

03081

2A

2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO DEL
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR

COMPORTAMIENTO DE LA CADENA RESPIRATORIA EN UN SISTEMA DE MICELAS
INVERTIDAS

TESIS QUE PRESENTA LA M.C. L.I. LAURA ESCOBAR PEREZ PARA OPTAR
POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN INVESTIGACION BIOMÉDICA BÁSICA (BIOQUÍMICA)

ASESOR: DR. EDGARDO ESCAMILLA MARVAN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D.F.

1991

**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.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCION	3
Catálisis enzimática en solventes orgánicos apolares.....	4
1) Propiedades fisicoquímicas de las micelas invertidas.....	6
2) Formación de las micelas invertidas.....	10
3) Propiedades del agua micelar.....	12
4) Tamaño de una micela invertida.....	15
5) Solubilización de una proteína en un medio micelar:	
i) Métodos....."	
ii) Estructura que adquieren las micelas invertidas al solubilizarse una proteína.....	16
iii) Cinética enzimática.....	20
iv) Termoresistencia.....	24
6) Reacciones secuenciales.....	27
7) Complejos enzimáticos:....."	
i) Reducción del citocromo c y de la citocromo oxidasa por ascorbato en un sistema de micelas invertidas.....	29
8) Catalasa. Una enzima modelo para la aplicación del electrodo de Clark a la medición de la catálisis enzimática en sistemas de micelas invertidas.....	30
II. OBJETIVO.....	31
III. METODOLOGIA.....	32
1) Obtención de mitocondrias de corazón.....	33
2) Preparación de partículas submitocondriales (PSM).....	35
3) Solubilización en el medio micelar de:	

i) las PSM.....	37
ii) el citocromo c y la citocromo oxidasa....."	
iii) los sustratos e inhibidores....."	
4) Determinación del contenido de agua en el medio micelar con las PSM solubilizadas.....	38
5) Incorporación de los complejos respiratorios en liposomas...."	
6) Determinaciones espectrofotométricas.	
i) Cuantificación de los citocromos:	
a) En las PSM y en los complejos respiratorios incorporados en liposomas.....	39
b) En las PSM solubilizadas en el medio micelar....."	
ii) Actividad de NADH y succinato deshidrogenasa en las preparaciones a y b.....	40
iii) Actividad de NADH, succinato y citocromo oxidasa en las preparaciones a y b....."	
Ensayos polarográficos....."	
7) Calibración del electrodo de Clark en el medio micelar.....	41
i) Determinación de la solubilidad del oxígeno en el medio.....	42
a) Consumo de oxígeno durante la oxidación de cantidades conocidas de ditionita....."	
b) Producción de oxígeno a partir de la reducción enzimática del perborato de sodio o del agua oxigenada por la catalasa.....	43
8) Caracterización de la actividad catalítica de la catalasa en el sistema de micelas invertidas de AOT....."	
i) Solubilización del sustrato....."	
ii) Solubilización de la enzima.....	44

iii) Determinación del contenido de agua....."	
iv) Ensayo enzimático en función del pH.....	45
v) Inhibición de la actividad con azida de sodio....."	
IV. RESULTADOS.....	47
1) Conservación de los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria en el medio micelar de asolectina-isooctano con 1.5% (v/v) de H ₂ O.....	48
i) Cuantificación de hemo....."	
ii) Actividades de SDH y NADH deshidrogenasa y oxidasa.....	50
2) Transferencia de electrones en isooctano.....	52
3) Oxidación de los citocromos.....	57
4) Ensayos polarográficos.....	59
i) Determinación de la concentración de O ₂ en el medio de micelas invertidas de AOT 0.2 M en tolueno....."	
ii) Parámetros cinéticos de la catalasa.....	63
5) Determinación de la actividad de la citocromo oxidasa en asolectina-isooctano.....	67
V. DISCUSION.....	78
VI. CONCLUSION.....	92
PERSPECTIVAS.....	93
VII. APENDICE.....	95
1) Cadena respiratoria.....	96
i) NADH: UBIQUINONA OXIDOREDUCTASA (Complejo I).....	101
ii) SUCCINATO: UBIQUINONA OXIDOREDUCTASA (Complejo II).....	111
iii) UBIQUINOL: CITOCROMO c OXIDOREDUCTASA (Complejo III)....	115
iv) FERROCITOCROMO c: OXIGENO OXIDOREDUCTASA (Complejo IV)...	125

VIII. BIBLIOGRAFIA.....133

1. On the Application of the Clark Oxygen Electrode to the Study of Enzyme Kinetics in Apolar Solvents: The Catalase Reaction". Analytical Biochemistry 184, 139-144 (1990).

2. Catálisis enzimática en solventes orgánicos apolares. Ciencia 41, 307-317.

3. Escamilla, E., Contreras, M., Escobar, L. and Ayala, G. "Polarography of oxygen in reverse micellar systems. From enzymes to cells". En Biomolecules in Organic Solvents. CRC Press, Inc. (1991). En prensa. (No se anexa).

4. Respiratory electron transfer activity in an asolectin-isooctane reverse micellar system. Sometido a Biochimie.

RESUMEN

Se estudió la funcionalidad de la cadena respiratoria de mitocondrias de corazón de res en un medio micelar de asolectina con 1.5 % de agua (v/v) en isooctano. Con NADH se observó un flujo lento de electrones desde el complejo de la NADH deshidrogenasa hasta el complejo de la citocromo oxidasa, acumulándose el 34 % de la citocromo oxidasa en presencia de cianuro.

Al incorporar a la muestra un análogo de la ubiquinona (la menadiona) se incrementó la velocidad y los niveles de reducción de los citocromos por efecto de NADH.

La oxidación de los citocromos reducidos se llevó a cabo con el N,N,N',N' tetrametil p. fenilendiamina (TMPD) como aceptor de electrones en el medio orgánico.

Se introdujo la aplicación del electrodo de oxígeno de Clark para la medición de reacciones enzimáticas en sistemas de micelas invertidas. Se utilizó como modelo a la catalasa solubilizada en un medio micelar de AOT en tolueno. Los parámetros cinéticos K_M y K_p de la enzima en condiciones óptimas ($W_o = 10$) en el medio micelar fueron similares a los observados en una solución acuosa.

Con el método anterior se pudo determinar la actividad de la citocromo oxidasa en el medio micelar de asolectina/isooctano.

Con la fenazina metosulfato (PMS), reducida por NADH o por ascorbato, se estimó la actividad de la citocromo oxidasa en el medio micelar. La actividad de la enzima fue dependiente de la cantidad de agua y de la concentración de fosfolípidos en el

medio, alcanzándose el máximo de la actividad a partir de 1.1% de agua ($W_0 = 50$) y de 0.7 mg ml^{-1} de asolectina, respectivamente.

El modelo de micelas invertidas permitió demostrar por primera vez que es posible la transferencia de electrones entre los complejos respiratorios y que la catálisis de una enzima de membrana, como la citocromo oxidasa, se puede llevar a cabo eficientemente en un medio con bajo contenido de agua.

I. INTRODUCCION

Catálisis enzimática en solventes orgánicos apolares

Hasta ahora el desarrollo de la enzimología se ha basado en el estudio de enzimas puras en soluciones acuosas; no obstante, en la célula, se sabe que muchas enzimas actúan principalmente en o cerca de alguna interfase membranal; incluso, aquellas enzimas consideradas libremente difusibles, se encuentran en un medio citoplasmático cuyas propiedades fisicoquímicas están lejos de ser las de una solución acuosa (Drost-Hansen y Clegg, 1979; Cooke y Kuntz, 1974; Drost-Hansen, 1971; Clegg, 1984).

Es indudable que el agua es vital para que una enzima funcione, pero ¿cuánta agua es realmente necesaria?. El agua tiene un efecto dual en los sistemas enzimáticos: es esencial para que una enzima adquiera y mantenga su conformación catalíticamente activa, ya que el agua participa directa o indirectamente en todas las interacciones no covalentes (puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y de van der Waals) que determinan la estructura tridimensional de la enzima. Al mismo tiempo, al aumentar el agua disponible alrededor de la enzima, aumenta su movilidad y con ello las posibilidades de que se lleve a cabo la desnaturalización de la proteína por inactivación térmica (Zale y Klivanov, 1986).

Por otra parte, se ha podido demostrar que a una enzima le basta tan sólo la primera monocapa de agua que le rodea, para manifestar su actividad biológica. Esta conclusión se ha derivado

de experimentos realizados con enzimas liofilizadas y transferidas a solventes orgánicos apolares (Klibanov, 1986). Incluso, en estos medios se hacen posibles reacciones enzimáticas que no son factibles en medios acuosos. Por ejemplo, las lipasas pueden catalizar reacciones de transesterificación, esterificación, aminólisis, intercambio de grupos acilo, tiotransesterificaciones y oximólisis en solventes orgánicos (Zaks y Klibanov, 1985).

Del estudio de las propiedades fisicoquímicas del agua celular de los quistes de un crustáceo llamado *Artemia*, se han determinado los siguientes parámetros: los tiempos de relajación (T_1 y T_2) y el coeficiente de difusión (D) por resonancia magnética nuclear (RMN); la permitividad dieléctrica (ϵ) así como el parámetro de dispersión (α) por estudios dieléctricos de microondas; el D y los tiempos de correlación (τ) en 10^{-12} seg por dispersión de neutrones cuasi-elástica (QNS) y la densidad (ρ) (Clegg, 1986). Un porcentaje importante del agua celular de ese sistema presentó propiedades translacionales y rotacionales diferentes a las de una solución acuosa.

El hecho de que el agua celular presente propiedades fisicoquímicas diferentes a las del agua de bulto, ha motivado el estudio del comportamiento cinético de una enzima en contacto con cantidades muy pequeñas y controlables de agua, para poder conocer los efectos del agua de interfase sobre la catálisis enzimática. Por lo anterior, en años recientes ha surgido un interés creciente en el estudio del comportamiento de enzimas solubilizadas en micelas invertidas en un solvente orgánico

apolar (Luisi y Magid, 1986; Martinek y col., 1986; Luisi y col., 1988).

Las micelas invertidas consisten de un sistema formado de pequeñas gotas de agua estabilizadas por un agente tensoactivo en un medio orgánico apolar. En la figura 1 se representa el modelo de una micela invertida en la cual los grupos cargados del tensoactivo se orientan hacia el interior acuoso de la micela, mientras que la región apolar se encuentra en contacto con el solvente orgánico.

La importancia de estudiar el comportamiento cinético de una enzima en estos sistemas, radica en la posibilidad de ponerla en contacto con diferentes microambientes acuosos, y así determinar como influyen éstos en el proceso de la catálisis. Lo anterior se logra gracias a que en el interior de la micela se puede atrapar agua en cantidades variables (1-10 %, p/v de medio micelar; Douzou, 1980) pero controlables, pudiéndose trabajar desde concentraciones de agua correspondientes a "agua unida" (de interfase), que equivaldría al agua de solvatación de los grupos cargados del tensoactivo, hasta concentraciones de agua donde además estaría presente el agua "libre", definida como aquella con las propiedades del agua pura (de bulto).

1) Propiedades fisicoquímicas de las micelas invertidas

A temperatura ambiente la mayoría de las soluciones micelares en solventes orgánicos apolares son homogéneas y transparentes hasta 350-250 nm dependiendo del tipo de tensoactivo. Conforme se

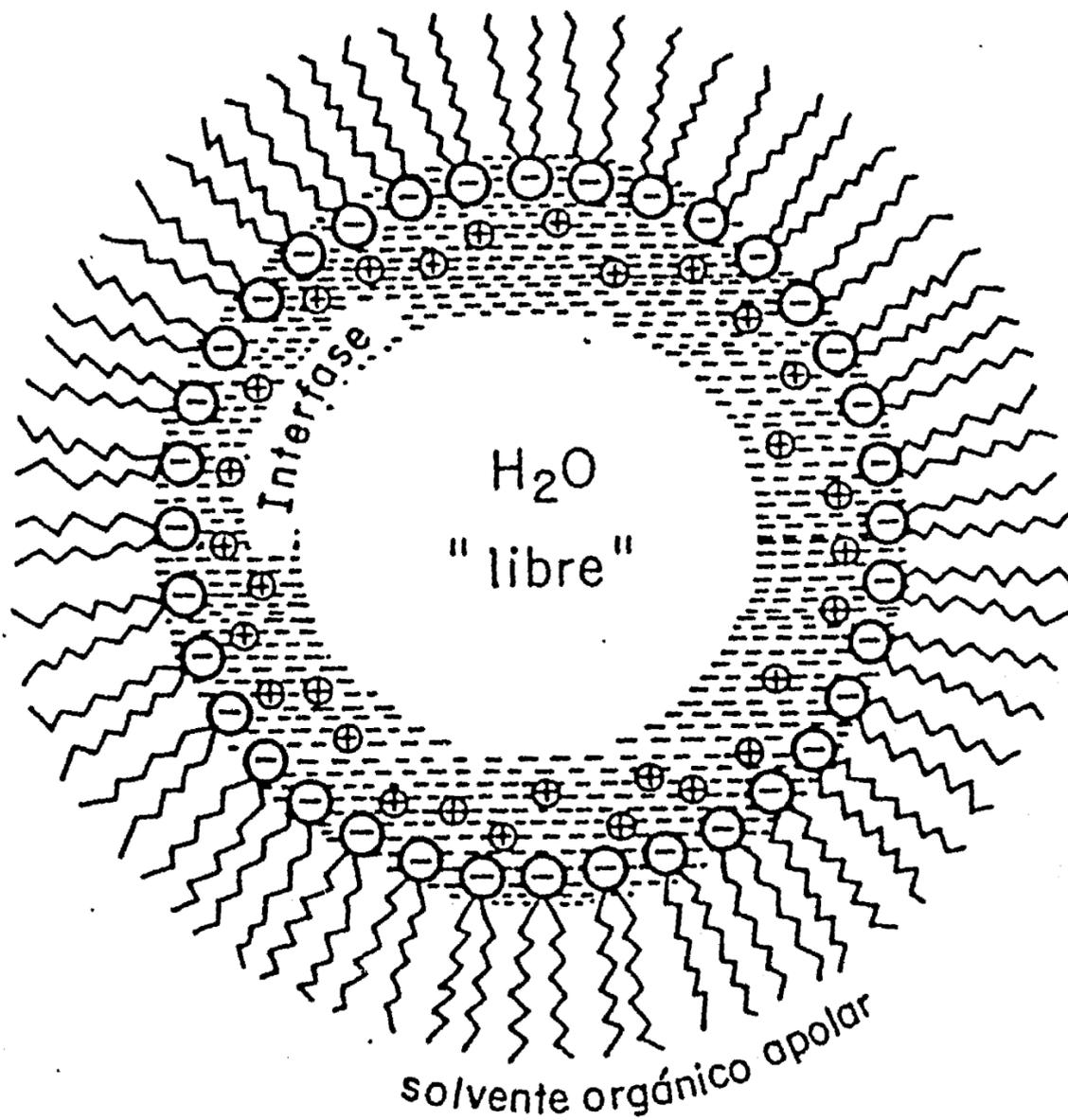


Figura 1. Modelo de una Micela Invertida de AOT en un solvente orgánico apolar (El Seoud, 1984). Los grupos cargados del tensoactivo se orientan hacia el interior acuoso de la micela, mientras sus cadenas hidrocarbonadas se encuentran en contacto con el solvente orgánico apolar.

disminuye la temperatura aparecen tres regiones en los diagramas de fases de micelas invertidas: incolora, translúcida azul y turbia (Kon-No y Kitahara, 1970). De estas regiones, las dos primeras son homogéneas y estables, y representan las regiones en que el agua es soluble. Se han estudiado soluciones micelares de AOT variando la temperatura encontrándose que éstas permanecen homogéneas hasta -45°C . La presencia de enzimas o de electrolitos (sales neutras, amortiguadores) no afecta marcadamente la solubilidad del agua en las soluciones de AOT ni se modifica apreciablemente el rango de temperaturas de la región transparente (Dozou, 1980).

La constante dieléctrica del medio micelar de AOT-agua en octano se asemeja a la del octano ($D = 1.95$) y no a la del agua ($D = 78.5$) aún a concentraciones de agua altas (50 moles de H_2O / mol de tensoactivo). Sin embargo, al considerar que la constante dieléctrica es una propiedad macroscópica se midió la polaridad de la poza acuosa micelar con un marcador de fluorescencia (Fendler y Liu, 1975). A bajas concentraciones de agua la polaridad es menor respecto a la del agua de bulto (equivalente a la polaridad del metanol); conforme se aumenta la concentración del agua en la poza micelar, la polaridad tiende a ser la del agua de bulto. Por consiguiente, la naturaleza del agua "atrapada" por el tensoactivo en el medio orgánico no es uniforme. Se han descrito dos tipos de agua: el agua unida a los grupos polares y el agua presente en el centro de la micela invertida (Figura 1). El agua unida tiene un movimiento restringido, mientras que el agua del segundo tipo aunque tiene

mayor movilidad es menor que la del agua de bulto (Wells, 1974).

La viscosidad de las microfases acuosas se ha estudiado por RMN (Frank y col., 1973), por infrarojo (Ekwall y col., 1970) y con marcadores de fluorescencia (Wong y col., 1976). La viscosidad del agua micelar fue menor que la del agua de bulto, concluyéndose que el estado físico de las pozas acuosas es único y completamente diferente.

Las soluciones micelares son entidades dinámicas, es decir, se encuentran en equilibrio con la forma monomérica del tensoactivo (Lindman y col., 1981; David y col., 1981). Debido a su carácter dinámico, las micelas invertidas alcanzan fácilmente el equilibrio. La estabilidad de las soluciones micelares es muy grande: pueden conservarse por semanas y hasta meses sin modificar sus propiedades (O'Connor y Ramage, 1980).

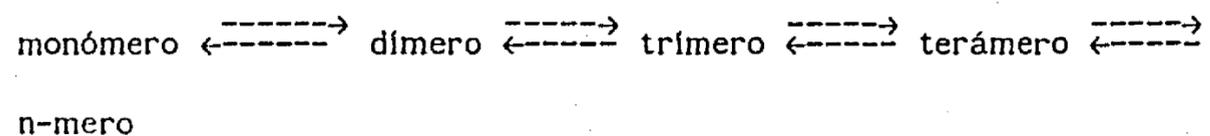
En contraste con las micelas en solución acuosa, las micelas invertidas son eléctricamente neutras, por lo que no hay repulsión coulombica y se facilitan las colisiones. Se ha propuesto que el intercambio del contenido micelar ocurre por un proceso de fusión-fisión (Eicke y col., 1976; Fletcher y col., 1987). Lo anterior significa que cuando dos micelas invertidas colisionan se forma una micela con la poza acuosa mezclada; posteriormente, se separa la micela en dos nuevas micelas invertidas.

El número de colisiones que conducen a un intercambio depende de la energía térmica y la composición del sistema. Se han reportado frecuencias de intercambio entre 10^6 y 10^8 $M^{-1} s^{-1}$. Esto significa que sólo una en mil colisiones conduce a un evento de

intercambio y que las micelas invertidas se comunican una con otra en una escala de tiempo de micro a milisegundos (Verhaert, 1989).

2) Formación de las micelas invertidas

En la figura 2 se muestran algunos de los tensoactivos más usados en la formación de las micelas invertidas. Como puede observarse, dependiendo de la naturaleza de sus grupos polares estos pueden ser: no iónicos, catiónicos, aniónicos y zwitteriónicos. Además, todos ellos presentan una región apolar cuya longitud puede ser variable, contener enlaces insaturados, y/o estar formada por más de una cadena. La agregación de los tensoactivos depende de su estructura química y de la naturaleza de la solución. Los modelos que se han propuesto para la agregación de los tensoactivos en los solventes no polares se han basado principalmente en modelos derivados de micelas en agua. Sin embargo, se ha encontrado que el número de monómeros involucrados en la mayoría de los agregados en medios orgánicos apolares es relativamente menor que el número en solución acuosa, y que la asociación de tipo monómero \rightleftharpoons n-mero no corresponde al comportamiento del tensoactivo en el solvente orgánico (Douzou, 28). Se han propuesto modelos en que la asociación del tensoactivo se da paso a paso en la cual un equilibrio múltiple supone la formación de agregados en una asociación indefinida:



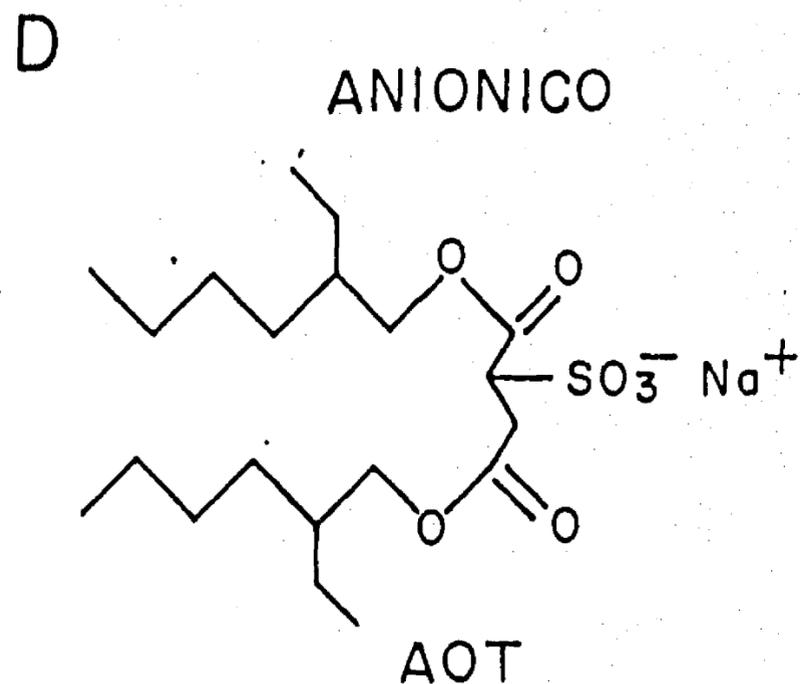
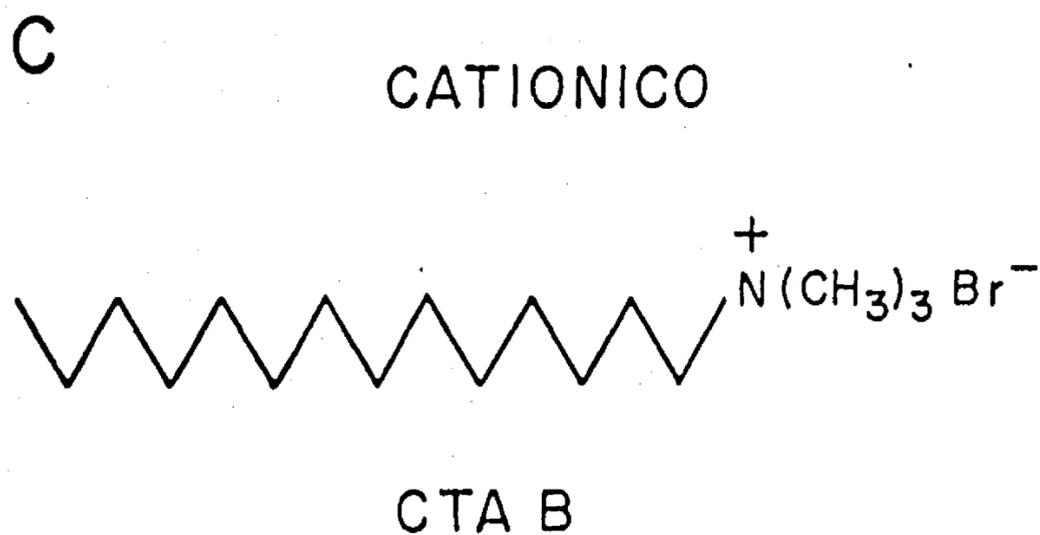
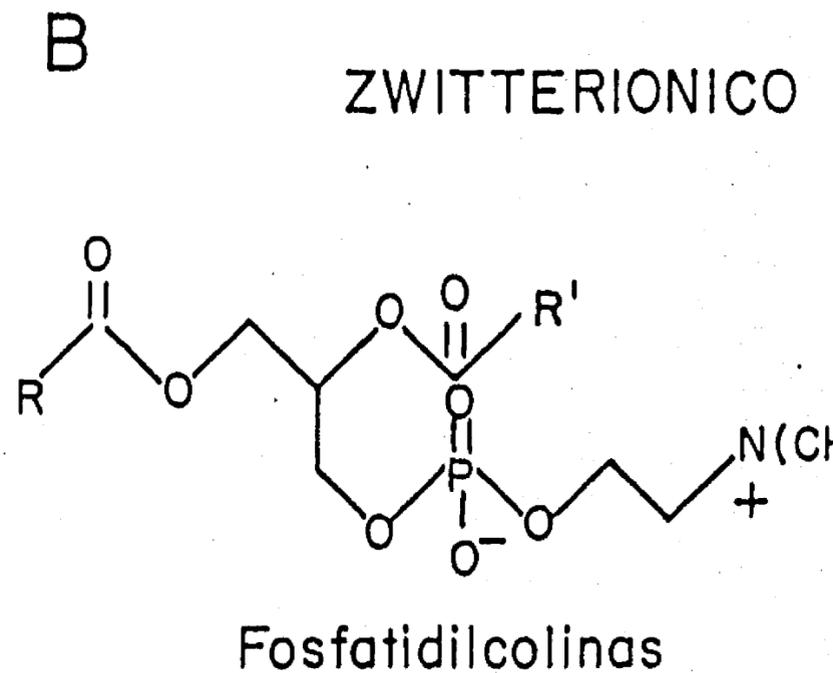
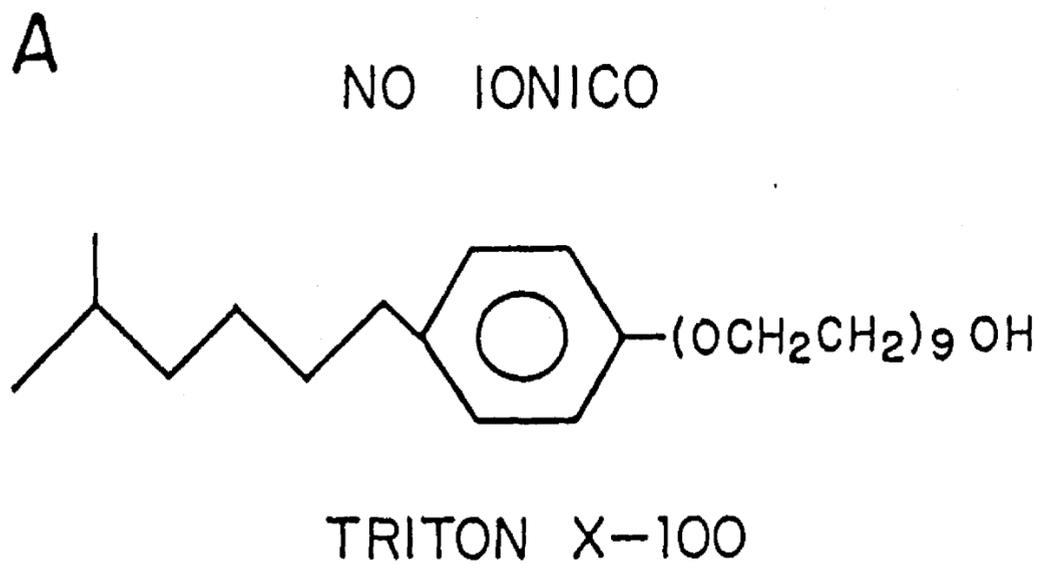


Figura 2. Tensoactivos que forman micelas invertidas en un solvente orgánico apolar. (CTAB: bromuro de hexadeciltrimetilamonio; AOT: bis-dietilhexilsulfosuccinato de sodio).

A bajas concentraciones de tensoactivo los monómeros se asocian para formar micelas lamelares, con los grupos polares y lipofílicos orientados hacia el agua y el solvente orgánico respectivamente. La estructura de estos agregados es ligeramente asimétrica y se puede representar por un cilindro. El grado de asimetría se reduce notablemente en presencia de agua formándose una micela esférica. Se pueden identificar una variedad de mesofases en equilibrio una con otra. Cada mesofase puede involucrar diferentes estructuras micelares en equilibrio. Con base en lo anterior, a diferencia de un medio acuoso en los solventes orgánicos apolares no parece existir un cambio brusco en alguna propiedad fisicoquímica del sistema que permita evidenciar la formación de las micelas invertidas y, por ende, determinar la concentración crítica micelar (CMC) del sistema (Kertes y Gutmann, 1976). Ya se mencionó como al aumentar la concentración del tensoactivo en la solución orgánica, se favorece desde el inicio la formación de agregados de tensoactivo con números de agregación variable, dependiendo de la naturaleza del solvente orgánico y del tensoactivo. Para los dialquilsulfosuccinatos, (Eicke y Zulauf, 1979), los dinonilnaftalensulfonatos (Little, 1970) y las fosfatidilcolinas (Poon y Wells, 1974), los números de agregación en los solventes orgánicos varían de 12 a 30 y, aún así, la definición de su CMC no es clara.

3) Propiedades del agua micelar

La cantidad de agua que contiene un sistema de micelas invertidas

se define por el cociente molar agua/tensoactivo llamado W_o . Uno de los tensoactivos más usados en la formación de las micelas invertidas es el tensoactivo aniónico bis-dietilhexil sulfosuccinato de sodio, más conocido como AOT y cuya fórmula se encuentra en la figura 2. Cuando el AOT se disuelve en un solvente orgánico, éste se agrega en forma de micelas invertidas capaces de solubilizar hasta 50 moléculas de agua por cada molécula de tensoactivo (Menger y Saito, 1978); con este tensoactivo aniónico son necesarias alrededor de 10 moléculas de agua para solvatar a sus grupos cargados, y sólo por arriba de ese valor ($W_o=10$), comienza a aparecer el agua libre en el interior de la micela (Luisi y Magid, 1986). Estas dos poblaciones de agua se representan en el interior de una micela invertida en la figura 1.

Un ejemplo de como varía el comportamiento del agua micelar con el aumento del agua en la cavidad de las micelas invertidas de AOT en el octano, es la medición del desplazamiento químico (δ) en RMN del ^1H del agua (Thompson y Gierasch, 1984). Como se puede observar en la figura 3 los cambios más drásticos ocurren justo a valores bajos de W_o : conforme crece la cantidad de agua en el interior de la micela, el δ del ^1H del agua tiende al valor del agua "libre".

Un aspecto importante relacionado con el agua micelar, es la definición de su pH. Como resulta imposible determinar en forma precisa el pH intramicelar, se han usado escalas de acidez empíricas basadas en la medición por RMN, del desplazamiento químico (δ) del ^{31}P de amortiguadores de fosfato en agua pura y

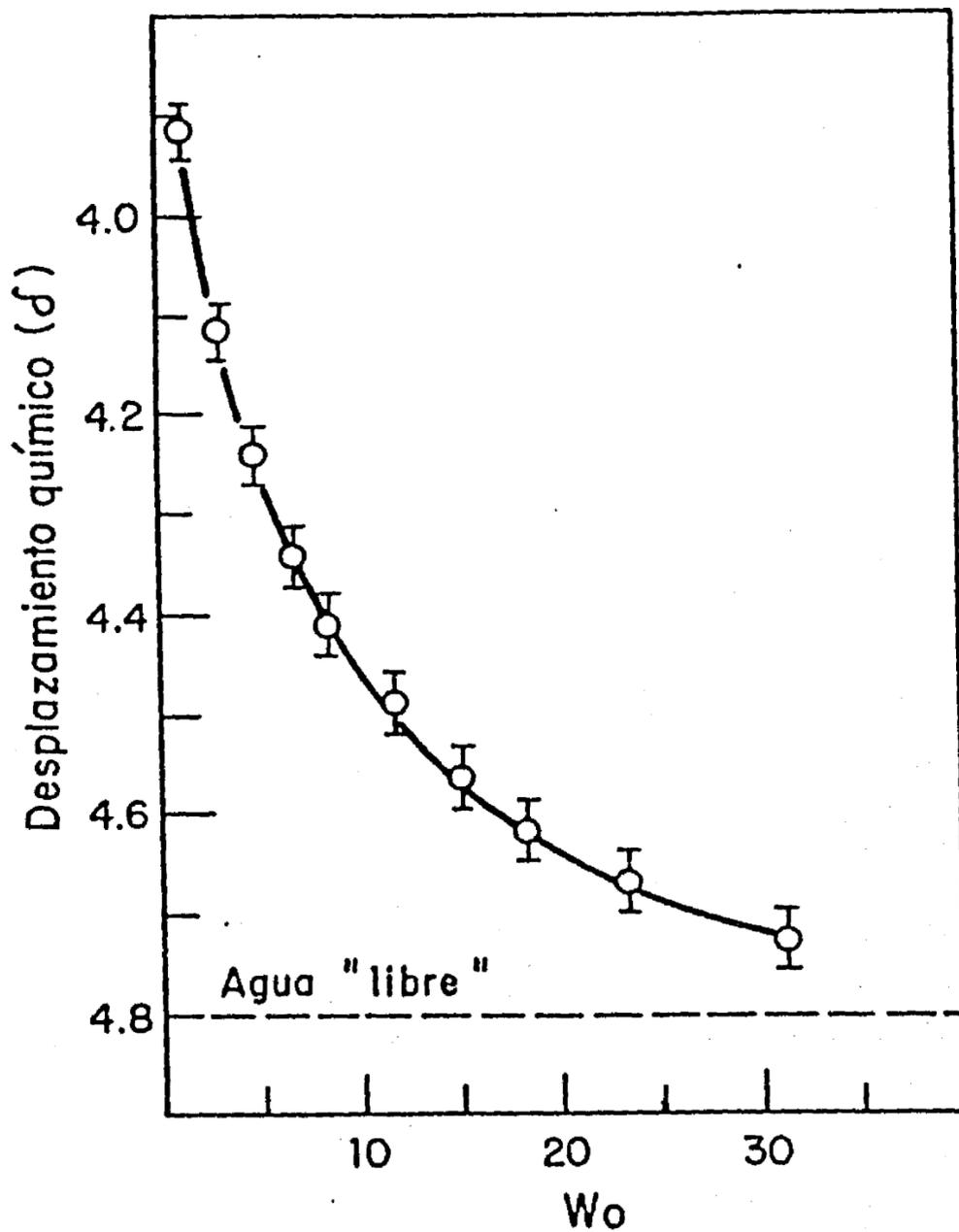


Figura 3. Desplazamiento químico (δ) en función del W_o , obtenido por resonancia magnética nuclear (250MHz) del ^1H del agua de micelas invertidas de AOT en octano. El W_o es el cociente molar agua/tensoactivo. Conforme aumenta el W_o del medio, el δ del ^1H del agua micelar tiende al valor de δ para el ^1H del agua "libre" (Thompson y Gierasch, 1984).

en las micelas invertidas, para lo cual se supone que el valor de pK es el mismo en ambos medios. Ya que los δ 's para el ^{31}P determinados por RMN son sensibles al pH, se ha determinado el pH intramicelar para varias soluciones de micelas invertidas de AOT al correlacionar el δ del ^{31}P en el medio micelar con una curva de calibración de δ del ^{31}P de soluciones acuosas de fosfato de pH diferente. De esta manera, se ha encontrado que el pH aparente de la cavidad micelar se encuentra desplazado en tan sólo 0.4 unidades más arriba del pH de la solución acuosa solubilizada (Smith y Luisi, 1980).

4) Tamaño de una micela invertida

Un aspecto muy controvertido es el tamaño que puede alcanzar una micela invertida. Se ha descrito que de manera similar a las micelas en agua, las micelas invertidas son estructuras esféricas que alcanzan diámetros de 30 a 60 Å y que conforme se aumenta la cantidad de agua solubilizada en su interior, se da lugar a una microemulsión cuyo diámetro puede llegar a ser de 60 a 1000 Å (Fendler, 1982; Kumar y col., 1984).

5) Solubilización de una proteína en un sistema de micelas invertidas

i) Métodos. Prácticamente cualquier proteína puede solubilizarse dentro de una micela invertida. Los métodos más comunes para llevarlo a cabo se describirán brevemente, sin discutir los aspectos termodinámicos que explican la factibilidad de este

proceso, de lo cual, por cierto, aún se sabe muy poco. En la figura 4A. se ilustra el método de transferencia de una proteína a partir de su estado sólido, el cual consiste en la incorporación de una proteína liofilizada, dentro de una solución micelar (Delahodde y col., 1984). Llama la atención que por este método la transferencia máxima de la proteína ocurre a una concentración relativamente baja de agua en la micela invertida, alrededor de un $W_o = 6-8$.

En el método conocido como transferencia de fase (fig.4B) la proteína disuelta en un medio acuoso salino se extrae con una fase de micelas invertidas (Luisi y col., 1979; Leser y col., 1986). Cuando la concentración de la sal es óptima, siempre se logra una transferencia adecuada de la proteína la cual se acompaña de una transferencia máxima de agua dentro de la fase orgánica. También se ha observado que la extracción de las proteínas por este método se favorece sólo en presencia de ciertas sales.

El método de inyección (fig.4C) es el más sencillo y el más utilizado. Este consiste en inyectar un volumen muy pequeño de una solución acuosa concentrada de la proteína en una solución micelar (Luisi y Steinmamm-Hofmann, 1987).

Las enzimas que se han solubilizado siguiendo alguno de los métodos anteriores han sido principalmente hidrolasas, deshidrogenasas y oxidasas.

ii) Estructura que adquieren las micelas invertidas al solubilizarse una proteína. Se han propuesto varios modelos para explicar como una proteína dependiendo de sus características

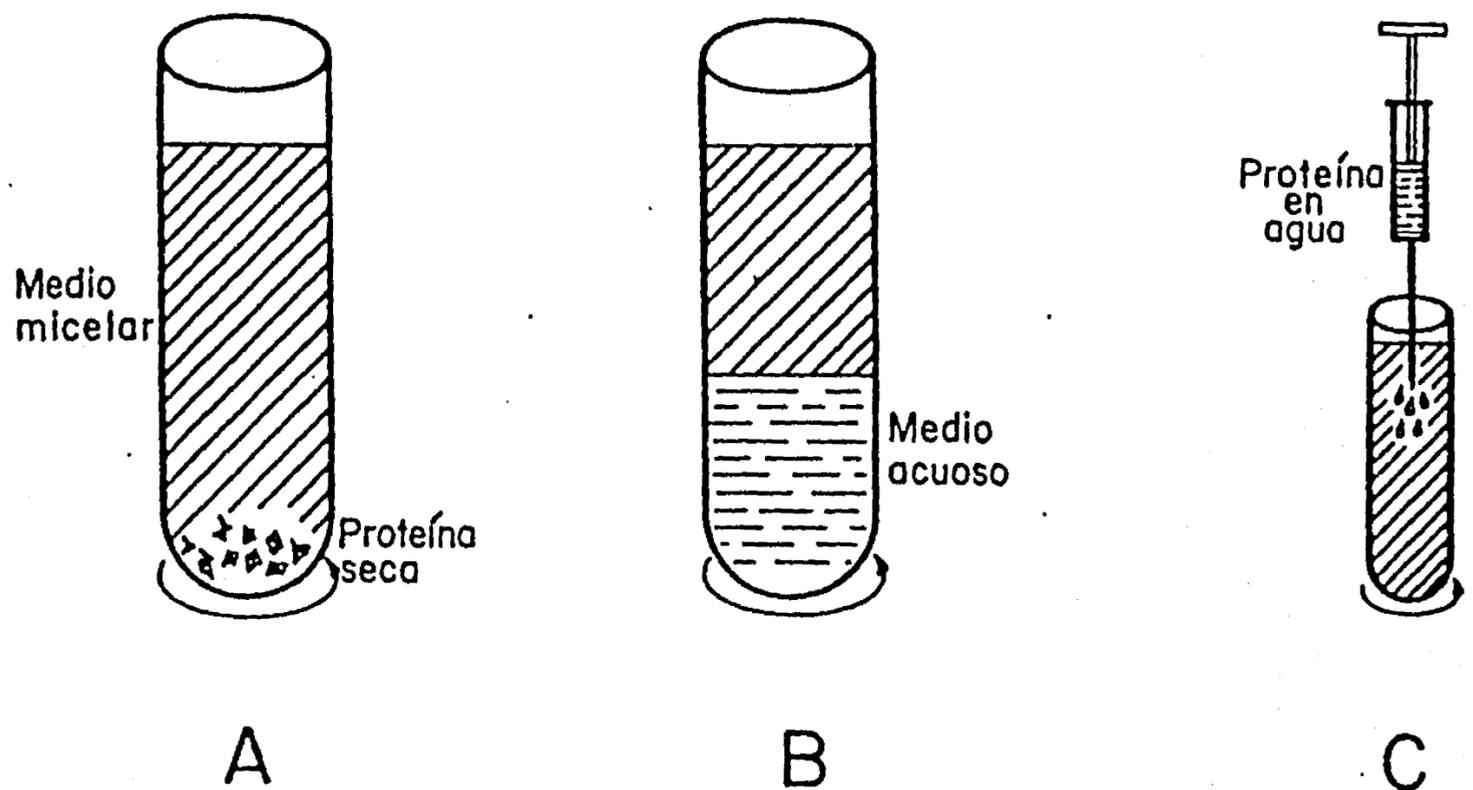


Figura 4. Métodos para la solubilización de una proteína en un sistema de micelas invertidas. (A) Solubilización de una enzima seca: la proteína liofilizada se agrega al medio micelar ; (B) Transferencia de fase: la proteína disuelta en un medio acuoso salino se extrae con un medio de micelas invertidas y (C) Inyección: se inyecta un volumen muy pequeño de una solución acuosa concentrada de la proteína al sistema micelar. En los tres métodos es necesario agitar por un período corto (Luisi y Steinmann-Hofmann, 1987).

puede solubilizarse en un medio de micelas invertidas. En la figura 5a se propone el modelo de la poza acuosa para una proteína hidrofílica, en el que ésta se encuentra rodeada de monocapas de agua que evitan su contacto con las moléculas del tensoactivo y del solvente orgánico (Bonner y col., 1980; Sheu y col., 1986). Por otra parte, se han sugerido otros modelos para el caso de una proteína hidrofóbica (ver figura 5b y 5d). En estos casos la proteína interacciona con las cadenas hidrocarbonadas del tensoactivo o incluso con el solvente orgánico. La interacción del tensoactivo con el sitio activo de una enzima puede explicar aquellos casos en que una proteína sólo es activa en presencia de su sustrato (Fig.5c).

En el caso de la rodopsina (Ramakrishnan y col., 1983) y de una proteína básica de la mielina (Chatenay y col., 1985), se han encontrado indicios de la formación de agregados micelares de alto peso molecular. Este hecho ha planteado que en ciertos casos se favorece la existencia de una población de estas estructuras entrecruzadas (Fig.5e).

Del tamaño de la cadena hidrocarbonada del tensoactivo así como de la naturaleza del solvente orgánico apolar, depende el tamaño que alcanza una micela invertida. Esto se ve reflejado en la solubilización de enzimas de membrana de gran tamaño como son: la rodopsina (Darszon y col., 1979), los centros de reacción de bacterias fotosintéticas (Schönfeld y col., 1980; Kendall-Tobias y col., 1981), los complejos enzimáticos de la membrana interna de la mitocondria (Escamilla y col., 1989), e incluso de células enteras (Häring y col., 1985; Darszon y col., 1988; Pfammatter y

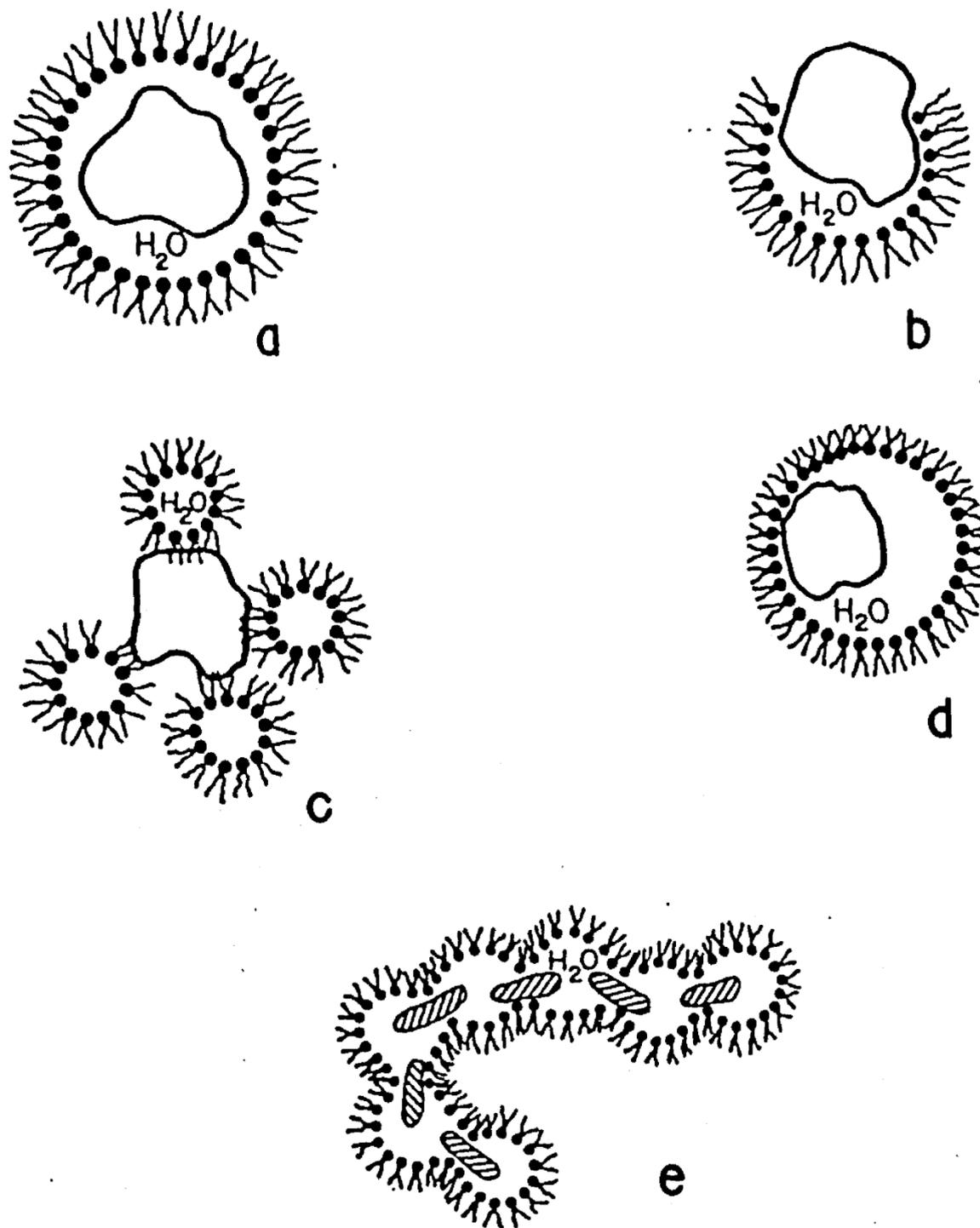


Figura 5. Estructuras propuestas para la solubilización de una proteína en un sistema de micelas invertidas: (a) una proteína hidrofílica se encuentra en la poza acuosa de la micela (Bonner y col., 1980; Sheu y col., 1986); (b) una proteína con un dominio hidrofílico y otro hidrofóbico interacciona con el agua micelar y con el solvente orgánico, respectivamente ; (c) una proteína totalmente hidrofóbica se encuentra en contacto con las cadenas del tensocativo y con el solvente orgánico (Luisi y Magid, 1986); (d) el sitio activo de una proteína hidrofílica interacciona con los grupos cargados del tensoactivo (Steinman y col., 1986); (e) las micelas invertidas forman redes interconectadas por proteínas de membrana (Ramakrishnan y col., 1983; Chatenay y col., 1985).

col., 1989). Sin embargo, en la solubilización de células se ha dudado se formen micelas invertidas, a pesar de que se mantengan las condiciones de cantidad de agua mínima, transparencia y homogeneidad del medio. El tipo de estructuras que prevalecen en estos medios es todavía una pregunta abierta.

iii) Cinética Enzimática

Un hecho interesante es que, en general, la actividad máxima de las enzimas solubles en estos medios micelares se alcanza a valores de W_0 de 10-12 y ésta es cercana a la que se observa en un medio acuoso (Luisi y col., 1988); lo anterior sugiere que una enzima sólo requiere del agua de interfase para desarrollar su actividad catalítica máxima.

La cinética de las reacciones químicas catalizadas por las enzimas solubilizadas en estos sistemas obedece, como regla, la ecuación de Michaelis-Menten. No obstante, la teoría cinética de las reacciones enzimáticas que proceden en estos medios microheterogéneos, debe tomar en cuenta la partición del sustrato entre la pseudofase acuosa de las micelas y la fase orgánica (Martinek, 1986; Hilhorst y col., 1984; Verhaert y col., 1990a y 1990b). La partición entre las fases también influye en la interacción de la enzima solubilizada con los inhibidores, activadores y otros solutos del proceso enzimático.

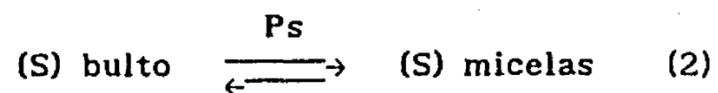
Debido a la partición del sustrato el valor de la constante de Michaelis (K_M) depende del volumen de la fase orgánica como de la fase (acuosa) micelar.

A continuación se describe el modelo que han propuesto Khmel'nitsky y col. (1989) para la caracterización de los parámetros cinéticos en un medio de micelas invertidas.

Si se considera que la reacción entre la enzima E y el sustrato S obedece la cinética de Michaelis Menten en un sistema de micelas invertidas:



Si el sustrato se particiona:



El coeficiente de partición estaría dado por:

$$P_S = \frac{[S]_{mic}}{[S]_b} \quad (3)$$

Los subíndices mic y b se refieren a la fase micelar y a la fase del bulto, respectivamente. Se considera que la enzima sólo se distribuye en la fase micelar. La velocidad inicial de la reacción enzimática relacionada con respecto al volumen total del sistema esta dada por:

$$v = \frac{k_{cat,mic} [E]_{o,mic} [S]_{o,mic}}{K_{M,mic} + [S]_{o,mic}} \quad \Theta \quad (4)$$

Θ es la fracción de volumen de la fase micelar y el subíndice "o" se refiere a la concentración inicial. En este modelo se supone que el intercambio de las moléculas de sustrato entre las fases es suficientemente rápido, de tal manera que la reacción enzimática no perturba el equilibrio de partición. Por lo tanto se puede hacer un balance del material:

$$[S]_o = [S]_{o,mic} \Theta + [S]_{o,b} (1 - \Theta) \quad (5)$$

$$[E]_o = [E]_{o,mic} \Theta$$

La sustitución de las ecuaciones 3 y 5 en la ecuación 4 da:

$$v = \frac{k_{cat,ap} [E]_o [S]_o}{K_{M,ap} + [S]_o} \quad (6)$$

donde $k_{cat,ap} = k_{cat,mic} \quad (7) \quad y,$

$$K_{M,ap} = K_{M,mic} \frac{1 + \Theta (P_s - 1)}{P_s} \quad (8)$$

En el caso de sustratos cargados la ecuación (8) puede simplificarse al suponer que las moléculas del sustrato se encuentran sólo en la fase micelar, así que sólo $P_s \gg 1$, y también $P_s \Theta \gg 1$.

Por lo tanto

$$K_{M,ap} = K_{M,mic} \Theta \quad (9)$$

Mientras que para los sustratos apolares $P_s \ll 1$, así

$$K_{M,ap} = K_{M,mic} \frac{1 - \theta}{P_s} \quad (10)$$

Como criterio de la actividad catalítica de una enzima solubilizada en una micela invertida, se ha utilizado a la constante catalítica K_{cat} (o número de recambio): número de moles de sustrato transformadas por mol de centro catalítico y por unidad de tiempo (Martinek y col., 1981).

La validez de la teoría cinética basada en el modelo de la pseudofase se ha comprobado con varias enzimas solubilizadas en los sistemas micelares. Sin embargo, debe mencionarse que este modelo no es estrictamente válido para las enzimas que interaccionan con la membrana micelar. Con estas enzimas el valor de K_{cat} depende de la concentración del tensoactivo a un valor de W_0 constante; es decir, de la fracción de volumen de la fase micelar, θ . Tal es el caso de la peroxidasa, de la lacasa y de la fosfatasa ácida descrito por el grupo de Martinek (Khmelnitsky y col., 1989).

La actividad enzimática de los biopolímeros solubilizados en las micelas invertidas muestra una fuerte dependencia del W_0 . Tomando en cuenta las propiedades fisicoquímicas de las micelas invertidas, se ha propuesto un modelo que predice el comportamiento de la actividad catalítica de una enzima en estos medios (Bru y col., 1989). En éste se considera la existencia de tres dominios en una micela invertida: la región apolar del agente tensoactivo, el agua de interfase y el agua "libre" (ver fig.1). Dependiendo del dominio en el que la enzima presente

mayor actividad, se obtienen tres tipos de comportamiento, estos se muestran en la figura 6. En las curvas se considera que la constante catalítica es mayor cuando la enzima se encuentra en contacto con: el agua de interfase (6a), el agua "libre" (6b) y con las cadenas del tensoactivo (6c). En la práctica se pueden encontrar algunos ejemplos de esos comportamientos. En la figura 7 se ilustra un caso para cada uno de los perfiles de la actividad que se predicen con el modelo descrito: A una campana para la hidrólisis del éster etílico de la N α -benzoil de arginina por la tripsina (Walde y col., 1988); B una sigmoide para la reducción del peróxido de hidrógeno por la catalasa (Escobar y col., 1990); y C una función monótona decreciente en el caso de la oxidación de la prednisona (\square) o de la progesterona (O) por la 20 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Hilhorst y col., 1984).

iv) **Termoresistencia.** Otra característica sobresaliente de las enzimas solubilizadas en estos medios micelares es su resistencia al aumento en la temperatura: las enzimas se mantienen activas aún a aquellas temperaturas que provocan la desnaturalización de la proteína en un medio acuoso. Esta mayor resistencia a la termoinactivación disminuye conforme se aumenta la cantidad de agua en el medio micelar (Ayala y col, 1986; Garza-Ramos y col, 1989; Garza-Ramos y col, 1990). Este comportamiento es muy similar al observado con las enzimas liofilizadas y suspendidas en un solvente orgánico apolar (Klibanov, 1984).

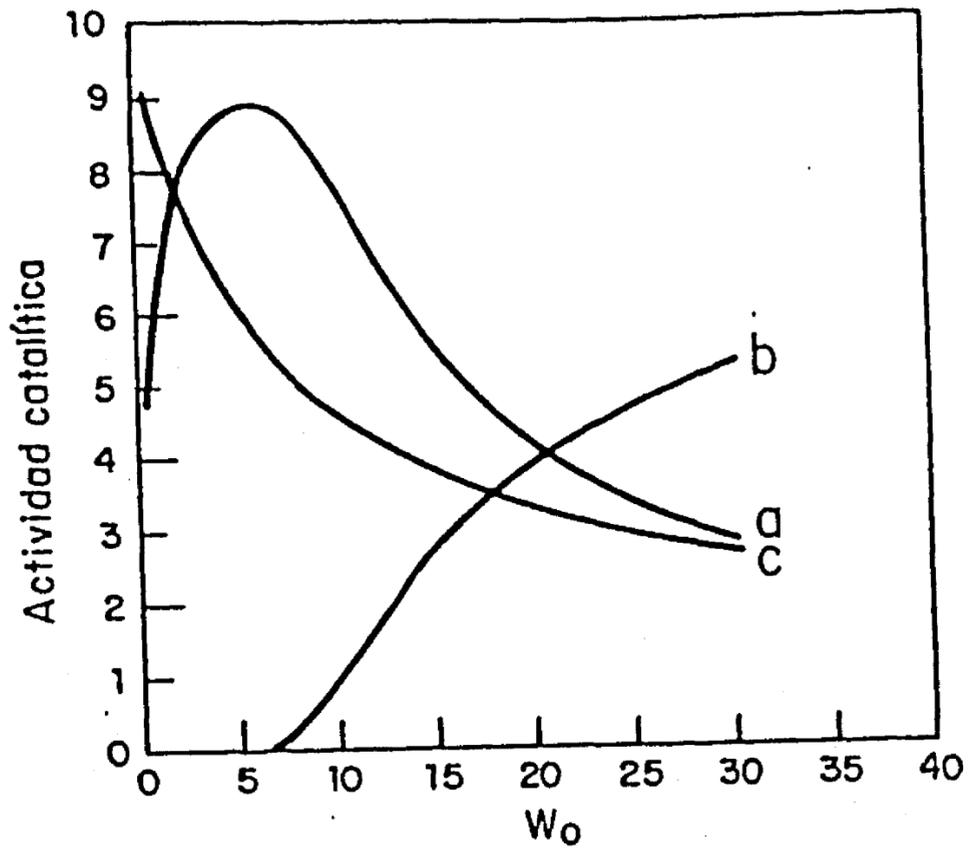


Figura 6. Perfil teórico de la actividad enzimática como función del W_0 del sistema micelar. La enzima tiene su actividad máxima en: (a) agua de interfase; (b) agua "libre", y (c) las cadenas hidrocarbonadas del tensoactivo (Bru y col., 1989).

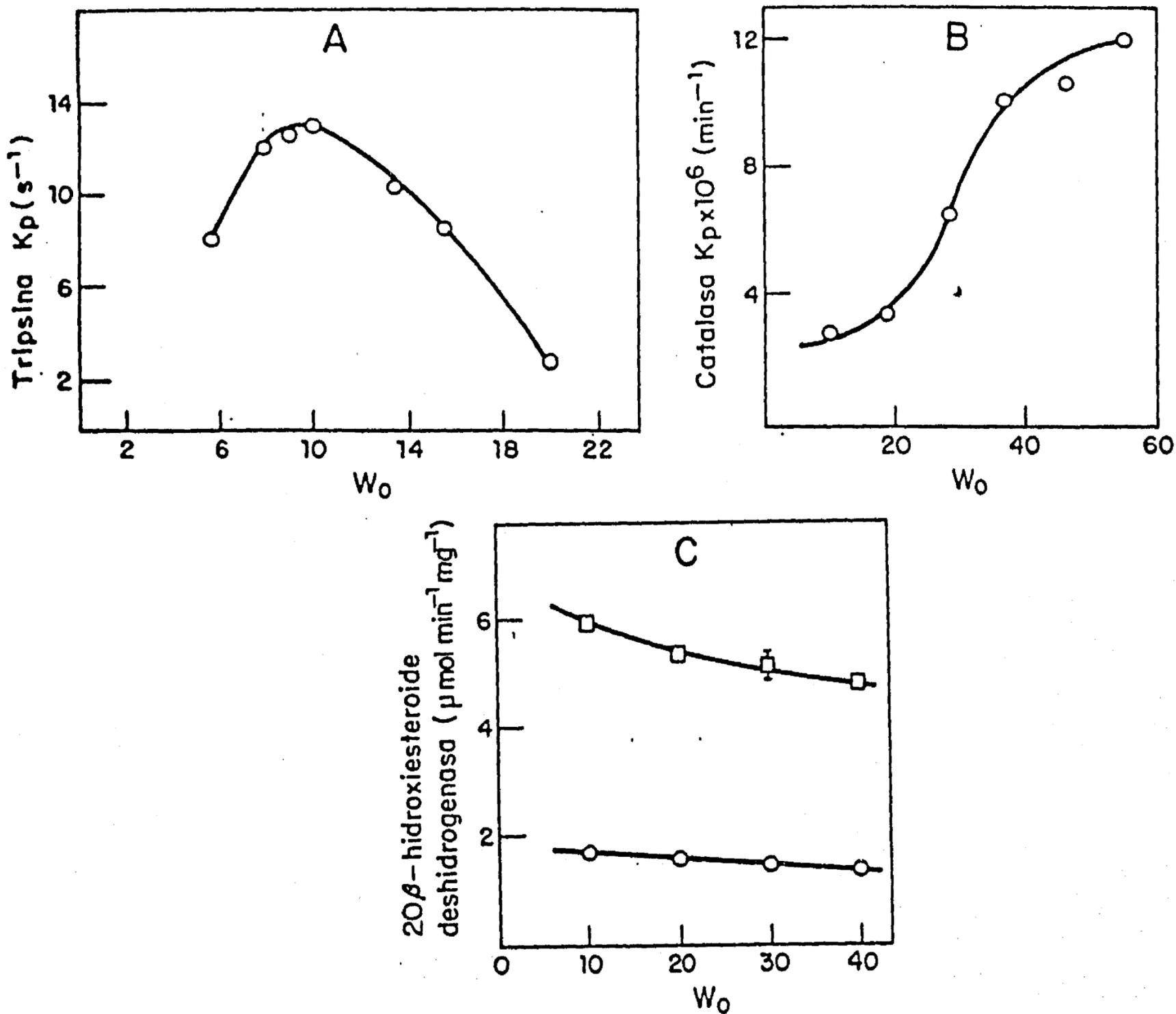


Figura 7. Perfil de la actividad enzimática al variar el W_0 del medio micelar. (A) Hidrólisis del éster etílico de la N α -benzoil-L-arginina por la tripsina (Walde y col., 1988); (B) Reducción del perborato de sodio por la catalasa (Escobar y col., 1990); en ambos casos, las enzimas se solubilizaron en micelas invertidas de AOT en isooctano. (C) Reducción de la prednisona (□) y de la progesterona (○) por la 20 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa en micelas invertidas de CTAB/hexanol en octano (Hilhorst y col., 1984).

6) Reacciones Secuenciales

Ultimamente ha surgido el interés de experimentar con sistemas más complejos que enzimas aisladas. Intentos pioneros en este sentido demostraron que es posible llevar a cabo reacciones enzimáticas en secuencia, a partir de enzimas atrapadas en conjunto en un medio de micelas invertidas: con el objeto de lograr la reducción de la progesterona en un medio apolar (esteroide cuya solubilidad en agua es $< 50 \mu\text{M}$), se diseñó un sistema de micelas invertidas compuesto no sólo por la enzima responsable de la reducción del esteroide, la 20β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSDH), sino también por un sistema regenerador del reductor NADH, en el que participan una deshidrogenasa (H_2 asa) y una lipoamida deshidrogenasa (LipDH) (Hilhorst y col., 1983). El esquema del acoplamiento de estas reacciones enzimáticas se muestra en la figura 8. A través del consumo continuo de hidrógeno (H_2) por la H_2 asa se reduce al metilviológeno de MV^{2+} a MV^+ , el cual se reoxida por la LipDH al regenerar el NADH a partir del NAD^+ que se forma después de la reducción de la progesterona por la HSDH.

7) Complejos enzimáticos membranales

Salvo algunos estudios enfocados a la preservación de la estructura y actividad de la rodopsina (Darszon y col., 1979), de la bacteriorodopsina (Huang y col., 1977), de los centros de reacción de *Pseudomonas Spheroides* (Schönfeld y col., 1980) y, más recientemente, de la ATPasa de partículas submitocondriales

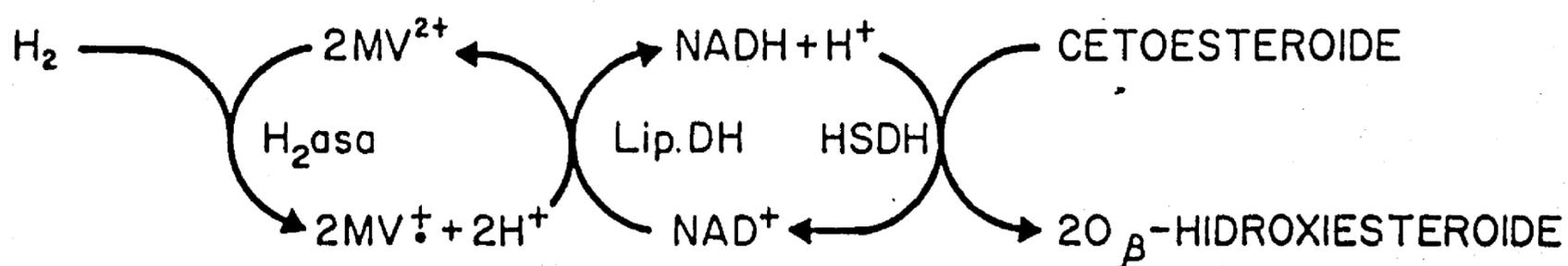


Figura 8. Reacciones multienzimáticas entre enzimas solubles en agua en un medio de micelas invertidas. La reducción de la progesterona se lleva a cabo por la 20_{β} -hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSDH) en presencia de NADH regenerado *in situ* por la lipoamida deshidrogenasa (LipDH) y por metilviológeno reducido (MV^{\bullet}). Este último se regenera a su vez al reducirse con un burbujeo de hidrógeno en el medio vía una hidrogenasa (H_2asa). El sistema micelar fue 4.7% de agua (V/V)/ CTAB/ hexanol en octano (Hilhorst y col., 1983).

de corazón de res (Garza-Ramos y col., 1990) en un medio de micelas invertidas, llama la atención como la mayoría de los trabajos realizados en estos sistemas micelares se enfocaron principalmente al estudio de enzimas no asociadas a membranas. ↓

i) Reducción parcial de la citocromo oxidasa por ascorbato en un sistema de micelas invertidas. Escamilla y colaboradores en 1989 reportaron que en un medio micelar de asolectina en tolueno con tan sólo 0.3% de agua (v/v; con un W_0 de aproximadamente de 10), tanto preparaciones micelares del citocromo c como de la citocromo oxidasa podían reducirse con ascorbato. La transferencia de electrones del citocromo c reducido a la citocromo oxidasa también ocurría pero sólo cuando ambas proteínas se solubilizaban conjuntamente en el medio micelar. Este resultado sugiere que en el caso de las macromoléculas, como son las proteínas, se adopta un arreglo donde el intercambio intermicelar entre esos componentes ya no es factible. Sin embargo, Eremin y col. (1986) han mostrado que hay interacción entre un antígeno y un anticuerpo solubilizados independientemente en micelas invertidas.

Una vez que los citocromos se reducían, sólo el citocromo c se oxidaba lentamente mientras que la citocromo oxidasa permanecía reducida incluso después de agitarla constantemente o de burbujear oxígeno en el medio. Al aumentar el contenido de agua en el sistema hasta 1.3% de agua, el medio perdía su transparencia para dar lugar a una emulsión. En esas condiciones ya no fue posible observar la acumulación de los citocromos reducidos debido a su rápida oxidación.

A través de los espectros diferenciales que se obtienen de la citocromo oxidasa en su estado oxidado y reducido en presencia de cianuro, se pudo concluir que la enzima reducida con ascorbato permanecía en un estado semireducido (a^{2+} a_3^{3+}). Por consiguiente, se concluyó que la enzima no era capaz de llevar a cabo un ciclo catalítico completo en el medio micelar.

Los resultados anteriores motivaron el estudio del funcionamiento y acoplamiento de los otros complejos de la cadena respiratoria en un sistema de micelas invertidas (las características estructurales y funcionales de cada uno de los complejos respiratorios se describen en el apéndice). En lugar del sistema micelar de asolectina en tolueno fue posible trabajar con otro medio compuesto por asolectina en isooctano, el cual tiene una capacidad mayor para solubilizar agua (hasta 1.5% de H₂O, v/v).

8) Catalasa. Una enzima modelo para la aplicación del electrodo de Clark a la medición de la catalisis enzimática en sistemas de micelas invertidas.

Para determinar si las oxidasas de la cadena respiratoria estaban activas en el medio micelar, se propuso una enzima modelo para explorar la posibilidad de utilizar el electrodo de Clark en la medición del consumo de oxígeno en la solución orgánica. Se eligió a la catalasa por ser una de las enzimas más eficientes en la producción de oxígeno: su número de recambio es de 10,000 por segundo por sitio activo, lo que hace a la catalasa una de las pocas enzimas cuya velocidad de reacción se aproxima al límite impuesto por la difusión del sustrato (Bonnichsen y col., 1947).

II. OBJETIVO

El objetivo principal de este trabajo fue el estudio del acoplamiento y funcionalidad de los complejos respiratorios mitocondriales en un medio con bajo contenido de agua, para lo cual se utilizó un sistema de micelas invertidas de asolectina en isooctano.

Por otra parte, para estimar la presencia de actividad respiratoria en el medio micelar, se planteó la necesidad de validar el uso del electrodo de Clark en la medición de cinéticas enzimáticas en un sistema de micelas invertidas.

III. METODOLOGIA

1) Obtención de mitocondrias de corazón de res.

Método de Low y Vallin.

Material biológico

Un corazón de res fresco se sumergió en hielo inmediatamente después del sacrificio del animal.

Soluciones

1. 10 ml de una solución saturada de Trisma-base.
2. 4 l de amortiguador A: sacarosa 250 mM, EDTA 15 mM/Tris-NaOH pH 7.4.
3. 750 ml de amortiguador B: solución A sin EDTA.
4. 20 ml de sacarosa 250 mM.
5. Reactivos para determinar proteína por el método de biuret:
 - a) 1.5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
 - b) 6 g de tartrato de Na-K

Se agregaron lentamente 300 ml de NaOH al 10% a los reactivos anteriores agitando constantemente. Se aforó a 1 l con agua (reactivo de biuret).

- c) dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10%
- d) albúmina 100 mg/ml

Procedimiento.

Todo el proceso se llevó a cabo en un cuarto frío a 4 °C. Se limpió el corazón del tejido conectivo, grasa y coágulos de sangre. Se cortó el músculo en tiras de 2-4 cm de ancho. Se molió la carne. Se agregaron 4 l de la solución A por cada Kg de carne

molida y se ajustó el pH a 7.4 con el Tris saturado. Se necesitaron de 5-8 ml de la solución de tris por cada Kg de carne.

Posteriormente, se licuó durante 90 segundos y se ajustó el pH a 7.4 nuevamente con la solución amortiguadora. El licuado se vació en botellas para centrifuga de 500 ml y se centrifugó a 2,500 rpm (1100 x g) durante 10 minutos a 4 °C. Se utilizó el rotor JA-10 (Sorval) o GS-3 (Beckman).

El sobrenadante se decantó a través de una gaza triple colocada en un vaso de 5 l. Se desechó el precipitado. El filtrado se centrifugó a 10,000 rpm (16 000 x g) durante 10 min a 4°C. Se utilizó el rotor JA-14 (Sorval) o GSA (Beckman) para botellas de 250 ml. El precipitado que se obtuvo correspondió a las mitocondrias, las cuales se resuspendieron con una pipeta en 500 ml de amortiguador B/Kg de carne molida.

La suspensión se centrifugó nuevamente a 2,500 rpm durante 10 minutos. Se limpiaron las paredes del vaso y se recuperó el sobrenadante. Se eliminó el precipitado blanco rojizo que contenía miosina.

El sobrenadante se centrifugó a 10,000 rpm por 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante. El precipitado se compuso de dos capas: una superior correspondiente a las mitocondrias "ligeras" y una inferior con mayor adhesión al fondo de la botella, equivalente a las mitocondrias "pesadas".

La botella se agitó, se decantó y se enjuagó con unos cuantos ml de sacarosa 0.25 M. Las mitocondrias pesadas se resuspendieron en

el volumen mínimo posible de sacarosa.

Las dos preparaciones de mitocondrias se homogenizaron y se determinó su contenido de proteína por el método de biuret (ver adelante). Se utilizaron alícuotas de 10-20 μ l.

Las mitocondrias se almacenaron en volúmenes de 50 y 100 ml. Las preparaciones muy concentradas de mitocondrias se conservaron hasta por 6 meses a -70°C .

Generalmente se emplean las mitocondrias "ligeras" para la extracción de los componentes mitocondriales o para la preparación de partículas submitocondriales desacopladas.

Determinación de proteína por el método de biuret

En un tubo de ensaye de 5ml se agregaron 0.2 ml de SDS al 10% y cantidades variables de albúmina (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mg) para trazar la curva patrón. El volumen se ajustó a 1 ml con agua. Se agregaron 2 ml del reactivo de Biuret y se esperó 10 minutos antes de determinar la absorbancia de la muestra a 540 nm.

2) Preparación de las partículas submitocondriales MgATP (PSM)

El procedimiento que se siguió es el reportado por Lee y Ernster (1967), el cual consiste en el rompimiento de las mitocondrias por sonicación durante un tiempo corto (1 minuto), en un medio acuoso neutro con el sustrato de la ATPasa. Se trabajó con lotes de mitocondrias pesadas y ligeras, prefiriéndose estas últimas por su mayor contenido en citocromo b.

Material y soluciones

- sacarosa 0.5 M

- ATP-Tris 0.3 M
- acetato de magnesio 0.3 M
- NaOH 10 N
- albúmina 100 mg/ml
- reactivos para determinar proteína por el método de Biuret

Procedimiento

Todos los pasos se llevaron a cabo a 4 °C. Se descongelaron 500 mg de mitocondrias dejándolas a temperatura ambiente. Se resuspendieron las mitocondrias en un medio cuyas concentraciones finales después de ajustar el pH a 7.0 fueron: sacarosa 0.25 M, ATP-Tris 6 mM, acetato de magnesio 6 mM y albúmina 1 mg/ml, para obtener una concentración final de aproximadamente 15 mg/ml de mitocondrias.

Se sonicaron porciones de 20 ml de la suspensión de mitocondrias durante dos minutos, haciendo un reposo de 30 segundos al minuto.

El sonicado se centrifugó a 15,000 rpm (17,000 x g) por 15 minutos. El sobrenadante se centrifugó a 45,000 rpm (105 K x g) 30 minutos en un rotor 50 Ti. El precipitado que se obtuvo correspondió a las PSM. Para lavar las PSM, el precipitado se resuspendió en sacarosa 0.25 M y se centrifugó nuevamente a 45,000 rpm durante 40 minutos.

Finalmente, las PSM se resuspendieron en sacarosa para dar una concentración final de 50-60 mg/ml, y se guardaron en porciones de 200 µl a - 70 °C.

La determinación de proteína se efectuó con alícuotas de 20 µl.

3) Solubilización en el medio micelar de:

i) las PSM

2 mg de PSM en 75 μ l de sacarosa 0.25 M y Tris-HCl 10 mM, pH 7.4 se mezclaron con 1 ml de una solución de asolectina (10 mg ml⁻¹) en isooctano. La asolectina se purificó parcialmente por el método de Kagawa y Racker (1971).

Las muestras anteriores se sonicaron en tubos de 1.7 x 14.5 cm durante dos minutos en un baño sonicador (modelo G112SPIT, Laboratory supplies Co., Inc.). La emulsión que se obtuvo se sometió a un flujo de N₂ para eliminar agua en la muestra, hasta alcanzar un estado transparente (micelas invertidas). El volumen se ajustó con isooctano (Darszon y col., 1978).

ii) el citocromo c y la citocromo oxidasa

De manera independiente, 150 μ g (3.3 nmol) del citocromo c comercial (Sigma, tipo III) y 100 μ g de la citocromo oxidasa (1.25 nmol) purificada según Capaldi y Hayashi (1972), en 7 μ l de Tris 0.2 M, pH 7.4, se solubilizaron en 1 ml de asolectina en isooctano (10 mg ml⁻¹) como se describió para las PSM. En este caso no fue necesario burbujear con N₂ porque se obtuvieron muestras transparentes.

iii) los sustratos e inhibidores

De manera independiente, 5 μ l de soluciones 1M de NADH, succinato de sodio, ascorbato de sodio, TMPD, DCPIP, PMS, ferricianuro de potasio y KCN en Tris-HCl 0.5M, pH 7.4, se solubilizaron en 1 ml de asolectina al 1% en isooctano. Las muestras se sonicaron en tubos de vidrio de 1.4 X 9.5 cm durante 1 minuto. En estos casos se obtuvieron micelas invertidas sin necesidad de secar las

muestras.

Se prepararon soluciones concentradas de menadiona y menadiol 0.2M, rotenona 60 μM y antimicina 20 μM en tolueno.

Para alcanzar la reducción total de los citocromos en las preparaciones de PSM en el medio micelar, se añadieron alícuotas de 5 μl de una solución concentrada y recién preparada de ditionita.

4) Determinación del contenido de agua en el medio micelar con las PSM solubilizadas.

La cantidad de agua en las muestras de las PSM en isooctano se determinó a partir de 4 muestras (3 ensayos) preparadas en $^3\text{H}_2\text{O}$. El contenido de radioactividad en la emulsión (2.87×10^6 cpm ml^{-1}) se refirió al contenido inicial de agua en la muestra (75 μl ml^{-1}). Este valor se comparó con la radioactividad residual en las preparaciones micelares (5.6×10^5 cpm ml^{-1}) para estimar su contenido de agua (15 μl ml^{-1}) de acuerdo a (Ayala y col., 1986). La preparación micelar continuó secándose hasta formarse un gel (Scartazzini y Luisi, 1988). En estas condiciones se calculó un valor de 1.06×10^5 cpm ml^{-1} y, por consiguiente, 2.8 μl de agua ml^{-1} del gel.

5) Incorporación de los complejos respiratorios en liposomas.

Se evaporó el solvente orgánico con un flujo de N_2 de varias muestras de PSM solubilizadas en micelas invertidas. El residuo se resuspendió con 100 μl de Tris-acetato 0.1M, pH 7.4 por cada mg de proteína (Ayala y col., 1985).

6) Determinaciones espectrofotométricas. Todos los ensayos se

repetieron entre 5-10 veces. Se observó reproducibilidad en todos ellos.

i) cuantificación de los citocromos.

a) En las PSM y en los complejos respiratorios reincorporados en liposomas.

La muestra consistió de 2.0 mg de proteína de PSM o en liposomas en 1 ml de una solución de sacarosa 0.25 M, Tris-HCl 50 mM, pH 7.4. Las concentraciones del citocromo c y de la citocromo oxidasa se estimaron por reducción con ascorbato 1 mM, mientras que la reducción del citocromo b se determinó reduciendo con ditionita en polvo.

b) En las PSM solubilizadas en el medio micelar.

La reducción total de los citocromos en el medio orgánico se llevó a cabo al agregar 5 μ l de una solución concentrada y fresca de ditionita a 1 ml de las PSM (2.0 mg) solubilizadas en el medio micelar.

En todos los casos se utilizaron los pares de longitud de onda y los coeficientes de absortividad molar siguientes: citocromo aa₃, $\epsilon_{603-630} = 16.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; citocromo c, $\epsilon_{555-540} = 18.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y el citocromo b, $\epsilon_{562-575} = 28.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Rieske, 1967). A esos valores de longitud de onda no se observaron cambios apreciables en los valores de los coeficientes de absortividad molar en el medio micelar.

Las determinaciones se efectuaron en un espectrofotómetro Aminco DW-2C UV-VIS a temperatura ambiente en celdas de cuarzo con 1 cm de paso óptico.

ii) Actividad de succinato (SDH) y NADH deshidrogenasa en las preparaciones a y b.

La actividad de SDH se determinó en medio acuoso a 25 °C y a pH 7.4 de acuerdo a Hatefi y Stiggall (1978). 0.15 mg de proteína de PSM o en liposomas se disolvieron en un medio de succinato de sodio 20 mM, fosfato de potasio 50 mM (pH 7.4), PMS 0.54 mM, DCPIP 0.11 mM, KCN 0.1 mM. Las muestras se incubaron previamente con succinato 20 mM durante 5 minutos.

Se utilizó un coeficiente de extinción molar de $19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el DCPIP a 600 nm.

La actividad de la NADH deshidrogenasa se midió en las mismas condiciones pero sustituyendo el succinato de sodio y el PMS por NADH 0.15 mM (Galante y Hatefi, 1978).

En el medio micelar se agregó a 1 ml de la muestra que contenía los complejos respiratorios, 0.5 mM del acarreador de electrones correspondiente para cada ensayo, NADH 0.3 mM y succinato de sodio 1 mM, según el caso.

iii) Actividad de NADH, succinato y citocromo oxidasa en las preparaciones a y b.

Ensayos polarográficos

Las actividades de oxidasa de las PSM y de los complejos respiratorios reincorporados en liposomas se determinaron con el electrodo de Clark. En 2.5 ml de un medio de KH_2PO_4 100 mM, pH 7.4, se disolvieron succinato de sodio 40 mM y NADH 1 mM para la medición de las actividades de succinato y NADH oxidasas, respectivamente. La actividad de citocromo oxidasa se midió con

una mezcla de ascorbato de sodio 5 mM, TMPD 0.15 mM y 9 μ M de citocromo c. En todos los ensayos se utilizaron 0.25 mg de proteína de PSM y hasta 2.0 mg en el caso de los liposomas.

La actividad de oxidasa en el medio micelar se llevó a cabo también con el electrodo de Clark pero en una cámara de vidrio (ver 7). La muestra consistió de 1 mg de proteína de PSM solubilizadas en 1.8 ml del sistema de micelas invertidas. La reacción se inició con 10 μ l NADH 0.5 M y 10 μ l de soluciones acuosas de PMS (desde 0.036 a 1.71 M), para dar una concentración final de NADH 2.8 mM y de PMS de 0.2 a 9.5 mM. La autooxidación del PMS reducido en el medio micelar se determinó en un ensayo paralelo en presencia de KCN 0.5 mM.

En el ensayo de la actividad de la citocromo oxidasa en función del W_o (fig. 17), se siguió el procedimiento anterior, excepto que la muestra de las PSM se sonicó junto con el colorante PMS a una concentración de 4 mM final para el volumen del ensayo. En este caso la reacción se inició con ascorbato solubilizado en micelas invertidas para dar una concentración final de 3 mM.

Cuando se estudió el efecto de la variación de la concentración de asolectina en la actividad de la oxidasa (fig. 19), las muestras se prepararon junto con el PMS a diferentes concentraciones de asolectina (0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 2.0, 3.0 y 10 mg ml⁻¹) en el isooctano, manteniendo el valor de W_o constante (50-60). De la misma manera, el ascorbato de sodio se solubilizó en el medio micelar correspondiente para cada ensayo.

7) Calibración del electrodo de Clark en el medio micelar.

i) **Determinación de la solubilidad del oxígeno en el medio.** Se siguieron dos estrategias experimentales, una química y otra enzimática, para determinar la concentración del oxígeno en el medio micelar: la reacción de autooxidación de la ditionita y la reducción del perborato de sodio o del agua oxigenada por la catalasa.

Los ensayos para determinar la concentración del oxígeno en el medio micelar o para la determinación de la actividad catalítica se llevaron a cabo en un oxímetro Yellow Springs modelo 53, y en una cámara de vidrio de 4.0 X 1.0 cm sin componentes plásticos con una entrada lateral para el electrodo de Clark. Se utilizó una membrana de teflón estándar. Todos los ensayos se llevaron a cabo a 30° C.

a) Consumo de oxígeno durante la oxidación de cantidades conocidas de ditionita. Se preparó una solución de ditionita al 4% en condiciones anaeróbicas a través del burbujeo de un flujo de nitrógeno, pasado previamente por una trampa con una solución concentrada de ditionita.

1a) Medio acuoso. Se determinó la concentración de ditionita en agua al adicionar alícuotas sucesivas de 2 µl de la solución de ditionita a 2 ml de una solución amortiguadora de fosfato de potasio 0.1 M, pH 7.0 (Figura 12 A). La concentración de ditionita fue de 40 mM.

2a) Medio micelar. Se siguió el procedimiento anterior, excepto que fueron necesarias alícuotas de 20 µl para producir el mismo cambio en el consumo de oxígeno registrado en el medio acuoso

(Figura 12 B). En consecuencia la concentración del oxígeno en el sistema de micelas invertidas formado por 1% de asolectina en tolueno fue de 1.7 mM, considerando una concentración de 0.2 mM de O₂ para el medio acuoso.

b) Producción de oxígeno a partir de la reducción enzimática del perborato de sodio o del agua oxigenada por la catalasa. Después de calibrar el oxímetro con el medio de reacción saturado con oxígeno, se burbujeo con N₂ para desplazar el oxígeno del medio. Bajo estas condiciones se registró la estabilidad de la señal durante 15 minutos. Posteriormente, se agregó el sustrato y se registró nuevamente una señal estable en menos de 10 segundos.

1b) Medio acuoso. A 2 ml de un amortiguador de fosfato de potasio 0.1 M se agregaron 40 µl (0.38 µmol) de una solución de perborato de sodio 9.5 mM. Al agregar 17.5 µg de catalasa se registró el cambio en la concentración de oxígeno en el medio.

2b) Medio micelar. Para determinar la concentración del oxígeno en el medio micelar se siguió el mismo procedimiento que en el medio acuoso. Se adicionaron 2 µmol de NaBO₃ (emulsión) o de H₂O₂ a la cámara de vidrio con 1.7 ml de un medio de AOT (Sigma) 0.2 M en tolueno. Posteriormente se agregaron las micelas invertidas de la enzima (7 µg) y se midió el cambio registrado. La solubilización de los sustratos y de la enzima en el medio micelar se describen a continuación.

8) **Caracterización de la actividad catalítica de la catalasa en el sistema de micelas invertidas de AOT.**

i) **Solubilización del sustrato**

Se tomó una alícuota de 100 μ l de soluciones de perborato de sodio (Mallinckrodt) de concentraciones variables en un amortiguador de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.0 (amortiguador A); se sonicó durante 2 minutos junto con 900 μ l de una solución de AOT 0.2 M en tolueno. La emulsión resultante se utilizó tal cual en los ensayos. Por otra parte, a partir de una solución concentrada de H₂O₂ (30%) se agregaron alícuotas variables (1-20 μ l) directamente al medio orgánico. En la determinación de la constante de Michaelis siempre se agregó un volumen constante de cada sustrato. Con el NaBO₃ fueron 500 μ l de emulsiones de concentración variable para dar una concentración final de 5 a 45 mM; con el H₂O₂, 10 μ l y concentraciones finales de 3 a 60 mM.

ii) Solubilización de la enzima

50 μ l con un contenido de 120 a 350 μ g de catalasa de hígado de res (sigma, tipo C-30) en el amortiguador A, se mezclaron con 1 ml de AOT 0.2 M en tolueno. Se sonicó durante 2 minutos. La emulsión resultante se llevó a transparencia al burbujear un flujo de N₂ por 3-4 minutos, y se ajustó al volumen inicial con tolueno.

iii) Determinación del contenido de agua

50 μ l de la catalasa (120 μ g) en el amortiguador A se mezclaron con 5 μ l de ³H₂O. La emulsión contenía 1.37 x 10⁶ cpm/ml después de sonicar la muestra. Al obtener el medio micelar como se describió anteriormente, el contenido de agua en las muestras se estimó a partir de la comparación de la cantidad de radioactividad residual en el medio micelar con el valor inicial

de la emulsión. También se determinó el contenido de agua en el AOT (23 μl de $\text{H}_2\text{O}/\text{g}$ de tensoactivo) por la técnica de Karl Fischer (1962) y por análisis termogravimétrico (Wendlandt, 1974).

iv) Ensayo enzimático en función del pH

a) Medio acuoso. Se utilizó un amortiguador con la siguiente composición: ácido cítrico 20 mM, KH_2PO_4 30 mM, H_3BO_3 30 mM y ácido dietilbarbitúrico 26 mM; el pH se ajustó con NaOH (amortiguador B; Dawson y col., 1969). Los pH's que se estudiaron fueron: 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.5 y 12.0. En 1.7 ml del amortiguador B con perborato de sodio 30 mM a los diferentes pH's, se inició la reacción con $0.035 \mu\text{g ml}^{-1}$ de la enzima.

b) Medio micelar. En este caso se prepararon micelas invertidas con la enzima solubilizada en el amortiguador B a los pH's antes descritos. Los ensayos se llevaron a cabo con perborato de sodio 3 mM y $0.6 \mu\text{g ml}^{-1}$ de la catalasa en 1.7 ml de AOT 0.2 M. No se observó descomposición del sustrato a esos valores de pH's.

v) Inhibición de la actividad con azida de sodio

La concentración de la enzima fue la misma que se usó en el procedimiento anterior para cada uno de los ensayos.

a) Medio acuoso. En el amortiguador A con perborato de sodio 30 mM se adicionaron alícuotas variables de una solución stock de azida 3×10^{-5} M (de 0.15 a 6 μM).

b) Medio micelar. La emulsión del inhibidor se preparó al mezclar 0.1 ml de una solución de azida 3×10^{-4} M con 0.9 ml de una solución de AOT 0.2 M. Esta mezcla se sonicó por 2 min y se usó

tal cual en los ensayos. El medio de reacción consistió de la emulsión de perborato de sodio (3.4 mM) y de alícuotas variables de la emulsión del inhibidor (las concentraciones fueron las mismas que para el ensayo acuoso).

IV. RESULTADOS

1) Conservación de los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria en el medio micelar de asolectina con 1.5% (v/v) de H₂O en isooctano.

i) Cuantificación de hemo.

La integridad de los complejos respiratorios después de haberlos solubilizado en el medio micelar se evaluó antes de intentar medir cualquier actividad enzimática en el medio orgánico apolar. El criterio que se consideró fue el contenido de hemo en los citocromos así como las actividades de deshidrogenasa y oxidasa de los complejos respiratorios.

En la Tabla I se muestra el contenido total de hemo para cada hemoproteína en las diferentes preparaciones: las PSM originales, las PSM solubilizadas en el medio micelar, y los complejos enzimáticos reincorporados en liposomas. El contenido de hemo de los citocromos c y aa₃ se mantuvo prácticamente constante después de la solubilización de las PSM en el medio micelar, y de su posterior reincorporación en liposomas. Sin embargo, el citocromo b parece desnaturalizarse en una mayor proporción durante su transferencia al medio micelar ya que sólo se recuperó el 55%. Tal es el caso de la mioglobina y de los citocromos P450 y bs cuando se solubilizan en un sistema de micelas invertidas (Erjomin y Metelitz, 1983).

Los datos espectrales que se muestran en las Figuras 9, 10 y 11 indicaron por lo menos la integridad estructural de los

TABLA I. CUANTIFICACION COMPARATIVA DE LOS HEMOS DE LOS CITOCROMOS EN EL MEDIO ACUOSO Y EN EL SOLVENTE ORGANICO.^a

TIPO DE HEMO ^b	CONTENIDO DE HEMO (nmol mg ⁻¹)		
	PSM	ISOOCTANO	LIPOSOMAS
c	1.3	1.0	1.0
b	1.1	0.6	0.6
aa3	1.6	1.4	1.4

La cuantificación del hemo^a presente en los citocromos se determinó espectrofotométricamente como se describió en los métodos. Se utilizó a la ditionita como agente reductor y como referencia a la muestra oxidada.

^b Se incubaron 2.0 mg de partículas submitocondriales (PSM) en sacarosa 0.25 M, Tris-Cl 40 mM (pH 7.4), con ascorbato 10 mM y KCN 1 mM en la celda de medida (1 ml) después de registrar la línea base. Posteriormente, se agregaron algunos granos de ditionita a la muestra. El mismo procedimiento se siguió con 2.0 mg de los complejos respiratorios incorporados en liposomas. 2.0 mg de los complejos proteolípido se suspendieron en el sistema de micelas invertidas en isooctano, y en la celda de medida se incubaron con: cianuro 0.5 mM, menadiona 2 mM y 5 µl de una solución acuosa saturada de ditionita (ver la Figura 9A y 9B). Los ensayos se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Las concentraciones en el medio micelar se expresan siempre considerando el volumen total de la muestra (Martinek, 1981; Luisi, 1988).

citocromos solubilizados en el medio micelar. Resultados similares ya se habían obtenido con el citocromo c y la citocromo oxidasa puros solubilizados en un medio micelar de asolectina/tolueno con 0.3% de H₂O (Escamilla y col., 1989) y con otras proteínas de membrana (Darszon y col., 1979; Douzou, 1980; Delahodde y col., 1984) solubilizadas en diversos sistemas de micelas invertidas.

ii) Actividad de SDH y NADH deshidrogenasa y oxidasa.

Se determinó la actividad de las deshidrogenasas así como de las oxidasas después de evaporar el isooctano del medio micelar (ver métodos), y se comparó con aquellas actividades en las PSM originales (Tabla II). Las actividades de NADH deshidrogenasa, de SDH y de la citocromo oxidasa (i.e. 153, 74 y 640 nmol min⁻¹mg⁻¹, respectivamente) de los complejos respiratorios reincorporados en los liposomas apoyaron la conservación de los complejos respiratorios en el medio micelar, ya que esos valores representaron el 71%, 92% y el 100%, respectivamente, de las actividades correspondientes en las PSM.

La recuperación de la cadena respiratoria en los liposomas no se detectó, como puede observarse por la falta de las actividades NADH y succinato oxidasa (Tabla II). Se sabe que todas las actividades correspondientes a la transferencia de electrones en la cadena se pueden recuperar sólo cuando se satisfacen ciertas condiciones que permiten la interacción de las enzimas membranales. En consecuencia, es probable que el alto contenido de fosfolípidos en el ensayo no haya satisfecho las condiciones

TABLA II. ACTIVIDAD DE LAS DESHIDROGENASAS Y DE LAS OXIDASAS

ACTIVIDAD EN LAS PREPARACIONES				
	PSM	Liposomas	(b)/(a)	
	(a)	(b)		
Deshidrogenasa ^a (nmol mg ⁻¹ min ⁻¹)				
NADH	215	153	0.71	
Succinato	80	74	0.92	
Oxidasa ^b (nmol O ₂ mg ⁻¹ min ⁻¹)				
NADH	124	ND	————	
Succinato	75	ND	————	
Asc/TMPD/cit c	580	640	1,100	

Los complejos respiratorios de PSM (2.0 mg) después de solubilizarse en el medio de asolectina-isoctano como se describió en los métodos, se sometieron a un flujo de N₂ hasta obtener un residuo seco. Este residuo se hidrató con 200 µl de Tris-acetato 0.1 M, pH 7.4, y se resuspendió por agitación.

^aLas actividades de las deshidrogenasas se determinaron espectrofotométricamente con 0.1-0.2 mg de proteína de PSM o de liposomas como se describió en los métodos. El DCPIP y el par DCPIP/PMS se utilizaron como aceptores de electrones de la NADH y de la succinato deshidrogenasas, respectivamente.

^bLas actividades de las oxidasas se midieron polarográficamente con 0.25 mg de PSM y hasta con 2.0 mg de proteína en el caso de los liposomas. Se emplearon succinato de sodio 40 mM y NADH 1 mM en un amortiguador de fosfato 100 mM, pH 7.4. La actividad de la citocromo oxidasa se ensayó con una mezcla de ascorbato 5 mM (asc), TMPD 0.15 mM y 100 µg de citocromo c (cit c) en el amortiguador de fosfato.

óptimas para recuperar el transporte de electrones en los liposomas (Hatefi y col., 1962).

Una vez que se observó la integridad de los complejos respiratorios con base en la medida de sus actividades después de su incorporación en liposomas (Tabla II), se llevaron a cabo los ensayos correspondientes para medir sus actividades enzimáticas en el medio de micelas invertidas en isooctano.

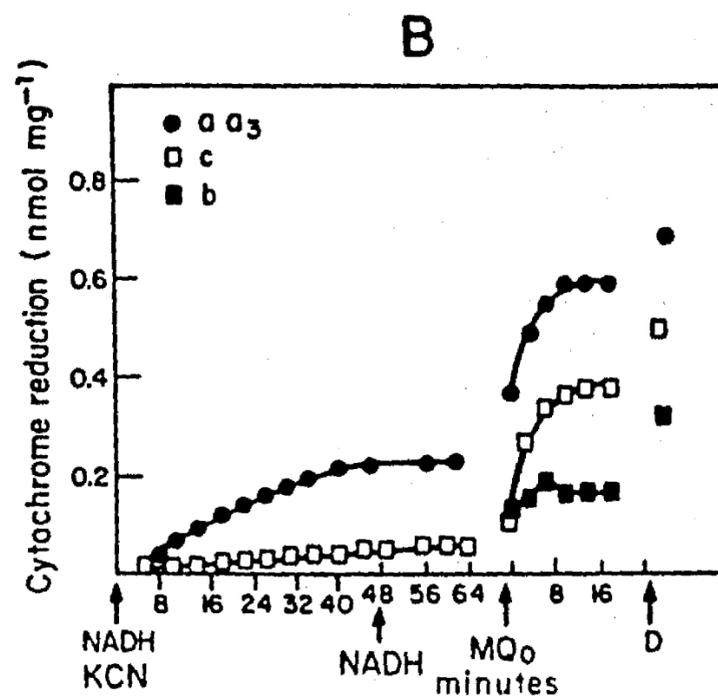
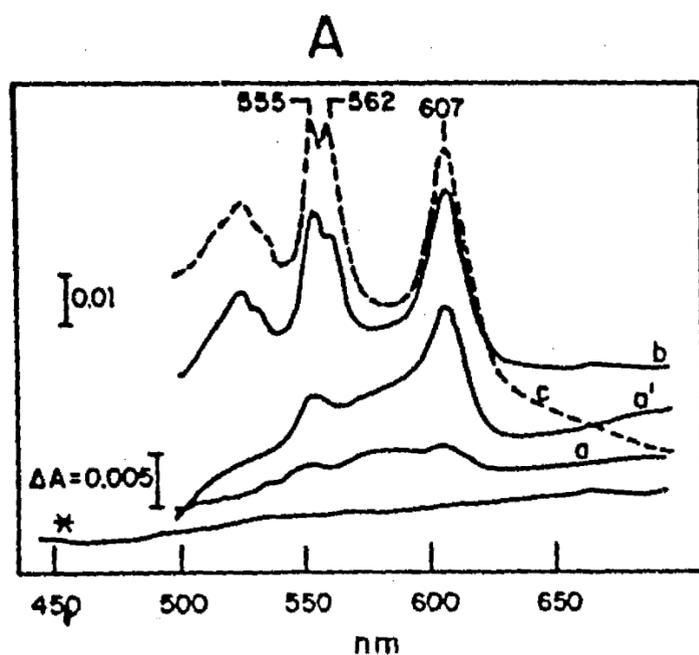
2) Transferencia de electrones en isooctano.

Todos los intentos para detectar actividad de la succinato (SDH) y NADH deshidrogenasa con aceptores de electrones comunes en agua, no tuvieron éxito (datos no mostrados). Sin embargo, aún se encontraba abierta la pregunta respecto a la funcionalidad y acoplamiento de los complejos respiratorios (i.e. actividad oxidasa) en el medio apolar.

Aunque la adición de succinato no tuvo ningún efecto, la presencia de NADH en el medio micelar provocó un nivel del estado estacionario de oxido-reducción de los citocromos muy bajo (trazo a en la Figura 9A). Sin embargo, al agregar cianuro 0.5 mM los citocromos reducidos se acumularon hasta alcanzar un máximo después de 30 minutos (trazo b de la Figura 9A y Figura 9B). Al comparar con el contenido total de los citocromos alcanzado con la ditionita (trazo c en la Figura 9A), el NADH en presencia de KCN redujo el 34% de la citocromo oxidasa y sólo el 12.5% del citocromo c (i.e. 0.23 y 0.06 nmoles mg^{-1} de proteína, respectivamente). Este transporte de electrones no fue bloqueado por la rotenona 0.2 μM .

Figura 9 (A) Reducción de los citocromos de las PSM solubilizadas en un medio de asolectina en isooctano. Las PSM (1 mg) se solubilizaron en 1 ml del sistema de micelas invertidas compuesto por 10 mg de asolectina y 1.5% de agua (ver métodos). Esta preparación se utilizó para registrar la línea base que se muestra en la figura (*). Se agregó a la celda de medida NADH 0.3 mM y se incubó por 10 min a temperatura ambiente (trazo a). Posteriormente se adicionó KCN 0.5 mM y se continuó la incubación por otros 45 min (trazo a'). A esta muestra se le agregó menadiona 2 mM y se incubó durante 20 min (trazo b). La reducción total de los citocromos en la muestra se alcanzó con la adición de 5 μ l de una solución acuosa y saturada de ditionita (línea punteada, trazo c). Siempre se expresan las concentraciones respecto al volumen total.

Figura 9 (B). Curso temporal de la reducción de los citocromos en las PSM en el medio de asolectina-isooctano. A la muestra incubada con KCN, el NADH, la menadiona (MQ₀) y la ditionita se agregaron a los tiempos señalados utilizando las concentraciones descritas anteriormente. El curso temporal de la reducción de cada uno de los citocromos se registró utilizando los pares de las longitudes de onda y los coeficientes de extinción molar reportados en la metodología.



Es de llamar la atención como el citocromo c, pero principalmente el citocromo b, difícilmente se acumularon en su estado reducido después de agregar el NADH y el KCN, lo cual sugiere que estos citocromos pueden reaccionar directamente con el oxígeno en el medio micelar. Ya se ha demostrado que el citocromo c reducido por ascorbato, tiende a autooxidarse lentamente en un medio micelar de asolectina en tolueno (Escamilla y col., 1989).

A pesar de que fue necesaria la presencia de KCN para observar la acumulación de los citocromos reducidos, este resultado apoyaba el hecho de que al menos 30% de los complejos proteolipídicos de la cadena respiratoria estaban acoplados (deducido del grado de reducción de la citocromo oxidasa) en el sistema de micelas invertidas.

Es bien conocido como la falta de ubiquinona conduce a una velocidad de oxidación lenta del NADH por la cadena respiratoria. La ubiquinona endógena (coenzima Q, CoQ₀) se solubiliza fácilmente en el isooctano (Crane y Barr, 1971). De esa manera, la conexión entre el complejo I y el complejo III debió deteriorarse debido a la dilución de la CoQ₀ en el solvente.

Se sabe que la menadiona (MQ₀) puede sustituir a la CoQ₁₀ en la cadena respiratoria mitocondrial en un medio acuoso (Sanadi y col., 1967). Por lo tanto, para intentar recuperar la actividad de NADH oxidasa de la cadena respiratoria en el medio orgánico, se escogió a ese análogo de la ubiquinona como acarreador de electrones. La cuantificación de los citocromos reducidos (Figura 9B) mostró que la adición de la menadiona a la muestra que ya

contenía NADH y KCN (Figura 9A), provocaba un notable aumento en la velocidad de reducción y en la cantidad de los citocromos reducidos, especialmente en el caso del citocromo b. Después de 6 minutos de incubación con la MQ₀ se alcanzó un máximo que correspondió a un 75-80% del contenido total de los citocromos: citocromo c, 0.37; citocromo b, 0.16 y citocromo aa₃, 0.58 nmoles mg⁻¹ de proteína (Figura 9B). Por consiguiente, la menadiona pudo sustituir a la CoQ₁₀ endógena y actuó como acarreador de electrones desde el complejo I hasta el complejo III, recuperando la actividad de NADH oxidasa en el medio orgánico.

La velocidad de reducción de cada citocromo se determinó en función de la concentración de menadiona por espectroscopia de doble longitud de onda (Figura 10A). En presencia de NADH y KCN, la velocidad de reducción máxima se alcanzó con 0.7 mM de MQ₀ respecto al volumen total del medio. Esta concentración de MQ₀ es prácticamente un orden de magnitud menor que la concentración de CoQ₁₀ y CoQ₁₀H₂ necesaria para saturar al complejo I y al complejo bc₁ (i.e. K_m= 10 mM y 3.3 mM, respectivamente; Lenaz y col., 1988) en la membrana.

El flujo de electrones del complejo III al citocromo c no se inhibió por antimicina.

La velocidad del transporte de electrones que se logró en presencia del MQ₀H₂ y de KCN fue de 0.38 nmol min⁻¹ mg⁻¹ (Figura 10B). Este valor es muy bajo comparado con la actividad de NADH oxidasa medida en las PSM en el medio acuoso (124 nmol O₂ mg⁻¹ mg⁻¹, Tabla II).

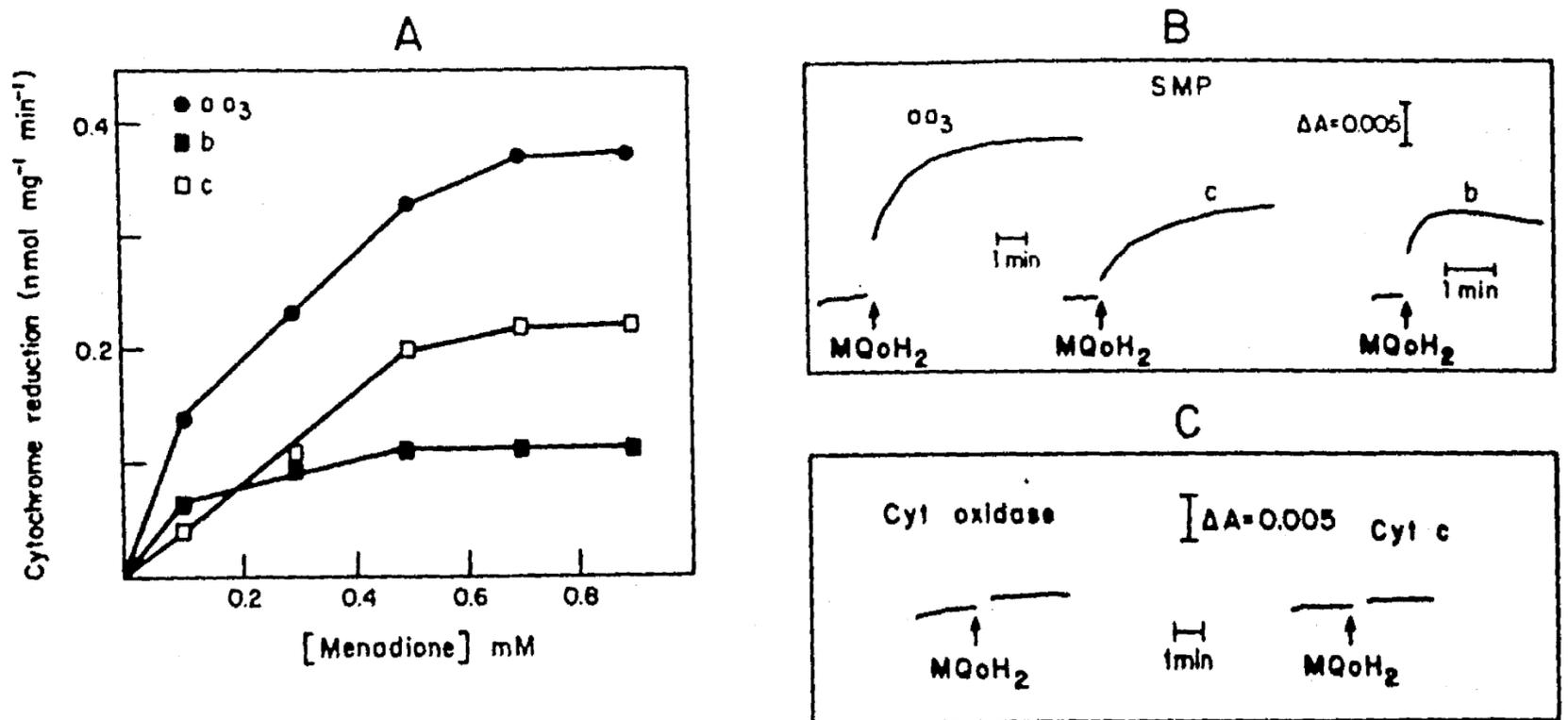


Figura 10. (A) Titulación de los citocromos con menadiona en presencia de NADH en el medio micelar. Una preparación de PSM en isooctano se preincubó durante 5 min con KCN 0.5 mM. Para cada concentración de menadiona señalada, el nivel de reducción máximo alcanzado se utilizó para calcular las concentraciones de los citocromos reducidos que se muestran en la figura. (B) Cinética de la reducción por menadiol en presencia de KCN. La cinética de la reducción de cada uno de los citocromos se midió por espectrofotometría de doble longitud de onda utilizando los pares de longitud de onda señalados en la metodología. La reducción se inició con menadiol 2 mM. (C) 1.0 nmol de las preparaciones micelares de la citocromo oxidasa y del citocromo c se preincubaron con KCN 0.5 mM. Posteriormente, se adicionó el menadiol 10 mM.

Para saber si el complejo bc_1 actuaba como mediador de la transferencia de electrones hacia el citocromo c , se ensayó la capacidad del menadiol ($MQoH_2$) para reducir al citocromo c y a la citocromo oxidasa puros en el medio micelar de asolectina en isooctano.

Como ya se mencionó al agregar el $MQoH_2$ a las PSM en asolectina-isooctano se observó una clara reducción de los tres citocromos (Figura 10B). El $MQoH_2$ no produjo este efecto con el citocromo c o con la citocromo oxidasa puros (Figura 10C), lo cual demostró que en efecto el complejo bc_1 es indispensable para la transferencia de electrones en la cadena respiratoria en el medio orgánico.

3) Oxidación de los citocromos.

Ya se había reportado anteriormente que la citocromo oxidasa reducida por ascorbato, sólo o con TMPD, permanece en su estado semireducido (i.e. a^{2+} a_3^{3+}) en un medio de micelas invertidas (Escamilla y col., 1989). Por lo anterior, se consideró interesante probar si la enzima semireducida podía oxidarse al transferir los electrones de manera "reversa" al propio TMPD oxidado. De esta manera se redujeron los citocromos de una preparación de PSM en el medio de asolectina-isooctano con una cantidad limitante de ascorbato (Figura 11Aa). Posteriormente, se procedió a titular con el TMPD a las concentraciones que se señalan en la Figura 11B. El TMPD provocó la oxidación de los citocromos reducidos: mientras el citocromo b se oxidó completamente a la concentración más baja de TMPD que se ensayó

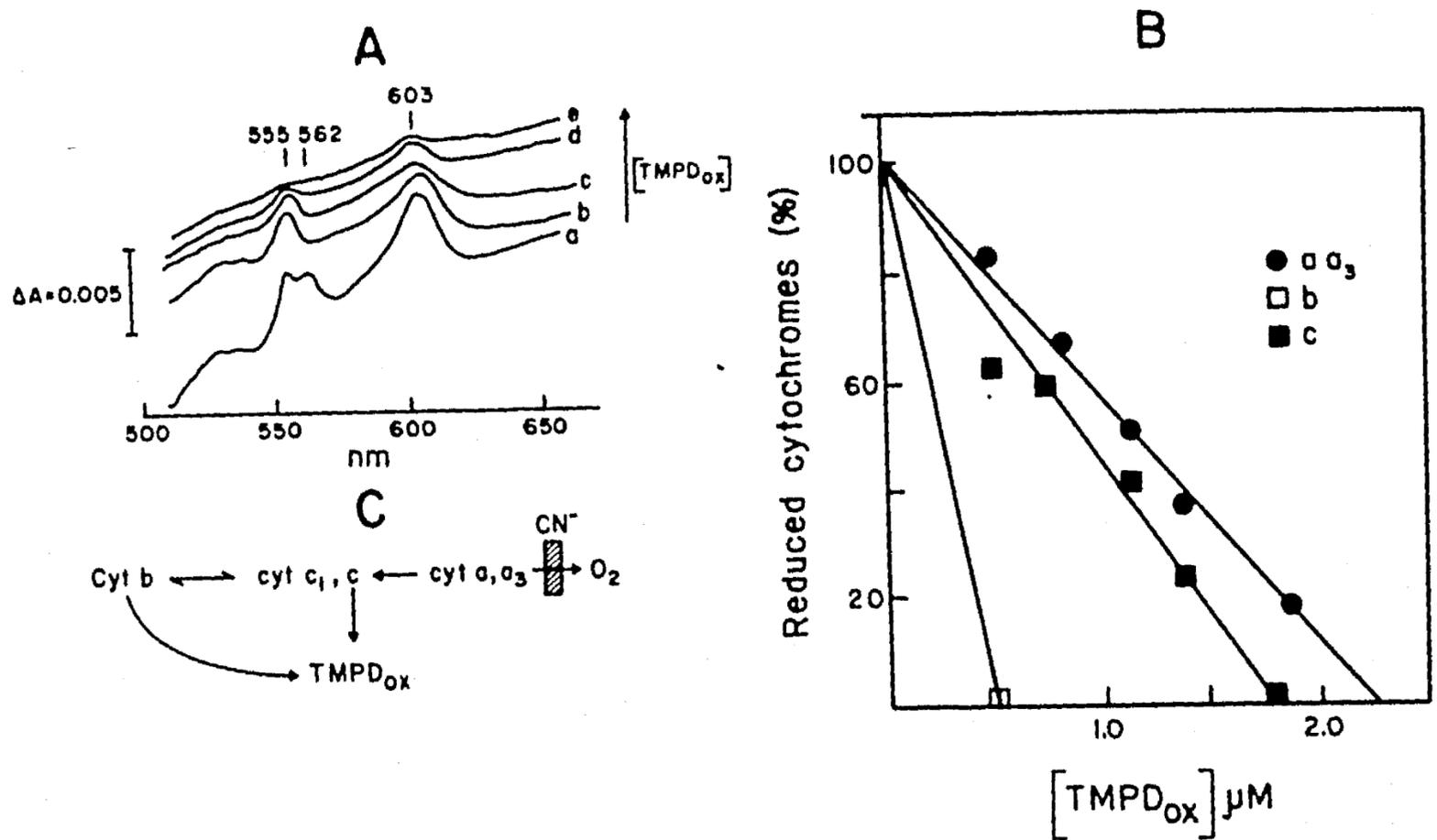


Figura 11. Transferencia de los electrones de los citocromos reducidos al TMPD en el medio de micelas invertidas. Las PSM (1 mg) en 1 ml del medio de asolectina-isooctano, se redujeron con ascorbato 0.45 mM, en presencia de KCN 0.5 mM y se incubaron hasta que se alcanzó la reducción máxima (Aa). Luego, los citocromos reducidos se titularon con TMPD (0.5, 1.1, 1.36 y 1.8 μ M; trazos b a e, respectivamente). (B) La gráfica muestra el porcentaje de cada uno de los citocromos oxidados por el TMPD a las concentraciones indicadas. (C) El esquema muestra la trayectoria propuesta para el flujo reverso de los electrones de la citocromo oxidasa al citocromo c y la transferencia directa de electrones del citocromo c y b al TMPD oxidado en el medio micelar.

(0.5 μM), los citocromos c y la citocromo oxidasa se oxidaron totalmente con 1.8 y 2.5 μM de TMPD (Figura 11A y B). El TMPD se ha utilizado como aceptor de electrones para producir un "bypass" de electrones entre el complejo bc_1 y el de la citocromo oxidasa en preparaciones de mitocondrias y de PSM inhibidas con antimicina A (Lee y col., 1967). La trayectoria del flujo de los electrones que se propuso inicialmente para la oxidación de los citocromos por el TMPD en el medio de isooctano se esquematiza en la Figura 11C, el cual se ha propuesto para las preparaciones inhibidas con antimicina. Sin embargo, posteriormente se comprobó que el TMPD puede oxidar directamente tanto a preparaciones micelares de citocromo c como de citocromo oxidasa previamente reducidas con una cantidad limitante de ascorbato (1 mM) y en presencia de TMPD (35 μM ; Figura 12 A y B). La velocidad de reducción del citocromo c fue de 2 nmol min^{-1} y la de la citocromo oxidasa de 0.5 nmol min^{-1} . Después de reducir a estos dos citocromos en esas condiciones, éstos se oxidaron con 70 μM de TMPD. La velocidad de la oxidación fue de 1.5 y 0.27 nmol min^{-1} para el citocromo c y la citocromo oxidasa, respectivamente.

————— o —————

4) Ensayos polarográficos.

i) Determinación de la concentración de O_2 en el medio de micelas invertidas de AOT 0.2 M en tolueno.

Como ya se mencionó en la metodología, se utilizaron dos

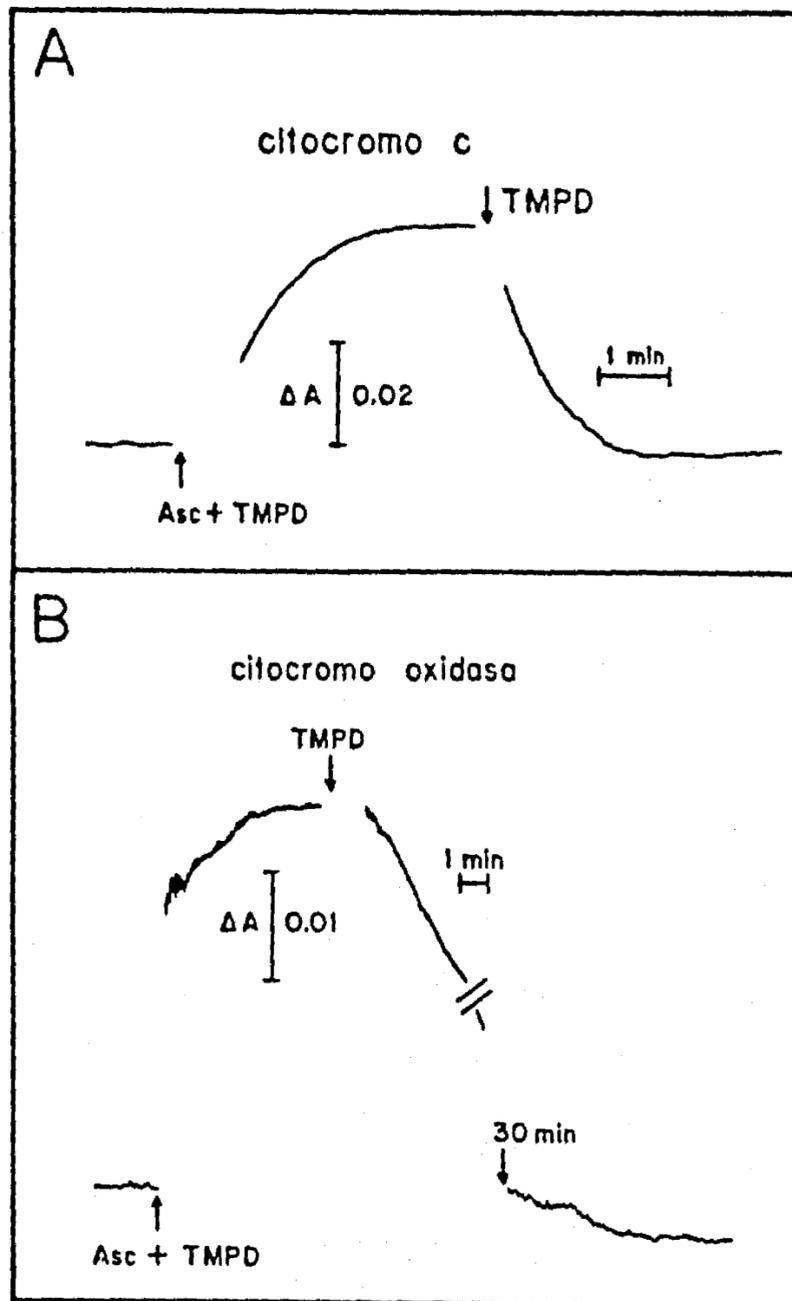
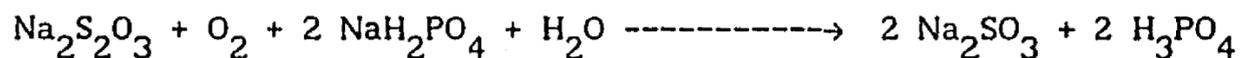


Figura 12. Cinética de la reducción y oxidación de los citocromos c y oxidasa en el medio micelar de asolectina-isooctano con 1.5% de agua. De manera independiente, $275 \mu\text{g ml}^{-1}$ ($25 \mu\text{l}$) de citocromo c y 1.25 mg ml^{-1} ($25 \mu\text{l}$) de citocromo oxidasa se solubilizaron en el medio micelar (ver métodos). Las muestras se redujeron con una mezcla de ascorbato (0.1 mM)/TMPD ($18 \mu\text{M}$). La oxidación de los citocromos se llevó a cabo con $75 \mu\text{M}$ de TMPD. Las determinaciones se llevaron a cabo en longitud de onda dual como se describe en métodos.

estrategias experimentales para determinar la solubilidad del oxígeno en el medio micelar.

a) Método químico. El medio acuoso sirvió como control para la determinación de la solubilidad del oxígeno en el medio micelar, con base en el cambio registrado en el consumo del oxígeno por la oxidación de la ditionita en ambos medios (Figura 13A). La reacción química que se llevó a cabo fue la siguiente:



Se consideró que la solubilidad del oxígeno en la solución amortiguadora de fosfatos era de 0.2 mM de O_2 a 30° C (Goldstein, 1968).

La solubilidad del O_2 que se estimó en el medio micelar fue de 7 veces mayor que la del medio acuoso, es decir, de 1.4 mM.

b) Método enzimático.

En este ensayo se determinó la producción enzimática de oxígeno por la catalasa a partir de cantidades conocidas de NaBO_3 o de H_2O_2 tanto en el medio acuoso (control) como en el medio de AOT en tolueno. Se logró hacer el medio anaeróbico a través del burbujeo de un flujo de N_2 en el medio. El ensayo también pudo realizarse sin necesidad de desplazar al O_2 del medio atenuando la señal en el oxímetro (5 veces), por el cambio de la sensibilidad del selector de la posición de "aire" a la de "oxígeno".

Las reacciones enzimáticas fueron las siguientes:

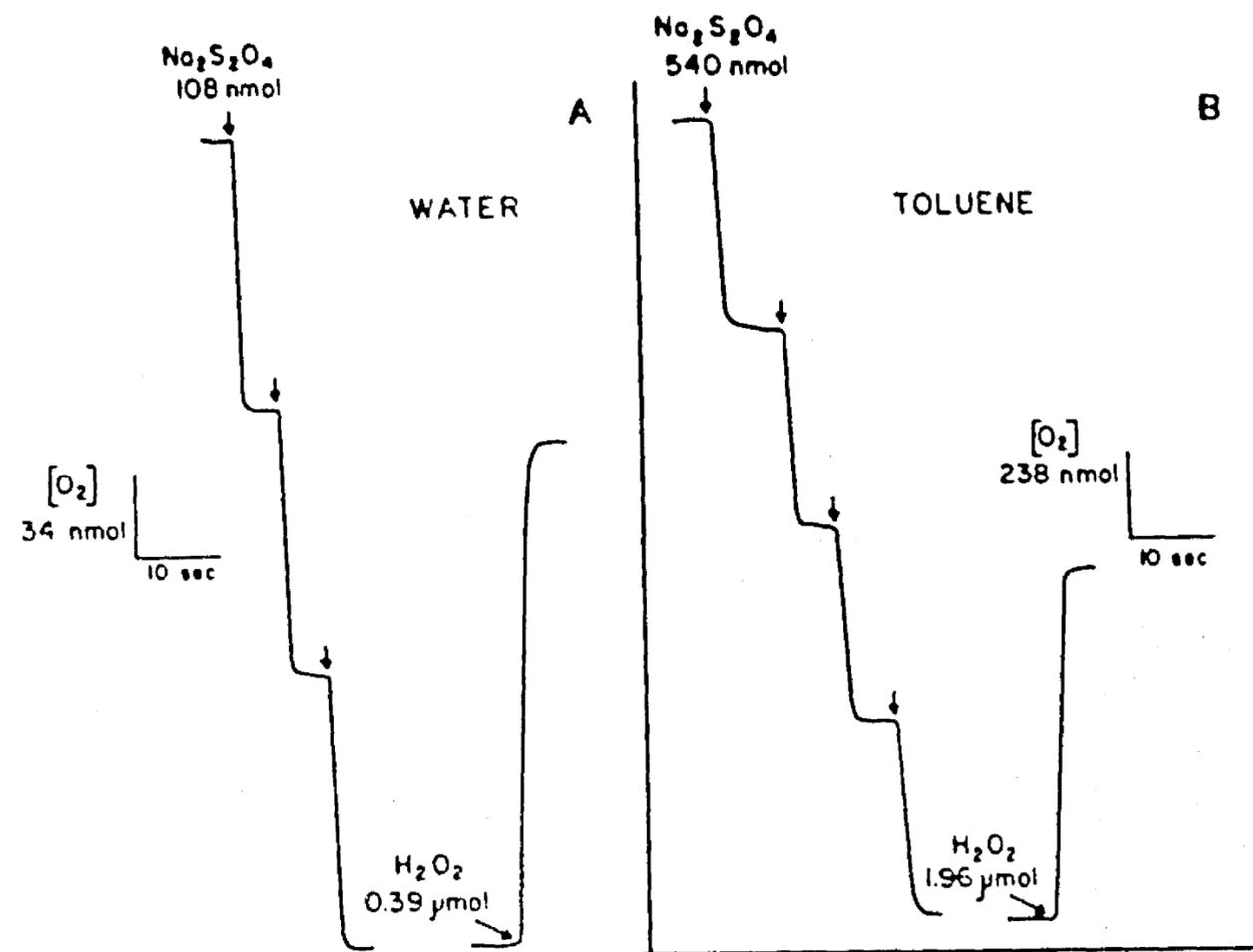
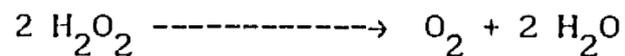
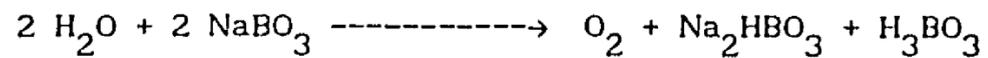


Figura 13. (A) Determinación polarográfica de la concentración de O_2 en el amortiguador de fosfato de potasio 0.1 M, pH 7.0 y (B) en el medio micelar de AOT 0.2 M con 1.7% de H_2O ($W_o = 8.0$) en tolueno. Los cambios producidos por la adición sucesiva de ditionita en el medio micelar, se correlacionaron con los resultados obtenidos en el ensayo acuoso. De la misma manera, se comparó con el ensayo acuoso, el cambio producido por la producción de oxígeno en la reducción de cantidades conocidas de H_2O_2 por la catalasa en isooctano. En el medio acuoso y orgánico se utilizó 17.5 μg y 7.0 μg de la catalasa, respectivamente. Los ensayos se llevaron a cabo a 30 $^{\circ}C$.



Por la reacción enzimática de la catalasa con NaBO_3 o con H_2O_2 (Figura 13B), se pudo estimar un valor para la solubilidad del oxígeno de $1.4 \mu\text{mol de O}_2 \text{ ml}^{-1}$ en el medio micelar. Este valor fue el mismo que se obtuvo con el método químico.

La cinética de la catalasa ha sido ampliamente caracterizada en medios acuosos utilizando el electrodo de Clark (Goldstein, 1968). Por ello se procedió a determinar los parámetros cinéticos de la catalasa en el medio micelar de AOT, para compararlos con los obtenidos en el medio acuoso. En este estudio se realizaron ensayos con la enzima para determinar la constante de afinidad, la velocidad máxima, el efecto del pH así como del cociente molar agua/tensoactivo (W_o) sobre la catálisis, y su sensibilidad a un inhibidor (azida).

ii) Parámetros cinéticos de la catalasa.

a) Determinación de la K_M

A un valor del W_o de 7-8 (con el NaBO_3 como sustrato el W_o final fue de 9), se obtuvo una hipérbola al graficar las velocidades iniciales en función de la concentración del H_2O_2 o del NaBO_3 (Figura 14). Se obtuvo una K_{mov} (respecto al volumen total) de 17 y 15 mM para el H_2O_2 y el NaBO_3 , respectivamente (Tabla III). Estos valores fueron casi tres veces menores que los K_M 's calculados para los sustratos en el medio acuoso (Tabla III). Estos resultados sugieren que se favorecen las interacciones

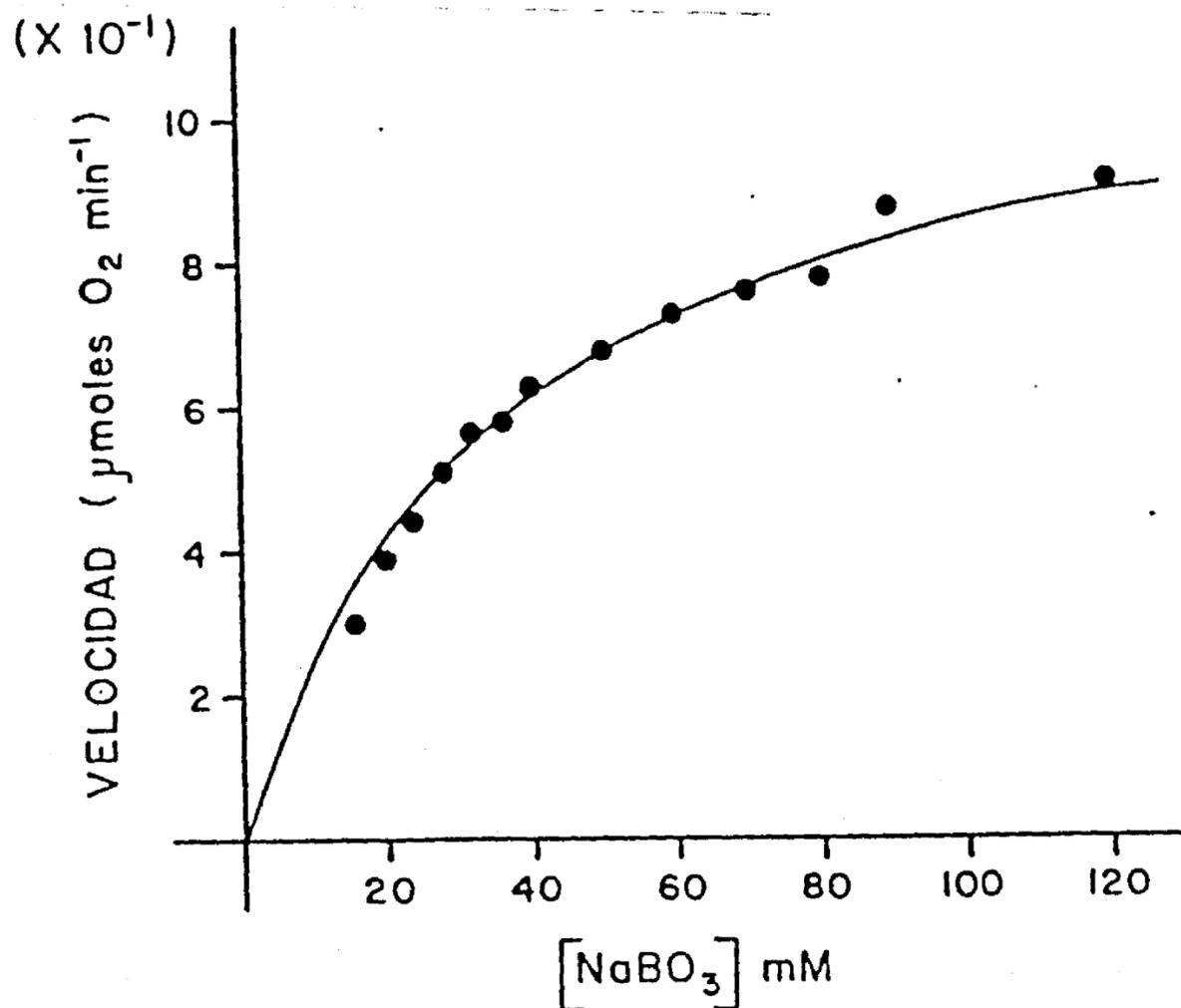


Figura 14. Curva de saturación de la actividad de la catalasa en el medio micelar de AOT 0.2 M en tolueno. Se adicionaron alícuotas variables de NaBO₃ 40 mM al medio. La reacción se inició con la catalasa en micelas invertidas para dar una concentración final de 7.4 nM.

TABLA III. COMPARACION DE LAS CONSTANTES CATALITICAS DE LA CATALASA EN EL MEDIO ACUOSO Y EL MEDIO ORGANICO.

MEDIO	K _m (mM)		K _p (x 10 ⁶ min ⁻¹)	
	NaBO ₃	H ₂ O ₂	NaBO ₃	H ₂ O ₂
fosfato de K ⁺ , 100 mM pH 7.0	45	54	5.4	7.3
AOT 0.2 M/tolueno, pH 7.0, W _o = 7-8	15	17	4.5	5.2
AOT 0.2 M/tolueno,	—	—	5.1	7.0

K_p, constante catalítica; W_o, cociente molar agua/tensoactivo.

entre el sustrato y la enzima en las micelas invertidas.

b) Determinación de la K_p

La K_p se define como el número de moles de sustrato transformados por minuto por mol de subunidad activa o centro catalítico bajo condiciones óptimas. La catalasa esta formada por 4 subunidades, cada una con un centro catalítico.

A un W_o de 10-12, la K_p para el H_2O_2 y el $NaBO_3$ alcanzó un valor que fue el 30-40% mayor que el obtenido a un W_o de 7-8 (Tabla III). Suponiendo que todas las moléculas de catalasa permanecen activas después de su transferencia al solvente orgánico, puede concluirse que las propiedades catalíticas de la catalasa en las micelas invertidas de AOT en tolueno son las mismas que las que la enzima presenta en la solución amortiguadora. Este comportamiento ha sido observado con otras enzimas solubilizadas en los sistemas de micelas invertidas (Luisi y Magid, 1986; Luisi y Steinman-Hofmann, 1987).

c) Actividad de la catalasa en función del pH.

Las reacciones enzimáticas en soluciones acuosas son muy dependientes del valor de pH del medio. Todas las enzimas poseen un valor de pH óptimo para el cual su actividad es máxima.

En la Figura 15A se comparan los perfiles de la actividad de la catalasa en función del pH. La actividad máxima se registró a pH 7.0 y 8.0 en el medio acuoso y el medio micelar, respectivamente. El desplazamiento alcalino del pH en el tolueno podría explicarse por la presencia del agente tensoactivo AOT de tipo aniónico, cuyo efecto es el de perturbar al pH localmente (Klyachko y col.,

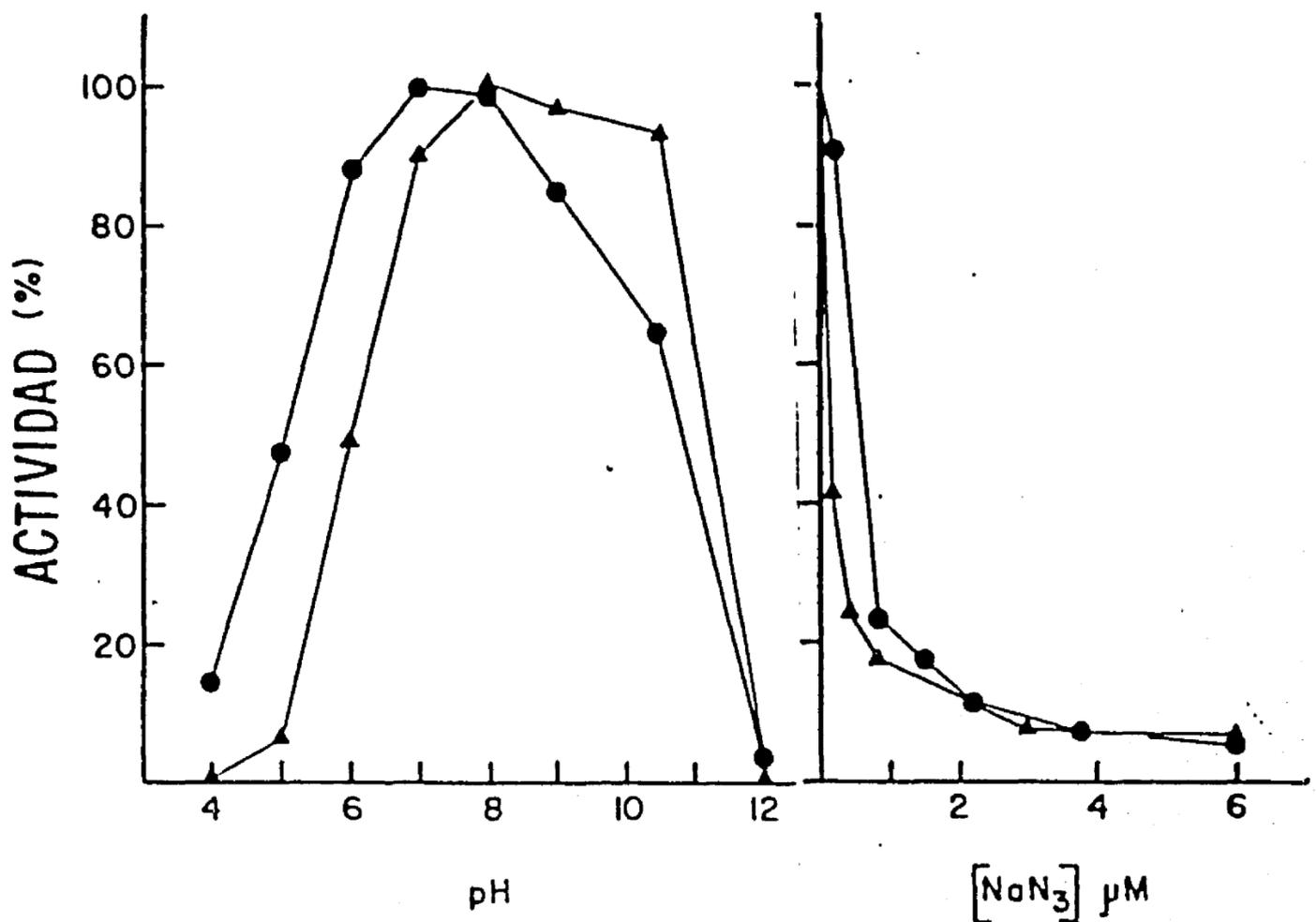


Figura 15. (A) Catálisis relativa de la catalasa a varios pH's en el medio acuoso (o) y en el medio de AOT-tolueno (O). Los ensayos en el medio acuoso se llevaron a cabo con un amortiguador que cubrió ese rango de pH (ver metodología). En el sistema micelar la enzima se solubilizó a esos valores de pH con el mismo amortiguador. La concentración de la catalasa en el medio acuoso fue de 0.147 nM con una actividad específica a pH 7.0 de $1.5 \mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1}$, mientras que en el medio orgánico fueron 2.5 nM de la enzima con una actividad (pH 8.0) de $23.5 \mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1}$. Los ensayos en tolueno se realizaron a W_o de 8.0. (B) Comparación de la inhibición de la catalasa por azida en el medio acuoso (o) y en el medio micelar (O). Se prepararon micelas invertidas de la enzima a pH 7.0. La enzima se incubó con alícuotas variables de una solución concentrada de azida y la reacción se inició con el sustrato (NaBO_3) en los dos medios como se describió en la metodología.

1984). Un desplazamiento de la actividad máxima hacia pH's alcalinos se ha descrito con otras enzimas en sistemas de micelas invertidas (Barbaric y Luisi, 1981; Menger y Yamada, 1979; Sánchez-Ferrer y col., 1988).

d) Sensibilidad de la catalasa a la azida de sodio.

La catalasa es una enzima muy sensible al KCN y al NaN_3 (Deisseroth y Dounce, 1970). Por lo que era importante probar si cualquiera de estos inhibidores afectaba la actividad de la catalasa en el medio orgánico. Las curvas de titulación con azida de la actividad de la catalasa fueron muy parecidas en los dos medios (Figura 15B): el 80% de la inhibición se obtuvo con $0.75 \mu\text{M}$ de azida. Por lo tanto, la enzima solubilizada en el medio micelar preserva su gran sensibilidad a la azida.

e) Efecto del W_o .

La actividad enzimática depende del valor del W_o en un medio de micelas invertidas (Luisi y Magid, 1986; Luisi-Steinman-Hofmann, 1987). A su vez, el perfil de la actividad enzimática varía de acuerdo a la naturaleza de la enzima, como ya se describió en la introducción (Bru y col., 1989). La actividad de la catalasa aumentó con el valor de W_o del medio micelar hasta alcanzar un máximo a partir de un W_o de 10 (Figura 16).

————— o —————

5) Determinación de la actividad de la citocromo oxidasa en isoctano.

La citocromo oxidasa se reoxidó cuando la cadena respiratoria se

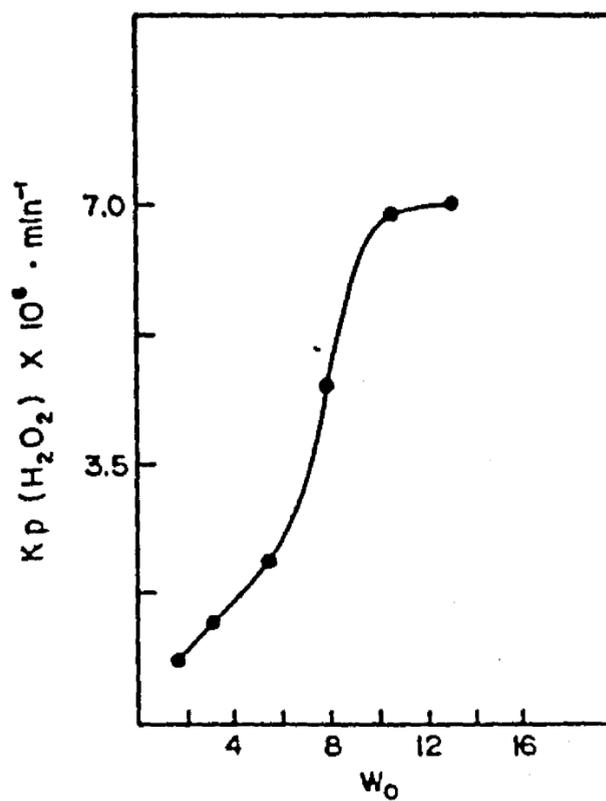


Figura 16. Efecto del W_0 sobre la actividad catalítica de la catalasa. Se solubilizó a la enzima en el medio micelar a los diferentes valores de W_0 como se describió en la metodología. Se tomó en cuenta el contenido de agua en el AOT (2.3% de H_2O , p/v). Se agregaron 10 μl de H_2O_2 de una solución concentrada (30%) a 1.7 ml del medio micelar preparado a los valores de W_0 señalados. La reacción se inició con 5 μl (2.5×10^{-4} nmol) de micelas invertidas con la enzima.

redujo con el NADH (trazo a en la Figura 9A) o con el menadiol (no se muestra) en ausencia de KCN. Sin embargo, la actividad de NADH o menadiol oxidasa nunca provocó un consumo de oxígeno medible al utilizar el electrodo de Clark en el medio orgánico.

En una serie de intentos por inducir de manera más eficiente la catálisis de alguno de los complejos respiratorios en el medio orgánico apolar, se encontró que la fenazina metosulfato (PMS) reducida por el NADH o por el ascorbato lograba este objetivo con la citocromo oxidasa.

En la Figura 17A se muestra un ejemplo del registro de las mediciones polarográficas con los complejos proteolipídicos en el medio micelar en isooctano, después de agregar el NADH 3.0 mM y el PMS 4.0 mM. Se llevó a cabo un ensayo de manera simultánea pero en presencia de KCN 0.5 mM para medir la autooxidación del PMS (Figura 17B).

La solubilidad del oxígeno en el medio micelar de asolectina-isooctano fue de 2 μM (se determinó de acuerdo al método descrito previamente en 4i).

La curva de titulación con PMS de la actividad específica de la citocromo oxidasa mostró un máximo de la actividad (0.52 μmol de O_2 min^{-1}) alrededor de PMS 4 mM, al tomar en cuenta la autooxidación del PMS en la solución micelar (Figura 18A). A concentraciones mayores de PMS se observó un efecto inhibitor de la actividad enzimática.

La concentración de PMS para registrar la actividad de la citocromo oxidasa fue muy alta comparada con la concentración μM

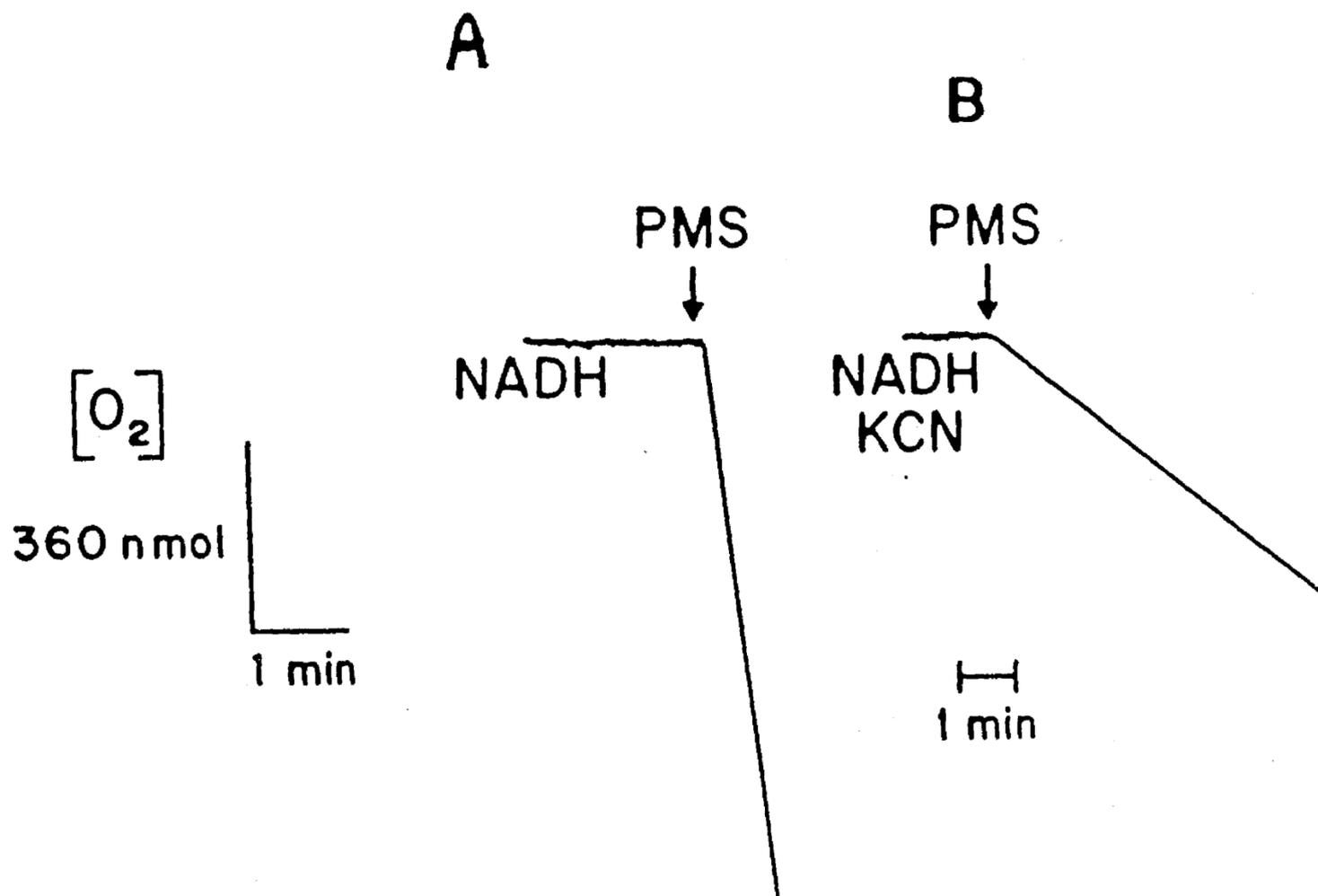


Figura 17. Registros polarográficos en isooctano. 1mg de las PSM solubilizadas en el medio micelar de asolectina en isooctano se incubaron en 1.8 ml del medio micelar en la cámara de vidrio descrita en métodos. (A) Se agregaron 10 μ mol (5.6 mM) de NADH a la muestra y se registró una lectura estable. La reducción de la citocromo oxidasa se inició al agregar 7.5 μ mol (4.0 mM) de PMS a la preparación. La oxidación de la citocromo oxidasa ocurrió inmediatamente después de la adición del PMS al sistema micelar como se observa en la figura. (B) Autooxidación del PMS. El mismo ensayo se llevó a cabo simultáneamente en otra cámara, pero en presencia de 1 μ mol (0.5 mM) de KCN. De esa manera se determinó la autooxidación del PMS en el medio micelar.

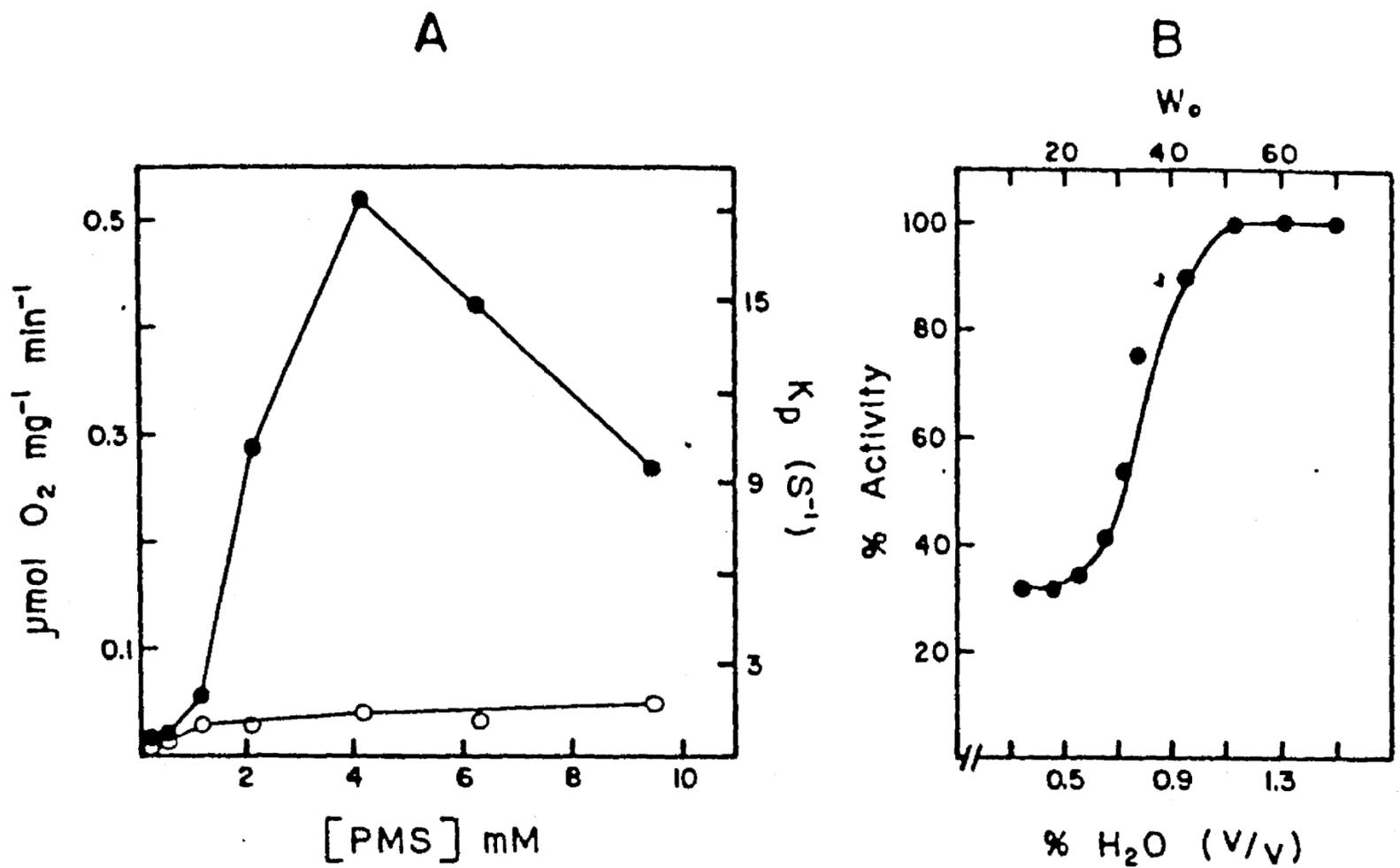


Figura 18. (A) Actividad enzimática del complejo de la citocromo oxidasa en el sistema de micelas invertidas asolectina-isooctano con 1.5% de agua (v/v). La reducción del oxígeno por el complejo enzimático (●) varía con la concentración del agente reductor fenazina metosulfato (PMS). Autooxidación del PMS en el medio (○). Las PSM solubilizadas en el medio micelar se incubaron con NADH 0.3 mM a 30 °C. La reacción se inició al agregar el PMS. (B) Curva de titulación con agua de la actividad de la citocromo oxidasa en el medio de isooctano. Las muestras de PSM en el medio micelar con PMS 4 mM se prepararon a las concentraciones de agua que se indican en la figura. La actividad oxidasa se inició al agregar 3 μmol de ascorbato en micelas invertidas (ver métodos). El 100 % de la actividad corresponde a una actividad específica de 0.52 μmol de $\text{O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

que se utiliza en ensayos de reducción de la enzima en medios acuosos (Bisschop y col., 1979; Halaka y col., 1981). El PMS reducido es muy soluble en solventes orgánicos apolares (Zaugg, 1964); por consiguiente, la mayor parte del PMS reducido debió encontrarse disuelto en el medio micelar y sólo una fracción del mismo se debió particionar en el interior acuoso de las micelas invertidas con la enzima.

Respecto al efecto inhibitor del PMS sobre la actividad oxidasa en el isooctano, también se ha observado la misma tendencia en el ensayo acuoso de la carboxilasa y de la SDH (Dickens y McIlwain, 1938).

Al comparar los números de recambio de la citocromo oxidasa (Tabla IV) en las PSM (20 s^{-1}), en las PSM solubilizadas en la solución micelar (18.5 s^{-1}) y con la enzima incorporada en liposomas (47.5 s^{-1}), se puede concluir que la eficiencia catalítica de la citocromo oxidasa se preservó en el medio micelar. Este hecho sugería que con sólo 1.5 % de agua en el medio de reacción apolar era posible mimetizar el ambiente que esta enzima de membrana tiene en una bicapa. Sin embargo, se planteó la necesidad de estudiar el perfil de la actividad de la citocromo oxidasa en función del contenido de agua del sistema. En la Figura 18B se muestran los resultados de este experimento. Puede observarse que la actividad enzimática varía sensiblemente con la cantidad de agua en el medio micelar, i.e. de 0.3 a 1.1% de H_2O o bien de un W_o de 10 a 50.

Recientemente, Bona y colaboradores (1990) reportaron la

TABLA IV. Comparación del número de recambio (K_p) de la citocromo oxidasa en los medios acuoso y orgánico.

	K_p (s^{-1})
PSM	20
Asolectina-isooctano	18.3
Liposomas	48

solubilización de la citocromo oxidasa en un medio de asolectina en hexano a dos valores diferentes de W_o : 1.8 y 8.0. El complejo de la enzima oxidada con CN se pudo reducir con el 2,3,5,6 tetrametil p. fenilendiamina (DAD). Cuando redujeron a la enzima a un W_o de 1.8 (equivalente a 0.06% de H_2O) sólo observaron la reducción del hemo a. Por el contrario, al elevar el W_o del sistema a 8.0 (0.24% de H_2O), la reducción de los dos hemos de la oxidasa por el DAD se llevó a cabo, además de manifestarse también la oxidación de la enzima con el tiempo. Estos resultados los obtuvieron de los espectros de la enzima. Por otra parte, sólo pudieron registrar el consumo de oxígeno por la citocromo oxidasa en el medio micelar con el W_o de 8.0, y esta respiración fue sensible a KCN. Sin embargo, no determinaron el valor de la actividad enzimática porque no estimaron la concentración del oxígeno en el medio micelar. No obstante, suponen que esta actividad fue similar a la que observaron en un medio acuoso (no la reportaron).

A partir de sus datos polarográficos se calculó el número de recambio, considerando que la solubilidad del oxígeno en el medio micelar en decano es de 2.76 mM (determinada en el laboratorio). El valor que se estimó fue de 0.5 s^{-1} . Este resultado puede atribuirse a la cantidad limitada de agua del ensayo (0.24%), lo cual estaría de acuerdo con el perfil de actividad de la citocromo oxidasa en función del % de H_2O que se obtuvo en nuestro sistema micelar (Figura 18B).

El perfil de inhibición con cianuro de la actividad de la

el perfil que se observa en un medio acuoso: la K_{150} en el medio micelar fue de $1.9 \mu\text{M}$ mientras se ha reportado una K_{150} de $4 \mu\text{M}$ para el ensayo acuoso (Yonetani & Ray, 1965; ver Figura 19).

Finalmente, se determinó la actividad de la enzima en función de la concentración de fosfolípidos en el sistema micelar, manteniéndolo el valor de W_0 constante (60-70). La Figura 20 muestra una campana para la actividad de la citocromo oxidasa en función de la concentración de asolectina. El máximo de la actividad se obtuvo con 0.7 mg ml^{-1} de tensoactivo A esa concentración de asolectina la actividad enzimática ($0.96 \mu\text{moles de O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína), a una concentración de PMS de 1.23 mM , se incrementó 10 veces respecto a la obtenida con la concentración de asolectina (10 mg ml^{-1}) utilizada en todos los experimentos anteriores. Este resultado sugiere que la actividad de la citocromo oxidasa es muy sensible a la concentración micelar y, por consiguiente, a la fracción de volumen de la fase micelar θ .

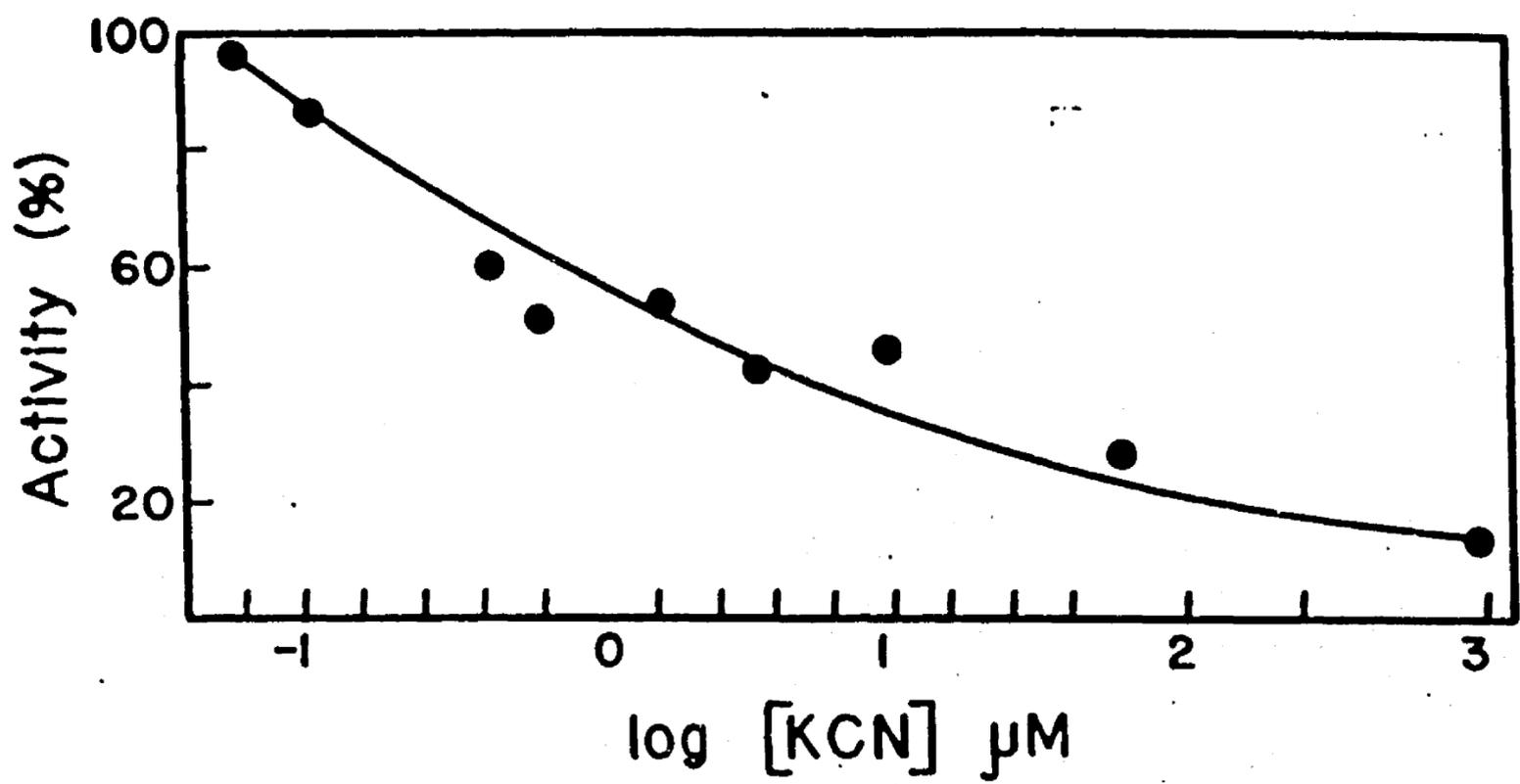


Figura 19. Inhibición de la actividad oxidasa con cianuro. Titulación de la inhibición con KCN de la actividad de la citocromo oxidasa dependiente de NADH/PMS a PMS 4mM en el sistema de micelas invertidas.

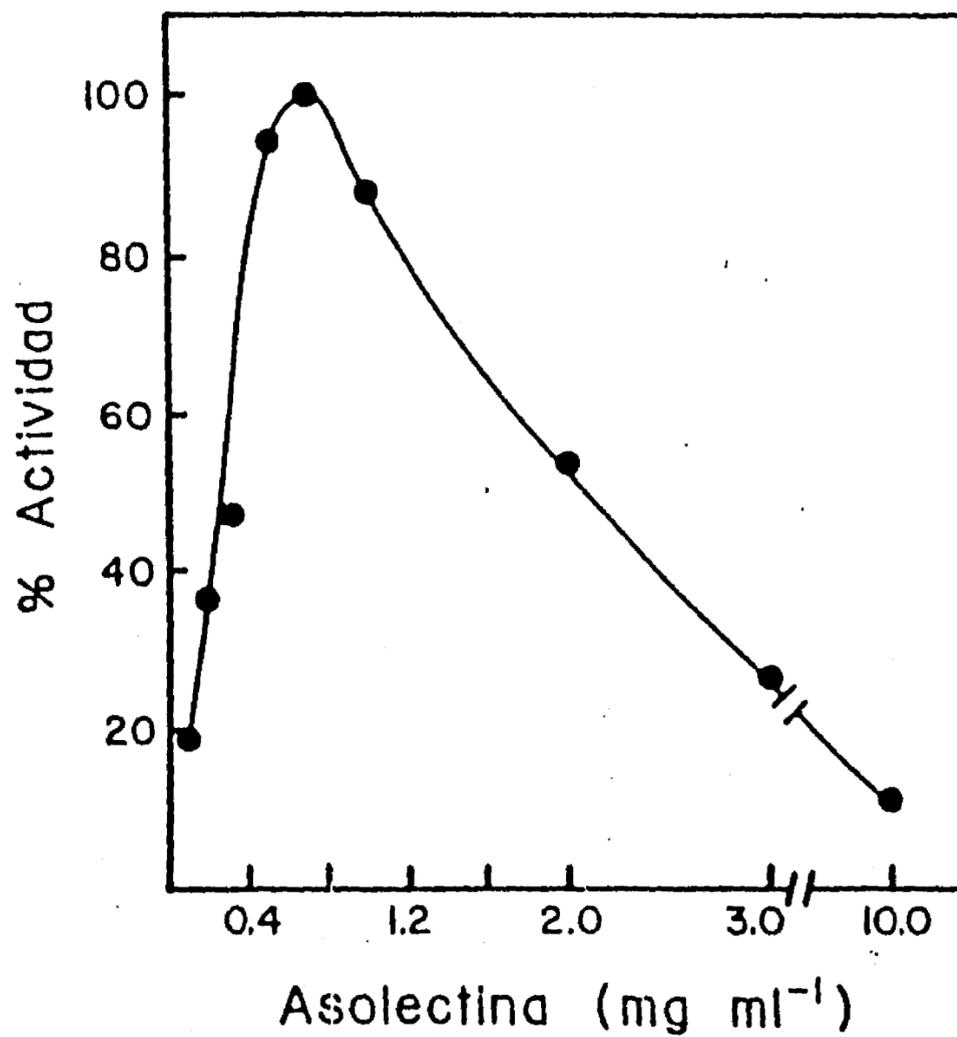


Figura 20. Efecto de la concentración de asolectina sobre la actividad de la citocromo oxidasa a $W_o = 50-60$. 1 mg de PSM junto con 2 μ l de PMS 1.0 M en Tris-Cl 1 M, pH 7.4, se solubilizaron en 1.7 ml del medio micelar como se describe en métodos. La reacción se inició al adicionar el ascorbato (3.8 mM final) solubilizado en micelas invertidas a la concentración de asolectina respectiva. El 100 % de actividad correspondió a una actividad específica de $0.96 \mu\text{mol de O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

V. DISCUSION

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

A partir de las actividades enzimáticas de los complejos respiratorios incorporados en liposomas (Tabla II) así como, de los espectros de los citocromos b, c y aa₃ reducidos en el medio micelar de asolectina en isooctano como en liposomas, se comprobó la preservación de los complejos respiratorios en el medio micelar. Estos resultados están de acuerdo con Ayala y colaboradores (1985), quienes después de extraer de un medio acuoso con PSM con un sistema de micelas invertidas recuperaron en diferente proporción y actividad específica (dependiendo de la cantidad de proteína, de fosfolípidos y de cationes) las enzimas ATPasa, succinato deshidrogenasa y citocromo oxidasa. A diferencia de la metodología reportada por los autores, en nuestro caso no efectúamos la extracción de las enzimas de un medio acuoso sino la suspensión de los complejos respiratorios directamente en el medio micelar (ver métodos).

Una de las contribuciones fundamentales de este trabajo es la detección del acoplamiento de los complejos respiratorios en un medio con un contenido bajo de agua (1.5%, v/v). Lo anterior está apoyado por los resultados obtenidos en el sistema de micelas invertidas en isooctano como son:

- (i) la actividad de la cadena respiratoria promovida por el NADH (Figura 9 Aa y a' y 9 B),
- (ii) el aumento en la velocidad de la transferencia de electrones por la cadena respiratoria al adicionar un análogo de la ubiquinona, es decir la menadiona (MQo; Figura 9 Ab y 9 B), y

(iii) la oxidación específica del menadiol por el complejo III (Figura 10 C).

La velocidad de la transferencia de electrones por la cadena respiratoria (i.e. 0.38 nmol de hemo reducido $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ por NADH, Figura 10 B) fue prácticamente de tres ordenes de magnitud menor a la observada en las PSM (actividad de NADH oxidasa de 124 nmol $\text{O}_2 \text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$, Tabla II). Estos resultados sugieren una débil interacción entre los complejos respiratorios en un ambiente de micelas invertidas.

Este es el primer estudio del acoplamiento entre enzimas de membrana, sin embargo es interesante comparar nuestros resultados con los obtenidos con el sistema multienzimático compuesto por tres enzimas solubles: la hidrogenasa (H_2 asa) de *D. vulgaris*, la lipoamida deshidrogenasa (LipDH) de corazón de puerco y la 20 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSDH) de *Streptomyces hydrogenans* (Hilhorst y col., 1983; Fig. 8). Los autores determinaron los números de recambio hasta después de 18 hr de reacción y fueron: 5, 1.3, 1.1 y 0.01×10^4 para la H_2 asa, la LipDH, la HSDH y el NAD^+ , respectivamente. Aunque estos datos son confusos ya que no se determinaron a partir de las velocidades iniciales, los autores señalan que este sistema multienzimático es eficiente en el sistema de micelas invertidas y, por consiguiente, el intercambio efectivo entre las enzimas, reactivos y productos. Por otra parte, las actividades enzimáticas del sistema descrito anteriormente, a una concentración constante de la enzima y del sustrato, varían

con la concentración del agua y cotensoactivo y de la naturaleza del solvente orgánico apolar (Van Berkel-Arts y col., 1986).

Actualmente sabemos que es posible obtener un acoplamiento más eficiente entre los complejos respiratorios de *Bacillus cereus* (Sánchez y Escamilla, 1991), en un sistema micelar de asolectina-isooctano. Los resultados son muy atractivos ya que el acoplamiento de esa cadena respiratoria en el sistema micelar, es decir la actividad de NADH oxidasa, es cercano al observado en un medio acuoso. En consecuencia ¿ de qué variables depende el acoplamiento entre las enzimas solubilizadas en micelas invertidas ?. A continuación se proponen algunos parámetros que pueden influir en este acoplamiento.

(i) Se ha reportado que el diámetro que puede alcanzar una micela invertida de lecitina en H_2O/CCl_4 /benceno a un W_o de 2.3 es de hasta 1000 Å (Fendler, 1982; Kumar y col., 1984); sin embargo, para un sistema de AOT/isooctano con un W_o de 50 el diámetro es de máximo 266 Å (Eicke y Zulauf, 1979). Con base en el modelo propuesto para el arreglo de la rodopsina solubilizada en un medio de asolectina en hexano (Ramakrishnan y col., 1983) y tomándo en cuenta que los tamaños transversales de los complejos respiratorios mitocondriales van de 80 a 300 Å (ver apéndice), y que incluso en algunos casos pueden formarse dímeros, se puede especular sobre su arreglo en el sistema de micelas invertidas (Figura 21). Los dominios hidrofílicos de las proteínas se encontrarían rodeados de microambientes acuosos micelares, mientras que los dominios hidrofóbicos estarían expuestos al

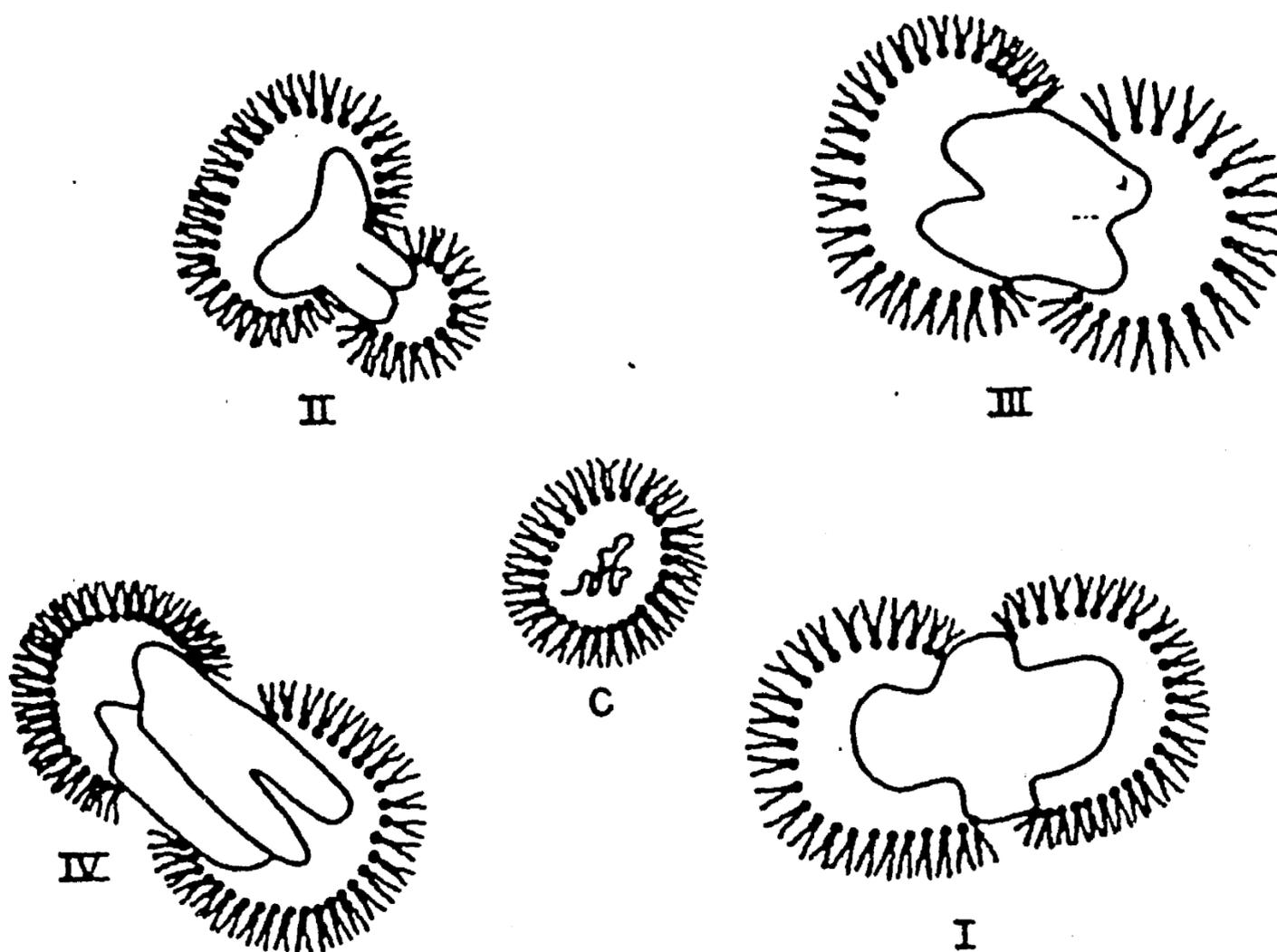


Figura 21. Representación esquemática propuesta para la solubilización de los complejos respiratorios de las PSM en el medio de micelas invertidas en isooctano. El citocromo c estaría encapsulado en la poza acuosa de una micela invertida. Los complejos respiratorios I, II, III y IV se contemplan rodeados parcialmente por pozas acuosas delimitadas por el agente tensoactivo, en contacto con los dominios hidrofílicos de las proteínas. Las regiones hidrofóbicas de las proteínas se encuentran expuestas al solvente orgánico apolar. Sólo se muestran los complejos respiratorios cuya actividad enzimática se ensayó en el medio micelar. Los modelos de la topografía de los complejos de la cadena respiratoria se tomaron de Hatefi, 1985; Ragan, 1987 y Ohnishi, 1987.

solvente orgánico apolar (Escamilla y col., 1989). Considerando este modelo, la solubilización de más de un complejo respiratorio en una micela invertida podría ser factible, pero no el de toda la cadena respiratoria. Por consiguiente, los complejos membranales se deben encontrar dispersos y, de esta manera, su dilución en el medio apolar podría explicar la baja actividad de la cadena respiratoria. Este hecho contribuiría a disminuir la probabilidad de la frecuencia de las colisiones entre los complejos enzimáticos, ya que se pierde la bidimensionalidad de una bicapa y, con ello, la difusión lateral que favorece una interacción más rápida y eficiente (Hackenbrock y col., 1986). Además, la transferencia de electrones en la cadena respiratoria esta asociada a procesos difusionales de corta distancia (Kawato y Kinoshita, 1981), en vista de que la distancia promedio entre los complejos en la membrana es de nanómetros (Capaldi, 1982).

Sin embargo, en el caso de los complejos respiratorios de *Bacillus cereus*, cuyo acoplamiento es eficiente en el medio micelar (Sánchez y Escamilla, 1991), su tamaño es menor y probablemente en este caso no se pueda descartar la posibilidad de que se integre la cadena respiratoria en una microemulsión.

Cabe señalar que existen reportes referentes a la solubilización de células en sistemas de micelas invertidas (Häring y col., 1985; Darszon y col., 1988; Pfammatter y col., 1989). En estos casos es desafortunada la viabilidad de las células después de cierto tiempo, lo que implica que el arreglo estructural del agente tensoactivo permite que las membranas celulares se

expongan al solvente orgánico.

(ii) La estructura que adoptan los complejos respiratorios en las micelas invertidas puede influir en la transferencia de electrones de los centros redox de cada uno de ellos y, aunque se diera el contacto entre las enzimas, el acoplamiento no sería posible. Tal es el caso de la citocromo oxidasa mitocondrial, la que permanece en un estado semireducido (Escamilla y col., 1989).

(iii) La velocidad del intercambio intermicelar es una variable que puede limitar la velocidad de una reacción enzimática, pese a que el intercambio sea por lo menos de cinco ordenes de magnitud mayor que el número de recambio de la enzima (Verhaert y col., 1990b). Incluso la velocidad de intercambio intermicelar puede ser diferente para cada sustrato dependiendo de su tamaño y carga. El uso de agentes cotensoactivos aumenta ésta velocidad; por consiguiente será importante estudiar su efecto en el acoplamiento.

— o —

La falta del efecto inhibitor de la rotenona sobre el complejo I y de la antimicina sobre el complejo bc₁, puede deberse a por lo menos dos factores. Uno de ellos es la alta solubilidad de estos inhibidores en el solvente orgánico apolar. En contraste, el KCN, el cual es sólo soluble en agua, bloqueó la actividad de la citocromo oxidasa en el medio micelar (Figura 19). También se ha descrito que la diferencia principal entre los extractos de la NADH deshidrogenasa soluble y la NADH deshidrogenasa membranal es

que la primera presenta una actividad reductasa de CoQ₁₀ que no es sensible a la rotenona (Hatefi y col., 1969; Hatefi y Stiggall, 1976). Por otra parte, la antimicina bloquea la transferencia de electrones desde los citocromos b del complejo III a la ubiquinona, pero no la mediada a partir de la proteína Fe-S (de Rieske) o del citocromo c₁. Por lo tanto, se debió probar en conjunto otros inhibidores del complejo III en el medio micelar (ver apéndice).

— o —

La funcionalidad de los complejos respiratorios en el medio micelar no sólo se dedujo a partir de la reducción de los citocromos sino también por su susceptibilidad a la oxidación. Al adicionar el TMPD (Figura II) a la muestra de PSM solubilizadas en el medio de asolectina-isooctano con los citocromos reducidos, el TMPD funcionó como aceptor de electrones reoxidando a todos los citocromos. Por consiguiente, aunque sólo la citocromo oxidasa no fue capaz de reoxidarse espontáneamente por el oxígeno debido a la baja actividad del agua en el medio micelar, permaneciendo en un estado semireducido, esta enzima si logró reoxidarse por el TMPD.

En una comunicación previa (Escamilla y col., 1989; ver introducción) se propuso que la citocromo oxidasa no podía llevar a cabo un ciclo completo y que permanecía en un estado semireducido (a^{2+} a_3^{3+}) en un medio de micelas invertidas de asolectina-tolueno con 0.3% de H₂O (V/V). Este resultado se ha

visto reforzado recientemente por Kornblatt y colaboradores (1990), quienes propusieron que la transferencia de electrones del centro del citocromo a Cua al centro del citocromo a₃ CUB requiere que aproximadamente 10 moléculas de agua entren y salgan de la oxidasa.

En este trabajo los pares NADH/PMS o ascorbato/PMS fueron efectivos en promover la actividad catalítica de la citocromo oxidasa. Lo anterior fue posible porque el PMS reducido puede provocar la reducción simultánea de los dos hemos (Halaka y col., 1981). Sin embargo, este hecho no parece ser suficiente, sino que también se deben satisfacer ciertos requerimientos de hidratación, como lo demuestran los resultados obtenidos al variar el contenido de agua en el medio micelar (Figura 18B).

La actividad enzimática en los sistemas de micelas invertidas depende fuertemente del grado de hidratación del sistema. Ya se ha reportado la dependencia de la actividad enzimática en función del contenido de agua en un medio de micelas invertidas para la F₁-ATPasa transferida a un medio micelar en tolueno (Garza-Ramos y col., 1989). El perfil de actividad de esta enzima también muestra una curva de saturación con el contenido de agua, alcanzándose un máximo a 1.35% de H₂O. Sin embargo, aún en esas condiciones la actividad ATPasa fue ordenes de magnitud menor que la observada en un medio acuoso.

El agua es esencial para que la enzima tenga movilidad y, por consiguiente, pueda iniciar la catálisis. Un ejemplo claro de este fenómeno son los resultados que se han obtenido con la

lisozima a través de experimentos que se han diseñado con la enzima seca para estudiar el papel del agua sobre la catálisis (Poole y Finney, 1986), con técnicas como el infrarrojo diferencial, la espectroscopía Raman y la dispersión ⁴ de neutrones. Los resultados que se han obtenido son consistentes con un modelo de la enzima seca inactiva la que es más rígida y ligeramente diferente en estructura respecto de la enzima hidratada. Conforme se agrega agua a la enzima (0.05 g/g), se observa la ionización de los grupos cargados como consecuencia de la hidratación de los grupos polares. A un bajo nivel de hidratación (0.07 g/g), ocurre un aumento en la flexibilidad de la enzima lo que permite el acceso del agua hacia los grupos amida más "ocultos" en la matriz proteica. Ya que aumenta la flexibilidad, aparecen cambios tanto en la conformación de las cadenas laterales como en el esqueleto de la proteína antes de que la enzima, aparentemente en su estado nativo, recupere la actividad hasta 0.2g de agua por g de enzima. Es interesante notar que con ese nivel de hidratación aún no se hidratan todos los grupos polares ni se cubre la enzima por una monocapa de agua. Estos resultados indican que la actividad de una enzima es muy sensible a la concentración de agua en el medio.

La actividad de la citocromo oxidasa también mostró una fuerte dependencia de la concentración de fosfolípidos en el medio a un W_0 constante de 50-60 (Figura 20). La variación de la concentración micelar y, en consecuencia, de la fracción de volumen de la fase micelar Θ , dió lugar a un perfil de actividad

en forma de campana. Este resultado implica que hay un radio óptimo de la cavidad micelar en el que la citocromo oxidasa muestra la mayor actividad catalítica. Este efecto se ha observado con otras enzimas, como son la peroxidasa la lacasa y la fosfatasa ácida, cuya característica es la de tener grupos que interaccionan con la monocapa micelar (Khmelnitsky y col., 1989). En consecuencia será necesario estudiar con mayor detalle tanto la catálisis de la citocromo oxidasa así como la funcionalidad de la cadena respiratoria mitocondrial a la concentración micelar óptima.

— o —

La introducción del electrodo de Clark para la medición de la actividad enzimática en un medio de micelas invertidas pudo validarse por primera vez* a través de la determinación de los parámetros cinéticos de la catalasa solubilizada en micelas invertidas de AOT en tolueno, y utilizando tanto al perborato de sodio como al peróxido de hidrógeno como sustratos de la enzima. Al aislar de la solución con la membrana de teflón tanto a la solución electrolito como al ánodo y al cátodo del electrodo de oxígeno de Clark, se podrá medir el consumo o producción de oxígeno en medios no conductores.

* (NOTA: Hochkoepler y Palmieri publicaron posteriormente (9 meses) la validación del electrodo de Clark midiendo la actividad de la lipooxigenasa en un medio micelar de AOT/isooctano. Sin

embargo, sólo determinaron la actividad enzimática frente a varios sustratos. La solubilidad del O_2 que se infiere de sus datos fue de 6.0 mM a $30^\circ C$).

Con este método se determinó una concentración de O_2 de 1.4 mM en el medio orgánico compuesto por 0.31-1.6 M de agua y 0.2 M de AOT en tolueno a $30^\circ C$ y a una presión atmosférica de 582 mm de Hg. La concentración del oxígeno en un medio orgánico puede estimarse a partir de los coeficientes de absorción de Bunsen (α). El O_2 en el tolueno puro tiene un α de 168×10^3 a $18^\circ C$ a una presión de 1 atmósfera (Washburn, 1928). A partir de estos datos se calculó una concentración de 7.03 mM de O_2 en el tolueno puro. Este valor es cinco veces mayor que el valor experimental determinado en el medio micelar de AOT-tolueno, lo cual puede deberse a la diferencia en temperatura y presión a la que se llevó a cabo la determinación, lo cual contribuye a disminuir la solubilidad del oxígeno en el solvente orgánico.

El electrodo mostró una gran estabilidad y sensibilidad a lo largo de los experimentos. La velocidad con la que el O_2 drenó a través del tapón capilar de la celda fue de $0.07 \mu\text{mol ml}^{-1} \text{h}^{-1}$, lo que ocasionó un cambio en el registrador del 5 % en toda la escala al cabo de 1 hr. Para los valores que se obtuvieron de las actividades enzimáticas en el medio micelar (0.7 a $25 \mu\text{mol } O_2 \text{ ml}^{-1} \text{min}^{-1}$) ese factor pudo despreciarse.

Se determinó la solubilidad del oxígeno en varios medios micelares de AOT variando el solvente orgánico con polaridades diferentes (no se muestra), encontrándose una relación lineal

entre la capacidad por disolver al O_2 y el índice de polaridad del solvente (Inoue y Horikoshi, 1989). Por consiguiente, el electrodo de Clark puede utilizarse en diferentes solventes orgánicos.

Las propiedades cinéticas de la catalasa solubilizada en el medio micelar de AOT-tolueno fueron similares a las obtenidas en el medio acuoso (Figuras 14, 15 y Tabla III). Tal es el caso de varias enzimas solubilizadas en un medio micelar (Luisi y Magid, 1986; Luisi y Steinman-Hofmann, 1987).

El perfil de la actividad para las enzimas en micelas invertidas es generalmente una campana con un máximo a un Wo de 10-12 (Klyachko y col., 1984). En el caso de la catalasa se obtuvo una curva sigmoideal con un valor máximo a Wo de 10-12. El efecto de Wo 's mayores a 12 no pudo estudiarse debido a que el tolueno tiene poca capacidad para solubilizar agua respecto a los solventes orgánicos hidrocarbonados. En solventes como el tolueno y el CCl_4 , el AOT solubiliza una cantidad ligeramente mayor al agua de hidratación de sus grupos sulfonato y de su contraión sodio; en cambio en los solventes hidrocarbonados el AOT puede solubilizar una cantidad de agua apreciable (hasta Wo de 70; Frank y Zografi, 1969). Este efecto está relacionado con la penetración del solvente a la micela invertida. Al respecto, será conveniente hacer la comparación de los valores de la constante catalítica obtenidos en el medio micelar de AOT-tolueno con los de un solvente hidrocarbonado. Experimentos preliminares llevados a cabo en isooctano han mostrado un perfil parecido al obtenido

en tolueno manteniéndose el máximo de la actividad hasta un W_o de 60 (no se muestra). Tomando en cuenta que se requieren aproximadamente 10 moléculas de agua para hidratar a una molécula de AOT, se puede considerar que a un W_o de 10 sólo se encuentra presente agua de interfase. La actividad de la enzima es muy sensible a la presencia de agua de interfase; esta dependencia puede atribuirse a cambios en el microambiente de la enzima como son: fuerza iónica, puentes de hidrógeno, viscosidad, constante dieléctrica, etc... Por lo tanto, la enzima parece funcionar eficientemente sólo con el agua de interfase en el medio, sin verse afectada por la existencia de agua de bulto ($W_o > 10$). Resultados similares se han descrito con la tripsina transferida a un medio micelar de AOT en silicón (Douzou, 1980).

VI. CONCLUSION

La mayoría de los complejos respiratorios mitocondriales no sólo preservan su estructura y funcionamiento, sino también su acoplamiento en un medio micelar de asolectina-isooctano con 1.5% de agua.

La actividad enzimática de la citocromo oxidasa es dependiente de la cantidad de agua en el medio hasta un 1.14% de H₂O (v/v); en estas condiciones la actividad de la enzima es prácticamente la misma que la que ésta muestra en forma nativa. La actividad de esta enzima también puede incrementarse hasta diez veces al variar la concentración de asolectina en el medio micelar, observándose el máximo a una concentración de asolectina de 0.7 mg ml⁻¹. Por consiguiente, la citocromo oxidasa puede efectuar la catálisis al máximo de su capacidad dentro de un microambiente acuoso en un solvente orgánico apolar.

Estos resultados constituyen la primera evidencia de que el flujo de electrones puede efectuarse entre los complejos respiratorios y que una enzima de membrana puede llevar a cabo la catálisis eficientemente en un sistema de micelas invertidas.

Por consiguiente, las micelas invertidas como modelo de membrana resultan una herramienta útil para estudiar el efecto de cantidades limitantes de agua sobre la catálisis de complejos enzimáticos membranales.

Se introdujo por primera vez la aplicación del electrodo de Clark para la medición de cinéticas enzimáticas que involucran la producción o consumo de oxígeno en un medio orgánico apolar.

PERSPECTIVAS

La citocromo oxidasa es una enzima de membrana ideal para estudiar la modulación de la catálisis en función de la concentración del agua en el sistema de micelas invertidas de asolectina en isooctano. Será importante continuar el estudio del efecto de la concentración micelar sobre su actividad, y de que manera esta variable influye. Es fundamental que dicho estudio se complemente con la aplicación de técnicas espectroscópicas para la elucidación de las propiedades estructurales de la enzima en el medio micelar. El dicroísmo circular ha servido para medir los cambios en la estructura secundaria de proteínas solubles (Wolf y Luisi, 1979; Meier y Luisi, 1980; Grandi y col., 1981; Barbaric y Luisi, 1981), y de la proteína de membrana Folch-Pi (Delahodde y col., 1984) en micelas invertidas. Por fluorescencia se podrían estimar varios parámetros como son: constantes de disociación enzima-sustrato, concentración de sitios activos, formación de agregados de proteína, etc...

De la determinación de la estructura de los agregados micelares por técnicas de dispersión de rayos X a ángulo bajo (SAXS), puede inferirse cómo se encuentra una proteína en el medio micelar (Pileni y col., 1985; Fletcher y col., 1984).

Por lo anterior, será necesaria la introducción de técnicas más sofisticadas para poder obtener información estructural y dinámica de la citocromo oxidasa solubilizada en diferentes microambientes acuosos en estos sistemas micelares.

Respecto al estudio del acoplamiento de la cadena respiratoria mitocondrial, habrá que experimentar con otras variables como es el uso de cotensoactivos que facilitan el intercambio micelar. Probablemente las cadenas respiratorias bacterianas, por su menor complejidad, resulten un mejor modelo de estudio del acoplamiento entre enzimas de membrana en función del contenido de agua (Sánchez y Escamilla, 1991).

La posibilidad de elucidar las condiciones en que pueden llevarse a cabo eventos tan complejos como la germinación de esporas en estos medios microheterogéneos (Contreras y Escamilla, 1991), permitirá tener en el futuro un panorama del papel del agua sobre la catálisis de una enzima, hasta el de su participación a nivel celular.

VII. APENDICE

1. CADENA RESPIRATORIA.

La membrana interna de la mitocondria es prácticamente impermeable a iones, por ello puede mantener gradientes de potencial electroquímico a través de los cuales se lleva a cabo la transducción de energía. La mitocondria se especializa en la oxidación rápida de un número limitado de sustratos, especialmente de NADH, de ácidos grasos y succinato, con la generación de ATP a partir de la energía libre de la oxidación.

El sistema de la fosforilación oxidativa de eucariontes se encuentra presente en la membrana interna, la cual se compone de aproximadamente 70% de proteína y 30% de lípido (Hatefi, 1985). Los lípidos que predominan son la fosfatidilcolina (40%), la fosfatidiletanolamina (35%) y la cardiolipina (15%) (Fleischer y col., 1961).

Cuando la membrana interna se expone a detergentes y solventes apropiados, la membrana se disocia en cinco complejos que colectivamente contienen todas las proteínas necesarias para llevar a cabo la respiración y la fosforilación acopladas. Los complejos enzimáticos:

- a) NADH:ubiquinona oxidoreductasa (complejo I)
- b) succinato:ubiquinona oxidoreductasa (complejo II)
- c) ubiquinol:ferricitocromo c oxidoreductasa (complejo III)
- d) ferrocitocromo c: oxígeno oxidoreductasa (complejo IV)

junto con los acarreadores móviles la ubiquinona y el citocromo c comprenden la cadena respiratoria.

Excepto el complejo II cada uno es una unidad translocadora de protones individual asociada débilmente con los otros bloques.

Durante la respiración los electrones fluyen del NADH ($E_m = -320$ mV) al oxígeno ($E_m = +820$ mV) a través de una serie de reacciones redox reversibles.

La transferencia de electrones entre los complejos de la cadena respiratoria está mediada por su difusión lateral al azar y por colisiones favorables energéticamente (Höchli y Hackenbrock, 1979).

La transferencia de electrones entre los complejos respiratorios se lleva a cabo por componentes móviles que actúan como cosustratos, es decir, por la ubiquinona (Q) y el citocromo c (cit c). En especial, la ubiquinona tiene una posición central en la cadena, ya que se reduce por un gran número de deshidrogenasas vía flavoproteínas y se reoxida por el complejo ubiquinol cyt c reductasa (complejo bc₁ o complejo III) (Lenaz y col., 1985). La posición que presenta la Q es estratégica para actuar como regulador en la transferencia de electrones.

La cadena respiratoria se encuentra sujeta a un control termodinámico por la concentración del adenilato mediado por el gradiente electroquímico de protones (Erecinska y Wilson, 1982). Sin embargo, también se ha propuesto que puede existir un control cinético a través de los acarreadores de la cadena respiratoria (Kadenbach, 1985; Lenaz y col., 1988), e incluso una modulación del transporte de electrones por lípidos (Lenaz y Castelli, 1985). También se ha sugerido un control de "término duradero"

por los niveles y las propiedades de los sustratos respiratorios y acarreadores redox (Lenaz y Parenti-Castelli, 1984; Hackenbrock y col., 1986).

La organización estructural de la cadena respiratoria todavía es controvertida (Rich, 1984), particularmente en la región de la Q. Se han planteado dos condiciones extremas: (a) la cadena se organiza en un estado líquido en el que los complejos multiproteicos se distribuyen al azar en el plano de la membrana, donde se mueven libremente por difusión lateral. La Q y el cit c se consideran acarreadores móviles y su velocidad de difusión es mayor que los voluminosos complejos proteicos. Sus frecuencias de colisión acopladas a su difusión pueden ser mayores o menores que cualquier reacción en los complejos. Consecuentemente, la transferencia de electrones puede estar limitada ya sea por alguna reacción o por la difusión. (b) Los componentes de la cadena se encuentran en forma de agregados, desde racimos pequeños de unos cuantos complejos hasta el extremo de un ensamblaje en el estado sólido. Los agregados pueden ser permanentes o transitorios, pero su duración debe ser mayor que cualquier número de recambio de la transferencia de electrones.

El modelo que plantea que la transferencia de electrones depende de colisiones al azar de los complejos respiratorios ha sido apoyado por Hackenbrock y colaboradores (1986), quienes han dado evidencias de que los componentes de la cadena respiratoria se mueven por difusión lateral, por lo que la transferencia de electrones es un proceso cinético acoplado a la difusión. También

se ha postulado que la velocidad de la transferencia de electrones esta limitada por la difusión de los componentes redox más rápidos (i.e. la Q y el cit c).

La Q no sólo se encuentra libre en el medio (poza de Q), sino también hay moléculas de quinona estrechamente unidas a los complejos. Se han reportado varias evidencias de quinonas unidas (Suzuki y Ozawa, 1984) y de proteínas que unen quinonas dentro de los complejos (King, 1982).

Para una reacción limitada por la difusión de sus componentes, la reducción de la dimensionalidad como ocurre en una bicapa, puede disminuir el tiempo de difusión y por consiguiente, aumentar las velocidades de reacción (Adam y Delbrück, 1961). La principal ventaja de la difusión lateral de una enzima localizada en una membrana debe ser que la proteína no puede rotar y, de esa manera, la localización del sitio activo de una proteína integral se hace más eficiente.

De la dependencia del transporte de electrones en la mitocondria con la difusión, se puede inferir que la velocidad de difusión de los componentes de la cadena respiratoria fija el límite superior de la velocidad de la transferencia de electrones.

Chazotte y Hackenbrock (1988) han definido a la cadena del transporte de electrones como un proceso multicolisional, obstruido, de largo alcance y dependiente de la difusión de sus componentes. Existe un amplio espacio para la difusión lateral en el plano de la membrana, ya que las proteínas integrales se encuentran dispersas al azar (Hackenbrock y Hammond, 1975) y

porque ocupan menos del 50% de la superficie membranal (Sowers y Hackenbrock, 1981). Además, la microviscosidad de la bicapa de fosfolípidos de la mitocondria es muy baja (0.9 poises), lo cual ofrece poca resistencia a la difusión lateral.

TABLA V. COMPLEJOS ENZIMATICOS DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL

COMPLEJO (monómero)	SUBUNIDADES	GRUPOS PROSTETICOS
I NADH-ubiquinona reductasa, 850,000	25	1 FMN; 16-24 Fe.S en 5 a 7 centros
II Succinato-ubiquinona reductasa, 140,000	4-5	1 FAD; 8 Fe.S en 3 centros
III Ubiquinona-citocromo c reductasa, 280,000	9-10	2 hemos tipo b, 1 hemo tipo c (c1); 2 Fe.S
IV Citocromo c oxidasa, 200,000	13	2 hemos tipo a (a1a3); 2 Cu

i) NADH-UBIQUINONA OXIDOREDUCTASA

La NADH-ubiquinona oxidoreductasa (Complejo I) se compone de más de 25 polipéptidos diferentes y constituye el sitio de acoplamiento I de la fosforilación oxidativa (Hatefi, 1985). Este complejo lipoproteico oligomérico de la cadena respiratoria de mamíferos, cataliza la oxidación del NADH por estructuras quinoide (menadiona, ubiquinona, 2,6 diclorofenolindofenol, azul de metileno), de compuestos férricos (ferricianuro, citocromo c) y de NAD. Este flujo de electrones se encuentra acoplado con la translocación vectorial de protones desde la matriz mitocondrial hasta el citoplasma.

La enzima contiene 1 mol de FMN, 4 g-átomo de hierro no hemo y 4 moles de sulfuro lábil por mol. El FMN (Rao y col., 1963) y por lo menos cuatro centros Fe-S (Kowal y col., 1986) de la enzima participan en la transferencia de electrones desde el NADH a la poza de la ubiquinona. A cada FMN se le unen de 2-4 ubiquinonas (Hatefi, 1985). Se ha reportado una estequiometría de $2-5 \text{ H}^+ / 2\text{e}^-$ en la reacción de la oxidación del NADH por la poza de la ubiquinona en mitocondrias y en partículas submitocondriales (Lemasters, 1984).

Aún se desconoce la secuencia en que opera y el funcionamiento del mecanismo de la transferencia de electrones, llevado a cabo por el gran número de grupos redox en el complejo I. Sin embargo, la información que hasta ahora se conoce proviene de estudios de resonancia paramagnética del electron (EPR) de los racimos de

Fe-S (Ragan y col., 1986). El número total de racimos de Fe-S que se han reportado hasta ahora es de 8-9 : 3 tetranucleares y 5-6 binucleares (Ragan y col., 1982).

Los estudios de EPR de la flavina han sugerido que sus tres estados redox (FMN, FMNH[•] y FMNH₂) pueden participar en la transferencia de electrones, lo que conlleva a un mecanismo de la transferencia de electrones cíclico (ver figura 22 ; Ragan y col., 1986). De la misma manera, como se han encontrado en el complejo I de una a dos ubisemiquinonas estables (King y Suzuki, 1984), también se ha propuesto un mecanismo cíclico para la ubisemiquinona.

Monómero o dímero

El análisis por sedimentación y por microscopía electrónica apoya el hecho de que el complejo I es un dímero (Dooijewaard y col., 1978a; Boekema y col., 1984). Sin embargo, no hay evidencias estructurales de que la enzima sea un dímero en la membrana. Por otra parte, hay indicios que demuestran que la enzima no es homogénea funcionalmente, lo que implica suponer que en el dímero cada monómero interactúa para crear diferencias funcionales o que cada monómero es diferente funcionalmente.

Otras evidencias de la heterogeneidad funcional provienen de estudios cinéticos del estado estacionario. Ragan (1978) ha sugerido dos fases para la reducción de la ubiquinona con valores de K_m diferentes. A su vez, se han encontrado dos sitios de unión para el NADH (Dooijewaard y Slater, 1976). También se ha reportado

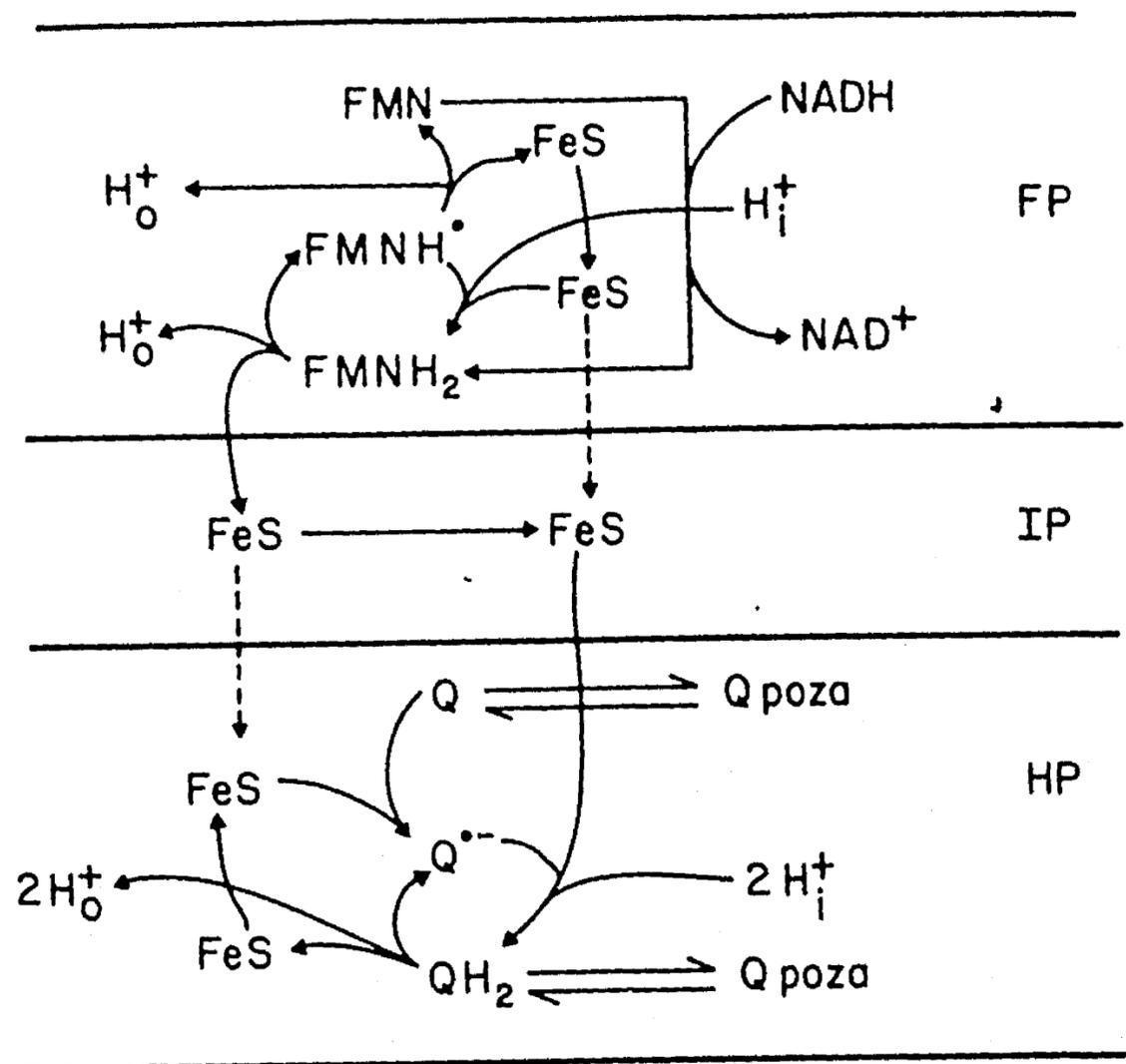


Figura 22. Mecanismo cíclico de la transferencia de electrones (e^-) en el complejo I propuesto por Ragan y col., 1986. Los racimos Fe-S oxidan a la flavina (FMN) reducida. La primera reducción de la ubiquinona (Q) ocurre por un racimo Fe-S de alto potencial, mientras que la segunda por la transferencia de e^- de la flavina de la enzima. Se translocan 5 H^+ por cada 2 e^- transferidos del NADH a la Q (ver apéndice para mayor detalle).

que la inhibición del complejo I por la rotenona no es lineal con la unión del inhibidor (Ragan, 1987).

Propiedades catalíticas

La oxidación fisiológica del NADH por ubiquinonas de cadena larga puede medirse en membranas o con la enzima pura con homólogos de cadena corta o con análogos de alquilo (Hatefi y col., 1962). La actividad máxima de la enzima cuando se usa UQ-1 es de 25 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína a 38 °C. Un ensayo que no se afecta tanto si la enzima está dañada es la reducción del $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ por el NADH. La reducción de la UQ, pero no la de FeCN, se inhibe específicamente por rotenona y piericidina (un sitio por molécula). Además del NADH, el NADPH puede ser usado como sustrato (Hatefi y Hastein, 1973).

El mecanismo que se ha propuesto para la translocación de protones acoplada a la transferencia de electrones es totalmente quimiosmótico, y los protones se toman y se liberan como un resultado directo de las reacciones redox (figura 22). La oxidación del NADH se lleva a cabo por el FMN, el cual se reduce a FMNH_2 . La reoxidación de la flavina ocurre vía dos transferencias de un electrón a los racimos Fe-S. Los potenciales de media onda de los dos pares están en correspondencia con esta función ($E_{m,8}$ son para los pares FMN/ FMNH_2 , FMN/ FMNH' , y $\text{FMNH}'/\text{FMNH}_2$ -320 mV, -380 mV, y -260 mV, respectivamente, (Ragan, 1987). Por consiguiente, la reducción de un racimo Fe-S de alto

potencial (via el par de alto potencial FMNH'/FMNH₂) puede ocasionar la reducción de un racimo Fe-S de bajo potencial (via el par FMN/FMNH' de bajo potencial; ver figura 22). En un segundo número de recambio de la enzima, este racimo Fe-S causa la reducción del FMNH' hacia FMNH₂. El efecto es la transferencia del electrón del racimo de bajo potencial al de alto potencial y con ello la translocación de un protón extra a través de la membrana. Por lo tanto, por cada par de electrones que siguen la trayectoria de alto potencial, tres protones se liberan en el exterior y uno se toma del interior.

Las ubisemiquinonas que se forman en el complejo I tienen un E_m de -115 mV y de -169 mV para los pares $Q/Q\bar{\cdot}$ y $Q\bar{\cdot}/QH_2$, respectivamente. Estos valores no sólo representan una constante de estabilidad alta para el anión de semiquinona sino también que Q y QH₂ se unen a este sitio con afinidades diferentes, ya que el E_m para el par Q/QH₂ es muy diferente del de la poza. Se cree que la primera reducción de Q a $Q\bar{\cdot}$ se lleva a cabo por un racimo Fe-S de alto potencial (i.e. el racimo N-2). La segunda reducción hasta QH₂ ocurre por la transferencia de uno de los electrones de la flavina de la enzima a un potencial muy bajo, lo que causa la captación de dos protones. La reoxidación del QH₂ libera los dos protones en el interior y dona un electron para la reducción posterior de Q a $Q\bar{\cdot}$ y regenera $Q\bar{\cdot}$ tomando el segundo electron de la región de la flavina y posteriormente dos protones del interior (Ragan, 1987; figura 22). El ciclo se arregla de esta manera para ajustarse con los potenciales redox de los pares de

quinona. La estequiometría son 5 protones translocados por 2 electrones transferidos del NADH a la ubiquinona.

De lo anterior se puede concluir que en la NADH-reductasa, los radicales de ubisemiquinona están involucrados en la transferencia de electrones como ubiquinona-proteína (QP-N) para formar radicales estables. Se sabe que a pH 8.0 aproximadamente 25% de los radicales de ubisemiquinona se encuentran en la forma neutra (QP-NH) la cual es más resistente a la rotenona y puede ser un intermediario durante el flujo de electrones a través de la reductasa, mientras el 75% del radical funciona en la forma aniónica (QP-N⁻) la cual es muy sensible a la rotenona (Suzuki & King, 1983).

Fragmentación de la enzima

Durante el proceso de la purificación del complejo I, éste puede degradarse en fragmentos más pequeños conocidos como FP, IP y HP.

El fragmento FP.

El fragmento FP es una flavoproteína soluble de bajo peso molecular que cataliza la oxidación del NADH por una amplia variedad de aceptores de electrones, incluyendo al citocromo c y a análogos de la ubiquinona (Ragan, 1987). A este fragmento también se le conoce como la NADH deshidrogenasa de tipo II o de bajo peso molecular.

El fragmento FP comprende el FMN y seis de los átomos de fierro del complejo I (Galante y Hatefi, 1979). El fragmento tiene tres

polipéptidos (51, 24 y 10 kDa) en un cociente molar 1:1. Los estudios de EPR del fragmento aislado (Ohnishi y col., 1985) sugieren la presencia de un racimo binuclear y uno tetranuclear, los que parecen ser los racimos N-1b y N-3; éstos se encuentran ubicados en la proteína de 25-kDa y en la de 51-kDa, respectivamente (Ohnishi y col., 1985). La localización de la flavina es incierta, ya que la resolución mayor de FP produce la pérdida del grupo prostético. Sin embargo, la localización del sitio que une al NADH en la subunidad de 51 kDa (Chen y Guillory, 1981) apoya fuertemente que el FMN, el oxidante más probable del NADH, también se ubica en esta subunidad.

El fragmento FP conserva las propiedades de la región del sitio de unión del NADH, así que el efecto principal de la separación es que es más fácil el acceso de los aceptores artificiales a ciertas regiones de la proteína. La similitud cinética entre el fragmento FP y el complejo I además de que se conserva la señal en EPR del Fe-S (Ohnishi y col., 1985) muestra que la conformación de FP debe ser muy parecida a la de la enzima intacta.

El fragmento IP.

En la separación del complejo I se puede obtener además del fragmento FP otra fracción soluble rica en Fe pero muy pobre en flavina; este fragmento se conoce como el fragmento de proteína-Fe (IP) (Davis y Hatefi, 1969). Este fragmento contiene por lo menos tres racimos Fe-S localizados en subunidades fuertemente asociadas de 75, 49, 30 y 13 kDa. También presenta

otras dos proteínas (18 y 15 kDa) que no contienen grupos redox. La proteína de 15 kDa une a la ubiquinona-10 por lo que se ha sugerido que esta proteína está involucrada en la transferencia terminal de los electrones (Suzuki & Ozawa, 1986).

El fragmento hidrofóbico o HP.

Este fragmento se obtiene después de la separación del complejo I con perclorato y corresponde al 70% de la proteína total; contiene de 6-7 de los átomos de Fe y carece de flavina (Ragan y col., 1982). Se encuentran presentes dos centros Fe-S cuyo relajamiento en EPR corresponde a un racimo binuclear y a uno tetranuclear, respectivamente (Ohnishi y col., 1985). Este último se ha designado como el racimo N-2 y probablemente es el donador de la ubiquinona (Ohnishi y col., 1974).

Estructura de la enzima

A partir de los resultados que se han obtenido con sondas hidrofóbicas y con la caracterización de los productos de entrecruzamiento del complejo I, se ha propuesto un modelo de la estructura de esta enzima (Ragan, 1987; figura 23). El NADH parece unirse dentro de un vestíbulo hidrofóbico en una subunidad del fragmento FP, el cual se une a la subunidad más grande del fragmento IP. La transferencia de e^- ocurriría hacia el FMN y a los racimos de Fe-S del fragmento FP (racimos N-3 y N-1b) y luego a las proteínas Fe-S transmembranales del dominio IP, las que forman las regiones expuestas de la proteína. Las partes transmembranales del dominio IP y, quizás, la mayoría del

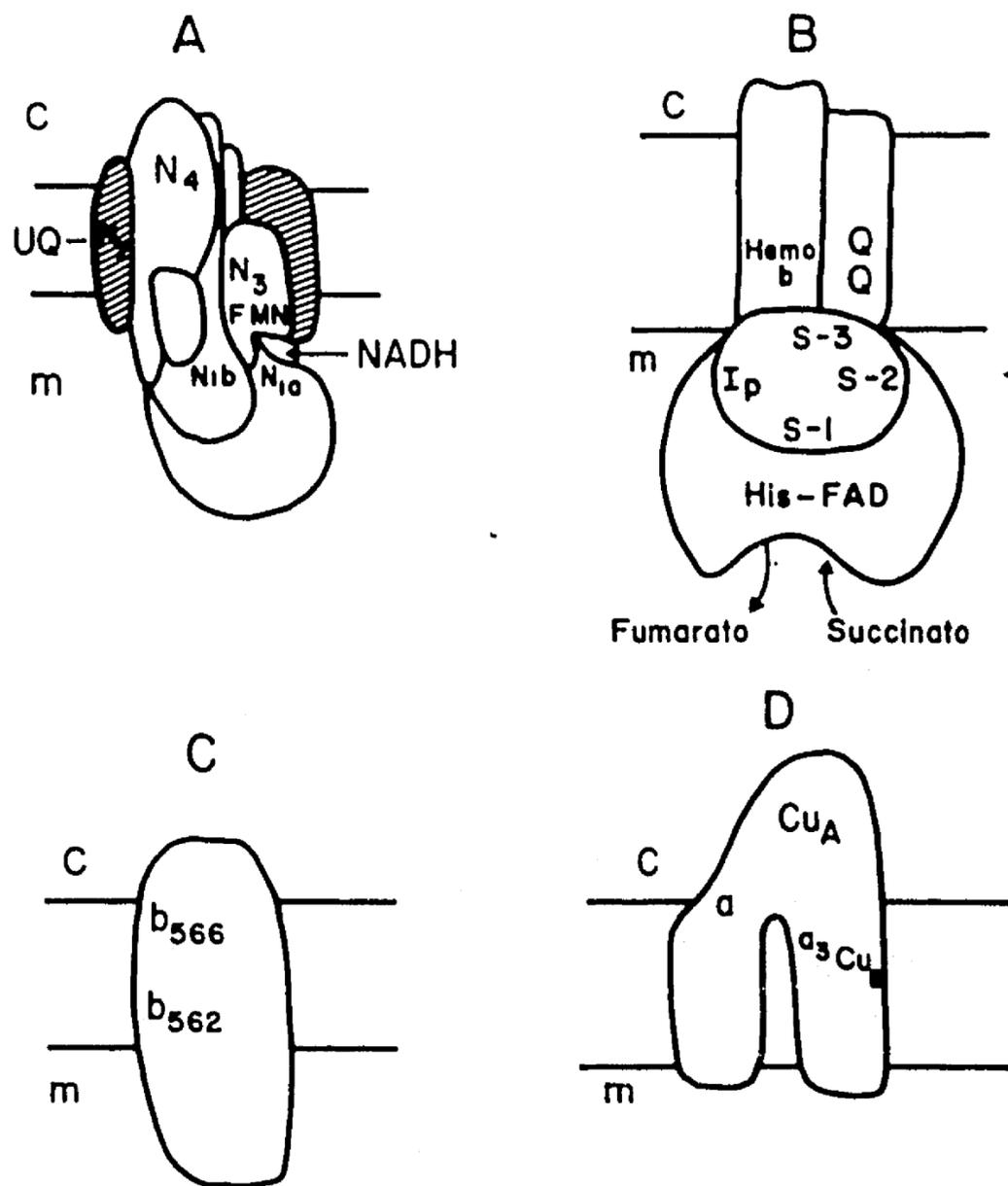


Figura 23. Modelos propuestos para la estructura de los complejos respiratorios. (A) Complejo I. Se señalan las subunidades de las proteínas Fe-S de los fragmentos IP y FP y la de los centros Fe-S. El fragmento HP corresponde al área sombreada (Ragan, 1987). (B) Distribución topográfica de los centros redox de la SDH, el FAD unido covalentemente, los racimos S-1, S-2 y S-3, el hemo b y un par de UQ unidas (Ohnishi, 1987). (C) Arreglo topográfico de los centros redox del complejo bc₁ deducido a partir de estudios de EPR (Ohnishi y Von Jagow, 1985). (D) Monómero de la citocromo oxidasa y sus centros redox (Malmström, 1990). El lado citosólico (c) y el de la matriz mitocondrial (m) se indican en cada figura.

fragmento FP se encierran por una capa de proteínas hidrofóbicas (el fragmento HP), algunas de las cuales se encuentran en contacto con la bicapa y algunas en contacto con las fases acuosas a ambos lados de la membrana. La transferencia de e^- se lleva a cabo desde los racimos Fe-S del fragmento IP (racimos N-1a, N-4 y otros) hasta racimos Fe-S en la región asociada a lípidos (racimo N-2 y otros), los que eventualmente llevan a cabo la reducción de la UQ vía uno o más intermediarios. El polipéptido de 33 kDa que une a la rotenona se ha propuesto como el sitio de la reducción de la UQ.

ii) SUCCINATO-UBIQUINONA OXIDOREDUCTASA

Composición y estructura del complejo II

El complejo II de mamíferos se compone de cuatro polipéptidos de Mr de 70, 27, 15.5 y 13.5 x 10³ (Hatefi y Galante, 1980; figura 22). Al tratar el complejo II con caótropos (1 M NaClO₄) se extrae la enzima hidrofílica succinato deshidrogenasa (SDH), la cual es soluble en agua. La SDH tiene dos subunidades de Mr 70 y 27 x 10³ (Hatefi y Hanstein, 1974), además de una flavina FAD covalentemente unida, 7-8 átomos grammo de Fe y 7-8 moles de sulfuro lábil a ácidos (S²⁻). La separación de las dos subunidades mostró que la subunidad mayor contiene el FAD más 4 equivalentes de Fe y S²⁻, mientras que la subunidad menor tiene 3 Fe y 3 S²⁻ por mol (Davis y Hatefi, 1971).

Las preparaciones de SDH contienen una ferroflavoproteína (FP) de Mr de 60-70 x 10³ y una hierroproteína (IP) de Mr de 25-30 x 10³.

El complejo II también presenta un citocromo de tipo b en cantidades equimoleculares al FAD. Este citocromo b es diferente de los citocromos b del complejo III (Davis y col., 1973). Esta diferencia parece deberse a que el citocromo b del complejo II se codifica en el DNA citoplasmático mientras que los citocromos b del complejo III se codifican en el DNA mitocondrial (Weiss y Kolb, 1979).

El citocromo b del complejo II de res se ha purificado de preparaciones compuestas por dos polipéptidos de Mr 15.5 (CII-3) y 13.5 (CII-4) x 10³ (Hatefi y Galante, 1980). El polipéptido

hidrofóbico CII-3, el cual es necesario para la actividad de Q reductasa del complejo II y que probablemente contiene el hemo b560, parece que atraviesa la membrana interna de la mitocondria ya que es accesible a modificadores de proteína que son impermeables desde el lado del citosol (Girdlestone y col., 1981).

La liberación de la SDH por caótipos de la membrana puede hacerse reversible por iones que estructuren el agua (sulfato o fosfato), y el efecto del D₂O contra el H₂O en este equilibrio de separación y reconstitución indica que la interacción de la SDH con la membrana es de naturaleza hidrofóbica (Hatefi y Hanstein, 1974). Esta interacción de la membrana ocurre por la subunidad IP (Girdlestone y col., 1981).

Propiedades espectrales de absorción de luz y de ESR del complejo II y de la SDH

Los cromóforos del complejo II son los citocromos b560, el FAD y los tres racimos Fe-S. El b560 reducido absorbe a 560 (α), 526 (β) y a 424 (Soret) nm a temperatura ambiente (Hatefi y Galante, 1980). El FAD y los racimos FeS oxidados absorben luz visible entre 400 y 550 nm con máximos a 450 nm por el FAD y a 420 nm por los racimos FeS (Hatefi y Stiggall, 1976).

Se ha sugerido a partir de estudios de ESR que la SDH tiene dos racimos FeS binucleares y uno tetranuclear, designados como S-1, S-2 y S-3 (Beinert y Albracht, 1982). El racimo S-1 tiene una señal de ESR con una $g = 1.93$ y un E_m aparente de alrededor de 0 mV. S-3 es un racimo de tipo HiPIP, es paramagnético en el estado

oxidado y tiene una señal de ESR con una $g = 2.0$ con un E_m aparente de + 65 mV en el complejo II y de + 120 mV en la mitocondria (Ohnishi y Salerno, 1982). El racimo S-3 es estable en la SDH unida a membrana, pero en la SDH soluble es sensible al oxígeno y su señal de ESR se deteriora paralelamente con la pérdida de la reconstitución y una actividad baja con el ferricianuro de la enzima. Los racimos S-1 y S-3 de la SDH son equimolares con el FAD (65). El racimo S-2 se considera como un racimo binuclear con un E_m aparente de - 400 mV en la SDH aislada y con -260 mV en las partículas (Ohnishi y Salerno , 1982).

Se ha propuesto que la subunidad FP de la SDH contiene los dos racimos binucleares S-1 y S-2, y que la subunidad IP el S-3 (65). Sin embargo, aún no hay evidencias directas de esta distribución.

Como en el fragmento FP del complejo I, la actividad catalítica de la SDH es ensayable sólo en presencia de aceptores artificiales de electrones, y sólo en asociación con otros polipéptidos mitocondriales la SDH puede expresar una actividad fisiológica (Hatefi, 1985).

Propiedades catalíticas y mecanismo de acción del complejo II y de la SDH

El complejo II cataliza la transferencia de electrones del succinato a la ubiquinona (UQ) y a colorantes artificiales como son el ferricianuro y la fenazina metosulfato (PMS). La actividad de Q reductasa del complejo II se inhibe por 2-tenoiltrifluoroacetona (TTFA) (Hatefi y Stiggall, 1976). La SDH aislada también reacciona con los colorantes citados

anteriormente pero no con la quinona.

Las preparaciones de SDH presentan dos clases de propiedades catalíticas: una es la actividad de succinato-reductasa de un colorante y la otra es esta actividad pero con un aceptor de electrones natural (probablemente el citocromo b₅₆₀) en la cadena respiratoria. (Hatefi, 1985). La primera actividad es mucho más estable que la última y la presentan preparaciones de SDH con menos del 50% de su contenido original de Fe y S⁻² (Singer, 1966).

Los colorantes comunmente usados para medir la actividad reductasa son el ferricianuro o el PMS; éste último en presencia del 2,6, diclorofenolindofenol (DCPIP) como aceptor de electrones del PMS, el cual se oxida muy fácilmente.

La actividad de la SDH para transferir electrones a su aceptor natural es estable cuando la enzima se encuentra unida a la membrana, pero la SDH aislada se deteriora rápidamente en condiciones aeróbicas (Hatefi y Stiggall, 1976).

La SDH pura presenta una actividad de ubiquinona reductasa baja, lo cual indica que el complejo se ha separado. Sin embargo, la actividad de PMS reductasa no cambia ya que el complejo II unido y la SDH deshidrogenasa soluble tienen la misma actividad de PMS reductasa.

Las preparaciones del complejo II catalizan la oxidación del succinato por el PMS o por la ubiquinona a una velocidad máxima de cerca de 45-55 μ moles/min/mg de proteína a 38 °C (Hatefi y Stiggall, 1976).

iii) UBIQUINOL:CITOCROMO c OXIDOREDUCTASA (COMPLEJO III)

Composición y estructura.

La enzima se compone de 9-10 polipéptidos diferentes, tres de los cuales se asocian con centros redox: los hemos b₅₆₂, b₅₆₆ y c₁ y un racimo [2Fe-2S] conocido como centro de Rieske. Además también se encuentran presentes dos especies de ubisemiquinona en dos dominios separados del complejo III (Ohnishi y Trumpower, 1980).

El complejo III mitocondrial tiene dos citocromos b (b₅₆₂ y b₅₆₆) cuyas propiedades espectrales son diferentes (Redy y Hendler, 1983); sin embargo, las preparaciones puras sólo presentan el espectro del citocromo b₅₆₆ (Tsai y Palmer, 1982). El espectro del citocromo b₅₆₆ también se pierde y sólo se observa el del b₅₆₂ cuando se pone en contacto al complejo III con detergentes o caótopos (Davis y col., 1973).

Se considera que los hemos tipo b se encuentran asociados con un sólo polipéptido hidrofóbico (Sarastre, 1984), una proteína de 42 Kda la que puede formar de 8 a 9 dominios hidrofóbicos que atraviesan la membrana (Widger y col., 1984). Los dos hemos se encuentran localizados en un plano perpendicular a la membrana con el b₅₆₆ cerca del citosol y el b₅₆₂ cerca de la matriz (Widger y col., 1984; figura 23).

El citocromo c₁ en forma pura es soluble en agua y esta formado por dos polipéptidos diferentes (King, 1983). La proteína más grande se compone de 241 aminoácidos y el hemo se une

covalentemente cerca de su amino terminal a dos residuos de cisteína. El peso molecular de esta proteína y el hemo es de cerca de 28 Kda. El citocromo c₁ de corazón de res se caracteriza por contener un estrecho ininterrumpido de 15 residuos, no cargados cerca del carboxilo terminal. Este estrecho se ha considerado que ancla la subunidad a la membrana.

Hay otras dos subunidades pequeñas (de 9.2 y 7.2 kDa) que se asocian estructuralmente con el citocromo c₁. La proteína de 9.2 kDa media la interacción entre el citocromo c y el c₁ y por ello se le ha llamado la proteína "bisagra" (King, 1983). Sin embargo, otros autores no han encontrado que sea necesaria una subunidad pequeña para la formación del complejo entre el citocromo c₁ y el c (Königs y col., 1981).

La subunidad Fe-S

Hasta ahora sólo se ha determinado la estructura primaria de la proteína Fe-S de la citocromo reductasa de *Neurospora*. Esta proteína tiene un peso molecular promedio de 21,600 cuya secuencia se caracteriza por tener un dominio pequeño hidrofílico N-terminal de 29 residuos, separado por un segmento hidrofóbico de 25 residuos de un dominio grande hidrofílico C-terminal de 145 residuos. Las 4 cisteínas únicas que parecen unirse al racimo de Fe-S se localizan en una región ligeramente hidrofóbica del dominio grande hidrofílico. Están arregladas en dos pares, un par separado por 4 residuos incluyendo una histidina, mientras que el

otro par está separado sólo por una prolina (Harnisch y col., 1985). La subunidad Fe-S de mitocondrias de *Neurospora* es una proteína amfifílica como el citocromo c₁.

Propiedades catalíticas y mecanismo de acción del complejo III.

El complejo III cataliza la transferencia de electrones del ubiquinol al citocromo c; se han reportado números de recambio de 2.5 a $4 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ a 38°C y pH 8.0 usando el ubiquinol-2 como sustrato (Rieske, 1976) para la enzima. El complejo III de mamíferos puede oxidar al duroquinol y el menaquinol (Kröger & Klingenberg, 1973; Zhu y col., 1982), y reducir a varios citocromos de tipo c (Davis y col., 1972). El complejo III se recombina estequiométricamente con los complejos I, II y IV en presencia del citocromo c, para reconstituir la cadena respiratoria (Hatefi y col., 1962).

La transferencia de electrones a través del complejo III está acoplada a la translocación de protones transmembranal con una estequiometría de H^+/e^- de 2 (Wikström y col., 1981). El mecanismo por el cual el complejo del citocromo bc₁ acopla la transferencia de electrones a la translocación de protones es la fuerza protonmotriz del ciclo Q (Mitchell, 1976). A continuación se detalla en que consiste este mecanismo.

El complejo del citocromo bc₁ contiene tres proteínas que transfieren electrones: el citocromo b que posee dos grupos hemo b, no unidos covalentemente a través de residuos de bis histidina

(Carter y col., 1981), el citocromo c_1 , el cual presenta un hemo del grupo c unido covalentemente a la proteína por uniones tiol éter a cisteínas (Yu y col., 1975), y una proteína Fe-S, la cual tiene un racimo $2Fe:2S$ unido de manera no covalente a la proteína por dos cisteínas y dos histidinas (Gurbiel y col., 1989). El complejo del citocromo bc_1 mitocondrial tiene varios polipéptidos que carecen de grupos prostéticos redox. En la figura 24 se muestra el modelo que Trumpower ha propuesto para la fuerza protonmotriz del ciclo Q del complejo. El citocromo b es una proteína transmembranal (Beattie y col., 1981). Los dos grupos hemo del citocromo b forman un circuito eléctrico a través de la membrana, y un potencial de membrana aplicado mueve un e^- desde un hemo hasta el otro (West y col., 1988).

El potencial del hemo b-560 es de aproximadamente 60-120 mV más positivo que el del hemo b-566 en todos los complejos de citocromo bc_1 hasta ahora caracterizados (Trumpower, 1990). Este aumento en el potencial facilita la transferencia de electrones del hemo b-566 al de b-560.

El citocromo c_1 y la proteína Fe-S se localizan en el lado electropositivo P de la membrana interna de la mitocondria (Trumpower, 1990a). El citocromo c_1 está embebido en el complejo bc_1 con la región del hemo localizada en la superficie de la membrana (Li y col., 1981a). La proteína Fe-S se mantiene en la superficie del complejo bc_1 por interacciones hidrofóbicas (Li y col., 1981b) y puede eliminarse reversiblemente del complejo con detergente (Trumpower & Edwards, 1979).

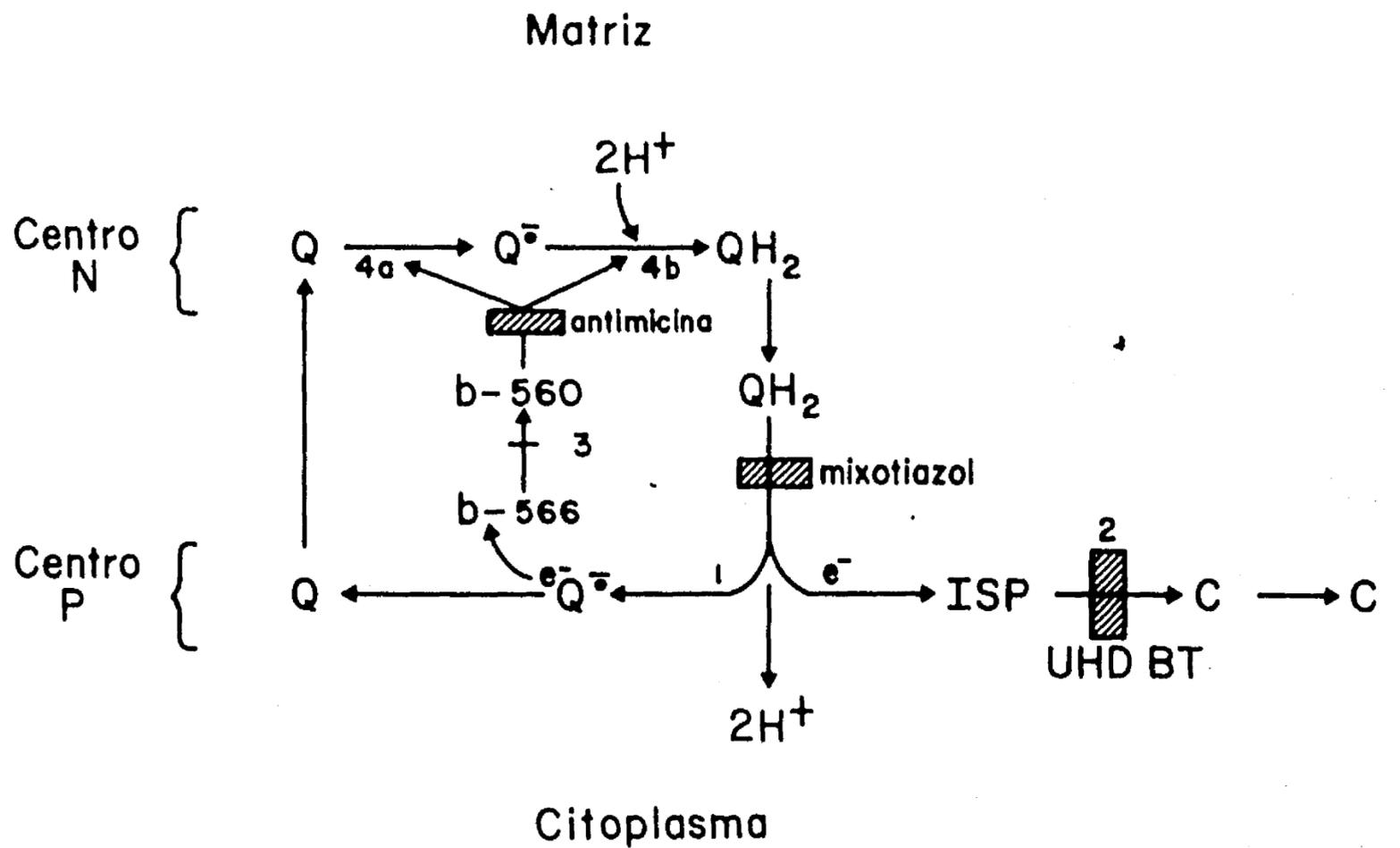


Figura 24. Mecanismo del ciclo Q de la fuerza electromotriz de la transferencia de electrones y la translocación de protones en el complejo bc₁. En 1 el ubiquinol (QH₂) se oxida y un electrón (e⁻) se transfiere a la proteína Fe-S (ISP) generándose un anión de ubisemiquinona de bajo potencial (Q⁻), el que reduce al hemo b₅₆₆ liberándose dos H⁺. En el paso 2 el e⁻ transferido a la proteína Fe-S se transfiere al citocromo c₁ y luego al citocromo c. En el paso 3 el e⁻ transferido al hemo b₅₆₆ se transfiere en contra de un potencial de membrana interno a través de la membrana del hemo b₅₆₆ al hemo b₅₆₀. Cuando b₅₆₀ se reduce nuevamente, el b₅₆₀ reduce al anión de ubisemiquinona a QH₂ (paso 4b). La reducción del anión de ubisemiquinona al QH₂ en el centro N consumo 2 H⁺. Los inhibidores como el mixotiazol, el UHDBT y la antimicina bloquean las reacciones de transferencia dentro del complejo como se indica en la figura.

Mecanismo del ciclo Q de la fuerza protónmotriz

El ciclo Q de la fuerza protónmotriz se muestra en la figura 24, describe la trayectoria de la transferencia de electrones entre los grupos prostéticos redox del complejo del citocromo bc₁ y explica la interconexión entre la translocación de protones y la transferencia de electrones. En el paso 1 del ciclo Q el ubiquinol (QH₂) se oxida en el centro P en una reacción concertada en la cual un e⁻ se transfiere a la proteína Fe-S (ISP) para formar un anión de ubisemiquinona (Q⁻_p), el cual reduce inmediatamente al hemo b-566. Esta oxidación deposita dos protones en el lado positivo de la membrana.

Por consiguiente, los dos electrones que provienen del ubiquinol divergen en el centro P. Uno de ellos se transfiere a la proteína de Fe-S. En el paso 2 este electrón se transfiere al citocromo c₁ y luego al citocromo c. El segundo electrón del ubiquinol, donado desde Q⁻_p a b-566, recicla a través del complejo bc₁ ya que es transferido desde el hemo b-566 de bajo potencial hasta el hemo b-560 de potencial mayor (figura 24, paso 3). El citocromo b-560 entonces reduce a la ubiquinona (Q) al anión de ubisemiquinona (Q⁻_p) en el centro N (figura 24, paso 4a).

Hasta este paso el ciclo Q aún no se completa ya que sólo un electrón del ubiquinol se ha transferido al citocromo c. Este "ciclo a medias" deposita dos protones en el lado P de la membrana, mientras que el segundo electrón del ubiquinol reside transitoriamente en el anión de ubisemiquinona en el centro N

($Q_{\cdot n}^-$).

Una segunda molécula de ubiquinol se oxida posteriormente por la proteína Fe-S, transfiriendo un electrón al citocromo c₁ para reducir una segunda molécula de citocromo c, con lo cual se forma otra vez el anión de ubisemiquinona $Q_{\cdot p}^-$ y se depositan dos protones más en el lado P de la membrana. $Q_{\cdot p}^-$ reacciona por la misma trayectoria, donando un electrón a b-566 y b-560. El citocromo b-560 entonces reduce el anión de ubisemiquinona estable ($Q_{\cdot n}^-$) previamente formado a ubiquinol en el centro N, lo cual consume dos protones desde el lado negativo de la membrana y completando el ciclo Q (figura 24, paso 4b).

Durante un ciclo Q se oxidan dos moléculas de ubiquinol a ubiquinona, pero una molécula de ubiquinol se regenera por la reducción de una de estas ubiquinonas. Un ciclo Q completo requiere que la proteína Fe-S, el citocromo c y los dos hemos del citocromo b lleven a cabo dos "números de recambio redox", duplicando los pasos 1, 2 y 3. En el curso de un ciclo Q el citocromo b-560 reduce alternativamente a la ubiquinona al anión de ubisemiquinona (paso 4a) y a éste último a ubiquinol (paso 4b).

Como resultado de la oxidación siguiente de un ubiquinol, se reducen dos moléculas de citocromo c, $4 H^+$ se liberan en el lado positivo de la membrana en coincidencia con las dos oxidaciones divergentes del centro P, y dos H^+ se consumen en el lado negativo de la membrana conforme b-560 reduce a la ubiquinona a ubiquinol.

Evidencia experimental del ciclo Q de la fuerza protónmotriz

El ciclo Q de la fuerza protónmotriz explica la estequiometría de la translocación de H^+ en el complejo bc_1 y también como el citocromo b-566, el cual tiene un potencial de oxido-reducción más negativo que el par Q/QH₂, puede participar en la oxidación del ubiquinol. El ciclo Q también explica el fenómeno conocido como "reducción que induce la oxidación del citocromo b".

Chance descubrió en 1974 que cuando se aplicaba un pulso de oxígeno a mitocondrias que respiraban lentamente se observaba la oxidación de los citocromos c y c_1 además de una reducción transitoria de los citocromos b. Esta reducción inducida por oxidación del citocromo b involucra a los dos citocromos b, y la reducción del citocromo b se incrementa en presencia de antimicina (Chance, 1974). Ningún esquema lineal podría explicar este efecto.

Wikström y Berden (1972) explicaron esta reducción del citocromo b inducida por la oxidación al postular que el ubiquinol se oxida de manera divergente por el citocromo c_1 y el citocromo b. Mitchell (1976, 1975) propuso el ciclo Q de la fuerza protónmotriz e incorporó la oxidación divergente del ubiquinol. En el ciclo Q, la oxidación del citocromo c genera la oxidación secuencial del citocromo c_1 y de la proteína Fe-S (Figura 24). La última a su vez oxida al ubiquinol y genera un reductor Q_{-p} , para el citocromo b. Un aumento en la velocidad de oxidación del

citocromo c conduce a un aumento transitorio de la reducción de b, como consecuencia del aumento en la velocidad de formación de Q_p^- .

La antimicina inhibe la reducción de la ubiquinona y del anión de ubisemiquinona por el citocromo b-560 en el centro N (paso 4a y 4b en la figura 24). La rápida formación de Q_p^- por la oxidación del citocromo c + c₁ y la proteína Fe-S, transfiere electrones a los hemos b-566 y b-560, donde se quedan atrapados debido a la presencia de la antimicina (Wikström y Berden, 1972). En ausencia de la antimicina, este fenómeno es transitorio ya que el citocromo b se reoxida por el ubiquinol y el anión de ubisemiquinona en el centro N.

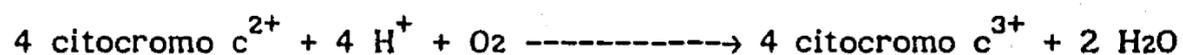
Una característica única del ciclo Q de la fuerza protónmotriz es la existencia de dos trayectorias para la reducción del citocromo b (figura 23). Hay otras evidencias de la existencia de este ciclo. Von Jagow y colaboradores (1984) mostraron como el mixotiazol y la estigmatelina inhibían la reducción del citocromo b en el centro P. Cuando sólo se añade el mixotiazol, éste bloquea la reducción del citocromo c₁ en el paso 1 (figura 24) pero no bloquea la reducción del citocromo b, lo cual ocurre por la reversión de los pasos 4b y 4a en el centro N (figura 24), bajos las condiciones de estado pre-estacionario del experimento. Cuando el mixotiazol se agrega junto con la antimicina, el mixotiazol bloquea la reducción de los dos citocromos b y de c₁ (Von Jagow y col., 1984). De esta manera el mixotiazol mimetiza el efecto que produce la eliminación de la proteína Fe-S del

complejo bc₁.

Otro análogos de la ubiquinona, como son los alquilhidroxi-benzotiazoles (UHDBT), también inhiben la transferencia de electrones en el centro P pero por un mecanismo diferente. El UHDBT se une a la proteína Fe-S o en la interfase entre el citocromo b y la proteína Fe-S reducida (Bowyer y col., 1982). Esto aumenta el potencial de media onda de membrana de la proteína Fe-S aproximadamente por 90 mV e impide la transferencia de electrones del racimo Fe-S al citocromo c₁ (Bowyer y col., 1982; Matsuura y col., 1983).

iv) CITOCROMO OXIDASA

La citocromo oxidasa es la enzima terminal de la cadena respiratoria y a partir de su reducción por el citocromo c cataliza la reducción del oxígeno molecular a agua. La reducción de la enzima ocurre en el lado citosólico de la membrana interna de la mitocondria, mientras que los protones que se consumen en la reducción del oxígeno provienen de la matriz. De esta manera, la citocromo oxidasa es una bomba de protones electrogénica capaz de transportar hasta 4 protones desde la matriz al citosol por cada molécula de oxígeno reducida. La reacción que cataliza es la siguiente:



La citocromo oxidasa de mamíferos es una proteína compuesta de varias subunidades con un total de 13 polipéptidos. La transferencia de electrones así como el bombeo de protones está asociada con las dos subunidades más pesadas (I y II).

Actualmente se reconoce que la citocromo oxidasa de eucariontes contiene cuatro grupos prostéticos, los dos hemos a y a₃, y los dos átomos de cobre, Cu_A y Cu_B. La unidad funcional más pequeña de la citocromo oxidasa contiene además de estos cuatro centros metálicos otros cuya función no se conoce: un zinc y un ión magnesio fuertemente unidos (Einarsdóttir y Caughey, 1985), y un ión cobre (Steffens y col., 1987).

Los aceptores de electrones de la enzima son los dos hemos y los

dos átomos de Cu.

La transferencia de electrones a través de la citocromo oxidasa es un proceso exergónico, y la energía que se libera se conserva como un gradiente de protones en la membrana interna de la mitocondria, la que se utiliza para el transporte de iones o en la síntesis de ATP (Capaldi y col., 1983).

Tamaño y forma de la citocromo oxidasa de corazón de res

La citocromo oxidasa de corazón de res es la citocromo oxidasa mejor caracterizada. Se han aislado cristales en dos dimensiones para estudios de microscopía electrónica y reconstrucción de imágenes (Fuller y col., 1982). Se han obtenido dos formas cristalinas diferentes. En una de ellas la enzima es un dímero que se inserta en la bicapa de lípidos (Henderson y col., 1977). En la otra forma cristalina, la enzima es un monómero que se arregla en hojas ricas en detergente sin que se encuentre presente una bicapa (Fuller y col., 1982).

La estructura de baja resolución de las dos formas cristalinas de citocromo oxidasa muestra que esta tiene una forma de Y (figura 22). Un dominio de gran tamaño se extiende 55 Å de la superficie de la membrana hacia el citosol. Este dominio (C) es mayor en la superficie de la membrana y se separa en dos subdominios diferentes del mismo tamaño, terminando en un subdominio más pequeño. Por otra parte, los dominios M₁ y M₂ se separan cerca de la membrana interna de la mitocondria y cada uno de ellos se expande en la bicapa, para prolongarse cerca de 20 Å en la matriz

(Capaldi y col., 1987). El dominio M no se ha observado en los cristales sino que se ha inferido su presencia a partir de experimentos con anticuerpos (Frey y col., 1978) y con marcadores (Capaldi y col., 1987).

Probablemente la citocromo oxidasa sea un dímero en la membrana interna de la mitocondria, cuyo contacto se establece por los dominios C (Deatherage y col., 1982).

Estado de agregación

El estado de agregación de la citocromo oxidasa pura depende del detergente que se utiliza para dispersarla, del pH, de la concentración de sal, y varía dependiendo del origen de la enzima. La citocromo oxidasa de corazón de res es dimerica (Robinson y Capaldi, 1977), pero puede convertirse a la forma monomérica por incubación a pH alto (> 8.5), con altas concentraciones de sal y en presencia de altas concentraciones de Tritón X-100 (Georgevich y col., 1983).

Papel de los lípidos

La citocromo oxidasa se encuentra fuertemente asociada con la membrana (Mitchell, 1966). Por resonancia magnética nuclear de alta resolución de ^{31}P se encontró que 130 moléculas de fosfolípidos se encuentran unidas a la enzima de corazón de res (aproximadamente 11 cardiolipinas, 54 fosfatidiletanolaminas y 64 fosfatidilcolinas). La cardiolipina es esencial para la actividad

catalítica de esta enzima. La eliminación de la cardiolipina de la enzima desaparece la fase cinética de baja afinidad de la actividad (Vik y col., 1981). Lo anterior comprueba que la cardiolipina participa en el sitio de unión de baja afinidad del citocromo c (Robinson y Capaldi, 1977).

Cinética

La reacción de la transferencia de electrones de la citocromo oxidasa puede medirse por la oxidación del citocromo c espectrofotométricamente o midiendo la captación de oxígeno, por el método polarográfico. Hasta ahora se han realizado numerosos estudios con la enzima unida a la membrana en forma de partículas, soluble a través de detergentes, o con la enzima reconstituida. Sin embargo, aún no existe un acuerdo general sobre el mecanismo de reacción.

A pesar de que la velocidad inicial depende de la concentración del citocromo c, la constante de velocidad de primer orden disminuye de manera no lineal al aumentar la concentración del citocromo c (Errede y Kamen, 1978).

Otro problema no resuelto es el valor diferente de la K_m de la citocromo oxidasa que se observa a diferentes concentraciones de citocromo c (Mochan y Nicholls, 1972). A baja fuerza iónica se observa una cinética de dos fases (Ferguson-Miller y col., 1978), obteniéndose las constantes de Michaelis de 2×10^8 M y 10^{-6} M para las fases de alta y baja afinidad, respectivamente. De estos

resultados los autores propusieron dos sitios catalíticos para el citocromo c en la citocromo oxidasa. Sin embargo, Antalis y Palmer (1982) presentaron un modelo cinético que involucra dos pasos en la transferencia de electrones en un sólo sitio para el citocromo c. Este modelo se ha visto apoyado por el mapeo del dominio del citocromo c que participa en la unión (Veerman y col., 1983).

Si la cinética de la citocromo oxidasa se mide por espectrofotometría o polarografía en las mismas condiciones (excepto por la adición de ascorbato y TMPD en el último caso), se obtienen resultados diferentes. Se supone que en el ensayo espectrofotométrico la disociación del citocromo c de la enzima representa el paso limitante (Smith y col., 1979). En el ensayo polarográfico se obtienen velocidades mayores lo cual se ha explicado por la formación de un agregado de citocromo c-citocromo oxidasa que se puede reducir repetidamente por el TMPD antes de que se disocie (Ferguson-Miller y col., 1978).

Según Myers y Palmer (1988) los dos fenómenos de estado estacionario que presenta la citocromo oxidasa se deben poder explicar por cualquier mecanismo que se postule. El primero es la cinética de la oxidación del citocromo c que es de primer orden aún a concentraciones altas de citocromo c; y el segundo, es la naturaleza no hiperbólica de la ecuación cinética que se obtiene en un amplio rango de concentraciones de citocromo c a baja fuerza iónica (Nicholls, 1974).

Estudios recientes han demostrado que la citocromo oxidasa sólo

tiene un sitio de unión para el citocromo c, lo cual implica que la enzima puede presentar dos conformaciones con diferentes afinidades por el sustrato (Malmström, 1990).

Se encuentra bien establecido que la k_{cat} aumenta continuamente al disminuir el pH, mientras que el cociente k_{cat}/K_m permanece constante (Gregory y Ferguson-Miller, 1988). La dependencia del pH de la k_{cat} refleja el efecto del H^+ en la velocidad de los pasos más lentos de toda la reacción, los que deben corresponder con la transferencia intramolecular de electrones o una transición conformacional (Malmström, 1990).

Modelos estructurales

La falta de datos de cristalografía de rayos X de alta resolución ha motivado la construcción de modelos estructurales de las subunidades I y II con base en las predicciones topográficas basadas en análisis evolutivos, y en las propiedades de los centros redox (Holm y col., 1987). En la estructura propuesta la subunidad II contiene el sitio del CuA. En la subunidad I los tres centros metálicos restantes se encuentran bastante cercanos uno del otro por residuos presentes en tres hélices transmembranales. El citocromo a_3 y el CuB forman una unidad bimetalica, pero el modelo también contempla a los hemo de los citocromos a y a_3 muy cercanos (ver figura 22).

Cambios conformacionales

La citocromo oxidasa puede existir en más de una conformación; por ejemplo, las formas que reaccionan con cianuro a velocidades diferentes, descritas por primera vez por Van Buuren y col. en 1972, o las formas de "reposo" y "pulsada", originalmente diferenciadas por sus números de recambio diferentes (Brunori y col., 1979). El primer intento para escoger, de manera sistemática, los estados conformacionales de la citocromo oxidasa oxidada se llevó a cabo por Brudvig y colaboradores en 1981. Ellos demostraron que el origen de la heterogeneidad se debía principalmente a la existencia de estructuras diferentes del sitio bimetálico del citocromo a₃-C_{ub}.

El factor importante para mantener a la enzima en el estado pulsado es evitar pH's menores a 7.6 durante la purificación (Baker y col., 1987).

La forma lenta es heterogénea, ya que muestra dos fases lentas en la reacción con cianuro (Baker y col., 1987).

Se ha señalado que las dos formas lenta y rápida se encuentran en el estado "cerrado" (Jensen y col., 1984), ya que aún la forma rápida une cianuro lentamente comparada con la conformación "abierta" que se forma después de reducir parcialmente a la enzima.

Los cambios conformacionales de gran escala no son comunes en las proteínas redox, ya que sería poco favorable para una transferencia de electrones rápida. Sin embargo, para una bomba de protones acoplada a procesos redox tales cambios conformacionales ocurren (Malmström, 1985).

Los dos citocromos a y Cua necesitan estar reducidos para convertir la enzima del estado cerrado al estado abierto (Scholes y Malmström, 1986). También se sabe que los cambios conformacionales acoplados a los procesos redox conducen a desplazamientos en los potenciales de los sitios, y estos cambios juegan un papel importante en la dirección del flujo de electrones y su acoplamiento a la translocación de protones (Malmström, 1990).

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Adam, G. y Delbrück, M. (1968) In "Structural Chemistry and Membrane Biology". A.Rich, N.Davidson, eds. Freeman, London. pp 198-215.
- Antalis, T.M. y Palmer, G. (1982) *J.Biol.Chem.* 257, 6194-6206.
- Ayala, G., Nascimiento, A., Gómez Puyou, A. y Darszon, A. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 810. 115-122.
- Ayala, G. Tuena de Gómez Puyou, M., Gómez Puyou, A. y Darszon, A. (1986) *FEBS Lett.* 203 41-43.
- Baker, G.M., Noguchi, M. y Palmer, G. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 595-604.
- Barbaric, S. y Luisi, P.L. (1981) *J. Amer. Chem. Soc.* 103, 4239-4244.
- Beattie, D.S., Clejan, L., Chen, Y., Lin, C.P. y Sidhu, A. (1981) *J. Bioenerg. Biomembr.* 13, 357-372.
- Beinert, H. y Albracht, S.P.J. (1982) *Biochim Biophys. Acta* 683, 245-277.
- Boekema, E.J., Van Heel, M.G. y Van Bruggen, E.F.J. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 787, 19-26.
- Bona, M., Fabian, M. y Sedlák, M. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1020, 94-100.
- Bonner, F.J., Wolf, R. y Luisi, P.L. (1980) *J. Solid Phase Biochem.* 5, 255-258.
- Bonnichsen, R.K., Chance, B. y Theorell, H. (1947) *Acta Chem. Scand.* 1, 685-709.
- Bowyer, J.R., Edwards, C.A., Ohnishi, T. y Trumpower, B.L. (1982)

- J. Biol. Chem 257, 8321-8330.
- Bru, R. Sánchez-Ferrer y García-Carmona, F. (1989) Biochem. J. 259, 355-361.
- Brudvig, G.W., Stevens, T.H., Morse, R.H. y Chan, S.I. (1981) Biochemistry 20, 3912-3921.
- Brunori, M., Colosimo, A., Rainoni, G., Wilson, M.T. y Antonini, E. (1979) J. Biol. Chem. 254, 10, 769-775.
- Capaldi, R.A. (1982) Biochim. Biophys. Acta 694, 291-306.
- Capaldi, R.A. y Hayashi, H. (1972) FEBS Lett. 26, 261-263.
- Capaldi, R.A., Malatesta, F. y Darley-Usmar, U.M. (1983) Biochim. Biophys. Acta 726, 135-148. Capaldi, R.A., Takamiya, S., Zhang, Y., González-Halphen, D. y Yanamura, W. Current Topics in Bioenergetics 15, 91-112.
- Carter, K.R., Tsai, A. y Palmer, G. (1981) FEBS Lett. 132, 243-246.
- Clegg, J.S. (1984) J. Cell Biol. 99, 167-171s.
- Clegg, J.S. (1986) Methods Enzymol. 127, 230-239.
- Contreras, M. y Escamilla, E. (1991) Germination and respiration of *Bacillus cereus* spore in organic solvents. Biophys. J. 59, 518a.
- Cooke, R. y Kuntz, I.D. (1974) Annu. Rev. Biochem. 43, 95-126.
- Chance, B. (1974) in Dynamics of Energy-transducing Membranes (Ernster, L. Estabrook, K.W. y Slater, E.C. eds.) pp 553-578. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.
- Chatenay, D., Urbach, W., Cazbat, A.M., Vacher, M. y Waks, M. (1985) Phys. Rev. Lett. 54, 2253-2256.

- Chazotte, B. y Hackenbrock, C.R. (1988) In "Integration of mitochondrial function". (John J. Lemasters, C.R. Hackenbrock, R.G. Thurman y H.V. Westerhoff, eds.) Plenum Press, N.Y. pp 53-61.
- Crane, F.L. y Barr, R. (1978) *Methods Enzymol.* 18c 137-140.
- Darszon, A., Phillip, M., Zarco, J. y Montal, M. (1978) *J. Memb. Biol.* 43, 71-90.
- Darszon, A., Strasser, R. y Montal, M. (1979) *Biochemistry* 18, 5205-5213.
- Darszon, A., Escamilla, E., Gómez Puyou, A. y Tuena de Gómez Puyou, M. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151, 1074-1080.
- David, G.G., Morris, D.F.C. y Short, E.L. (1981) *J. Colloid Interface Sci.* 92, 226-232.
- Davis, K.A. y Hatefi, Y. (1971) *Biochemistry* 10, 2509-2516.
- Davis, K.A., Hatefi, Y., Salemme, F.R. y Kamen, M.D. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49, 1329-1335.
- Davis, K.A., Hatefi, Y., Poff, K.L. y Butler, W.L. (1973) *Biochim Biophys. Acta* 325, 341-356.
- Dawson, R.M.C., Elliot, D.C., Elliot, W.H. y Jones, K.M. (1969) *Data for Biochemical Research.* Oxford Uni. Press, London. pp 485.
- Deatherage, J.F., Henderson, R. y Capaldi, R.A. (1982) *J. Mol. Biol.* 158, 487-499.
- Deisseroth, A. y Dounce, A.L. (1970) *Physiol. Rev.* 50, 319-375.
- Delahodde, A., Vacher, M., Nicot, C. y Waks, M. (1984) *FEBS Lett.* 172, 343-347.
- Dickens, F. y McIlwain, H. (1938) *Biochem. J.* 32, 1615-1625.
- Dooljewaard, G. y Slater, E.C. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 440,

1-15.

Dooijewaard, G., De Bruin, G.J.M., Van Dijk, P.J. y Slater, E.C. (1978) *Biochim. Biophys. Acta.* 501, 458-469.

Douzou, P. (1980) *Adv. Enzymol.* 51, 1-74.

Drost-Hansen, W. (1971) *Fed. Proc.* 30, 1539-1545.

Drost-Hansen, W. (1973) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 204, 100-113.

Drost-Hansen, W. y Clegg, J.S. (1979) *Cell associated water* (Academic Press, N.Y.).

Eicke, H.F. y Shepherd, J.C.W. y Steinmann, A. (1976) *J. Colloid Interface Sci.* 56, 168-176.

Eicke, H.F. y Zulauf, M. (1979) *J. Phys. Chem.* 83, 480-486.

Einarsdóttir, O. y Caughey, W.S. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 129, 840-847.

Ekwall, P., Mandell, L. y Fontell, K. (1970) *J. Colloid Interface Sci.* 33, 215-219.

Erecinska, M. y Wilson, D.F. (1982) *J. Membr. Biol.* 70, 1-14.

Eremin, A.N., Savenkova, M.I. y Metelitsa, D.I. (1986) *Bioorg. Khim.* 12, 606-612.

Erjomin, A.N. y Metelitsa, D.I. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 732, 377-386.

Escamilla, E., Ayala, G., Tuena de Gómez Puyou, M., Gómez Puyou, A., Millán, L. y Darszon, A. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* 272, 332-343.

Escobar, L., Salvador, C., Contreras, M. y Escamilla, E. (1990) *Anal. Biochem.* 184, 139-144.

Fendler, J.H. (1982) *Membrane Mimetic Chemistry* (John Wiley and Sons, N.Y.)

- Ferguson-Miller, S., Brautigan, D.L. y Margoliasch, E. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 149-159.
- Fischer, K. (1962) in *Text Book of Quantitative Inorganic Analysis* (Vogel, A.I., ed.) Longmans, London pp. 944-949.
- Fleischer, S., Brierley, G. y Klouwen, H. (1961) *J. Biol. Chem.* 236, 2936-2941.
- Fletcher, P.D.I., Howe, A.M., Perins, N.M., Robinson, B.H., Toprakcioglu, C. y Dore, J.C. (1984) *Surfactants in Solutions III* (Edited by K.L. Mittal y B. Lindman) pp 1745, Plenum Press, New York.
- Fletcher, P.D.I., Howe, A.M. y Robinson, B.H. (1987) *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I.* 83, 985-1006.
- Frank, S.G. y Zografis, G. (1969) *J. Colloid Interface Sci.* 29, 27-31.
- Frey, T.G., Chan, S.H.P. y Schatz, G. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 4389-4395.
- Fuller, S.D., Capaldi, R.A. y Henderson, R. (1982) *Biochemistry* 21, 2525-2529.
- Galante, Y.M. y Hatefi, Y. (1978) *Methods Enzymol.* 53, 15-21.
- Galante, Y.M. y Hatefi, Y. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 192, 559-568.
- Garza-Ramos, G., Darszon, A., Tuena de Gómez Puyou, M y Gómez Puyou, A. (1989) *Biochemistry* 28, 3177-3182.
- Garza-Ramos, G., Darszon, A., Tuena de Gómez Puyou, M. y Gómez Puyou, A. (1990) *Biochemistry* 29, 751-757.
- Georgevich, G., Darley-Usmar, V.M. Malatesta, F. y Capaldi, R.A.

(1983) *Biochemistry* 22, 1317-1322.

Girdlestone, J., Bisson, R. y Capaldi, R.A. (1981) *Biochemistry* 20, 152-156.

Goldstein, D. (1968) *Anal. Biochem.* 24, 431-437.

Grandi, C., Smith, R.E. y Luisi, P.L. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 837-843.

Gurbiel, R.J., Batie, C.J., Sivaraja, M., True, A.E., Fee, J.A.,

Harnisch, U., Weiss, H. y Sebald, W. (1985) *Eur. J. Biochem.* 149, 95-99.

Hackenbrock, C.R., Chazotte, B. y Gupte, S.S. (1986) *J. Bioenerg. Biomemb.* 18, 327-364.

Hackenbrock, C.R. y Hammon, K.M. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 9185-9197.

Häring, G., Luisi, P.L. y Meussdoerffer, F. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 127, 911-915.

Hatefi, Y. (1978) *Methods Enzymol.* 53, 11-14.

Hatefi, Y. y Galante, Y.M. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 5530-5537.

Hatefi, Y., Haavick, A.G. y Griffiths, D.E. (1962) *J. Biol. Chem.* 237, 1676-1680. Hatefi, Y. y Hanstein, W.G. (1973) *Biochemistry* 12, 3515-3522.

Hatefi, Y. y Hanstein, W.G. (1974) *Methods Enzymol.* 31, 770-790.

Hatefi, Y. y Stiggall, D.L. (1976) *The Enzymes*, ed. Boyer, P.D. (Academic Press, N.Y.) Vol. XII, parte C, pp 175-295.

Hatefi, Y. y Stiggall, D.L. (1978) *Methods Enzymol.* 53, 21-26.

Hatefi, Y. (1985) *Ann. Rev. Biochem.* 54, 1015-1069.

Hatefi, Y., Stempel, K.E. y Hanstein, W.G. (1969) 244, 2358-

Henderson, R., Capaldi, R.A. y Leigh, J.S. (1977) *J.Mol.Biol.*

- 112, 631-648.
- Hilhorst, R., Laane, C. y Veeger, C. (1983) FEBS Lett. 159, 225-228.
- Hilhorst, R., Spruijt, R., Laane, C. y Veeger, C. (1984) Eur. J. Biochem. 144, 459-466.
- Hochkoepler, A. y Palmieri, S. (1990) Biotechnol. Bioeng. 36, 672-677.
- Hoffman, B.M. y Ballou, D.P. (1989) Biochemistry 28, 4861-4871.
- Huang, S.G., Korenbrot, N.I. y Stoeckenius, W. (1977) Membr. Biol. 36, 115-136.
- Ioue, A. y Horikoshi, K. (1989) Nature (London) 338, 264-266.
- Jensen, P., Wilson, M.T., Aasa, R. y Malmström, B.G. (1984) Biochem. J. 224, 829-837.
- Kadenbach, B. (1985) J. Bioenerg. Biomembr. 18, 39-54. Kagawa, Y. y Racker, E. (1971) J. Biol. Chem. 246, 5477-5487.
- Kawato, S. y Kinosita, K. (1981) Biophys. J. 36, 277-296.
- Kertes, A.S. y Gutmann, H. (1975) Surf. Coll. Sci. 8, 193-197.
- Khmelnitsky, Y.L., Kabanov, A.V., Klyachko, N.L., Levashov, A.V. y Martinek, K. Enzymatic Catalysis in Reverse Micelles. In Structure and reactivity in reverse micelles. Edited by M.P. Pileni. Elsevier (1989).
- King, T.E. (1978) Methods Enzymol. 53, 181-191.
- King, T.E. (1982) In "Function of Quinones in Energy-conserving Systems". B.L. Trumpower, ed. Academic Press, N.Y. pp. 3-28.
- King, T.E. y Suzuki, H. (1984). In "Biomedical and Clinical Aspects of Coenzyme Q" (K. Folkers y Y. Yamamura, eds.), Vol. 4,

pp. 43-55 Elsevier, Amsterdam.

Klibanov, A.M. (1984) *Science* 224, 1249-1251.

Klibanov, A.M. (1986) *Chemtech.* 16, 354-359.

Kon-No, K. y Kitahara, A. (1970) *J. Colloid Interface Sci.* 33, 124-128.

Konigs, B.W., Wilms, J. y Van Gelder, B.F. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 636, 9-16.

Kornblatt, J.A. y Hui Bon Hoa, G. (1990) *Biochemistry* 29, 9370-9376.

Kröger, A., Klingenberg, M. (1973) *Eur. J. Biochem.* 39, 313-323.

Kumar, V.V., Kumar, C., Raghunathan, P. (1984) *J. Colloid Interface Sci.* 99, 315-323.

Lee, C., Sottocasa, G.L. y Ernster, L. (1967) *Methods Enzymol.* 10, 35-37. Lemasters, J.J. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 1058-3063.

Lenaz, G., Fato, R., Castelluccio, C., Esposti, M.D., Samworth, C.M., Battino, M. y Castelli, G.P. (1988) In "Integration of mitochondrial function (John J. Lemasters, C.R. Hackenbrock, R.G. Thurman y H.V. Westerhoff, eds.) Plenum Press, N.Y. pp. 33-52.

Lenaz, G. y Parenti-Castelli, G. (1984) *Drugs Exp. Clin. Res.* 10, 481-490.

Lenaz, G. y Parenti-Castelli, G. (1985) In "Structure and Properties of Cell Membranes", Gh.Benga, ed. vol.1, CRC Press, Boca Raton, FL. pp 93-136.

Leser, M.E., Wei, G., Luisi, P.L. y Maestro, M. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135, 629-633.

Li, Y., Leonard, K. y Weiss, H. (1981) *Eur. J. Biochem.* 116, 199-205.

- Li, Y., De Vries, S., Leonard, K. y Weiss, H. (1981) FEBS Lett. 135, 277-280.
- Lindman, B., Stilbs, P. y Moseley, M.E. (1981) J. Colloid. Interface Sci. 83, 569-582.
- Little, R.C. (1970) J. Phys. Chem. 74, 1817-1818.
- Löw, H. y Vallin, I. (1963) Biochem. Biophys. Acta 69, 361-374.
- Luisi, P.L., Bonner, F.J., Pellegrini, A., Wiget, P. y Wolf, R. (1979) Helv. Chim. Acta 62, 740-745.
- Luis, P.L. y Magid, L.J. (1986) Crit. Rev. Biochem. 20, 409-474.
- Luisi, P.L. y Steinmann-Hofmann, B. (1987) Methods Enzymol. 136, 188-216.
- Luisi, P.L., Giomini, M., Pileni, M.P. y Robinson, B.H. (1988) Biochim. Biophys. Acta 947, 209-246.
- Malmström, B.G. (1990) Arch. Biochem. Biophys. 280, 233-241.
- Martinek, K., Levashov, A.V., Klyachko, N.L., Pantin, V.I. y Berezin, I.V. (1981) Biochim. Biophys. Acta 657, 277-294.
- Martinek, K., Levashov, A.V., Klyachko, N.L., Khmel'nitski, Y.L. y Berezin, I.V. (1986) Eur. J. Biochem. 155, 453-468.
- Meier, P. y Luisi, P.L. (1980) J. Solid Phase Biochem. 5, 269-282.
- Menger, F.M. y Yamada, K. (1979) J. Am. Chem. Soc. 101, 6731-6734.
- Menger, F.M. y Saito, G. (1978) J. Am. Chem. Soc. 100, 4376-4379.
- Mitchell, P. (1966) "Chemiosmotic Coupling in Oxidative and Photosynthetic Phosphorylation". Glynn Research, Bodmin.
- Mitchell, P. (1976) J. Theor. Biol. 62, 327-367.
- Mochan, E. y Nicholls, P. (1972) Biochim. Biophys. Acta 267,

309-319.

O'Coonor, C.J. y Ramage, R.E. (1980) *Aus. J. Chem.* 33, 695-698.

Ohnishi, T. (1987) *Curr. Top. Bioenerg.* 15, 37-65.

Ohnishi, T., Leigh, J.S., Ragan, C.I. y Racker, E. (1974)

Biochem. Biophys. Res. Commun. 56, 775-781.

Ohnishi, T., Ragan, C.I. y Hatefi, Y. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 2782-2788.

Ohnishi, T. y Salerno, J.C. (1982) *Iron-sulfur proteins*, ed. T.G.

Spiro. 4, 285-327. Ohnishi, T. y Trumpower, B.L. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 3278-3284.

Pileni, M.P., y Zemb, Th. y Petit, C. (1985) *Chem. Phys. Lett.* 118, 414-420.

Pfammatter, N., Ayala, G. y Luisi, P.L. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161, 1244-1251.

Poole, P.L. y Finney, J.L. (1986) *Methods Enzymol.* 127, 284-293.

Poon, P.H. y Wells, M.A. (1974) *Biochemistry* 13, 4928-4936.

Ragan, C.I. (1978) *Biochem. J.* 172, 539-547.

Ragan, C.I. (1987) *Curr. Top. Bioenerg.* 15, 1-36.

Ragan, C.I., Ohnishi, T. y Hatefi, Y. (1986). In "Frontiers of Iron-Sulfur Protein Research" (H. Matsubara, Y. Katsube and K. Wada, eds.) pp 220-231 Japan Scientific Societies Press, Tokyo.

Ragan, C.I., Galante, Y.M. y Hatefi, Y. (1982) *Biochemistry* 21, 2518-2524.

Ramakrishnan, V.R., Darszon, A. y Montal, M. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 4857-4860.

Reddy, K.V.S., Hendler, R.W. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 8568-8581.

Rich, P.R. (1984) *Biochim Biophys. Acta* 768, 53-79.

- Rieske, J.S. (1967) *Methods Enzymol.* 10, 488-493.
- Rieske, J.S. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 456, 195-247.
- Robinson, N.C. y Capaldi, R.A. (1977) *Biochemistry* 16, 375-381.
- Sanadi, D.R., Pharo, R.L. y Sordahl, L.A. (1967) *Methods Enzymol.* 10, 297-302.
- Sánchez, L. y Escamilla, E. (1991) Tesis de maestría.
- Sánchez-Ferrer, A., Bru, R. y García-Carmona, F. (1988) *FEBS Lett.* 233, 363-366.
- Saraste, M. (1984) *FEBS Lett.* 166, 307-372.
- Scartazzini, R. y Luisi, P.L. (1988) *J. Phys. Chem.* 92, 829-833.
- Singer, T.P. (1966) *Comprehensive Biochemistry*, ed. M. Florkin, E.H. Stotz, 14, 127-198. Amsterdam, Elsevier.
- Scholes, C.P. y Malmström, B.G. (1986) *FEBS Lett.* 198, 125-129.
- Schönfeld, M., Montal, M. y Feher, G. (1980) *Biochemistry* 19, 1535-1542.
- Sheu, E.Y., Goklen, K.E., Hatton, T.A. y Chen, S.H. (1986) *Biotech. Prog.* 2, 175-179.
- Smith, L., Davies, H.C. y Nava, M.E. (1979) *Biochemistry* 18, 3140-3146.
- Smith, R.E. y Luisi, P.L. (1980) *Helv. Chim. Acta* 63, 2302-2311.
- Sowers, A.E. y Hackenbrock, C.R. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6246-6250.
- Steffens, G.C.M., Biewald, R. y Buse, G. (1987) *Eur. J. Biochem.* 164, 295-300.
- Suzuki, H. y King, T.E. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 352-358.
- Suzuki, H. y Osawa, T. (1984) *Biochem. Internat.* 9, 563-568.

- Suzuki, H. y Ozawa, T. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 138, 1237-1242.
- Thompson, K.F. y Gierasch, L.M. (1984) *J. Am. Chem. Soc.* 106, 3648-3652.
- Tsai, A.L. y Palmer, G. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 681, 484-495.
- Trumpower, B.L. y Edwards, C.A. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 8697-8706.
- Trumpower, B.L. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 11409-11412.
- Van Berkel-Arts, A., Dekker, M., Van Dijk, C., Grande, H.J., Hagen, W.R., Hilhorst, R., Krüse-Wolters, M., Laane, C. y Veeger, C. (1986) *Biochimie* 68, 201-209.
- Van Buuren, K.J.H., Zuurendonk, P.F., Van Gelder, B.F. y Muijsers, A.O. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 256, 243-257.
- Veerman, E.C.J., Wilms, J., Dekker, H.L., Muijsers, A.O., van Biuren, K.J.H., van Gelder, B.F., Osheroff, N., Speck, S.H. y Margoliash, E. (1983) *J. Biol. Chem.* 257, 5739-5745.
- Verhaert, M.D.R., Hilhorst, R., Vermue, M., Schaafsma, T.J. y Veeger, C. (1990a) *Eur. J. Biochem.* 187, 59-72.
- Verhaert, M.D.R., Tyrakowska, B., Hilhorst, R., Schaafsma, T.J. y Veeger, C. (1990b) *Eur. J. Biochem.* 187, 73-79.
- Vik, J.S.B., Georgevich, G. y Capaldi, R.A. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 1456-1460.
- Von Jagow, G., Ljungdahl, P.O., Garf, P., Ohnishi, T. y Trumpower, B.L. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 6318-6326.
- von Jagow, G., Link, T.A. y Ohnishi, T. (1985) *J. Bioenerg.*

Biomem. 18, 157-179 (1986)

Walde, P., Giuliani, A.M., Boicelli, A. y Luisi, P.L. (1990)
Chem. Phys. Lip. 53, 265-288.

Walde, P., Peng, Q., Fadnavis, N.W., Battistel, E. y Luisi, P.L.
(1988) Eur. J. Biochem. 173, 401-409.

Washburn, E.W. (1928) International Critical Tables of Numerical
Data, Physics, Chemistry and Technology, Vol. 3, p.261,
Mc-Graw-Hill, New York/London.

Wells, M.A. (1974) Biochemistry 13, 4937-4941.

Wendlandt, W. W. (1974) Thermal Methods of Analysis. Wiley, N.Y.,
Chichester, Brisbane.

West, I.C., Mitchell, P. y Rich, P.R. (1988) Biochim. Biophys.
Acta 933, 35-41.

Weiss, H. y Kolb, H.J. (1979) Eur. J. Biochem. 99, 139-149.

Widger, W.R., Cramer, W.A., Herrmann, R.G. y Trebst, A. (1984)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 674-678.

Wikström, M.K. y Berden, J.A. (1972) Biochim. Biophys. Acta 283,
403-420.

Wikström, M., Krab, K., Saraste, M. (1981) Ann. Rev. Biochem. 50,
623-655.

Wolf, R. y Luisi, P.L. (1979) Biochim. Biophys. Res. Commun. 89,
209-217.

Wong, W., Thomas, J.K. y Gratzel, M. (1976) J. Am. Chem. Soc. 98,
2391-2395.

Yonetani, T. y Ray, G.S. (1965) J. Biol. Chem. 240, 3392-

Yu, L., Chiang, Y.L., Yu, C.A. y King, T.E. (1975) Biochim.

Biophys. Acta 379, 33-42.

Zale, S.E. y Klibanov, A.M. (1986) Biochemistry 25, 5432-5444.

Zaks, A. y Klibanov, A.M. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82,
3192-3196.

Zaugg, W.S. (1964) J. Biol. Chem. 239, 3964-

Zhu, Q.S., Berden, J.A., De Vries, S., Slater, E.C. (1982)
Biochim. Biophys. Acta 680, 69-79.

On the Application of the Clark Oxygen Electrode to the Study of Enzyme Kinetics in Apolar Solvents: The Catalase Reaction

Laura Escobar,* Carolina Salvador, Martha Contreras, and J. Edgardo Escamilla

*Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70-242, 04510 México, D.F., and *Unidad de Investigación Biomédica, Centro Médico Nacional, Instituto Mexicano del Seguro Social, A.P. 73032, 06760 México, D.F.*

Received June 6, 1989

A method for recording O_2 concentrations in nonconducting organic media with the Clark oxygen electrode was developed. Spontaneous oxidation of $Na_2S_2O_4$ and the enzymatic reduction of $NaBO_3$ or H_2O_2 by bovine liver catalase trapped in hydrated micelles of dioctylsulfosuccinate (AOT)/toluene were used as model systems. O_2 titration with the above systems showed that air-saturated 1.6 M H_2O /0.2 M AOT/toluene media contain seven times more O_2 (1.4 mM) than aqueous solutions (0.2 mM). The measured K_m values of catalase for $NaBO_3$ and H_2O_2 in organic media were $K_{mov} = 15$ and 17 mM, respectively, whereas in aqueous buffer the values were 45 and 54 mM. In the toluene media, catalase activity increased with the W_0 (H_2O /AOT molar ratio) of the micellar preparation, reaching maximal activity at $W_0 = 10-12$; under this condition, the catalytic center activity (K_p) of H_2O_2 was $7 \times 10^6 \text{ min}^{-1}$, similar to that obtained in the aqueous buffer ($H_2O_2 = 7 \times 10^6 \text{ min}^{-1}$). It was found that the optimal pH for catalase in toluene media (pH 8.0) was shifted 1.0 unit compared to that in the aqueous buffer (pH 7.0). On the other hand, catalase was severely inhibited by NaN_3 in both media. Thus, polarography based on the Clark oxygen electrode seems to be an easy, rapid, and sensitive technique for studying enzyme reactions consuming or evolving O_2 in apolar media. © 1990 Academic Press, Inc.

Enzymology in colloidal solutions of water in organic solvents stabilized with amphiphilic compounds has become an attractive research area. The physicochemical properties of the encased aqueous solutions differ from those of bulk water in many respects and depend on the degree of hydration of the micelles (1-3). In these systems it is possible to generate different and well-defined microenvironments which affect the properties of a sequestered enzyme. Kinetic parameters such as the k_{cat}

(4-6), thermostability (7,8), and substrate specificity (9) of the catalyzed reaction may be different from those of the water systems.

Protein-containing colloidal solutions of water in organic solvents are optically transparent; thus, they can be studied by conventional spectroscopic techniques. However, the increasing interest in micellar enzymology is demanding a wider range of quantitative techniques for the recording of enzyme activity in apolar solvents. In this report we describe the application of the Clark oxygen electrode to reactions consuming or evolving oxygen in microheterogeneous systems formed by surfactants in an organic solvent and small quantities of water. The decomposition of $NaBO_3$ or H_2O_2 catalyzed by catalase (EC 1.11.1.6) in hydrated reverse micelles of AOT¹ in toluene was used as a model enzyme reaction.

MATERIALS AND METHODS

Transfer of catalase and chemicals to toluene. Aliquots of 50 μ l containing 120-350 μ g of bovine liver catalase (Sigma, type C-30) in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0 (buffer A), were mixed with 1.0 ml of 0.2 M AOT (Sigma)/toluene solution and sonicated in a bath sonicator for 2 min. The enzyme emulsions obtained were clarified by a gentle stream of N_2 (3-4 min) on the emulsion surface (10). Either $NaBO_3$ or H_2O_2 was used as substrate. In the first case, 100- μ l aliquots with different $NaBO_3$ concentrations in buffer A were mixed with 1.0 ml of surfactant/toluene solution and sonicated as above. The high concentrations required for assay of catalase activity excluded the possibility of obtaining transparent reverse micelle preparations; therefore, $NaBO_3$ emulsions were used as such. On the other hand, H_2O_2 added directly (1-20 μ l) to the organic reaction

¹ Abbreviation used: AOT, dioctylsulfosuccinate.

mixture before the enzyme was rapidly incorporated into the micellar solution of 0.2 M AOT/toluene. For determination of the Michaelis constant, increasing concentrations of NaBO_3 or H_2O_2 were added as constant volumes of water/oil emulsions (NaBO_3 , 500 μl ; to give 5 to 45 mM) or as water solutions (H_2O_2 , 10 μl ; to give 3 to 60 mM). The final volume of the 0.2 M AOT/toluene system with varying water concentrations was 1.7 ml. The final water concentration in assays with NaBO_3 emulsions was 1.6 M (to give a W_0 value of 8–9). In assays with H_2O_2 , the final W_0 was adjusted to the values noted in Table 1 and Figs. 1–4.

Sodium azide (0.1 mM, 100 μl) was transferred to 0.2 M AOT/toluene as described above and used as an emulsion.

The water content of the enzyme/AOT/toluene preparations was determined as follows: 50 μl of catalase (120 μg) in buffer A was mixed with 5 μl of $^3\text{H}_2\text{O}$ (4.75×10^6 cpm ml^{-1}). After the sonication step (see above), the enzyme emulsions contained 1.37×10^6 cpm ml^{-1} . The water content of the transparent solution (after N_2 flux) was determined by measuring the residual radioactivity in the samples. For calculations, it was assumed that commercial preparations of AOT contained 23 μl of water per gram of surfactant, as determined by the Karl Fischer technique (11) and thermogravimetric analysis (12). The water content of the organic preparations is expressed as W_0 , which represents the $\text{H}_2\text{O}/\text{AOT}$ molar ratio (13). In the case of catalase in organic medium after the N_2 flushing step (see above), the final W_0 values varied from 7 to 8. For the experiment shown in Fig. 4, the indicated W_0 values were achieved by increasing the water concentration of the system (assuming that commercial AOT contains 2.3% water). In this case, sonicated enzyme preparations were not flushed with N_2 ; instead, the preparations were allowed to stand at room temperature until clarification was achieved (usually 1–2 h).

Polarographic assays. A Model 53 oxygenmeter (Yellow Springs Instruments) with an all-glass-cell water jacket (1.7 ml) was used. A standard Clark-type electrode was laterally inserted using the same O ring that holds the membrane, with a tight seal. A capillary bore glass stopper was used for additions to the chamber during the reaction. Dissolved O_2 in the aqueous system was determined with bovine heart mitochondrial particles, which consume known concentrations of NADH (data not shown), and by formation of O_2 by catalase in buffer A at 30°C, from known concentrations of H_2O_2 or NaBO_3 . Both systems gave similar results and the average concentration determined was 0.2 μmol of O_2 ml^{-1} .

In the case of the apolar medium, the oxygen electrode was placed in contact with the organic solvent system until a stable reading was reached (2–3 min); this was considered 100%. Between experiments, the chamber was rinsed with ethanol and toluene. After use, the elec-

trode was stored in water. The Teflon membrane (standard type) was changed after three or four work sessions.

To estimate the O_2 concentration in our toluene preparations, two experimental approaches were used: (a) A 50 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ solution was prepared in cold water previously bubbled with N_2 . The stability of the solution (kept in crushed ice, in a bottle sealed with a rubber cap) was assayed; aliquots were withdrawn through the cap with a microsyringe and tested in the oxygenmeter with air-saturated buffer A (not shown). In the first minutes, the concentration of dithionite decreased about 20%, but thereafter it remained fairly constant for at least 2 h (the decay was about 3% per hour). The actual reactive dithionite concentration, as titrated with dissolved O_2 (0.2 μmol ml^{-1}) in air-saturated buffer A, was used for calculations of O_2 solubility in the toluene system. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ aliquots injected into the oxygenmeter (30°C) contained 1.7 ml of air-saturated buffer A or 1.7 ml of air-saturated 0.2 M AOT in toluene. The changes in the electrode reading caused by successive additions of the calibrated $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ solution (3 μl for the aqueous system and 15 μl for the organic medium) were compared and converted to micromoles of O_2 . (b) In the second procedure, the aqueous system was rendered anaerobic with a N_2 current. Subsequently, the system was calibrated with catalase using 4.0- μl aliquots of 0.39 μmol of a 98 mM H_2O_2 solution. For titration of O_2 in the toluene system, 20 μl of the above H_2O_2 solution was used. O_2 concentrations in aqueous and organic systems were calculated assuming that 1.0 nmol of NaBO_3 or H_2O_2 would produce 0.5 nmol of O_2 (14).

For the catalase assay in toluene media, organic (NaBO_3 emulsions) or aqueous (H_2O_2) substrate preparations were diluted to 1.7 ml with 0.2 M AOT/toluene and stabilized at 30°C while O_2 was displaced by bubbling of a gentle N_2 current. The reaction was started by the addition of catalase–reverse micelle (5 μl = 0.6 μg catalase) preparations. The assay could also be performed without displacing the O_2 from the toluene preparations but, in this case, the output signal in the oxygenmeter was attenuated (five times) by changing the sensitivity selector from the “air” to the “oxygen” position. Initial velocities for catalase with H_2O_2 or NaBO_3 were independent of the sensitivity position used on the oxygenmeter (not shown).

RESULTS

Oxygen titration in organic solvent systems. The solubility of oxygen in organic solvent solutions is several times greater than that in aqueous solutions (15). In agreement with this, O_2 titration with anaerobic solutions of dithionite (Fig. 1A) or with the catalase– H_2O_2 O_2 -evolving reaction (Fig. 1B) showed that oxygen solubility (1.4 μmol O_2 ml^{-1}) in the organic system was sevenfold higher than that in buffer A (0.2 μmol O_2 ml^{-1}).

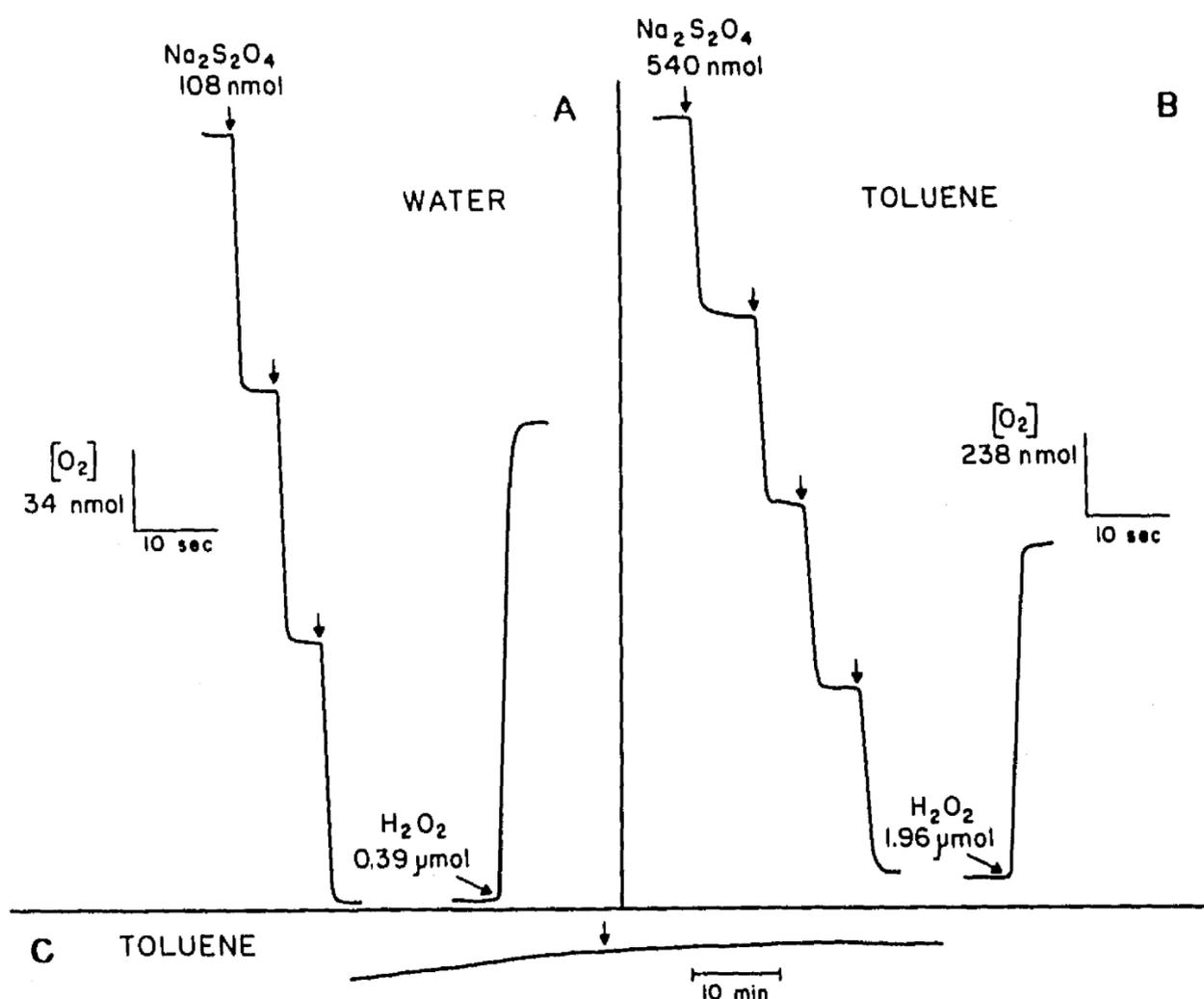


FIG. 1. Polarographic determination of O_2 concentration in air-saturated 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.0 (A), and in 1.6 M $H_2O/0.2$ M AOT/toluene (B). O_2 titration was performed with an anaerobic solution of 50 mM $Na_2S_2O_4$. The changes in the electrode reading caused by successive additions of $Na_2S_2O_4$ solution were compared and converted to micromoles of O_2 (see Materials and Methods), assuming that the aqueous system contains $0.2 \mu\text{mol}$ of $O_2 \cdot \text{ml}^{-1}$. O_2 evolved by catalase from H_2O_2 was calculated from the O_2 concentration change brought about by the addition of known quantities of H_2O_2 . Aqueous and organic reaction media contained 17.5 and 7.0 μg of catalase, respectively. Assays were performed at 30°C . Part C shows a long-term recording of the electrode in 1.6 M $H_2O/0.2$ M AOT/toluene medium (O_2 depleted by bubbling of N_2). After the arrow the oxygen chamber was closed by the insertion of a conical plastic device in the capillary bore.

The response of the oxygen electrode in AOT/toluene medium was proportional to the amount of dithionite, as indicated by the response obtained by successive additions of dithionite (Fig. 1). A similar linear response was observed in the O_2 -evolving reaction of catalase with substrate concentrations ($NaBO_3$ or H_2O_2) within the O_2 scale (not shown).

The O_2 concentration value given here for the toluene system represents the overall O_2 concentration and not the microenvironment concentration in the polar core of the AOT micelles. Indeed, it has been suggested that oxygen forms a concentration gradient, lower in the aqueous microphase and several times greater in the bulk solvent (15). In fact, the O_2 solubility of oxygen in water-swollen micelles of AOT was close to the value in pure water (16).

It was considered important to ascertain the stability of the electrode in long-term recording of media with toluene (catalase and substrate omitted), as well as the value of the "oxygen leak" rate through the capillary

bore of the cell stopper. After O_2 was depleted (N_2 bubbling, Fig. 1C) from the medium, O_2 concentration (capillary bore open) increased at a rate of $0.07 \mu\text{mol ml}^{-1} \text{h}^{-1}$; the O_2 leak stopped after the electrode chamber was closed (arrow in Fig. 1C) by the insertion of a plastic conical device in the capillary bore. Thus, long-term electrode recording (hours) was stable and the diffusion of oxygen through the capillary bore was orders of magnitude lower than that in enzyme-catalyzed reactions.

Catalytic properties of catalase trapped in hydrated reverse micelles of AOT in toluene. The kinetics of catalase in aqueous solutions using the Clark oxygen electrode has been previously reported (14). Thus, we decided to compare several kinetic parameters of the catalase reaction in aqueous and in $H_2O/AOT/toluene$ media. At a W_0 value of 7–8 (final W_0 with $NaBO_3$ as substrate was 8–9; see Materials and Methods), simple hyperbolic kinetics was obtained with both $NaBO_3$ and H_2O_2 as substrates in the toluene system (Fig. 2) and in the aqueous media (not shown). The Michaelis constant

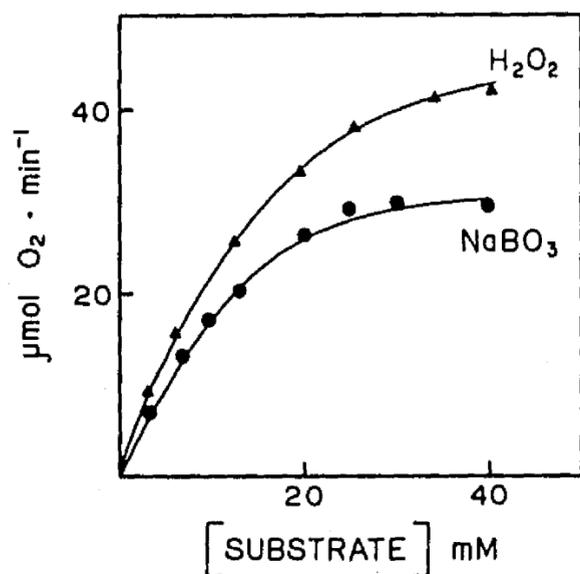


FIG. 2. Effect of the substrate concentration on the initial catalytic rate of liver catalase trapped in reverse micelles of 0.2 μM AOT in toluene, at $W_0 = 7-8$. Catalase activity was titrated with the indicated concentrations of NaBO_3 (●) or H_2O_2 (▲) as described under Materials and Methods. The reaction was started by the addition of 5 μl (0.6 μg of protein) of the micellar preparation of catalase; the initial rates were calculated within the first 10 s of reaction time. Liver catalase diluted in 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.0, was transferred to AOT/toluene medium as described under Materials and Methods. Assays were performed at 30°C.

K_m of water-soluble substrates in reverse micelle systems (17) can be referred to the overall volume ($K_{m\text{ov}}$) or to the water pool alone ($K_{m\text{wp}}$). $K_{m\text{ov}}$ values of 17 and 15 mM for H_2O_2 and NaBO_3 , respectively (Table 1), were

TABLE I
Comparison of Catalytic Constants of Catalase
in Aqueous and Organic Media^a

Medium	K_m^b (mM)		K_p^c ($\times 10^6 \text{ min}^{-1}$)	
	NaBO_3	H_2O_2	NaBO_3	H_2O_2
100 mM potassium phosphate, pH 7.0	45	54	5.4	7.25
0.2 M AOT/toluene, pH 7.0, $W_0 = 7-8^d$	15	17	4.5	5.2
0.2 M AOT/toluene, pH 7.0, $W_0 = 10-12$	—	—	5.1	7.0

^a Catalytic constants in toluene media at $W_0 = 7-8$ were calculated from data shown in Fig. 2, and the K_p value (H_2O_2 as substrate) at $W_0 = 10-12$ was taken from Fig. 4. Experiments run in aqueous buffer are not shown.

^b Apparent K_m values in toluene media were calculated assuming substrate concentrations in the overall volume (water pool plus hydrocarbon phase), thus noted as $K_{m\text{ov}}$ (17).

^c K_p , catalytic center activity.

^d $W_0 = 7-8$ corresponds to the enzyme preparation and in the case of H_2O_2 substrate, also corresponds to the W_0 of the final reaction mixture. W_0 values of final mixtures with NaBO_3 were 8-9 (see Materials and Methods).

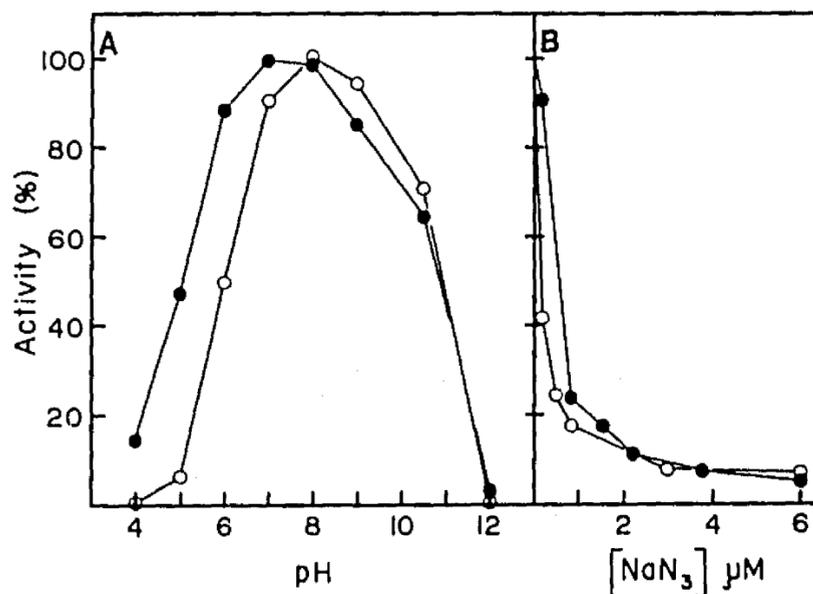


FIG. 3. (A) Relative rate of catalysis of catalase in H_2O_2 , at varying pH in aqueous (●) and toluene media (○). Assays in the aqueous system were performed using a wide-range pH buffer (24) composed of 20 mM citric acid, 30 mM H_2PO_4 , 30 mM H_3BO_3 , and 26 mM diethylbarbituric acid, adjusted to the desired pH with NaOH. In the case of the toluene system, catalase-trapped micelles of AOT/toluene were prepared using the above buffer system at the indicated pH. Catalase concentration in the aqueous assays was 0.035 μg protein ml^{-1} with an activity (pH 7.0) of 1.5 $\mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$, while in the organic media it was 0.6 μg protein ml^{-1} with an activity (pH 8.0) of 23.5 $\mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$. Assays in toluene media were performed at $W_0 = 8.0$. (B) Comparative inhibition of liver catalase (Na_2BO_3 as substrate) by NaN_3 in an aqueous (●) and a toluene medium (○). Catalase reverse micelles of 0.2 M AOT/toluene ($W_0 = 8.0$) were prepared in 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.0, as described under Materials and Methods. The same buffer was used for the aqueous assays. Other conditions were the same as those used for (A). Various aliquots of a 30 μM NaN_3 emulsion were mixed with the substrate and sufficient toluene to yield a final volume of 1.7 ml. The reaction was started with the addition of the enzyme to the substrate-inhibitor mixture.

calculated. These values were three times lower than the calculated K_m 's for the same pair of substrates in the aqueous medium (Table 1). These data suggest that the catalase-substrate interactions would be favored in the reverse micelle environment.

The catalytic center activity (K_p) at W_0 of 7-8 was calculated from V_{max} values and the concentration of enzyme catalytic sites. The K_p values calculated for the organic system for each independent substrate (Table 1) were 30% lower (i.e., $K_p \text{ H}_2\text{O}_2 = 5.2 \times 10^6 \text{ min}^{-1}$ and $K_p \text{ NaBO}_3 = 4.5 \times 10^6 \text{ min}^{-1}$) than those obtained for the aqueous buffer.

At $W_0 = 10-12$, the K_p for H_2O_2 and NaBO_3 reached a value that was 30-40% (Table 1 and Fig. 4) higher than that obtained at a W_0 of 7-8. On the assumption that all the catalase molecules remain active after its transfer to the organic solvent, it seems that the catalytic properties of catalase in the reverse AOT micelles in toluene, at optimal values of W_0 , are similar to those observed in aqueous buffer. Similar patterns have been observed with other enzymes trapped in reverse micelles (13,17).

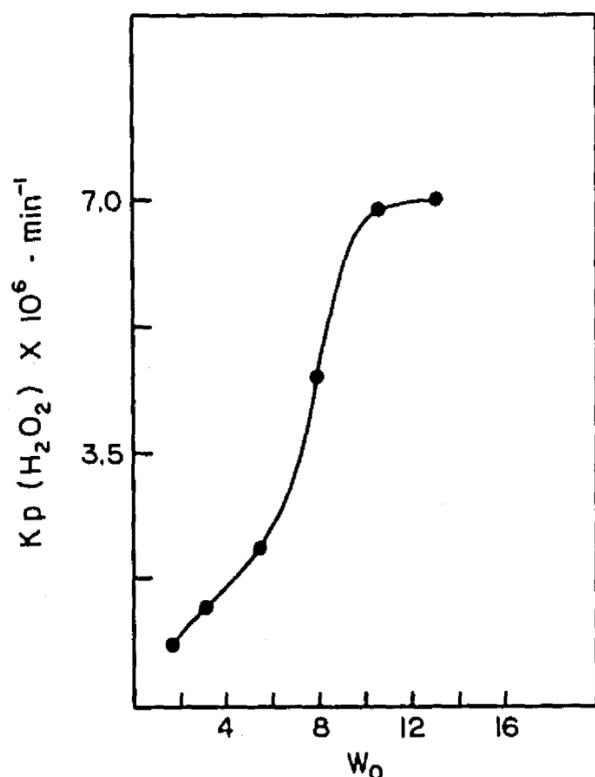


FIG. 4. Effect of the $\text{H}_2\text{O}/\text{AOT}$ molar ratio (W_0) on the catalytic center activity (K_p) of the liver catalase in H_2O_2 . Catalase reverse micelles of 0.2 M AOT in toluene were prepared at the indicated W_0 values, as described under Materials and Methods. To calculate the amount of H_2O required to reach each W_0 value, it was assumed that commercial preparations of AOT contain 2.3% H_2O , as indicated by thermogravimetric (12) and Karl Fisher analysis (11). Substrate (10 μl of H_2O of a 30% stock solution) was added to 1.7 ml of 0.2 M AOT/toluene solutions prepared at the indicated W_0 values and allowed to incorporate into the micellar solution (1 to 2 min). The reaction was started by addition of 5 μl (0.6 μg protein) of catalase.

The effects of pH on the catalase activity in the aqueous and in the organic system were compared (Fig. 3A). Maximal activity was recorded at pH 7.0 and 8.0 in aqueous buffer and in toluene, respectively. Alkaline shifts of optimal pH have been described for other enzymes trapped in reverse micelles (6,18,19). In the case of AOT reverse micelles, the anionic nature of surfactants may cause local perturbations of the pH (5).

Cu^{2+} -dependent catalases are highly sensitive to NaN_3 (20); therefore, it was interesting to test whether this inhibitor interfered with catalase activity in our organic system. Titration curves of catalase activity (NaBO_3 as substrate) with NaN_3 (Fig. 3B) were very similar in aqueous and organic media; 80% inhibition was obtained at 0.75 μM NaN_3 (overall concentration). Therefore, catalase trapped in AOT reverse micelles preserves its high sensitivity to NaN_3 .

Several reports (13,17) claimed that enzyme activity in hydrated reverse micelles of surfactants in organic media depends greatly on the degree of hydration of the system. Some enzymes work better at low water content ($W_0 > 10$), while others exhibit maximal activity at higher W_0 values. It was found that catalase activity in-

creased in proportion to the W_0 up to a value of 10–12. The water titration curve of catalase was sigmoidal, with a rapidly ascending part between W_0 values of 6 and 8. Interestingly, it has been reported (13,17) that at W_0 values above 6–8, the free water becomes apparent within the reverse micelle.

DISCUSSION

The assay of catalase activity with the Clark oxygen cathode was introduced by Goldstein (14), and its characteristics with respect to titrimetric (21) and spectrophotometric methods (22) have been discussed (14). Here, it is shown that catalase activity can be assayed with the Clark oxygen electrode in microheterogeneous systems composed predominantly of toluene. Thus, the use of a Teflon membrane in the Clark oxygen electrode to isolate the anode and the cathode and their electrolyte from the solution being measured also allows measurements in nonconducting fluids, such as those used in the present report.

With the Clark electrode, an O_2 concentration of 1.4 mM in an air-saturated organic medium composed of 1.6 M H_2O , 0.2 M AOT in toluene at 30°C and under a partial gas pressure of 582 mm was calculated. The dissolved gas concentration can be calculated from Bunsen absorptivity coefficients (α_1). O_2 in pure toluene has an $\alpha_1 = 168 \times 10^{-3}$ at 18°C under a partial gas pressure of 760 mm (23). From these data, a value of 7.03 mM for O_2 dissolved in pure toluene was calculated. This value is five times higher than the experimental value obtained from O_2 titration; however, it must be considered that our experiments were conducted at 30°C and under a partial gas pressure of 582 mm. In addition, the organic medium titrated in this work contains appreciable quantities of water and other electrolytes, which together should significantly decrease the O_2 -dissolving capacity. Our experimental procedures for O_2 titration in the oxygenmeter require water as carrier solvent and a surfactant agent, thus hampering the possibility of performing O_2 titrations in pure organic solvents.

The electrode in open and closed oxygraphs (Fig. 1C) showed a high stability and sensitivity, even in long-term experiments. The rate of the O_2 leak (0.07 $\mu\text{mol ml}^{-1} \text{h}^{-1}$) through the capillary bore resulted in a drift in the recorder of 5% full scale per hour. For most experimental purposes, this may be neglected; i.e., in this work, the range of measured activity was between 0.7 and 25 $\mu\text{mol O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{min}^{-1}$.

We have determined O_2 solubility in hydrated AOT solutions in several organic solvents (not shown) with different polarities (benzene, toluene, cyclohexane, *n*-hexane, and isooctane) and have found a linear correlation between O_2 -dissolving capacity and the apolar index (25) of the solvent. These findings suggest that the method could be extended to other organic solvents.

The kinetic properties of catalase trapped in hydrated micelles of AOT/toluene were similar to those observed in the aqueous buffer. Considering substrate concentrations in the overall volume (water pool plus hydrocarbon phase), the K_{mov} for H_2O_2 or $NaBO_3$ was threefold lower than that in the all-water system. Alternatively, taking just the water pool volume (28–30 μ l) at $W_0 = 8.0$, such values (K_{mwp}) increased almost 35 times. K_p , a parameter related to enzyme performance, was nearly the same in aqueous buffers and hydrated micelles (AOT/toluene) at optimal values of W_0 (ca. 10–12). These findings are in agreement with the described behaviors of many enzymes in reverse micelle systems (13,17).

Enzyme activities in reverse micelle systems of varying degrees of hydration usually exhibit bell-shaped curves (5). Thus, the maximal enzyme activity is not found at the maximal water content, but at smaller values, generally around $W_0 = 10$ –13 (13). Accordingly, we observed maximal catalase activity in H_2O_2 (Fig. 4) at $W_0 = 10$ –12. Activity was not studied at higher values of W_0 since the ability of reverse micelles in aromatic solvents, such as toluene, to solubilize water is very low (13). Indeed, under our experimental conditions, optically clear micelle preparations could not be generated beyond $W_0 = 12$. In future studies the hydrocarbon phase (i.e., isooctane) will be changed in order to cover higher values of W_0 .

Polarography based on the Clark oxygen electrode is widely recognized as an easy, rapid, and sensitive technique, and according to our report, it may prove to be a reliable and useful tool in the study of enzyme reactions consuming or evolving O_2 in different apolar media.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by Fondo Ricardo J. Zevada, México. We express our deep appreciation to Dr. A. Gómez-Puyou for his generous help and criticism during the preparation of this manuscript. We thank Dr. Ignacio González for his helpful discussions, Max Asomoza for the thermogravimetric analysis of AOT preparations, and Miss Fedora Helman and Mr. José García for their help with several steps of the work.

REFERENCES

1. Wong, M., Tomas, J. K., and Nowak, T. (1977) *J. Amer. Chem. Soc.* **99**, 4730–4736.
2. Sunamoto, J., Hamada, T., Seto, T., and Yamamoto, S. (1980) *Bull. Chem. Soc. Japan* **53**, 583–589.
3. Fung, B. M., and McAdams, J. L. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* **451**, 313–320.
4. Wolf, R., and Luisi, P. L. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **89**, 209–217.
5. Klyachko, N. L., Levashov, A. V., and Martinek, K. (1984) *Mol. Biol.* **18**, 839–840.
6. Barbaric, S., and Luisi, P. L. (1981) *J. Amer. Chem. Soc.* **103**, 4239–4244.
7. Ayala, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A., and Darszon, A. (1986) *FEBS Lett.* **203**, 41–43.
8. Douzou, P. (1980) *Adv. Enzymol.* **51**, 1–74.
9. Martinek, K., Khmel'nitski, Yu, L., Levashov, A. V., and Berezin, I. V. (1982) *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* **263**, 737–741.
10. Ayala, G., Nascimiento, A., Gómez-Puyou, A., and Darszon, A. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* **810**, 115–122.
11. Vogel, A. I. (1962) *Text Book of Quantitative Inorganic Analysis*, pp. 944–949, Longmans, London.
12. Wendlandt, W. Wm. (1974) *Thermal Methods of Analysis*, Wiley, New York/Chichester/Brisbane.
13. Luisi, P. L., and Magid, L. J. (1986) *Crit. Rev. Biochem.* **20**, 409–473.
14. Goldstein, D. (1968) *Anal. Biochem.* **24**, 431–437.
15. Tze-Chia, J., and Kenneth, L. K. (1984) *J. Colloid Interface Sci.* **102**, 308–310.
16. Wong, M., Thomas, J. K., and Grätzel, M. J. (1976) *J. Amer. Chem. Soc.* **98**, 2391–2397.
17. Luisi, P. L., and Steinman-Hofmann, B. (1987) in *Methods in Enzymology* (Mosbach, K., Ed.), Vol. 136, pp. 189–216, Academic Press, Orlando, FL.
18. Menger, F. M., and Yamada, K. (1979) *J. Amer. Chem. Soc.* **101**, 6731–6734.
19. Sánchez-Ferrer, A., Bru, R., and García-Carmona, F. (1988) *FEBS Lett.* **233**, 363–366.
20. Deisseroth, A., and Dounce, A. L. (1970) *Physiol. Rev.* **50**, 319–375.
21. Maehly, A. C., and Chance, B. (1954) *Methods Biochem. Anal.* **1**, 357–424.
22. Lück, H. (1963) in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H., Ed.), pp. 885, Academic Press, New York.
23. Washburn, E. W. (1928) *International Critical Tables of Numerical Data, Physics, Chemistry and Technology*, Vol. 3, p. 261, McGraw-Hill, New York/London.
24. Dawson, R. M. C., Elliott, D. C., Elliott, W. H., and Jones, K. M. (1969) *Data for Biochemical Research*, p. 485, Oxford Univ. Press, London.
25. Inoue, A., and Horikoshi, K. (1989) *Nature (London)* **338**, 264–266.

Catálisis enzimática en solventes orgánicos apolares

Laura Escobar Pérez

y

Edgardo Escamilla Marván

RESUMEN

La teoría clásica de la cinética enzimática se basa en los resultados obtenidos con enzimas en soluciones acuosas. Sin embargo, las enzimas en la célula se encuentran en un ambiente fisicoquímico que dista de ser el de una solución acuosa. Recientemente se ha desarrollado el estudio de la catálisis enzimática en medios con contenido de agua bajo y controlable (desde agua de interfase hasta agua "libre"), en los que la enzima junto con el agua se solubilizan dentro de una micela invertida en un solvente orgánico apolar. En esta revisión se describen las propiedades generales de las micelas invertidas así como del agua contenida en su interior. Se muestran los avances alcanzados en el conocimiento del papel que desempeña la cantidad de agua en la actividad catalítica de una enzima y de cómo ha sido posible obtener esta información por medio del estudio del comportamiento de las enzimas atrapadas en el interior acuoso de las micelas invertidas. Finalmente se revisan las aplicaciones que han tenido estos medios microheterogéneos en el estudio de la catálisis de algunos complejos multienzimáticos así como con células bacterianas transferidas *in toto* a sistemas orgánicos apolares con bajo contenido de agua.

Recibido el 26 de abril de 1990

Aceptado el 2 de junio de 1990

La M en C Laura Escobar estudió la licenciatura en química y la maestría en ciencias (química analítica) en la Facultad de Química de la UNAM. Cursó el doctorado en investigación biomédica básica en el área de bioquímica en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Realizó estancias en el departamento de química de la Universidad de Toronto y en el departamento de bioquímica del Centro de Investigación en Ingeniería Genética y Biotecnología de la UNAM. Es investigadora de la Unidad de Investigación Biomédica del Centro Médico Nacional del Instituto Mexicano del Seguro Social.

El Dr Edgardo Escamilla obtuvo el título de biólogo en la Facultad de Ciencias de la UNAM y el doctorado en ciencias químicas (bioquímica) en la Facultad de Química de la UNAM. Ha realizado estancias posdoctorales en el departamento de química de la Universidad Estatal de California en Los Angeles

I. EL AGUA EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS

La mayor parte de los procesos metabólicos en las células ocurren dentro de compartimentos acuosos: el núcleo, el citoplasma y los organelos membranales inmersos en el citoplasma. Una pregunta que se ha planteado es si las propiedades del agua en estos compartimentos son las mismas que las del agua pura. Las respuestas han sido muy controvertidas: desde las que consideran que prácticamente toda el agua celular se comporta como el agua pura (Brownstein y Tarr, 1979; Burnell y col, 1981; Finch, 1979; Foster y col, 1980), hasta las que plantean que casi toda el agua celular interactúa con solutos y superficies membranales, lo cual da lugar a un ambiente acuoso con propiedades fisicoquímicas diferentes a las del agua pura (Hazlewood, 1979; Ling, 1979; Ling y col, 1981).

Algunos de los métodos más útiles para el estudio de las propiedades físicas del agua celular, tales como densidad, viscosidad, capacidad calorífica, movilidad translacional y rotacional, y constante dieléctrica, implican el uso de condiciones experimentales drásticas que difícilmente podrían ser toleradas por la mayor parte de las células y de los tejidos. Sin embargo, existe una excepción notable: los quistes de un crustáceo llamado *Arte-*

y en el departamento de bioquímica de la Universidad de California en River Side. Actualmente, es investigador del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM e Investigador Nacional. Sus áreas de trabajo actuales son: sistemas respiratorios bacterianos y enzimología en solventes orgánicos.

nia. Este sistema es ideal por su capacidad natural para tolerar ciclos repetidos y reversibles de deshidratación y rehidratación, y porque se conocen sus propiedades bioquímicas (Clegg, 1986a y b, y 1984; Clegg y col, 1978 y 1982). Las técnicas espectroscópicas que se han utilizado en la caracterización de las propiedades del agua celular en los quistes de *Artemia* son la resonancia magnética nuclear (RMN) y la dispersión de neutrones cuasielástica (DNC).

Con RMN se pueden obtener varios parámetros experimentales, de los cuales los tiempos de relajación y el coeficiente de difusión han sido útiles en el estudio de las propiedades dinámicas del agua. Dicho de manera simple: en la medida que dichos parámetros en las células y en los tejidos se desvíen de los valores obtenidos en agua pura, estos cambios se correlacionarán con una movilidad diferente del agua en la célula. En las células de *Artemia* estos parámetros son menores que los observados en agua pura (Hazlewood, 1979). Como estas determinaciones se llevaron a cabo sobre distancias del orden del tamaño del diámetro celular, se pensó que la difusión del agua en la célula disminuye por la presencia del citoesqueleto. Por lo anterior, se midió por DNC el coeficiente de difusión del agua en distancias más cortas, para estimar este parámetro independientemente de la existencia de las barreras físicas en la célula.

Por DNC se puede obtener información de la difusión del agua en lapsos tan pequeños como 10^{-12} s y en distancias de 1 o 2 Å. Con esta técnica fue necesario que los quistes permanecieran dentro de un dispositivo sellado por varios días (Page, 1972). El coeficiente de difusión del agua que se obtuvo por DNC a una distancia de 1 Å fue también menor, lo cual demostró que si no toda, por lo menos una fracción importante del agua celular tiene propiedades físicas diferentes a las del agua pura (Clegg, 1984).

Por otra parte, se ha observado que las proteínas inyectadas al citoplasma de algunas células vivas difunden lentamente, como si se encontraran en un medio tan viscoso como una solución de sacarosa al 60% (Wojcieszyn y col, 1981). Esta alta viscosidad del medio celular se ha querido explicar por las restricciones estéricas impuestas por el retículo endoplásmico a la difusión de las macromoléculas (Mastro y Keith, 1984). Sin embargo, los eritrocitos carecen de microes-

tructura intracelular, lo que debería eliminar cualquier impedimento a la difusión del agua, y aun en ellos su difusión es igualmente lenta (Tanner, 1983). Los resultados anteriores indican que el confinamiento del agua en un espacio reducido trae como consecuencia el cambio de sus propiedades fisicoquímicas.

Estas evidencias experimentales muestran que la mayor parte del agua celular interactúa fuertemente con las membranas celulares, lo que da lugar a una población altamente estructurada conocida como agua de interfase (Drost-Hansen y Clegg, 1979). Incluso se ha propuesto que el agua localizada hasta 500 Å desde la superficie de una membrana corresponde a agua de interfase (Drost-Hansen y Clegg, 1982), lo cual, combinado con la presencia de organelos celulares, implicaría que prácticamente toda el agua citoplasmática está bajo la influencia de alguna superficie membranal.

Hasta ahora el desarrollo de la enzimología se ha basado principalmente en el estudio de enzimas en soluciones acuosas, a pesar de que en la célula muchas enzimas actúan en o cerca de alguna interfase membranal.

Si el agua es vital para que una enzima funcione, ¿cuánta agua es realmente necesaria? El agua tiene un efecto dual en los sistemas enzimáticos: es esencial para que una enzima adquiera y mantenga su conformación catalíticamente activa, ya que participa directa o indirectamente en todas las interacciones no covalentes (puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y de van der Waals) que determinan la estructura tridimensional de la enzima. Al mismo tiempo, al aumentar el agua disponible alrededor de la enzima, se incrementa la movilidad de su estructura tridimensional y con ello la posibilidad de que ocurran los fenómenos de inactivación térmica (Klibanov, 1984).

A partir de experimentos realizados con enzimas secas y transferidas a solventes orgánicos apolares, se ha podido demostrar que a algunas enzimas solubles les basta tan sólo la primera monocapa de agua que les rodea para manifestar su actividad biológica (Klibanov, 1986). En estos medios se hacen posibles incluso reacciones enzimáticas que no son factibles en medios acuosos (Klibanov, 1986; Zaks y Klibanov, 1986).

Sin embargo, no sólo es interesante conocer cuánta agua es necesaria para que una molécula de enzima pueda llevar a cabo la catálisis, sino también estudiar si existe al-

guna dependencia de la actividad enzimática con la cantidad de agua que rodea a la proteína. En años recientes ha surgido un interés creciente en el estudio del comportamiento de enzimas solubilizadas en micelas invertidas en un solvente orgánico apolar (Luisi y Magid, 1986; Martinek y col, 1986; Luisi y col, 1988).

Un medio de micelas invertidas es un sistema formado de pequeñas gotas de agua estabilizadas por un agente tensoactivo en un medio orgánico no miscible con el agua. En la figura 1 se representa el modelo de una micela invertida.

La importancia de estudiar el comportamiento cinético de una enzima en estos sistemas radica en la posibilidad de ponerla en contacto con diferentes microambientes acuosos y así determinar cómo influyen éstos en el proceso de la catálisis. Lo anterior se logra gracias a que en el interior de la micela se puede atrapar agua en cantidades variables (0.1 a 10% V/V) pero controlables, pudiéndose trabajar desde concentraciones equivalentes a agua de interfase, que correspondería al agua de solvatación de los grupos cargados del agente tensoactivo, hasta concentraciones donde además estaría presente el agua "libre", definida como aquella con las propiedades de agua pura.

En este trabajo se muestran las aportaciones que ha hecho el estudio de la incor-

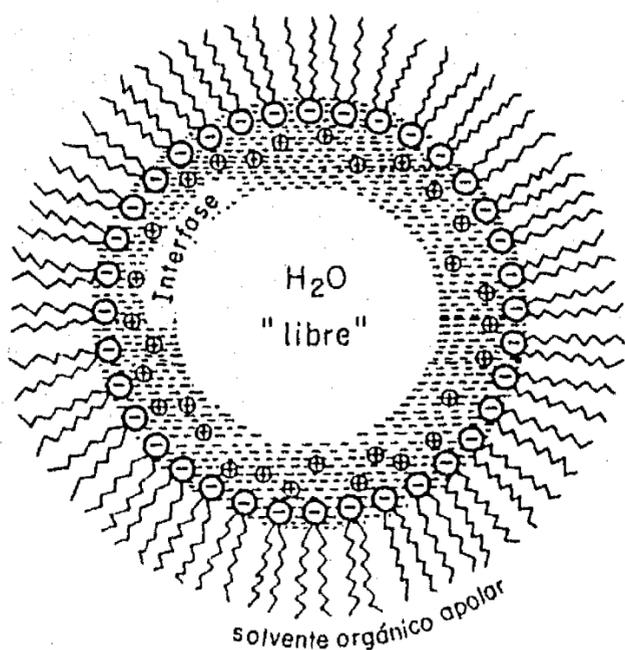


Figura 1. Modelo de una micela invertida de AOT en un solvente orgánico apolar (El Seoud, 1984). Los grupos cargados del agente tensoactivo se orientan hacia el interior acuoso de la micela, mientras que sus cadenas hidrocarbonadas se encuentran en contacto con el solvente orgánico apolar.

poración de enzimas en micelas invertidas a la cinética enzimática. Con la finalidad de explicar porqué han sido utilizados estos sistemas micelares, a continuación se describen sus propiedades más sobresalientes.

II. PROPIEDAD FÍSICAS DE LAS MICELAS INVERTIDAS

Los sistemas micelares presentan valores bajos de viscosidad y de temperatura de congelamiento (Douzou, 1980); asimismo se caracterizan por su transparencia. Son entidades dinámicas, es decir, se encuentran en equilibrio con la forma monomérica del agente tensoactivo: el tiempo de disociación de una micela es del orden de microsegundos. La estabilidad de las soluciones micelares es muy grande: pueden conservarse por semanas y hasta por meses sin modificar sus propiedades (O'Connor y Ramage, 1980).

A. Formación de micelas invertidas

En la figura 2 se muestran algunos de los agentes tensoactivos más usados en la formación de las micelas invertidas. Como puede observarse, dependiendo de la naturaleza de sus grupos polares, estos agentes pueden ser no iónicos, catiónicos, aniónicos y zwitteriónicos. Además, todos ellos presentan una región apolar cuya longitud puede ser variable, contener enlaces insaturados, y estar formada por más de una cadena.

En los solventes orgánicos apolares con bajo contenido de agua se favorece la formación de micelas invertidas. Como puede apreciarse en la figura 1, los grupos cargados del tensoactivo se orientan hacia el interior acuoso de la micela, mientras que la región

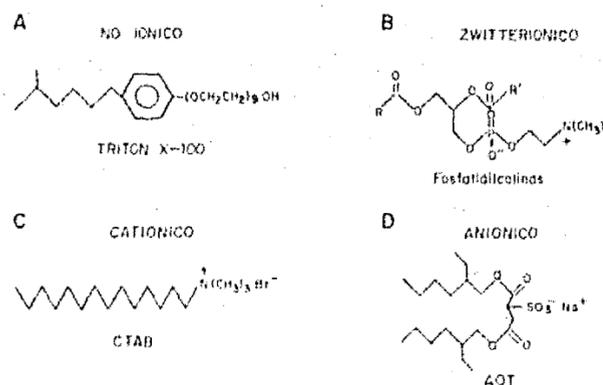


Figura 2. Agentes tensoactivos que forman micelas invertidas en un solvente orgánico apolar. CTAB: bromuro de hexadeciltrimetilamonio; AOT: bis-dietilhexilsulfosuccinato de sodio.

apolar se encuentra en contacto con el solvente orgánico. La formación de estos agregados micelares se debe tanto a la estructura química como a las interacciones dipolo-dipolo de las cadenas del agente tensoactivo, y también depende de la naturaleza del medio apolar en que éste se disuelve. El número de moléculas de agente tensoactivo que forman una micela invertida (número de agregación) es variable para una concentración dada del tensoactivo. Por ejemplo, para los dialquilsulfosuccinatos (Eicke y Zulauf, 1979), los dinonilnaftalensulfonatos (Little, 1970) y las fosfatidilcolinas (Poon y Wells, 1974), los números de agregación en los solventes orgánicos varían de 12 a 30. En consecuencia, a diferencia de lo que ocurre en un medio acuoso, en los solventes orgánicos apolares no parece existir un cambio brusco en alguna propiedad fisicoquímica del sistema que permita evidenciar la formación de las micelas invertidas y, por ende, determinar la concentración micelar crítica (CMC) del sistema (Kertes y Gutman, 1975).

B. Propiedades del agua micelar

La cantidad de agua que contiene un sistema de micelas invertidas se define por el cociente molar agua/tensoactivo, conocido como W_0 . Uno de los tensoactivos más usados en la formación de las micelas invertidas es el compuesto aniónico bis-dietilhexilsulfosuccinato de sodio, mejor conocido como AOT, cuya fórmula se encuentra en la figura 2. Cuando el AOT se disuelve en un solvente orgánico apolar, se forman micelas invertidas capaces de solubilizar hasta 50 moléculas de agua por cada molécula de tensoactivo (Menger y Saito, 1978). Se necesitan alrededor de 10 moléculas de agua para solvatar a los grupos cargados del AOT; por consiguiente, el agua "libre" comienza a aparecer en valores de W_0 mayores que 10 (Luisi y Magid, 1986). Estas dos poblaciones de agua se representan en el interior de una micela invertida en la figura 1.

Un ejemplo de cómo varía el comportamiento del agua micelar con el aumento de la cantidad de agua en el interior de las micelas invertidas de AOT en el octano, es la medición por RMN del desplazamiento químico (δ) del ^1H del agua (Thompson y Gierasch, 1984). Como se puede observar en la figura 3, los cambios más drásticos ocurren justo en valores de W_0 para los cuales sólo está presente el agua de interfase; conforme

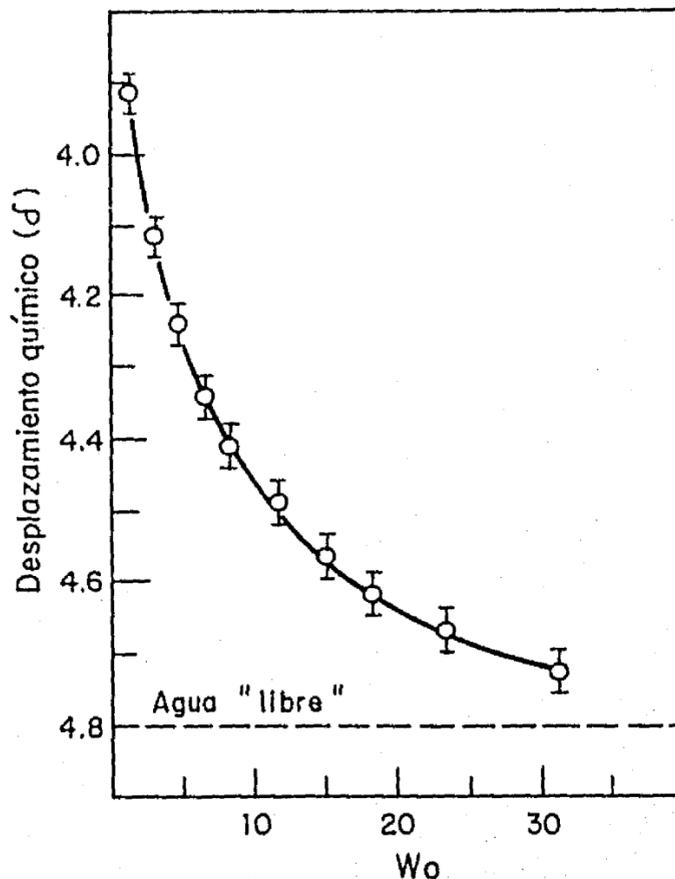


Figura 3. Desplazamiento químico (δ) en función del valor de W_0 , obtenido por resonancia magnética nuclear (250 MHz) del ^1H del agua de micelas invertidas de AOT en octano. El W_0 es el cociente molar agua/tensoactivo. Conforme aumenta el valor de W_0 del medio, el δ del ^1H del agua micelar tiende al valor de δ para el ^1H del agua "libre" (Thompson y Gierasch, 1984).

crece la cantidad de agua en el interior de la micela, el valor de δ tiende hacia el del agua "libre". Este resultado refleja cómo las propiedades fisicoquímicas del agua de interfase difieren de las del agua "libre" (Luisi y Magid, 1986).

Un aspecto importante relacionado con el agua micelar es la definición de su pH. Como es imposible determinarlo en forma precisa, se han usado escalas empíricas de acidez basadas en la correlación que existe entre el δ del ^{31}P y el pH de amortiguadores de fosfato. De esta manera se ha encontrado que el pH aparente de la cavidad micelar se encuentra 0.4 unidades por arriba del pH de la solución amortiguadora (Smith y Luisi, 1980).

C. Tamaño de una micela invertida

El tamaño que puede alcanzar una micela invertida es un aspecto muy controvertido. Se ha descrito que de manera similar a las micelas que se forman en agua, las micelas

invertidas son estructuras esféricas que alcanzan diámetros de 30 a 60 Å y que conforme aumenta la cantidad de agua solubilizada en su interior, se da lugar a una microemulsión cuyo diámetro puede llegar a ser de 60 a 1000 Å (Fendler, 1982). Los tamaños promedio que alcanza una micela invertida de AOT en isoctano al variar el W_0 son: 15 Å para $W_0 = 0$; 27 Å para $W_0 = 5$; 41 Å para $W_0 = 12$ y 50 Å para $W_0 = 22$ (Eicke y Zulauf, 1979).

III. SOLUBILIZACIÓN DE UNA PROTEÍNA EN UN SISTEMA DE MICELAS INVERTIDAS

A. Métodos

Muchas proteínas se han solubilizado en micelas invertidas. Los métodos más comunes para llevar a cabo este proceso se describirán brevemente a continuación, sin discutir los aspectos termodinámicos que explican su factibilidad (ver Bratko y col, 1988; Zhou y Stell, 1989).

En la figura 4A se ilustra el método para solubilizar una proteína a partir de su estado sólido, el cual consiste en la incorporación de una proteína liofilizada a una solución micelar (Delahodde y col, 1984). Llama la atención que por este método la solubilidad máxima de la proteína ocurre a una concentración relativamente baja de agua en el medio micelar ($6 < W_0 < 8$).

En el método conocido como "transferencia de fase" (Fig 4B) la proteína disuelta en un medio acuoso salino se extrae con una fase de micelas invertidas (Luisi y col, 1979; Leser y col, 1986). Cuando la concentración de sal

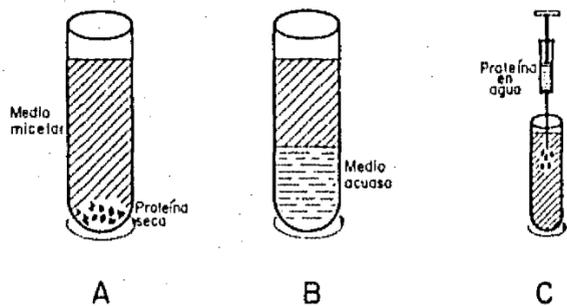


Figura 4. Métodos para la solubilización de una proteína en un sistema de micelas invertidas. A) Solubilización de una enzima seca: la proteína liofilizada se agrega al medio micelar. B) Transferencia de fase: la proteína disuelta en un medio acuoso salino se extrae con un medio de micelas invertidas. C) Inyección: se inyecta un volumen muy pequeño de una solución acuosa concentrada de la proteína al sistema micelar. En los tres métodos es necesario agitar las mezclas por un período corto (Luisi y Steinmann-Hofmann, 1987).

es óptima, siempre se logra una extracción adecuada de la proteína.

Por último, el método de inyección (Fig 4C) es el más sencillo y el más utilizado. Éste consiste en inyectar un volumen muy pequeño de una solución concentrada de la proteína en una solución micelar (Luisi y Steinmann-Hofmann, 1987).

Las enzimas que se han solubilizado siguiendo alguno de los métodos anteriores han sido principalmente hidrolasas, deshidrogenasas y oxidasas (Luisi y Steinmann-Hofmann, 1987).

B. Estructura de las micelas invertidas que contienen a una proteína

Se han propuesto varios modelos para explicar cómo una proteína, dependiendo de sus características, puede solubilizarse en un medio de micelas invertidas. En la figura 5A se propone el modelo de la poza acuosa para una proteína hidrofílica, en el que ésta se encuentra rodeada de monocapas de agua que evitan su contacto con las moléculas del agente tensoactivo y del solvente orgánico (Bonner y col, 1980; Sheu y col, 1986). Por otra parte, se han sugerido otros modelos para el caso de una proteína hidrofóbica (ver figuras 5B y 5C). En estos casos la proteína interaccionaría con las cadenas hidrocarbonadas del tensoactivo o incluso con el solvente orgánico (Luisi y Magid, 1986). El modelo de la figura 5D se ha propuesto para una enzima cuyo sitio activo interacciona con las cabezas cargadas del tensoactivo (Luisi y Magid, 1986).

Con dos proteínas de membrana: la rodopsina (Ramakrishnan y col, 1983) y la proteína básica de la mielina (Chantenay y col, 1985), se han encontrado indicios de la formación de agregados micelares de alto peso molecular, lo que podría favorecer la existencia de una población pequeña de estructuras entrecruzadas, como las representadas en la figura 5E.

El tamaño que alcanza una micela invertida depende del tamaño de la cadena hidrocarbonada del tensoactivo, así como de la naturaleza del solvente orgánico apolar. Sin embargo, se duda que pueda sostenerse su formación en la solubilización de entidades de gran tamaño como células enteras (Håring y col, 1985; Darszon y col, 1988; Pfammatter y col, 1989), a pesar de que se mantengan las condiciones de mínima cantidad de

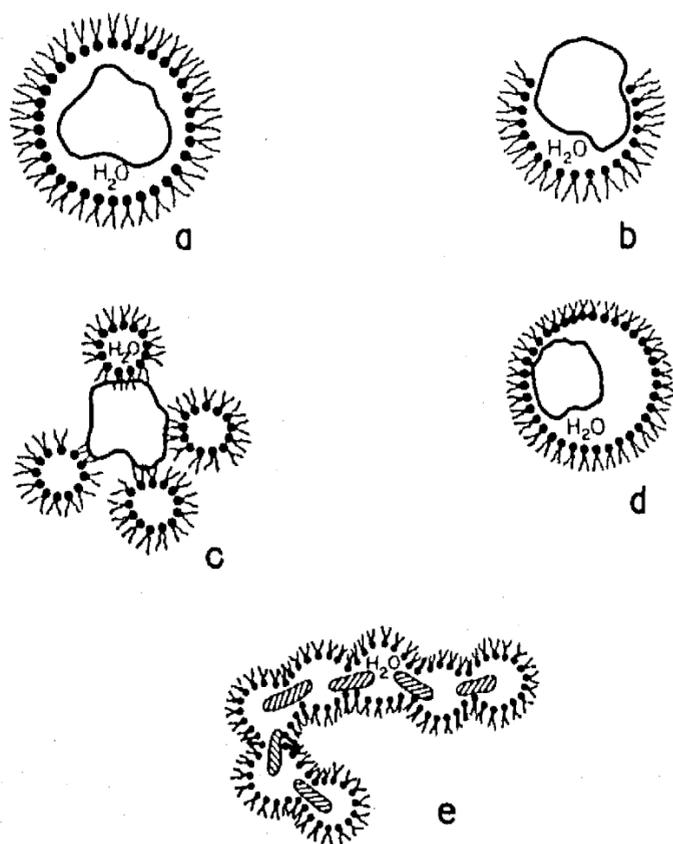


Figura 5. Estructuras propuestas para la solubilización de una proteína en un sistema de micelas invertidas. a) Una proteína hidrofílica se encuentra en la poza acuosa de la micela (Bonner y col, 1980; Sheu y col, 1986); b) una proteína con un dominio hidrofílico y otro hidrofóbico interactúa con el agua micelar y con el solvente orgánico, respectivamente; c) una proteína totalmente hidrofóbica se encuentra en contacto con las cadenas del agente tensoactivo y con el solvente orgánico (Luisi y Magid, 1986); d) el sitio activo de una proteína hidrofílica interactúa con los grupos cargados del agente tensoactivo (Steinmann y col, 1986); e) las micelas invertidas forman redes interconectadas por proteínas de membrana (Ramakrishnan y col, 1983; Chatenay y col, 1985).

agua, transparencia y homogeneidad del medio. El tipo de estructuras que prevalecen en estos medios es todavía una pregunta abierta.

C. Cinética enzimática

En general la cinética de las reacciones químicas catalizadas por las enzimas solubilizadas en estos sistemas obedece la ecuación de Michaelis-Menten. No obstante lo anterior, la teoría cinética de las reacciones enzimáticas que proceden en estos medios microheterogéneos debe tomar en cuenta la partición del sustrato entre la pseudofase acuosa de las micelas y la fase orgánica (Martinek y col, 1986; Hilhorst y col, 1984; Verhaert y col, 1990a y b). La partición entre las fases también influye en la interacción de la enzima solubilizada con los inhibidores, con los activadores y con otros solutos del proceso enzimático.

Como criterio de la actividad catalítica de una enzima solubilizada en una micela invertida se ha utilizado la constante catalítica (o número de recambio): número de moles de sustrato transformadas por mol de centro catalítico y por unidad de tiempo (Martinek y col, 1981). La actividad de las enzimas solubilizadas en las micelas invertidas muestra una fuerte dependencia del valor de W_0 .

Se ha propuesto un modelo del que se obtiene el perfil de la actividad enzimática como función de W_0 en estos medios (Bru y col, 1989). En éste se considera la existencia de tres dominios en una micela invertida: la región apolar del agente tensoactivo, el agua de interfase y el agua "libre" (ver Fig 1). Dependiendo del dominio en el que la enzima presente mayor actividad, se obtienen tres tipos de comportamiento, mismos que se muestran en la figura 6. En las curvas se considera que la constante catalítica es mayor cuando la enzima se encuentra en contacto con: el agua de interfase (6a), el agua "libre" (6b), y con las cadenas del tensoactivo (6c). En la figura 7 se ilustra cada uno de estos casos: una campana para la hidrólisis del éster etílico de la N α -benzoil de arginina por la tripsina (Walde y col, 1988); una sigmoide para la reducción del perborato de sodio por la catalasa (Escobar y col, 1990); y una función monótona decreciente en el caso de la oxidación de la prednisona o de la progesterona por la 20 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Hilhorst y col, 1984).

Un hecho interesante es que en general la actividad máxima de las enzimas en estos medios micelares es prácticamente la misma

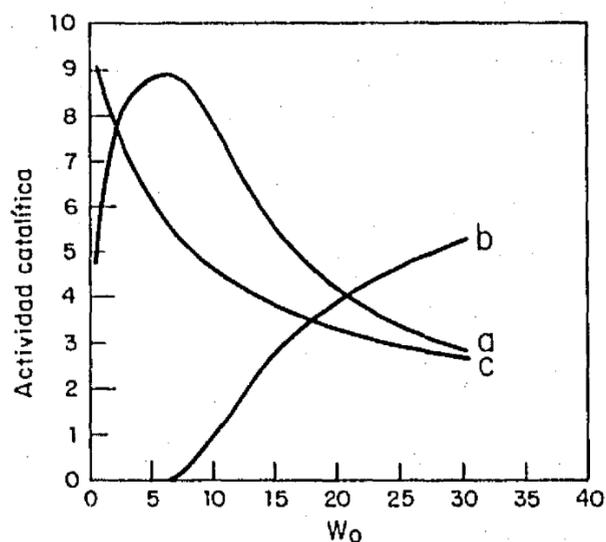


Figura 6. Perfil teórico de la actividad enzimática como función del valor de W_0 del sistema micelar. La enzima tiene su actividad máxima en a) agua de interfase; b) agua "libre", y c) las cadenas hidrocarbonadas del agente tensoactivo (Bru y col, 1989).

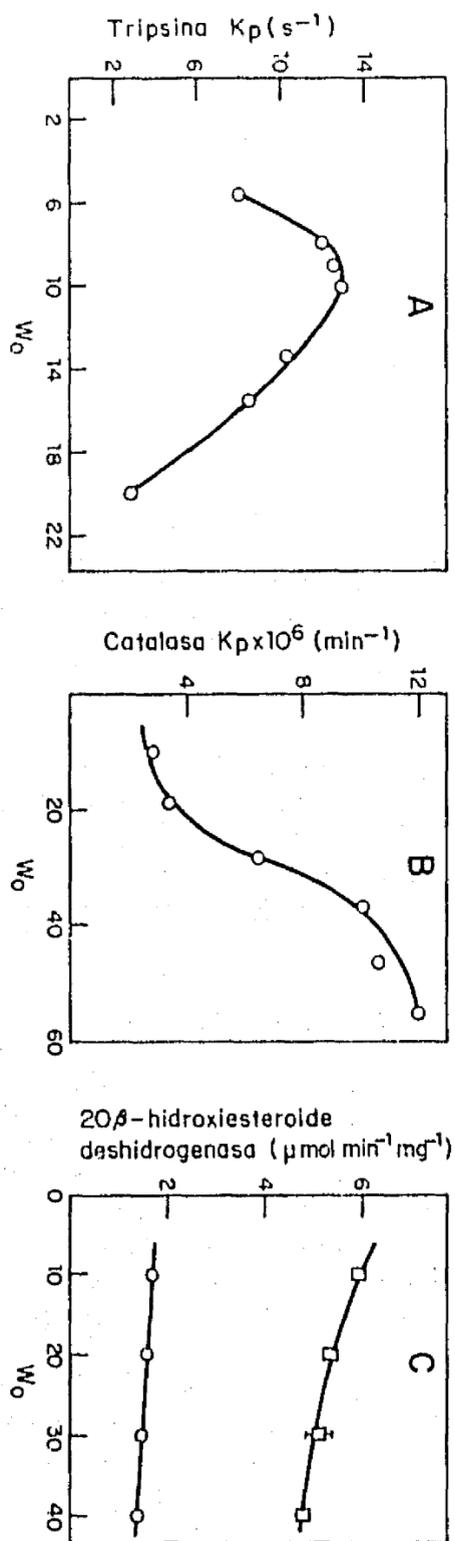


Figura 7. Perfil de la actividad de diferentes enzimas al variar el valor de W_0 del medio micelar. A) Hidrólisis del éster etílico de la $N \alpha$ -benzoin-L-arginina por la tripsina (Walde y col, 1988). B) Reducción del perborato de sodio por la catalasa (Escobar y col, 1990). C) Reducción de la prednisona (□) y de la progesterona (○) por la 20β -hidroxiesteroide deshidrogenasa en micelas invertidas de CTAB-hexanol en octano (Hilhorst y col, 1984). En los casos de A y B las enzimas se solubilizaron en micelas invertidas de AOT en isooctano.

que se observa en un medio acuoso (Luisi y col, 1988); lo anterior sugiere que el solvente no participa en la catálisis de una enzima, y que en algunos casos ésta sólo requiere

del agua de interfase para desarrollar su actividad catalítica máxima, como ocurre con las enzimas A y C de la figura 7.

D. Termorresistencia

Otra característica sobresaliente de las enzimas solubilizadas en los medios micelares es su resistencia a la desnaturalización por el aumento en la temperatura: las enzimas se mantienen activas aun a temperaturas que provocan su desactivación en un medio acuoso. La resistencia a la inactivación térmica disminuye conforme aumenta la cantidad de agua en el medio micelar. Como se puede apreciar en la figura 8, la ATPasa solubilizada en un medio de micelas invertidas con tan solo 0.3% de agua (V/V) adquiere una gran termoestabilidad: la vida media de la enzima a 70° , 80° y 90° C es alrededor de 11 h, 4 h y 20 minutos, respectivamente (Ayala y col, 1986). Este comportamiento también se ha encontrado en la F_1 soluble de la ATPasa mitocondrial (Garza-Ramos y col, 1989), y es muy similar al observado en las enzimas liofilizadas y suspendidas en un solvente orgánico apolar (Klibanov, 1984).

E. Complejos enzimáticos

Recientemente ha surgido el interés de experimentar con sistemas más complejos que las

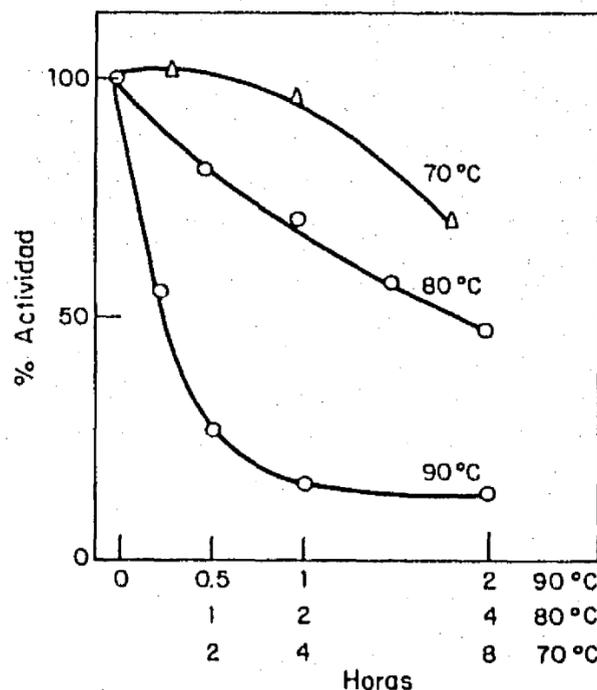


Figura 8. Estabilidad térmica de la ATPasa en un sistema de micelas invertidas de fosfolípidos en tolueno. El W_0 del sistema fue aproximadamente de 13.0. El 100% corresponde a la actividad de la enzima medida en liposomas a 37° C ($0.38 \mu mol \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$; Ayala y col, 1986).

enzimas aisladas. Intentos pioneros en este sentido demostraron que era posible llevar a cabo reacciones enzimáticas secuenciales a partir de enzimas atrapadas individualmente en micelas invertidas. Con objeto de lograr la reducción de la progesterona (esteroide cuya solubilidad límite en agua es $< 50\mu\text{M}$) en un medio apolar, se diseñó un sistema de micelas invertidas compuesto no sólo por la enzima responsable de la reducción del esteroide (la 20β -hidroxiesteroide deshidrogenasa) sino también por un sistema regenerador del reductor NADH, en el que participan otras dos enzimas (Hilhorst y col, 1983). Dicho proceso enzimático concatenado se esquematiza en la figura 9.

Existen varios ejemplos relacionados con el estudio de proteínas de membrana en un medio de micelas invertidas. Tal es el caso de la preservación de la actividad de la rodopsina (Darszon y col, 1979), de la bacteriorodopsina (Huang y col, 1977), de los centros de reacción de *Pseudomonas spheroides* (Schönfeld y col, 1980), y en la transferencia de electrones del citocromo c al complejo de la citocromo oxidasa (Escamilla y col, 1989). Más aún, el complejo de la citocromo oxidasa en un medio micelar con 3.2% de agua (V/V), presenta una actividad enzimática comparable a la que se observa con la enzima reconstituida en una bicapa. En la figura 10 se puede observar la variación de la actividad enzimática de este complejo con la concentración del agente reductor fenazina metosulfato (PMS) en el medio micelar (Escobar y Escamilla, datos no publicados).

De la misma manera que es posible llevar a cabo reacciones secuenciales catalizadas por enzimas solubles en agua en los medios micelares, es factible hacerlo con las enzimas de la membrana interna de la mitocondria (cadena respiratoria). El transporte de electrones tiene lugar a través de los diferentes componentes de esta cadena: desde

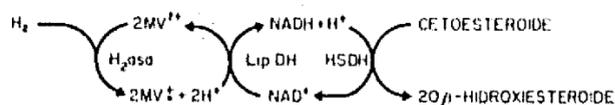


Figura 9. Reacciones multienzimáticas catalizadas por enzimas hidrosolubles dentro de un medio de micelas invertidas. La reducción de la progesterona se lleva a cabo por la 20β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSDH) en presencia de NADH regenerado *in situ* por la lipoamida deshidrogenasa (LipDH) y por metilviológeno reducido (MV^+). Este último se regenera a su vez al reducirse por burbujeo de hidrógeno en el medio vía una hidrogenasa (H_2 asa). El sistema micelar estuvo formado por 4.7% de agua (V/V)/CTAB/hexanol en octano (Hilhorst y col, 1983).

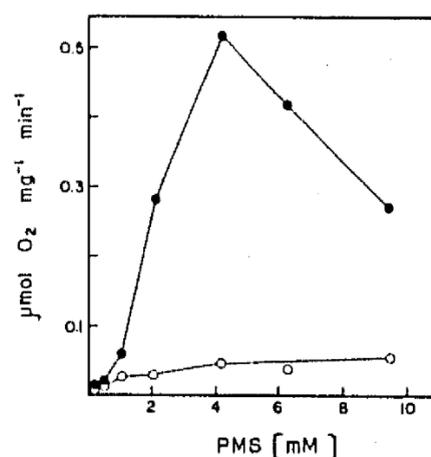


Figura 10. Actividad del complejo membranar citocromo oxidasa en un sistema de micelas invertidas. La reducción del oxígeno por el complejo enzimático (●) varía con la concentración del agente reductor llamado fenazina metosulfato (PMS), en un medio micelar compuesto por fosfolípidos y 3.2% de agua (V/V) en isooctano. (○) Autooxidación del PMS en el medio (Escobar y Escamilla, datos no publicados).

el complejo de la NADH deshidrogenasa, pasando por la CoQ_{10} , el complejo de los citocromos b/c_1 , el citocromo c, el complejo de la citocromo oxidasa, hasta la reducción del oxígeno (Escobar y Escamilla, datos no publicados).

F. Microbiología micelar

Merecen especial atención los estudios que se han realizado con células microbianas, solubilizadas en medios micelares con cantidades muy limitadas de agua. En 1985 Häring y colaboradores transfirieron células de *Escherichia coli* a un sistema micelar formado por agua/Tween 85/isopropilpalmitato. Estas células son portadoras de un plásmido (PEMBL-8), el cual les permite sintetizar la enzima llamada β -galactosidasa. En el sistema orgánico pudo observarse la aparición de actividad enzimática, lo cual sugirió que las células en el medio micelar con 3 a 4% de agua (V/V) podían llevar a cabo la biosíntesis de proteínas, al menos algún tiempo después de su solubilización.

Posteriormente también se describió la transferencia de células bacterianas y de levaduras a sistemas micelares constituidos por fosfolípidos en tolueno (Darszon y col, 1988), y por fosfolípidos en isopropilpalmitato y hexadecano (Pfammatter y col, 1989). Darszon y colaboradores demostraron que en células vegetativas de *Bacillus cereus*, en el medio micelar descrito anteriormente, se preserva la actividad de sistemas multienzimáticos complejos como la cadena respiratoria. Sin

embargo, sólo una de cada 10 000 células permanecía viable. Es probable que durante la estructuración del sistema micelar en el solvente orgánico, las células expuestas al tolueno sufran extenso daño en sus membranas. Este juicio fue apoyado por el hecho de que al utilizar esporas latentes de *B cereus* que son muy resistentes a los solventes orgánicos (poseen cubiertas pericelulares que impiden la penetración del solvente), el medio de las micelas invertidas no afectó su viabilidad (Darszon y col, 1988).

Recientemente, Escamilla y colaboradores (resultados no publicados) han logrado inducir la germinación de las esporas de *B cereus* en un medio de micelas invertidas.

Es bien sabido que la germinación de una spora bacteriana implica la activación de múltiples vías metabólicas para la degradación de reservas energéticas endógenas, así como la síntesis de múltiples componentes celulares (Setlow, 1983). Dicho de otro modo, la germinación es el proceso que lleva a una spora latente, metabólicamente inactiva, hacia una célula vegetativa plenamente activa y resulta asombroso que todos estos sucesos puedan acontecer en un medio que contiene solamente 3% de agua (V/V) en isooctano.

A este respecto cabe la pregunta: ¿cuál es la concentración mínima de agua en el medio orgánico que se requiere para que proceda la germinación bacteriana? Un resultado preliminar de nuestro laboratorio indica que se requiere entre 1 y 1.5% de agua (V/V). De esta cantidad, una fracción será utilizada para rehidratar la spora seca; será importante averiguar cuánta agua incorporada al interior de la célula permanece como agua "libre" y cuánta como agua de interfase. Ésta y otras preguntas que se formulen acerca de la interacción agua-célula en los sistemas micelares podrán ser contestadas en un futuro cercano y, quizá entonces podamos aprender más sobre el comportamiento del agua en el medio celular.

Es interesante hacer notar que recientemente un grupo de investigación japonés (Goldfine, 1989) reportó el descubrimiento de una cepa silvestre de *Pseudomonas putida* que es capaz de medrar en medios de cultivo que contienen hasta 50% (V/V) de un solvente orgánico apolar. Así, la sobrevivencia de células bacterianas en medios formados con una alta proporción de un solvente orgánico, no es sólo una curiosidad experimental de laboratorio sino un fenómeno natural.

IV. PERSPECTIVAS EN LA BIOTECNOLOGÍA

Las enzimas solubilizadas en los sistemas de micelas invertidas puede ser de interés en la biotecnología, debido a que sus propiedades catalíticas se ven modificadas como consecuencia de las propiedades fisicoquímicas de los microambientes acuosos generados en dichos sistemas. Como ejemplo de lo anterior se pueden mencionar los siguientes casos: la disolución de sustratos y productos hidrofóbicos (Lüthi y Luisi, 1984; Meier y Luisi, 1980), el incremento de la estabilidad térmica (Ayala y col, 1986; Garza-Ramos y col, 1989); en algunos casos el aumento de la constante catalítica (Klyachko y col, 1984); cambios en la especificidad por los sustratos (Martinek y col, 1982); y en la extracción preferencial de algunas enzimas de medios acuosos (Dekker y col, 1989), así como de células completas (Giovenco y Verheggen, 1987).

Ya se han reportado algunas aplicaciones en otras áreas como en la recuperación de aceite (Langevin, 1984), la extracción de metales a partir de minerales crudos (Tondre y Xenaxis, 1984) y de macromoléculas de medios de cultivo (Göklen y Hatton, 1985), y en la liberación de drogas *in vivo* (Speiser, 1984).

CONCLUSIÓN

Los medios micelares formados en solventes orgánicos apolares han permitido obtener información sobre el efecto que tienen cantidades variables de agua sobre la actividad catalítica de las enzimas. La concentración de agua es crítica para la modulación de los cambios estructurales de las enzimas, que tienen como consecuencia cambios en la catálisis.

Por otra parte, en estos medios micelares también ha sido posible estudiar la cantidad de agua necesaria para desencadenar procesos celulares tan complejos como la biosíntesis de proteínas y la germinación de esporas.

Sin embargo, aún nos faltan muchos conocimientos para comprender el mecanismo molecular de las interacciones agua-enzima y agua-célula. Creemos que dada la complejidad de estas interacciones, su comprensión sólo será posible mediante el trabajo multidisciplinario.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr Marcelo Galván Espinosa sus valiosos comentarios durante la elaboración del manuscrito.

REFERENCIAS

- Ayala, G, M Tuena de Gómez-Puyou, A Gómez-Puyou y A Darszon, *FEBS Lett* (1986) 203, 41-43.
- Bonner, FJ, R Wolf y PL Luisi, *J Solid Phase Biochem* (1980) 5, 255-258.
- Bratko, D, A Luzary y SH Chen, *J Chem Phys* (1988) 89, 545-550.
- Brownstein, KR, y CE Tarr, *Phys Rev* (1979) A 19, 2446-2453.
- Bru, R, A Sánchez-Ferrer y F García-Carmona, *Biochem J* (1989) 259, 355-361.
- Burnell, EE, ME Clarke, JAM Hinke y NR Chapman, *Biophys J* (1981) 33, 1-21.
- Clegg, JS, AC Zettlemoyer y HH Hsing, *Experientia* (1978) 34, 734-735.
- Clegg, JS, S Szwarnowski, VER McClean, RJ Sheppard y EH Grant, *Biochim Biophys Acta* (1982) 721, 458-468.
- Clegg, JS, *Am J Physiol* (1984) 243, 133-155.
- Clegg, JS, *Methods Enzymol* (1986a) 127, 230-236.
- Clegg, JS, "The Physical Properties and Metabolic Status of Artemia cysts at Low Water Contents", en *Membranes, Metabolism and Dry Organisms*. C Leopold (Ed) (Cornell University Press, Nueva York, 1986b).
- Chatenay, D, W Urbach, AM Cazabat, M Vacher y M Waks, *Phys Rev Lett* (1985) 54, 2253-2256.
- Darszon, A, R Strasser y M Montal, *Biochem* (1979) 18, 5205-5213.
- Darszon, A, E Escamilla, A Gómez-Puyou y M Tuena de Gómez-Puyou, *Biochem Biophys Res Commun* (1988) 151, 1074-1080.
- Dekker, M, R Hilhorst y C Laane, *Anal Biochem* (1989) 178, 217-226.
- Delahodde, A, M Vacher, C Nicot y M Waks, *FEBS Lett* (1984) 172, 343-347.
- Douzou, P, *Adv in Enzymol* (1980) 51, 1-74.
- Drost-Hansen, W, y JS Clegg, *Cell associated water* (Academic Press, Nueva York, 1979).
- Drost-Hansen, W, y JS Clegg, "The Occurrence and Extent of Vicinal Water", en *Biophysics of Water*. F Franks y S Mathias (Eds) (Wiley, Nueva York, 1982).
- Eicke, HF, y M Zulauf, *J Phys Chem* (1979) 83, 480-486.
- El Seoud, OA, *Reverse Micelles*. PL Luisi y BE Straub (Eds) (Plenum Press, Nueva York, 1984) pp 81.
- Escamilla, E, G Ayala, M Tuena de Gómez-Puyou, A Gómez-Puyou, L Millán y A Darszon, *Arch Biochem Biophys* (1989) 272, 332-343.
- Escobar, L, C Salvador, M Contreras y E Escamilla, *Anal Biochem* (1990) 184, 139-144.
- Fendler, JH, *Membrane Mimetic Chemistry* (John Wiley and Sons, Nueva York, 1982).
- Finch, ED, "Nuclear Magnetic Resonance Studies of the State of Water and Ions in Aqueous Cytoplasm", en *The Aqueous Cytoplasm*. AD Keith (Ed) (Dekker, Nueva York, 1979).
- Foster, KR, JL Schiepps y HP Schwan, *Biophys J* (1980) 29, 271-282.
- Garza-Ramos, G, A Darszon, M Tuena de Gómez-Puyou y A Gómez-Puyou, *Biochem* (1989) 28, 3177-3182.
- Giovenco, S, y F Verheggen, *Enzyme Microb Technol* (1987) 9, 470-473.
- Göklen, KE, y TA Hatton, *Biotechnol Prog* (1985) 1, 69-73.
- Goldfine, H, *Nature* (1989) 338, 202.
- Häring, G, PL Luisi y F Meussdoerffer, *Biochem Biophys Res Commun* (1985) 127, 911-915.
- Hazlewood, CF, "A View of the Significance and Understanding of the Physical Properties of Cell-Associated Water", en *Cell-Associated Water*. W Drost-Hansen y JS Clegg (Eds) (Academic, Nueva York, 1979).
- Hilhorst, R, C Laane y C Veeger, *FEBS Lett* (1983) 159, 225-228.
- Hilhorst, R, R Spruijt, C Laane y C Veeger, *Eur J Biochem* (1984) 144, 459-466.
- Huang, SG, NI Korenbrot y W Stoeckenius, *Membr Biol* (1977) 36, 115-136.
- Kertes, AS, y H Gutmann, *Surf and Colloid Sci* (1975) 8, 193-197.
- Klibanov, AM, *Science* (1984) 224, 1249-1251.
- Klibanov, AM, *Chemtech* (1986) 16, 354-359.
- Klyachko, NL, AV Levashov y K Martinek, *Mol Biol* (1984) 18, 1019-1032.
- Langevin, D, "Biological and Technological Relevance of Amphiphilic Structure in Apolar Media", en *Reverse Micelles*. PL Luisi y BE Straub (Eds) (Plenum, Nueva York, 1984) p 287.
- Leser, ME, G Wei, PL Luisi y M Maestro, *Biochem Biophys Res Commun* (1986) 135, 629-633.
- Ling, GN, "The Polarized Multilayer Theory of Cell Water and other Facets of the Association-Induction Hypothesis", en *The Aqueous Cytoplasm*. AD Keith (Ed) (Dekker, Nueva York, 1979) p 23.
- Ling, GN, CL Walton y MM Ochsenfeld, *J Cell Physiol* (1981) 106, 385-398.
- Little, RC, *J Phys Chem* (1970) 74, 1817-1818.
- Luisi, PL, FJ Bonner, A Pellegrini, P Wiget y R Wolf, *Helv Chim Acta* (1979) 62, 740-745.
- Luisi, PL, y LJ Magid, *Crit Rev Biochem* (1986) 20, 409-474.
- Luisi, PL, y B Steinmann-Hofmann, *Methods Enzymol* (1987) 136, 188-216.
- Luisi, PL, M Giomini, MP Pileni y BH Robinson, *Biochim Biophys Acta* (1988) 947, 209-246.
- Lüthi, P, y PL Luisi, *J Am Chem Soc* (1984) 106, 7285-7286.
- Martinek, K, AV Levashov, NL Klyachko, VI Pantin e IV Berezin, *Biochim Biophys Acta* (1981) 657, 277-294.
- Martinek, K, YL Khmeinitiski, AV Levashov e IV Berezin, *Dokl Akad Nauk SSSR* (1982) 263, 737-741.
- Martinek, K, AV Levashov, N Klyachko, YL Khmelinski e IV Berezin, *Eur J Biochem* (1986) 155, 453-468.
- Maestro, M, y AD Keith, *J Cell Biol* (1984) 99, 180s-187s.
- Meir, P, y PL Luisi, *J Solid Phase Biochem* (1980) 5, 269-273.
- Menger, FM, y G Saito, *J Am Chem Soc* (1978) 100, 4376-4379.
- O'Coonor, CJ, y RE Ramage, *Aust J Chem* (1980) 33, 695-698.
- Page, DI, "The Scattering of Neutrons by Liquid Water", en *Water a Comprehensive Treatise*. F Franks (Ed) (Plenum, Nueva York, 1972).
- Pfammatter, N, G Ayala y PL Luisi, *Biochem Biophys Res Commun* (1989) 161, 1244-1251.
- Poon, PH, y MA Wells, *Biochem* (1974) 13, 4928-4936.
- Ramakrishnan, VR, A Darszon y M Montal, *J Biol Chem* (1983) 258, 4857-4860.
- Setlow, P, *The Bacterial Spore* (Academic Press, Londres, 1983).
- Smith, RE, y PL Luisi, *Helv Chim Acta* (1980) 63, 2302-2311.
- Schönfeld, M, M Montal y G Feher, *Biochem* (1980) 19, 1535-1542.
- Sheu, EY, KE Göklen, TA Hatton y SH Chen, *Biotech Prog* (1986) 2, 175-179.
- Speiser, P, "Biological and Technological Relevance of Amphiphilic Structure in Apolar Media", en *Reverse Micelles*. PL Luisi y BE Straub (Eds) (Plenum, Nueva York, 1984) pp 339-350.
- Steinmann, B, H Jackle y PL Luisi, *Biopolymers* (1986) 25, 1133-1137.
- Tanner, JE, *Arch Biochem Biophys* (1983) 224, 416-428.
- Thompson, KF, y LM Gierasch, *J Am Chem Soc* (1984) 106, 3648-3652.
- Tondre, C, y A Xenakis, *Surfactants in Solution* (Plenum, Nueva York, 1984) p 1881.

- Verhaert, MDR, R Hilhorst, M Vermue, TJ Schaafsma y C Veeger, *Eur J Biochem* (1990) 187, 59-72.
Verhaert, MDR, B Tyrakowska, R Hilhorst, TJ Schaafsma, C Veeger, *Eur J Biochem* (1990) 187, 73-79.
Walde, P, Q Peng, NW Fadnavis, E Battistel y PL Luisi, *Eur J Biochem* (1988) 173, 401-409.
Wojcieszyn, JW, RA Schlegel, ES Wu y KA Jacobson, *Proc Natl Acad Sci USA* (1981) 78, 4407-4410.
Zaks, A, y AM Klibanov, *J Am Chem Soc* (1986) 108, 2767-2768.
Zhou, Y, y G Stell, *Mol Phys* (1989) 68, 1265-1275.

ABSTRACT

The classic theory of enzyme kinetics is based on the results obtained with enzymes in aqueous solutions. However, enzymes

in the cell are in an environment with physicochemical properties far away from an aqueous solution. Recently, the study of enzymatic catalysis in media with very low and variable water content (from interphase to bulk water) has been developed; in these systems both enzyme and water are solubilized inside a reversed micelle in an apolar organic solvent. In this review the general properties of reversed micelles and those of the water contained inside them are described. Results are shown on the effect of variable amounts of water on the catalytic activity of an enzyme, and how they have been obtained through the study of the behavior of enzymes trapped in the aqueous core of reversed micelles. Finally, the use of these microheterogeneous media on the study of catalysis of some multienzyme complexes as well as of bacterial cells transferred *in toto* to apolar organic systems with a low water content is reviewed.

LA FUNDACION FORD
Y LA FUNDACION
JOHN D. AND CATHERINE T. MacARTHUR
ANUNCIAN
EL PROGRAMA REGIONAL
DE
**BECAS
DE
POSTGRADO**
EN LAS CIENCIAS SOCIALES 1991

Propósito

Iniciación de estudios de maestría y doctorado, en el extranjero, hasta dos años, en las siguientes áreas:

- Antropología
- Asuntos internacionales
- Ciencias políticas
- Derecho público (con preferencia en derechos humanos, constitucionales, de la mujer y de grupos minoritarios)
- Economía
- Geografía
- Historia
- Política pública
- Psicología social
- Salud pública
- Sociología

Criterios para la selección

- Ciudadano Mexicano o Centroamericano.
- Calificación académica.
- Compromiso con las tareas de análisis y desarrollo en su país o región.
- Calidad de los programas de postgrado elegidos y relación de los mismos con los objetivos académicos y profesionales del candidato.
- Programa de postgrado fuera del país de origen.
- Vinculación con la institución nacional que apoye la solicitud y le asegure una posición a su regreso al país.
- Admisión oficial e incondicional al programa de postgrado.
- Ayuda económica complementaria.
- Conocimiento adecuado del idioma en el cual se hará el programa.

Las solicitudes e información complementaria se puede pedir a:

Institute of International Education
Programa Regional de Becas de Postgrado.
Londres 16, 2º piso
Col. Juárez
06600 México D.F.

El Programa de Becas en las Ciencias Sociales no ofrece apoyo para aquellos estudiantes que estén escribiendo o llevando a cabo investigación para tesis.

Fechas

- El límite de entrega de solicitudes y anexos es el 15 de marzo.
- La decisión del comité de selección se informará en el mes de junio.

Respiratory electron transfer activity in an asolectin-isoctane reverse micellar system

Laura Escobar⁺ and Edgardo Escamilla[•]

[•] Instituto de Fisiologia Celular, Universidad Nacional Autonoma de Mexico, A.P. 70-242, 04510 Mexico, D.F. and ⁺Unidad de Investigacion Biomedica, Centro Medico Nacional, Instituto Mexicano del Seguro Social, A.P. 73032, 06760 Mexico, D.F.

Author to whom correspondence should be sent: Edgardo Escamilla.
Instituto de Fisiologia Celular, Universidad Nacional Autonoma de Mexico, A.P. 70-242, 04510 Mexico, D.F.

telephone: (915) 5-50-52-15 Ext. 4887

FAX: 525 5-48-03-87

Bitnet: IFISCEL@UNAMVMI

SUMMARY

Bovine heart submitochondrial particles (SMP) were solubilized in an asolectin isooctane reverse micellar system and the functionality of the respiratory chain was tested by spectroscopic and amperometric techniques. Electron transfer rate supported by NADH was very slow as evidenced by the low cytochrome reduction levels attained over long incubation periods. In the presence of KCN, NADH caused 34% and 12.5% reduction of the cytochromes a_3 and c , respectively, and negligible reduction of cytochrome b . Supplementation of the system with menadione rose the NADH-dependent reduction of all the cytochromes to levels that were close to the total content. However, no measurable O_2 uptake activity took place in the presence of NADH plus menadione, or with ascorbate (or NADH) plus TMPD reducing systems. Therefore, it is suggested that in the organic medium, electron transfer from NADH to O_2 is arrested at the terminal oxidase step.

Cytochrome oxidase reduced by ascorbate (or NADH) plus TMPD seems to be trapped in its half reduced state (i.e. $a^{2+} a_3^{3+}$). Although it is poorly reactive with O_2 , it can transfer electrons back to cytochrome c and TMPD. Noteworthy, the electron transfer block to O_2 was overcome when PMS was used instead of TMPD. This seems to be due to the recognized capacity of PMSH₂ to carry out simultaneous reduction of both, a CuA and a_3 CuB redox centers of cytochrome oxidase.

The cytochrome oxidase reaction in the organic solvent was highly sensitive to KCN (K_i 1.9 μM) and showed bell-shaped kinetics towards the PMS concentration and a sigmoidal response to water concentration, reaching its maximal turnover number (18 sec^{-1}) at 4 mM PMS and 1.1 % (v/v) water. This value was about 92 % and 54 % of that attained with the native and reconstituted enzyme, respectively, in totally aqueous assays.

Key words: reverse micelles / micellar enzymology / respiratory chain / cytochrome oxidase / organic solvents

Running title: Respiratory chain activity in isooctane.

INTRODUCTION

The aqueous microenvironment which surrounds an enzyme has been the focus of extensive research as it is widely considered to play an important role on catalysis (1-6). In fact, there is evidence supporting the idea that bound water molecules, coupled with localized conformational changes, can govern substrate specificity and affinity of an enzyme (7).

In the study of the role of water over the enzyme catalysis, the use of reverse micelle systems has made possible the study of enzymes in different aqueous microenvironments (4, 5,). Indeed many soluble enzymes have been studied (8).

Attempts have been made to work with biological systems which are more complex than isolated enzymes, and it has been shown that reactions can take place between enzymes trapped in separate reverse micelles (9, 10).

Because of their high degree of hydrophobicity, membrane-associated enzymes in reverse micelles systems provide an interesting model to study the role of water on catalysis. However, few efforts have been performed with this aim (11-13). Previous trials with some components of the mitochondrial respiratory chain in reverse micellar systems have shown that electron transfer takes place from cytochrome c to cytochrome aa₃ (11). More recently, O₂ uptake activity and its inhibition by cyanide were shown for cytochrome oxidase in an asolectin reverse micellar system (13).

Here we studied if electron transfer activity in the whole span of the respiratory chain (i.e. from NADH to O_2) could take place in a reverse micellar system. To this purpose, bovine heart submitochondrial particles (SMP) were dissolved in an asolectin-isooctane medium containing limited amounts of water, and the activity of the individual respiratory complexes, as well as their coupled electron transfer activities were analyzed by spectroscopic and polarographic techniques.

MATERIALS AND METHODS

BIOLOGICAL PREPARATIONS. Mitochondria were obtained from bovine hearts (14) and submitochondrial particles were prepared according to (15). Cytochrome oxidase was purified as reported in (16).

Solubilization of the respiratory complexes, substrates and inhibitors into the reverse micelle system. Samples containing 1-3 mg of protein of SMP in 70 μ l of 0.25 M sucrose and 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, were mixed with 1 ml of isooctane containing 10 mg of partially purified soybean asolectin (17). Samples in tubes (1.7 x 14.5 cm) were sonicated for two minutes in a cylindrical bath sonicator (model G112SPIT, Laboratory supplies Co., Inc. Hicksville, N.Y.). Emulsions were fluxed with N_2 until transparency. The initial volume was restored with isooctane. Reverse micelles of cytochrome c (3.3 nmol, Sigma type III) or cytochrome oxidase (1.25 nmol) in 7 μ l of 0.2M Tris, pH 7.4, were prepared as described for SMP preparations.

Substrates and inhibitors in reverse micelles were prepared as follows: 5-10 μl of 1M solutions of either NADH, sodium ascorbate, N, N, N', N' tetramethyl, p phenyldiamine, (TMPD), phenazine methosulfate (PMS) or KCN in 0.5M Tris-HCl, pH 7.4, were added to 1 ml of 10 mg ml^{-1} asolectin in isooctane. These preparations were sonicated for 1 minute to obtain transparent solutions. Stock solutions of 0.2M menadione (MQ_0), 0.2M menadiol (MQ_0H_2) were prepared in pure toluene. MQ_0H_2 was obtained by reduction of MQ_0 with sodium borohydride according to Fieser (18). Where indicated, 5 μl aliquots from an immediately prepared aqueous concentrated dithionite solution were added to achieve full reduction of cytochromes in the organic preparations.

Determination of water in the organic samples. The amount of water in SMP-isooctane preparations was determined from typical SMP-reverse micelle samples prepared in $^3\text{H}_2\text{O}$. The initial radioactivity content present in the emulsion (2.87×10^6 cpm ml^{-1}) was referred to the initial water content ($75 \mu\text{l ml}^{-1}$) and compared to the remaining radioactivity in the reverse micelle preparations (5.6×10^5 cpm ml^{-1}) to calculate its water content ($15 \mu\text{l ml}^{-1}$).

Spectral measurements. Concentration of cytochromes was measured from dithionite reduced minus air oxidized spectra. The following wavelength pairs and millimolar extinction coefficients were used: cytochrome aa_3 , ϵ 603-630 = $16.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; cytochrome c, ϵ 555-540 = $18.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and cytochrome b, ϵ 562-575 = 28.5 mM^{-1}

cm^{-1} (19). At these wavelength pairs no significant changes in the ϵ were observed in the reverse micelle medium (not shown).

Reduction of cytochromes was followed in an Aminco DW-2C UV-VIS spectrophotometer at room temperature (1.0 cm light path quartz cuvettes) as described in (11).

Activity assays in the organic medium. Cytochrome oxidase activity in the organic solution was assayed with a Clark oxygen electrode placed in an all glass chamber at 30°C (20) containing 1.0 mg of SMP and 0.2-9.7 mM PMS in 1.8 ml of the micellar medium. The reaction was started with 10 μl of 0.5 M NADH aqueous solution or 600 μl of 10 mM ascorbate in reverse micelles. Spontaneous oxidation of PMSH_2 in the micellar medium was determined after inhibition of cytochrome oxidase with 90 μl of 10 mM KCN in reverse micelles.

The oxygen electrode was calibrated with the reverse micelle system in isooctane and the oxygen concentration ($2.0\ \mu\text{mol O}_2\ \text{ml}^{-1}$) was calculated according to the calibration method described elsewhere (20).

Concentrations in the apolar organic media were expressed on the basis of the total volume (overall concentration) of the assay, following the criterion discussed in (20, 21). The turnover number for the different cytochrome oxidase preparations was determined according to (22), considering the amount of cytochrome c or PMSH_2 molecules oxidized per second per heme a .

Liposomes. After evaporation of isooctane from reverse micelle

samples, the residues were hydrated with 200 μ l of 0.1 M Tris-acetate, pH 7.4, and resuspended by vortex agitation.

Activity assays in the aqueous medium. Succinate dehydrogenase activity was determined at 25 °C and pH 7.4 as described in (23). The sample (1 ml) consisted of a mixture of: 20 mM disodium succinate, 50 mM potassium phosphate (pH 7.4), 0.54 mM PMS, 0.11 mM 2,6 dichlorophenol indophenol (DCPIP), 0.1 mM KCN and 0.1-0.15 SMP-protein. NADH dehydrogenase activity was measured under the same conditions, but replacing disodium succinate and PMS with 0.15 mM NADH (24). An extinction coefficient of $19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ was used for DCPIP (600 nm).

Oxidase activities in SMP and in liposome preparations were measured with the Clark oxygen electrode. Disodium succinate (40 mM) and NADH (1mM) were used as electron donors. Cytochrome oxidase activity was measured with a mixture containing: 5mM sodium ascorbate, 0.15 mM TMPD and 9 μ M cytochrome c, in 100mM KH_2PO_4 , pH 7.4. Assays were carried out with 0.25 mg of SMP protein in a final volume of 2.5 ml.

Protein determination was performed with the Lowry modified method of Markwell (25) which eliminates most of the interference due to lipids.

RESULTS

Spectral evidence supporting retention of protein structure in reverse micelle systems has been obtained previously with cytochrome c and cytochrome oxidase (11), and for other membrane

proteins (26-29). However, it was judged important to evaluate to what extent the individual enzymic complexes were preserved after their solubilization in the micellar medium. Accordingly, the content of the a, b, and c cytochromes was spectroscopically determined in the SMP dispersed in buffer, in asolectin-reverse micelles, and in liposome preparations formed from reverse micelles (Table I).

The concentrations of cytochromes c and aa₃ (as reduced by ascorbate) in SMP-isooctane and SMP-liposomes were 20% lower than those of the native SMP preparation. Partial denaturation and adherence of materials to the glass walls may account for the loss observed. Similar data have been reported for cytochromes c and aa₃ in an asolectin-toluene medium (11). On the other hand, cytochrome b seems to be denatured in a high proportion during its transfer to the organic medium, since in the organic medium no more than 54% of the total amount transferred could be detected (as reduced by dithionite; Table I). It has been claimed that the solubilization of myoglobin and cytochromes P₄₅₀ and b₅ in reverse micelles, is accompanied by a significant decrease in the intensity of their Soret absorption band (30). This seems not to be the case for cytochrome b in our reverse micelles, since after evaporation of the organic solvent, the amount of cytochrome b equated that detected in the organic medium (Table I).

Enzymic activity associated to NADH and succinate dehydrogenases,

and to cytochrome oxidase was determined in liposomes after isooctane removal. These data were compared to those of the original SMP preparation (Table I). Specific activities of NADH and succinate dehydrogenases and of cytochrome oxidase (i.e. 153, 74 and 640 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, respectively), recorded in the liposome fraction were close to the values determined in the original SMP preparations (i.e. 215, 80 and 580 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, respectively). These results suggest that native structure and enzymic activity of most of the respiratory complexes were preserved during their residence in the micellar medium. This fact prompted us to investigate whether or not electron transport activity could take place in the reverse micelle system.

Electron transfer activity in isooctane. Electron transport through the respiratory chain in the reverse micelle medium was studied. To this purpose spectra of SMP dispersed in asolectin-isoctane were recorded at 4 min intervals, after addition of each of the chemicals noted below.

The highest reduction obtained after each addition is shown (Fig. 1A) and the level of reduction for each cytochrome was plotted against time after each addition (Fig. 1B).

Addition of NADH (0.3 mM final) caused a low steady state reduction of all the cytochromes (trace b in Figure 1A). However, in the presence of 0.5 mM KCN, NADH-dependent reduction increased steadily to a maximum after 30-40 min of incubation (trace b' in

Figure 1A, 1B). Compared to the reduction levels attained with dithionite (trace d in Figure 1A), NADH plus KCN caused the reduction of 34% ($0.23 \text{ nmol mg}^{-1}$) of cytochrome oxidase but, only 12.5% ($0.06 \text{ nmol mg protein}^{-1}$) of cytochrome c, and no measurable amounts of cytochrome b. Experimentally, reduced cytochrome a₃ was accumulated at an approximate rate of 7 pmol min^{-1} ; the reduction rate of cytochrome c was even slower (Figure 1B).

Regardless of the low reduction rates, the above results clearly indicated that electron transfer activity was taking place across the whole span of the respiratory chain (i.e. from NADH to O_2). However, reduction of cytochrome b appeared to be the rate limiting step in the organic medium. It was thought that partition of ubiquinone into the isooctane phase could account for the low reduction levels observed for cytochrome b. Thus we studied if the addition of 2 mM MQ₀ to the sample containing NADH plus KCN, affected the reduction level of the cytochromes. A dramatic effect was observed particularly for cytochrome b (trace c in Figure 1A). Within the first 6-8 min of incubation, a reduction plateau was reached; it was about 75-80 % of the total reducible cytochromes (dithionite, trace d in Figure 1A, 1B). Thus, MQ₀ might be replacing the endogenous CoQ₁₀ as electron carrier from complex I to complex III in the organic medium. In this respect, it is well known that MQ₀ can occupy the physiological site of CoQ₁₀ in the mitochondrial respiratory chain (31).

The reduction rate for each cytochrome type as a response to the MQ_o concentration was determined by dual wavelength spectroscopy (Figure 2A), using the wavelength pairs noted in the methods section. In the presence of NADH plus KCN, maximal reduction rates for all the cytochromes were attained at 0.5-0.7 mM MQ_o. It is interesting to consider that to saturate complex I and complex bc₁ the overall concentration of MQ_o required to reach maximal velocities in the asolectin-isoctane medium was lower by about one order of magnitude of the concentration required for CoQ₁₀ and CoQ₁₀H₂ in the native phospholipid membrane (i.e. K_m= 10 mM and 3.3 mM, respectively, 32).

To know whether or not the bc₁ complex was acting as mediator in the reduction of cytochromes c and aa₃ by MQ_oH₂ in the organic medium, the ability of MQ_oH₂ (prepared by borohydride reduction of MQ_o, see methods) to reduce cytochrome c and aa₃ in the presence and absence of the bc₁ complex was explored. When 2 mM MQ_oH₂ was added to SMP in asolectin-isoctane a clear reduction response was observed for cytochromes b, c and aa₃ (Figure 2B). On the other hand, no reduction was detected when MQ_oH₂ was added to either cytochrome c or purified cytochrome oxidase (Figure 3C); this indicates that the bc₁ complex was instrumental in the transfer of electrons from MQ_oH₂ to cytochrome c in the asolectin-isoctane medium.

The electron transport rate established by 2 mM MQ_oH₂ was calculated from the time course of reduction of cytochrome

oxidase shown in Figure 2B. In the presence of KCN the rate value obtained ($0.38 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) was low compared to the NADH oxidase activity recorded in the aqueous SMP preparation ($124 \text{ nmol O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$, not shown).

Back electron transport in the asolectin-isooctane medium. We have suggested (11) that in the organic apolar medium, cytochrome oxidase reduced by ascorbate (alone or in combination with TMPD and/or exogenous cytochrome c) remains trapped in its half reduced state (i.e. $a^{2+} a_3^{3+}$) for long periods. Thus, it was considered of interest to ascertain if the half reduced enzyme could transfer electrons back to an electron acceptor such as TMPD_{ox} . To this purpose, a SMP-asolectin isooctane preparation was spectrophotometrically titrated by step-addition of small quantities of ascorbate (about 20 nmol, total) until no increase in the reduction levels of the cytochromes was observed (Trace a in Fig. 3A). At this point, little excess of ascorbate was oxidized by vortex agitation. Thereafter, oxidation of the above preparation was spectroscopically titrated by step-addition of the indicated concentrations of TMPD. This caused the progressive oxidation of cytochromes (trace b-e in Fig. 3A). Plotting of the bleaching process by TMPD_{ox} (Fig. 3B) showed that cytochrome b was fully oxidized at the lowest TMPD concentration used (i.e. $0.5 \mu\text{M}$). Full oxidation of cytochromes c and aa_3 was accomplished with $1.8 \mu\text{M}$ and $2.5 \mu\text{M}$ TMPD, respectively. Oxidation of the half reduced cytochrome aa_3 by TMPD took place in the absence (not

sigmoidal with a rapidly ascending part between 0.55 and 1.14% water (v/v) (Figure 4B). Further water additions, up to 1.5% did not affect the maximal activity reached (i.e. $0.52 \mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ at 1.14-1.22% H_2O). Our results are in accordance with Garza-Ramos et al (12) who showed that catalysis of F_1 -ATPase transferred to asolectin-toluene was progressively stimulated as the water content of the system was raised to 1.35% H_2O (v/v). Interestingly, the catalytic response to water of F_1 -ATPase and of cytochrome oxidase (Figure 4B) followed a saturation kinetics and not the otherwise typical bell shaped curve reported for many non-membrane enzymes (34-37).

DISCUSSION

The rate of electron transfer with NADH as substrate in the organic medium was low* as evidenced by the low cytochrome-reduction levels (even in the presence of KCN) attained over long periods of incubation (Fig. 1A and 1B). Reduction of cytochrome b appeared to be the slowest rate step. Accordingly, supplementation of the system with menadione to replace the endogenous CoQ_{10} partitioned into the isooctane organic phase, caused close to total reduction of the whole cytochrome assortment. However, even under these circumstances, oxygen uptake measured with the Clark O_2 electrode was hardly detected (not shown).

Several causes can account for the low electron transfer activity by SMP in the asolectin-isooctane medium.

(I) Extensive inactivation of the respiratory complexes might take place during their transfer and/or their residence in the apolar organic medium. Irreversible enzyme inactivation can be neglected as a major factor on the basis that not less than 54% of the cytochromes and 70% of the original activities (i.e. cytochrome b and NADH dehydrogenase, respectively, Table I) could be recovered in liposomes after elimination of the organic solvent. Moreover, in the presence of NADH plus menadione, the cytochromes in the reverse micellar system reached reduction levels that were 75-80% of the total reducible content (Fig. 1A, B) indicating that cytochromes complexes in the organic medium retained their redox properties and specific sequential interactions that support electron transfer.

(ii) Respiratory complexes in the membrane bilayer are restricted to lateral diffusion movements which in turn favor the catalytic interactions (oriented collisions) between the partners (38). On the assumption that the membrane structure is lost during transfer to the isooctane medium, it could be expected that the dispersed respiratory complexes will randomly diffuse in a three dimensional pattern, making less frequent the catalytic encounters between the partners.

(iii) Internal electron transfer between redox centers of individual respiratory complexes could be much slower in the organic medium than in conventional aqueous systems. This seems to be the case at least for cytochrome oxidase, since electron

transfer to O_2 in the organic medium appears to be arrested between cytochrome a and cytochrome a_3 redox centers (11). In the same line, Garza-Ramos et al (12) have shown that the activity of F_1 -ATPase is one hundred times slower in reverse micellar systems than in water assays.

Therefore, we propose that electron transfer activity from NADH to O_2 in the organic medium is largely controlled by diffusion and severely arrested at the terminal oxidase reaction step.

Kornblatt and Hui Bon Hoa (39, 40) have postulated that there is an obligatory solvent cycle associated with the molecular mechanism of cytochrome oxidase. According to their scheme, water exchange with the medium is coupled to conformational changes during transfer of electrons from reduced aCu_A to $a_3 Cu_B$ centers. Therefore, high hydrostatic pressure (39) or low water activity (11, 40) renders the conditions for trapping the enzyme on its half reduced state. This accumulated enzyme intermediate was able to transfer back its electrons towards cytochrome c-TMPD (Fig.3). This result agrees with the Kornblatt model (40) where the osmotically sensitive step is localized after the entry of electrons to the cytochrome aCu_A center.

More recently Bona et al (13) reported that 2, 5, 3, 6 tetramethyl-p-phenyldiamine (DAD) could reduce the aCu_A center of cytochrome oxidase, at either W_0 value of 1.8 or 8.0 in an asolectin-hexane system. However, in the latter case the spectroscopic pattern also revealed a modest reduction of the

$a_3 Cu_B$ center that could be confirmed by measurements of the O_2 uptake in a decane medium using high concentrations of cytochrome oxidase (i.e. $3.2 \mu M$). The authors did not state the specific activity obtained. Using their data and considering the O_2 concentration in decane as $2.76 \mu M$ (20) we could calculate an approximate turnover value of 0.5 sec^{-1} . Contrasting with this low activity, we found that NADH-PMS (fig.4A) or ascorbate-PMS (fig. 4B) reducing systems were far more efficient to stimulate the cytochrome oxidase activity in the organic medium, reaching a turnover number value of 18 sec^{-1} . This value was about 92 % and 54 % of the activity attained with the native SMP and liposome-reconstituted preparations (Table I) in totally aqueous assays. We consider that the lower activity obtained with TMPD and DAD in comparison to that observed with PMS may be explained by the ability of $PMSH_2$ to produce the simultaneous reduction of both aCu_A and a_3Cu_B redox centers (41). Therefore, the PMS reducing system bypassed the internal electron transfer block imposed by the low water activity of the micellar medium.

Acknowledgments

We are grateful to Dr Armando Gómez-Puyou for his helpful discussions and to Dr Diego González-Halphen for his kind gift of cytochrome oxidase pure preparation. We also thank the technical assistance of Miriam Vázquez and Martha Contreras. This work was supported by grants IN202191 DGAPA, UNAM and D111 903667, CONACYT.

Figure 1. Respiratory electron transport in an asolectin-isooctane reverse micellar system. SMP (1 mg of protein) were solubilized in 1 ml of 10 mg ml^{-1} asolectin and 1.5% water in isooctane as described in methods. Spectra in part A are as follows: oxidized minus oxidized baseline (a). NADH (5 μmol) reduced minus oxidized spectrum after 12 min of incubation at 25°C (b). The same preparation after 45 min incubation in the presence of 0.5 μmol KCN (b'). Thereafter, 2.0 μmol menadione (MQ_0) was added to the sample cuvette and incubation continued for additional 20 min (c). Full reduction attained with 5 μl of a saturated dithionite solution (d). Part B shows the time reduction course for each cytochrome type, calculated from the spectra taken at 4 min intervals after each of the additions listed above. The wavelength pairs and millimolar extinction coefficients noted in methods were used. MQ_0 , menadione; D, dithionite. \circ , \square , \blacksquare , cytochrome aa3, c and b, respectively.

Figure 2. Menadione (MQ_0) and menadiol (MQ_0H_2) dependent electron transport in the isooctane medium. (A) Effect of the MQ_0 concentration on the NADH-dependent reduction-rate of cytochromes. SMP-isooctane preparations similar to those in figure 1 were preincubated for 1 min in the presence of 0.5 mM KCN at the indicated MQ_0 concentrations. The reaction was started by addition of 5 μmol of NADH and the reduction course was followed by dual wavelength spectroscopy at the specific

wavelength pairs for each cytochrome (see methods). (B) MQ₀H₂-dependent reduction of the SMP-cytochromes in the Isooctane medium. (C) MQ₀H₂-dependent reduction of purified cytochrome oxidase (1 nmol) or cytochrome c (1 nmol) in the Isooctane medium. Preparations shown in parts B and C contained 0.5 mM KCN. In all cases the reaction was started by addition of 2 μmol MQ₀H₂.

Figure 3. Oxidation of the half reduced cytochrome oxidase by TMPD in the Isooctane medium. (A) A typical SMP-*asolectin*-Isooctane preparation containing 0.5 mM KCN was spectroscopically titrated by step addition of tiny quantities of ascorbate (about 0.2 μmol) just to reach maximal reduction of c and *aa3* cytochromes (trace a). Thereafter, the above preparation was spectroscopically titrated by step addition of TMPD (0.5, 1.1, 1.36 and 1.8 μM; traces b to e, respectively). (B) The plot shows the bleaching percent reached for each cytochrome type at the indicated TMPD concentrations. (C) The scheme shows the proposed pathway for the electron back-flow from reduced cytochrome oxidase and the straightforward electron transfer from cytochrome b to the oxidized TMPD.

Figure 4. Polarographic measurement of oxygen uptake by SMP-cytochrome oxidase in the Isooctane medium. (A) Effect of the PMS concentration on the cytochrome oxidase activity and its inhibition by 0.5 mM KCN. Typical SMP-*asolectin* Isooctane

preparations containing 3 mM NADH (as bulk electron donor) were amperometrically titrated with the indicated PMS concentrations (o). The lower curve shows the same experiment but in the presence of 0.5 mM KCN (O). (B) Water titration curve of the cytochrome oxidase activity in the isooctane medium. SMP-isooctane samples containing 4 mM PMS were prepared at the indicated water concentrations. The cytochrome oxidase activity was started by addition of 3 μ mol ascorbate (bulk electron donor) prepared in reverse micelles as described in methods. 100% activity corresponded to an specific O₂ uptake activity of 0.52 μ mol O₂ mg⁻¹ min⁻¹.

TABLE I. Recovery of cytochromes and enzymic respiratory activities from asolectin-isooctane preparations of bovine heart submitochondrial particles (SMP).

CYTOCHROME CONTENT (nmol mg ⁻¹)			
HEME	SMP	ISOOCTANE ^a	LIPOSOMES ^b
c	1.34	1.0	1.0
b	1.1	0.6	0.6
aa3	1.64	1.4	1.38

ENZYMIC ACTIVITIES (nmol mg ⁻¹ min ⁻¹)			
	SMP (a)	Liposomes (b)	(b)/(a) ratio
NADH dehydrogenase	215	153	0.71
Succinate dehydrogenase	80	74	0.92
NADH oxidase	124	---	
Cytochrome oxidase	580	640	1,100

^a 2 mg protein of SMP in 70 μ l of 0.25 M sucrose, 40 mM Tris-HCl buffer at pH 7.4, were diluted in 1 ml of the above buffer or solubilized in 1 ml of 10 mg ml⁻¹ asolectin in isooctane to prepare reverse micelles (see methods). These preparations (SMP and isooctane in table heads) were used for the quantification of cytochromes from dithionite reduced minus air oxidized spectra.

^b Organic preparations as those described above were fluxed to dryness with a N₂ current and the precipitate was resuspended in 200 μ l of 0.1 M Tris-acetate buffer, pH 7.4, to prepare liposomes

as described in methods. Liposome preparations were used for cytochrome quantification and determination of enzyme activities noted in the second part of the table. For comparison, activity assays were also performed (see methods) with the aqueous preparations of SMP. NADH and succinate dehydrogenase activities are expressed as nmol of reduced DCPIP mg protein⁻¹ min⁻¹ and NADH oxidase activity as nmol of O₂ consumed mg protein⁻¹ min⁻¹.

REFERENCES

- 1 Zaks A, Klibanov AM (1985) Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 3192-3196.
- 2 Zaks A, Klibanov AM (1988) Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. *J Biol Chem* 263, 3194-3201.
- 3 Klibanov AM (1989) Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. *Trends Biochem Sci* 14, 141-144.
- 4 Martinek K, Levashov AV, Klyachko NL, Khmel'nitski YL, Berezin IV (1986) Micellar enzymology. *Eur J Biochem* 155, 453-468.
- 5 Luisi PL, Magid LJ (1986) Solubilization of enzymes and nucleic acids in hydrocarbon micellar solutions. *Crit Rev Biochem* 20, 409-474.
- 6 Luisi PL, Giomini M, Pileni MP, Robinson BH (1988) Reverse micelles as hosts for proteins and small molecules. *Biochim Biophys Acta* 209-246.
- 7 Quijcho, F.A., Wilson, D.K., & Vyas, N.K. (1989) Substrate specificity and affinity of a protein modulated by bound water molecules. *Nature* 340, 404-407.
- 8 Luisi PL, Steinmann-Hofmann B (1987) Activity and conformation of enzymes in reverse micellar solutions. *Methods Enzymol* 136, 188-216.
- 9 Hilhorst R, Laane C, Veeger C (1983) Enzymatic conversion of apolar compounds in organic media using an NADH-regenerating system and dihydrogen as reductant. *FEBS Letts* 159, 225-228.
- 10 Laane C, Hilhorst R, Veeger C (1988) Design of reversed micellar media for the enzymatic synthesis of apolar compounds. *Methods Enzymol* 136, 216-229.
- 11 Escamilla E, Ayala G, Tuena de Gómez-Puyou M, Gómez-Puyou A, Millán L, Darszon A (1989) Catalytic activity of cytochrome oxidase and cytochrome c in apolar solvents containing phospholipids and low amounts of water. *Arch Biochem Biophys* 272, 332-342.
- 12 Garza-Ramos G, Darszon A, Tuena de Gomez-Puyou M, Gomez-Puyou A (1989) Catalysis and thermostability of mitochondrial F₁-ATPase in toluene-phospholipid-low-water systems. *Biochemistry* 28, 3177-3182.

- 13 Bona M, Fabian M, Sedlak M (1990) Spectral and catalytic properties of cytochrome oxidase in organic solvents. *Biochim Biophys Acta* 1020, 94-100.
- 14 Low H, Vallin I (1963) Succinate-linked diphosphopyridine nucleotide reduction in submitochondrial particles. *Biochim Biophys Acta* 69, 361-374.
- 15 Ayala G, Nascimiento A, Gómez-Puyou, A., Darszon, A. (1985) Extraction of mitochondrial membrane proteins into organic solvents in a functional state. *Biochim Biophys Acta* 810, 115-122.
- 16 Capaldi RA, Hayashi H (1972) The polypeptide composition of cytochrome oxidase from beef heart mitochondria. *FEBS Lett* 26, 261-263.
- 17 Kagawa Y, Racker E (1971) Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 246, 5477-5487.
- 18 Fieser L (1940) Antihemorrhagic compounds. *J Biol Chem* 133, 392-393.
- 19 Rieske JS (1967) The quantitative determination of mitochondrial hemoproteins. *Methods Enzymol* 10, 488-493.
- 20 Escobar L, Salvador C, Contreras M, Escamilla JE (1990) On the application of the Clark oxygen electrode to the study of enzyme kinetics in apolar solvents: the catalase reaction. *Anal. Biochem.* 184, 139-144.
- 21 Martinek K, Levashov AV, Klyachko NL, Pantin VI, Berezin IV (1981) The principles of enzyme stabilization. VI. Catalysis by water-soluble enzymes entrapped into reversed micelles of surfactants in organic solvents. *Biochim Biophys Acta* 657, 277-294.
- 22 Yonetani T (1966) Cytochrome oxidase from beef heart muscle. *Biochem Prep.* 11, 14-19.
- 23 Hatefi Y, Stiggall DL (1978) Preparation and properties of succinate:ubiquinone oxidoreductase (complex II). *Methods Enzymol* 53, 21-26.
- 24 Galante YM, Hatefi Y. (1978) Resolution of complex I and isolation of NADH dehydrogenase and an iron-sulfur protein. *Methods Enzymol.* 53, 15-21.

- 25 Markwell MAK, Haas SM, Tolbert NE, Bleber LL (1981) Protein determination in membrane and lipoprotein samples: manual and automated procedures. *Methods Enzymol* 72, 296-303.
- 26 Darszon A, Strasser R, Montal M (1979) Rhodopsin-phospholipid complexes in apolar environments: photochemical characterization. *Biochemistry* 18, 5205-5213.
- 27 Douzou P (1980) Cryoenzymology in aqueous media. *Adv Enzymol* 51, 1-74.
- 28 Delahodde A, Vacher M, Nicot C, Waks M (1984) Solubilization and insertion into reverse micelles of the major myelin transmembrane proteolipid. *FEBS Lett.* 172, 343-347.
- 29 Kendall-Tobias MW, Celis H, Almanza de Celis S, Crofts AR (1981) Hexane-solubilized reaction centre proteolipid complexes of rhodospseudomonas sphaeroides. *Biochim Biophys Acta* 635, 585-601.
- 30 Erjomin AN, Metelitzka DI (1983) Catalysis by hemoproteins and their structural organization in reversed micelles of surfactants in octane. *Biochim Biophys Acta* 732, 377-386.
- 31 Sanadi DR, Pharo RL, Sordahl LA (1967) NADH-CoQ reductase-assay and purification. *Methods Enzymol* 10, 297-302.
- 32 Lenaz G, Fato R, Castelluccio C, Degli Esposti M, Sainworth CM, Battino M, Parenti Castelli G (1988) Role of ubiquinone diffusion in mitochondrial electron transfer. Integration of mitochondrial function (JJ Lemasters, CR Hackenbrock, RG Thurman, HV Westerhoff, ed) Plenum Press, New York and London, 33-52.
- 33 Dickens F, McIlwain H (1938) Phenazine compounds as carriers in the hexosemonophosphate system. *Biochem J* 32, 1615-1625.
- 34 Klyachko NL, Levashov AV, Martinek K (1984) Catalysis by enzymes incorporated in reverse micelles of surface-active substances in organic solvents. Peroxidase in the aerosol OT-water-octane system. *Mol Biol* 18, 830-840.
- 35 Larsson KM, Adlercreutz P, Mattiasson B (1987) Activity and stability of horse-liver alcohol dehydrogenase in sodium dioctylsulfosuccinate/cyclohexane reverse micelles. *Eur J Biochem* 166, 157-161.
- 36 Sanchez-Ferrer A, Bru R, Garcia-Carmona, F (1988) Kinetic properties of polyphenoloxidase in organic solvents. A study in Brij 96-cyclohexane reverse micelles. *FEBS Lett* 233, 363-366.

37 Kumar A, Kumar A, Katiyar SS (1989) Activity and kinetic characteristics of glutathione reductase in vitro in reverse micellar waterpool. *Biochim Biophys Acta* 996, 1-6.

38 Hackenbrock CR, Chazotte B, Gupte SS (1986) The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J Bioenerg Biomem* 18, 327-364.

39 Kornblatt JA, Hui Bon Hoa G, Heremans K (1989) Pressure-induced effects on cytochrome oxidase: the aerobic steady state. *Biochemistry* 27, 5122-5128.

40 Kornblatt JA, Hui Bon Hoa G (1990) A nontraditional role for water in the cytochrome c oxidase reaction. *Biochemistry* 29, 9370-9376.

41 Halaka FG, Babock GT, Dye JL (1981) Kinetic distinction between cytochromes a and aa3 in cytochrome c oxidase. *J Biol Chem* 256, 1084-1087.

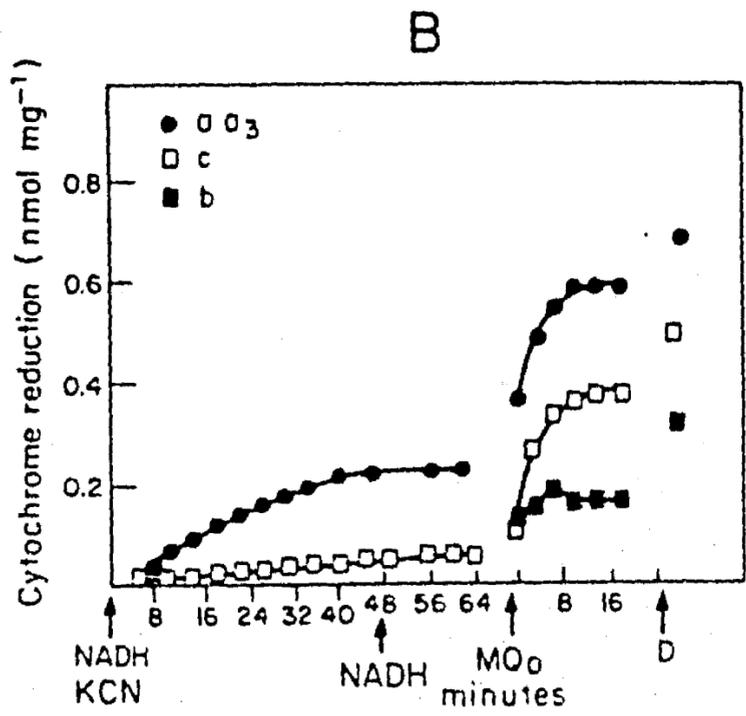
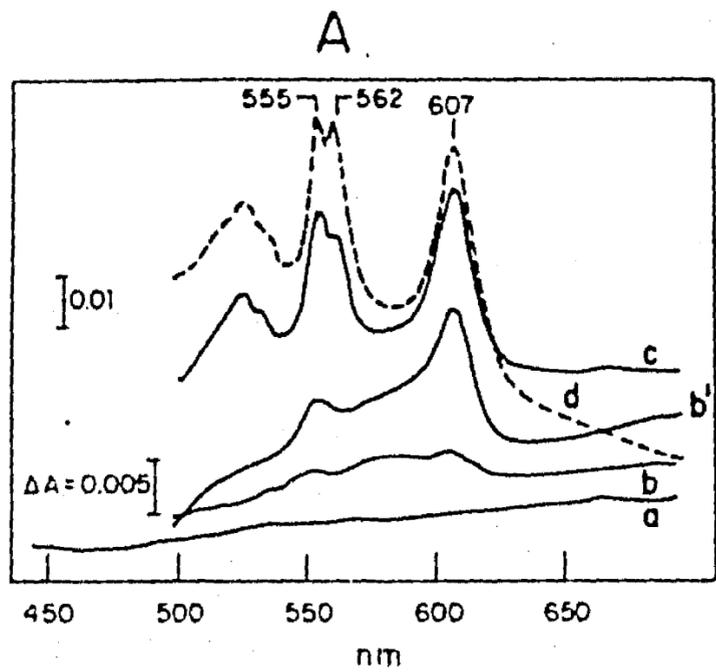


Figure 1

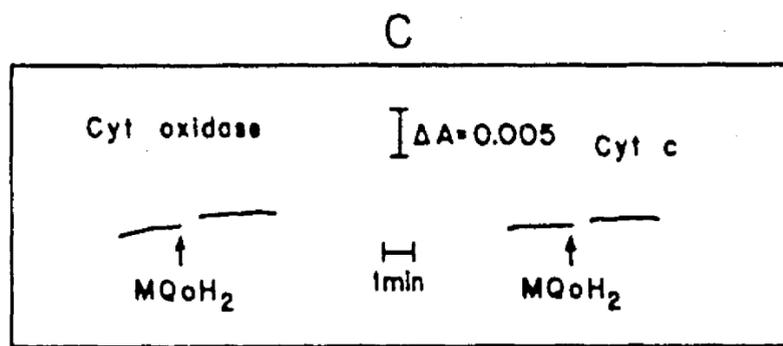
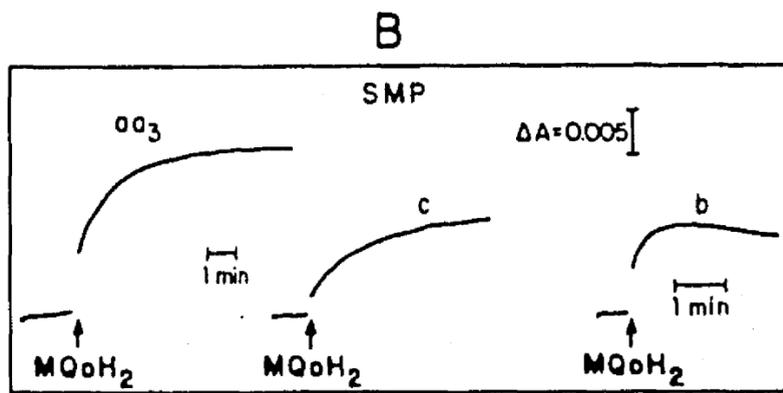
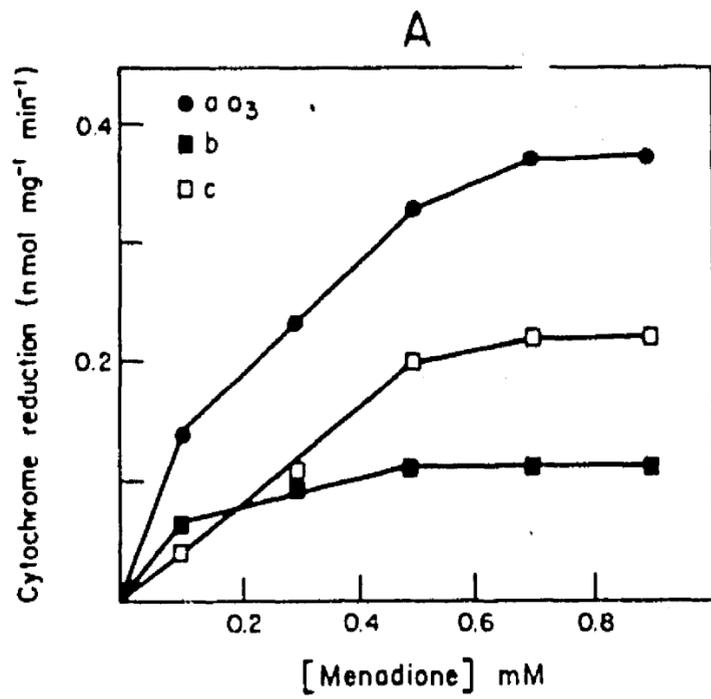


Figure 2

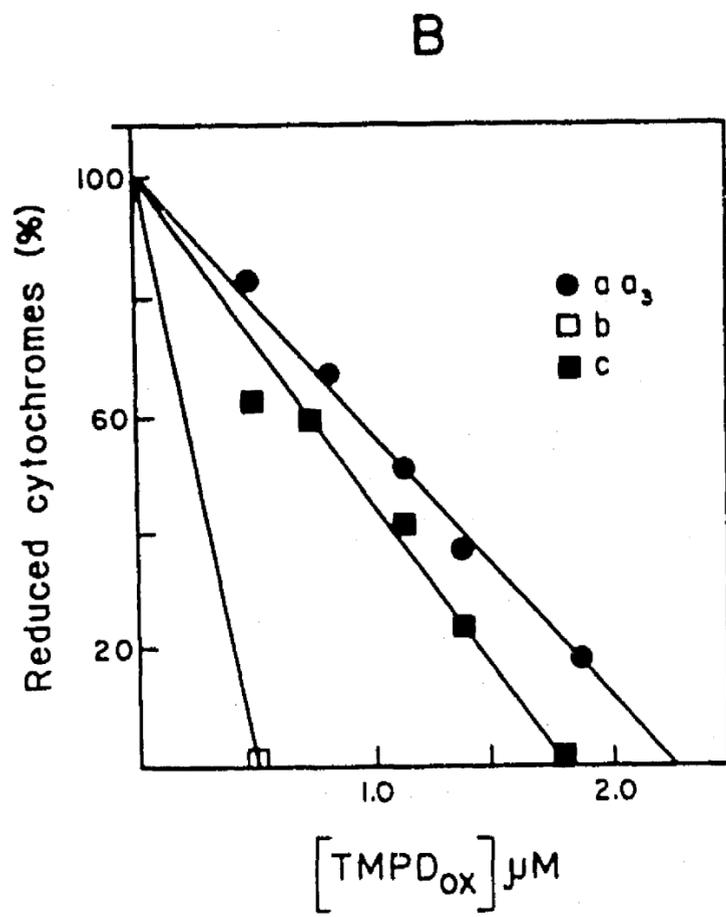
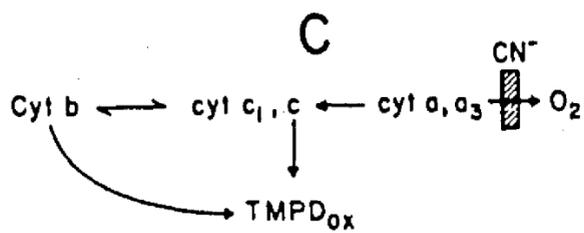
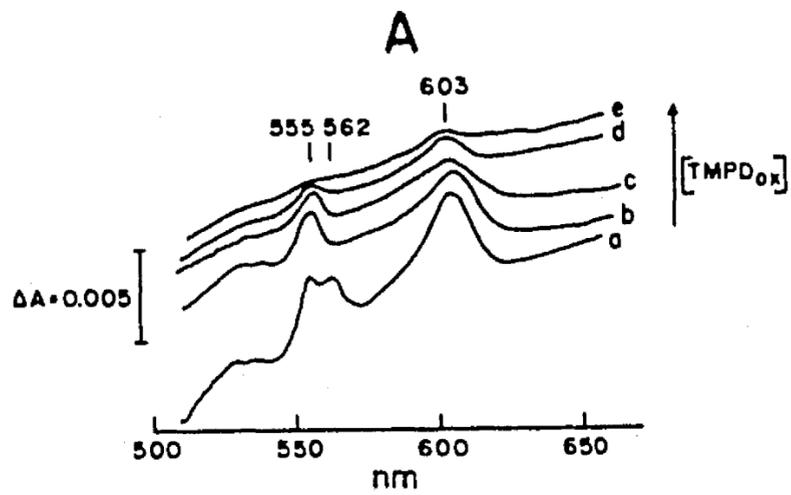


Figure 3