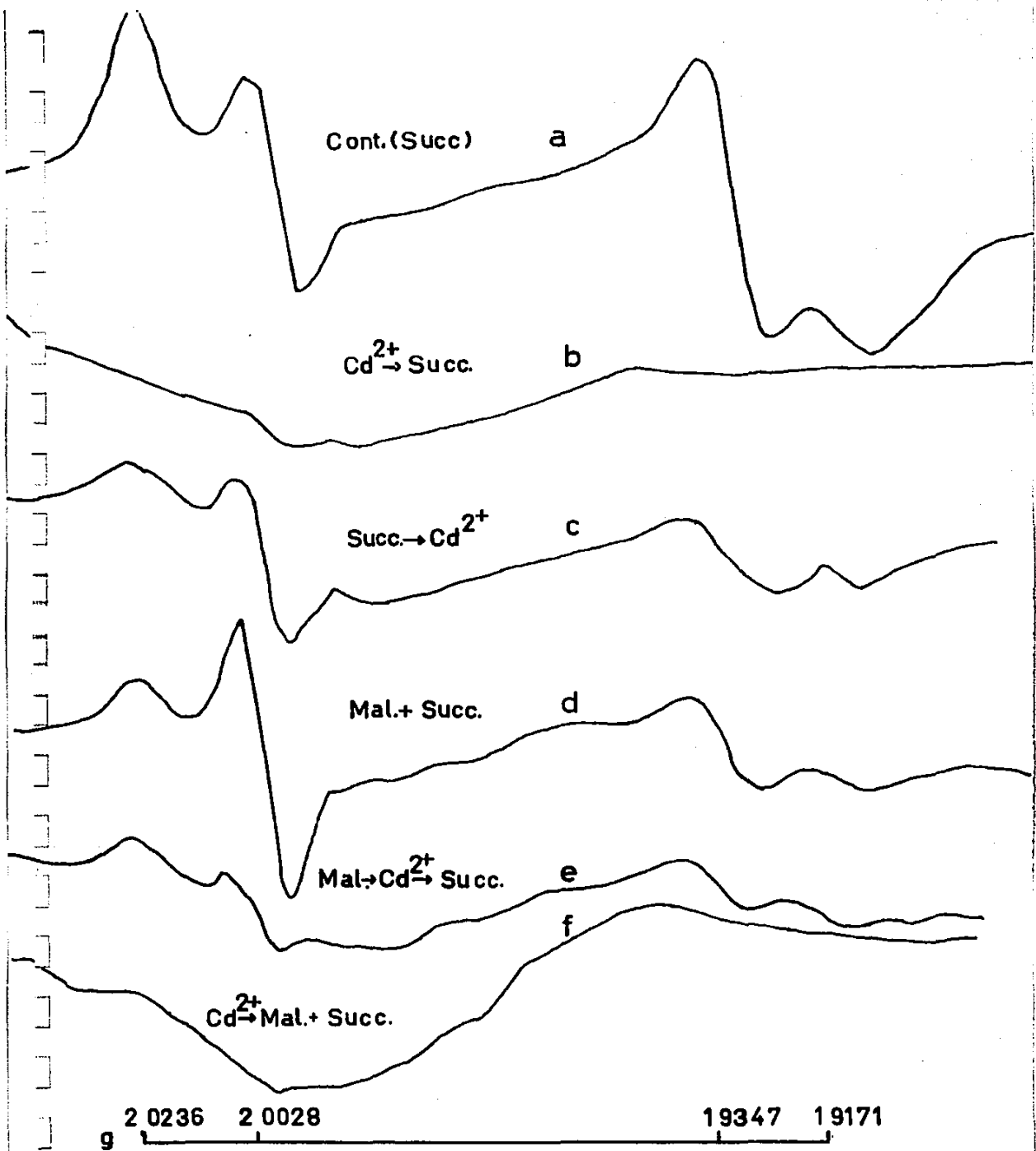
$10^{-2} K_{app}$

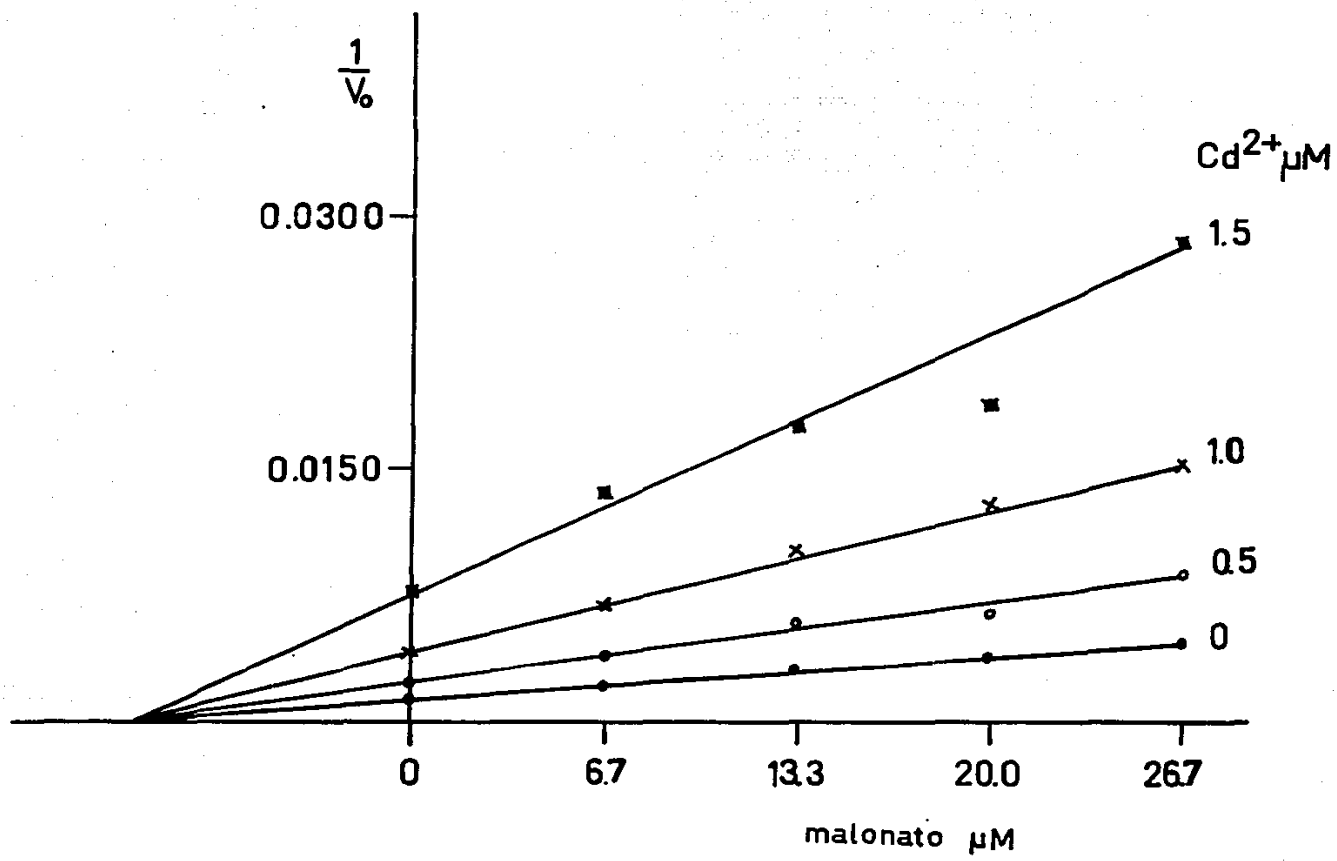


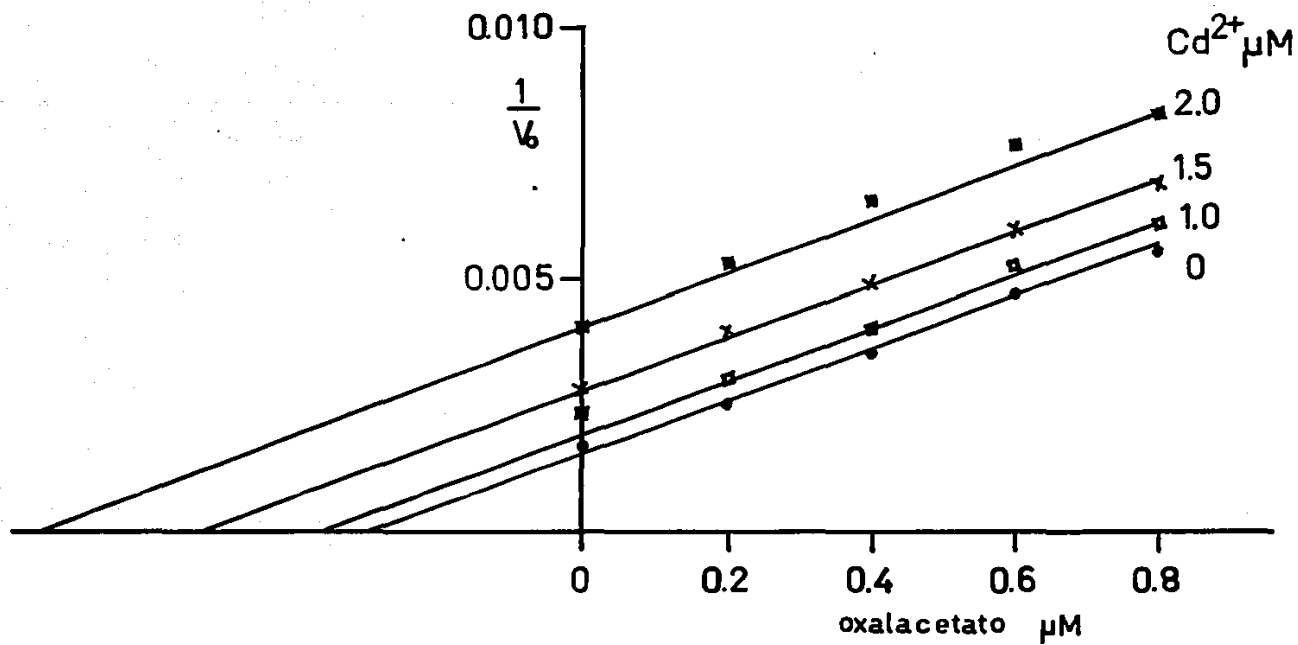
%Actividad remanente (escala Log)



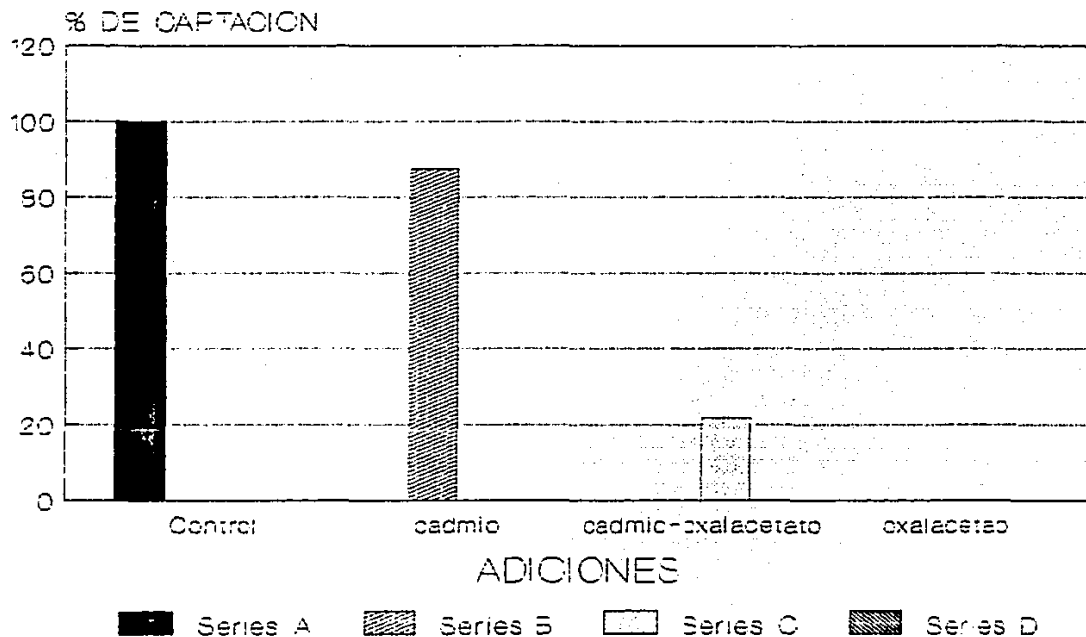








UNION DE [2-14]MALONATO A LAS PSM



BIBLIOGRAFIA

- 1.- Thunberg, T. (1909). *Skand. Arch. Physiol.* 22, 430-436.
- 2.- Hatefi, Y., Ragan, C.I., Galante, Y.M. 1985. *The Enzymes of Biological Membranes*, Vol. 4, ed A. Martonosi, pp. 1-70. New York: Plenum. 2nd ed.
- 3.- Hatefi, Y., Stiggalo, D.L. 1976. *The Enzymes*, ed. P.D. Boyer, pp. 175-297. New York: Academic. 3er ed.
- 4.- Der Vartanian, D.V., Zeylemaker, W.P. Veeger, C. 1966. In *Flavins and Flavoproteins*, ed. Slater, E.C. (Elsevier, Amsterdam), pp. 183-209.
- 5.- Rétey, J., Seibl, J., Arigoni, D., Cornforth, J.W., Ryback, G., Zeylemaker, W.P., Veeger, C. (1970). *Eur. J. Biochem.* 14, 232-242.
- 6.- Hatefi, Y., Galante, Y.M. (1980). *J. Bio. Chem.* 255, 5530-5537.
- 7.- Ulrich, J. T., Mathre, D.E. (1972). *J. Bacteriol.* 110, 628-632.
- 8.- Tucker, A.N. Lilich, T.T. (1974) *Antimicrob. Agents Chemother.* 6, 572-578.
- 9.- Mowery, P.C., Steenkamp, D.J., Ackrell, A.C.B., Singer, T.P., White, G.A. (1977). *Arch. Biochem. Biophys.* 178, 495-506.
- 10.- Hatefi, Y., Stiggal, L.D. (1978). *Meth. Enzymol.* 53, 21-35.
- 11.- Ackrel, A.C.B., Kearney, B.E., Singer, T.P. (1978). *Meth. Enzymol.* 53, 466-483.
- 12.- Singer, T.P., Kearney, B.E., Kenney, C.W. (1973). *Adv. Enzymol.* 5, 189-271.
- 13.- Hirsch, C.A., Rasminsky, M., Davis, B.D., Lin, E.C.C., (1963). *J. Biol. Chem.*, 238, 3770-3778.
- 14.- Singer, T.P. 1971. In *Biochemical Evolution and the Origin of Life*, E. Schoffeniels, Ed., North Holland, Amsterdam, p. 203.
- 15.- Davis, A.K., Hatefi, Y. (1971). *Biochemistry*, 10, 2509-2516.
- 16.- Ohnishi, T., King, E.T., Salerno, C.J., Blum, H., Bowyer, R.J., Maida, T. (1981). *J. Biol. Chem.* 10, 5577-5582.

- 17.- Johnson, M. K., Morningstar, J. E., Benett, D. E., Ackrell, B. A. C., and Kearney, E. B. (1985). *J. Biol. Chem.* **260**, 7368-7378.
- 18.- Beinert, H., Sands, R. H. (1960). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **3**, 41-46.
- 19.- Albracht, S. P. J., Subramanian, J. (1977). *Biochim. Biophys Acta.* **462**, 36-48.
- 20.- Ohnishi, T., Salerno, C.J., Winter, D. B., Lim, J., Yu, C. A., Yu, L., King, T. E. (1976). *J. Biol. Chem.* **251**, 2094-2104.
- 21.- Maguire, J. J., Johnson, M. K., Morningstar, J. E., Ackrell, B. A. C., and Kearney, E. B. (1985). *J. Biol. Chem.* **260**, 10909-10912.
- 22.- Ackrell, B. A. C., Kearney, E. B., Mims, W. B., Peisach, J., Beinert, H. (1984). *J. Biol. Chem.* **259**, 4015-4018.
- 23.- Beinert, H., Albracht, S. P. J. (1982). *Biochim. Biophys. Acta.* **683**, 245-277.
- 24.- Hatefi, Y. (1985). *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 1015-69.
- 25.- Singer, T.P., Johnson, M. K. (1985). *FEBS.* **180**, 189-198.
- 26.- Gutman, M. (1978). *Mol. Cell. Biochem.* **20**, 41-60.
- 27.- Wojtczak, L., Wojtczak, A. B., Ernster, L. (1969). *Biochim. Biophys. Acta.* **191**, 10-21.
- 28.- Kearney, E. B. (1957). *J. Biol. Chem.* **229**, 363-375.
- 29.- Gutman, M. (1977). *Biochemistry* **16**, 3067-3072.
- 30.- Gutman, M., Kearney, E. B., Singer, T.P. (1971). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **44**, 526-532.
- 31.- Gutman, M., Kearney, E. B., Singer, T.P. (1971). *Biochemistry* **10**, 2726-2733.
- 32.- Gutman, M., Kearney, E. B., Singer, T.P. (1971). *Biochemistry* **10**, 4763-4769.
- 33.- Kearney, E. B., Ackrell, B. A. C., Mayer, M., Singer, T.P. (1974). *J Biol. Chem.* **249**, 2016-2020.
- 34.- Gutman, M. (1976). *Biochemistry* **15**, 1324-1348.

- 35.- Hopkins, F. G., Morgan, E. J. (1938). *Biochem. J.* 32, 611-620.
- 36.- Slater, E. C. (1949). *Biochem. J.* 45, 130-142.
- 37.- Sanborn, B. M., Felberg, N. T., Hollocher, T. C. (1971). *Biochim. Biophys. Acta.* 227, 219-231.
- 38.- Felberg, N. T., Hollocher, (1972). *J. Biol. Chem.* 247, 4539-4542.
- 39.- LeQuóc, K., LeQuóc, D., Gaudemer, Y. (1981). *Biochemistry* 20, 1705-1710.
- 40.- Kenney, W. C. (1975). *J. Biol. Chem.* 250, 3089-3094.
- 41.- Vinogradov, A. D., Gavrikova, E. V., Zuevsky, V. V. (1976). *Eur. J. Biochem.* 63, 365-371.
- 42.- Kotlyar, A. B., Vinogradov, A. D. (1984). *Biochim. Biophys. Acta.* 784, 24-34.
- 43.- Vinogradov, A. D., Winter D. W., King T. E. (1972). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49, 441-444.
- 44.- Kenney, W. C., Mowery, P. C., Seng, R. L. Singer, T. P. (1976). *J. Biol. Chem.* 251, 2369-2373.
- 45.- Kenney, W. C. (1973). *Fed. Proc.* 32, Abstr. 2140.
- 46.- Valle, B. L., Ulmer, D. D. (1972). *Ann. Rev. Biochem.* 41, 91-128.
- 47.- Percovaro, V. L., Hermes, J. D., Cleland, W. W. (1984). 23, 5262-5271.
- 48.- Pearson, R. G. (1963). *J. Am. Chem. Soc.* 85, 3533.
- 49.- Jurkovitz, M., Scott, K. M., Altschuld, R., Merola, A. J., Brierley, G. P. (1974). *Arch. Biochem. Biophys.* 185, 98-113.
- 50.- Coles, C. J., Singer, T. P. (1977). *FEBS Lett.* 82, 267-268.
- 51.- Mowery, P. C., Steekamp, D. J., Ackrell, B. A. C., Singer, T. P., White, G. A. (1977). *Arch. Biochem. Biophys.* 178, 495-506.
- 52.- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. (1951). *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- 53.- Chávez, E., Briones, R., Michel, B., Bravo, C., Jay, D. (1985). *Arch. Biochem. Biophys.* 242, 493-497.

- 54.- Tian, W. X., Hsu, R. Y., Wang, Y. S. (1985). *J. Biol. Chem.* 260, 11375-11387.
- 55.- Dominici, P., Tancini, B., Voltattorni, C. B. (1985). *J. Biol. Chem.* 260, 10583-10589.
- 56.- Renosto, F., Seubert, P. A., Knudson, P., Segel, I. H. (1985). *J. Biol. Chem.* 260, 11903-11913.
- 57.- Perkins, D. J., (1961). *Biochem. J.* 80, 668-672.
- 58.- Cammack, R., Patil, D. S., Fernandez, V. M. (1985). *Biochem. Soc. Trans.* 13, 572-578.
- 59.- Krishnamoorthy, G., Hinkle, P. C. (1988). *J. Biol. Chem.* 263, 17566-17575.
- 60.- Segel, H. J. 1975. *Enzyme Kinetics*, 493-495, John Wiley & Sons, New York.
- 61.- King, T. E. (1966). *Adv. Enzymol.* 28, 155-236.
- 62.- Vinogradov, A. D., King, T. E. (1979). *Methods. Enzymol.* 55, 118-127.
- 63.- Zimakova, N. I., Shvetsov, Yu. N., Vinogradov, A. D. (1970). *Biochim. (U.S.S.R.)* 35, 973-982.
- 64.- Brodie, J. D., Nicholls, P. (1970). *Biochim. Biophys. Acta.* 198, 423-437.
- 65.- Wood, D., Darlison, M. G., Wilde, R. J., Guest, J. R. (1984). *Biochem. J.* 222, 519-534.
- 66.- Phillips, M. K., Hederstedt, L., Hasnain, S., Rutberg, L., Guest, J. R. (1987). *J. Bacteriol.* 169, 864-873.
- 67.- Kenney, W. C., Walker, W. H., Singer, T. P. (1972). *J. Biol. Chem.* 247, 4510-4513.
- 68.- Ohnishi, T., Salerno, C.J. 1982. *Iron-Sulfur Proteins*. ed. T. G. Spiro, 4: 285-327. New York: Wiley.
- 69.- Albracht, S. P. J. (1980). *Biochim. Biophys. Acta.* 612, 11-28.
- 70.- AEvarsson, A., Hederstedt, L. (1988). *FEBS Lett.* 232, 298-302.
- 71.- Vik, S. B., Hatefi, Y. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 6749-6753.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 72.- Kotlyar, A. B., Vinogradov, A. D. (1984). *Biochem. Int.* 8, 545-552.
- 73.- Ackrel, A.C.B., Kearney, B.E., Mayer, M. (1974). *J. Biol. Chem.* 249, 2021-2027.
- 74.- Ackrel, A.C.B., Kearney, B.E., Edmondson, D. (1975). *J. Biol. Chem.* 250, 7114-7119.
- 75.- Barnett, R., Jencks, W. P. (1976). *J. Am. Chem. Soc.* 89, 5963-5964.