

03081

4

rej

Universidad Nacional Autónoma de México

---

Instituto de Fisiología Celular

(UACF y P del CCH)

**ESTUDIO DE LOS GRUPOS FUNCIONALES DE LA ENZIMA  
DESHIDROGENASA SUCCINICA**

**TESIS**

Que para obtener el Grado de:

**DOCTOR EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA**

Presenta:

**DAVID JOHN JAY GÓMEZ-FARÍAS.**

---

MEXICO, D.F.

1991

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**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.

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi gratitud a las personas que de alguna manera brindaron su apoyo para la realización de este trabajo, en particular:

Dr. Edmundo Chávez Cossío.

M. en C. Roberto Gleason Villagran.

Dr. Eduardo Muñoz Picone.

Dr. Rafael Zamorano Ulloa.

Este trabajo lo dedico a mi familia quien con su constante apoyo y estímulo no me dejó perder de vista mis objetivos.

## PREFACIO

En el presente trabajo se discute el papel de algunos grupos funcionales de la enzima deshidrogenasa succínica. La discusión se basa en los resultados que he obtenido en trabajos previos que aparecen como anexos al final de esta tesis. La teoría y técnicas para llegar a ellos también se mencionan en dichos trabajos. De este modo, con el fin de no redundar en la información, aquí solo se hace una breve introducción para ubicar el tema de estudio para después discutir el significado y relevancia de los hallazgos en el contexto de la información disponible sobre la deshidrogenasa succínica.

CONTENIDO

I. INTRODUCCION Y ANTECEDENTES..... 5

II. OBJETIVOS..... 13

III. DISCUSION..... 14

IV. CONCLUSIONES..... 20

V. PERSPECTIVAS..... 21

VI. APENDICE..... 22

VII. REFERENCIAS..... 23

## RESUMEN DE LA TESIS

Los resultados de este trabajo muestran que los reactivos para tiol inhiben a la DHS al modificar un residuo de cisteína localizado en la región del sitio activo. A pesar de que este residuo tiene un valor de pKa anormalmente bajo muy probablemente no participe en el mecanismo catalítico. Sin embargo, al ser modificado, induce una conformación inactiva, la cual, está acompañada de una disminución en la interacción dipolar entre los centros S-1 y S-2. Asumiendo que este acoplamiento magnético entre centros es importante para la actividad, estos resultados brindarían, por primera vez, evidencia experimental directa en favor de un posible papel para el centro S-2. Así mismo, mostrarían el tipo de cambios que inducen los reactivos para tiol. Estos datos son consistentes con el modelo de transferencia de electrones propuesto por Cammack en 1986.

La tesis consta de las siguientes secciones:

- I. INTRODUCCION Y ANTECEDENTES
- II. OBJETIVOS
- III. DISCUSION
- IV. CONCLUSIONES
- V. PERSPECTIVAS
- VI. APENDICE
- VII. REFERENCIAS



Visto Bueno del Asesor  
Dr. Edmundo Chávez Cossio

## ABSTRACT OF THE THESIS

The results of this work show that the inhibition of succinate dehydrogenase activity by thiol binding reagents is the consequence of the modification of an -SH group located in the active site of the enzyme. This group has an abnormally low pKa value. However, it is not involved in the catalytic mechanism. On the other hand, its modification results in an alteration of the dipolar interaction between clusters S-1 and S-2. This constitutes direct evidence for a role of center S-2 in the oxidation of succinate. This conclusions are consistent with the electron transfer model proposed by Cammack in 1986.

The work consists of the following sections:

- I. INTRODUCTION AND ANTECEDENTS
- II. OBJETIVES
- III. DISCUSSION
- IV. CONCLUSIONS
- V. PERSPECTIVES
- VI. APPENDIX
- VII. REFERENCES



Visto Bueno del Asesor

Dr. Edmundo Chávez Cossio

## I. INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

La deshidrogenasa succínica (DHS) [succinato: (aceptor) oxidorreductasa, EC 1,3,99,1] es una enzima membranal que en células aeróbicas cataliza la oxidación del succinato a fumarato la cual está acoplada a la reducción de la ubiquinona constituyendo (junto con otras dos proteínas hidrofóbicas de anclaje) la unidad funcional, denominada por Hatefi, complejo II. En organismos eucariontes se encuentra localizada en el lado de la matriz de la membrana interna mitocondrial mientras que en bacterias aeróbicas está en el lado citoplásmico de la membrana (Hatefi, 1985).

### A. Composición y estructura.

La parte catalítica de la enzima está compuesta por dos polipéptidos, uno de 70,000 daltones (Fp) que contiene flavin adenín dinucleótido unido covalentemente al residuo de histidina 44 (1 mol de  $\alpha$ -[N(3)-histidil]-FAD/mol de enzima) (Walker, *et al.*, 1972) y otro de 27,000 daltones (Ip) que contiene fierro y azufre (Davis and Hatefi, 1971). El anillo de isoaloxazina del FAD puede existir en tres formas redox: una forma oxidada o quinona, una forma semirreducida o semiquinona y una forma completamente reducida o hidroquinona. En la enzima se presentan los tres estados, siendo el electrón desapareado de la semiquinona el que se detecta en experimentos de resonancia paramagnética electrónica (RPE): presenta un valor de  $g$  isotrópico alrededor de 2, típico de



un radical libre (Ohnishi, *et al.*, 1981; Jay, *et al.*, 1990a y Jay, *et al.*, 1991b). El hierro y azufre de la enzima, por otro lado, se encuentran organizados en tres centros Fe-S distintos (Singer and Johnson, 1985): un centro binuclear  $[2\text{Fe}-2\text{S}]^{2+,4+}$  denominado S-1 (en donde los sobreíndices indican las valencias funcionales del centro considerando la del S = -2) del tipo de las ferredoxinas, pero con un potencial redox medio ( $E_m \approx 0$  mV) mucho más positivo que el de éstas (alrededor de 400 mV); un centro tetranuclear  $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+,4+}$  de bajo potencial ( $E_m \approx -260$  mV) denominado S-2 y un centro trinuclear  $[3\text{Fe}-4\text{S}]^{1+,0}$ , centro S-3 de alto potencial ( $E_m \approx 60$  mV). La determinación de la estructura de estos núcleos, así como su posible papel en la transferencia de electrones son aspectos que han sido abordados de manera intensa con la espectroscopía de RPE. Una revisión de estos temas así como de los conceptos básicos de la teoría de RPE está dada en Jay *et al.*, 1990b. En este trabajo sólo se mencionarán los resultados relevantes para la discusión.

Actualmente se conoce la secuencia de los genes de la DHS y de la fumarato reductasa (FRD) de *E. coli* y de la DHS de *B. subtilis* (Cole, *et al.*, 1982; Darlison and Guest, 1984 y Phillips, *et al.*, 1987). También se ha determinado la secuencia parcial del DNA, de la subunidad menor (Ip), en varias especies (Gould, *et al.*, 1989 y Lauterbach, *et al.*, 1990), incluyendo *H. sapiens* (Kita, *et al.*, 1990), y la estructura primaria de esta subunidad en la proteína aislada de corazón de res (Yao, *et al.*, 1986). La FRD de *E. coli* es una enzima muy similar a la DHS pero que cataliza la reducción del fumarato a succinato durante el

crecimiento anaeróbico. La comparación de la secuencia de aminoácidos de la Ip de estas enzimas ha revelado tres juegos de residuos de cisteína en posición conservada los cuales, se sugirió, eran los ligandos de los tres centros Fe-S (Cammack, 1983; Ohnishi, 1987; Maguire and Hederstedt, 1989), por ejemplo:

**(Esquema I)**

**Comparación del arreglo de cisteínas en la subunidad menor entre la FRD de E. coli y la DHS de corazón de res**

<i>E. coli</i>	FRD(Ip)	56	SCRMAICGSCGMMVNNVFKLAC	79
corazón de res	DHS(Ip)	63	SCREGICGSCAMNINGGNTLAC	86

(Primer grupo)

<i>E. coli</i>	FRD(Ip)	147	GCINCGLCYAAQPFQF	163
corazón de res	DHS(IP)	156	ECILCACQSTSCPSY	172

(Segundo grupo)

<i>E. coli</i>	FRD(Ip)	203	SCTFVG--YQSEVQF	217
corazón de res	DHS(IP)	213	RCHTIM--NQTETQF	227

(Tercer grupo)

Por otro lado, Johnson, *et la.*, (1988), analizando con RPE extractos celulares de FRD de *E. coli* obtenidos de células normales o de células con FRD mutada por supresión en fragmentos específicos de las subunidades, encontraron que el centro S-1 está coordinado por las cisteínas 58, 63, 66 y 78; por otro lado, se encontró que el segundo grupo de residuos de cisteína en posición

conservada no puede constituir los ligandos para un centro tetranuclear por lo que se consideró que el centro S-2 estaba en la subunidad mayor o enlazado simultáneamente por las dos subunidades. Finalmente, se estableció que el centro S-3 estaba en la subunidad menor y se sugirieron dos posibles arreglos para su coordinación: uno involucra a las cisteínas 205, 211 y 159 y el otro a las cisteínas 149, 155 y 215.

Un problema con esta interpretación es que deja sin explicación la cuestión del alto potencial redox del centro S-1 (-79 mV en FRD de *E. coli*) en comparación con el de las ferredoxinas de cloroplasto (de -350 a -450 mV). A este respecto, el análisis de mutantes de FRD de *E. coli* en las cuales cada uno de los cuatro residuos de cisteína 58, 63, 66 y 78 fué cambiado individualmente por uno de serina mostró una coordinación parcial de cisteínas para el centro S-1: las cisteínas 57 y 62 estaban coordinadas al Fe(II) en el centro reducido mientras que la cisteína 78 estaba en la posición de valencia localizada Fe(III). Por otro lado, se determinó que la cisteína 65 no estaba directamente ligada al núcleo Fe-S sino coordinada con una molécula de agua cuya sustitución puede cambiar sólo ligeramente la anisotropía del tensor  $g$  para este centro. Esta coordinación mixta explicaría el valor anormalmente alto de potencial redox del centro S-1 (Werth, *et al.*, 1990 y Bertrand and Gayda, 1979).

En lo que se refiere a la composición de aminoácidos que forman el sitio activo de la DHS y de la FRD, ésta no ha sido completamente definida. Estudios de modificación química han mostrado la presencia de un grupo -SH muy reactivo, localizado en

la subunidad mayor y que puede ser protegido por el sustrato y los inhibidores competitivos (Kenney, 1975; Vinogradov, *et al.*, 1976; Jay, 1991; Jay, *et al.*, 1991a y Jay, *et al.*, 1991c). Se propuso que este tiol estaba directamente involucrado en el mecanismo catalítico como donador/aceptor de protones (Vinogradov, *et al.*, 1976 y Vinogradov, 1986) y también que participaba en la fuerte unión del oxaloacetato mediante la formación de un enlace tiohemiacetal (Vinogradov, *et al.*, 1972). Considerado esencial, este tiol ha sido asignado a la cisteína 247 de la subunidad mayor de la FRD de *E. coli*, la cual corresponde a la única cisteína en posición conservada que aparece en la mayoría de las DHS y FRD estudiadas hasta la fecha:

(Esquema II)

**Secuencia de aminoácidos que se piensa contribuyen al sitio activo de la FRD y de la DHS**

↓

<i>E. coli</i>	FRD	229-VQYHPTGLPSSGI--LMTEGCRGEGGIL-254
<i>P. vul</i>	FRD	229-VQYHPTGLPSSGI--LLTEGCRGDGGIL-254
<i>W. succ</i>	FRD	253-VQFHPTPLFPSSGI--LLTEGCRGDGGIL-278
<i>E. coli</i>	DHS	238-WRFHPTGIAGAGV--LVTEGCRGEGGYL-263
<i>B. sub.</i>	DHS	232-IDIHPTAIPGDDKLRLMSESARGEGGRV-261

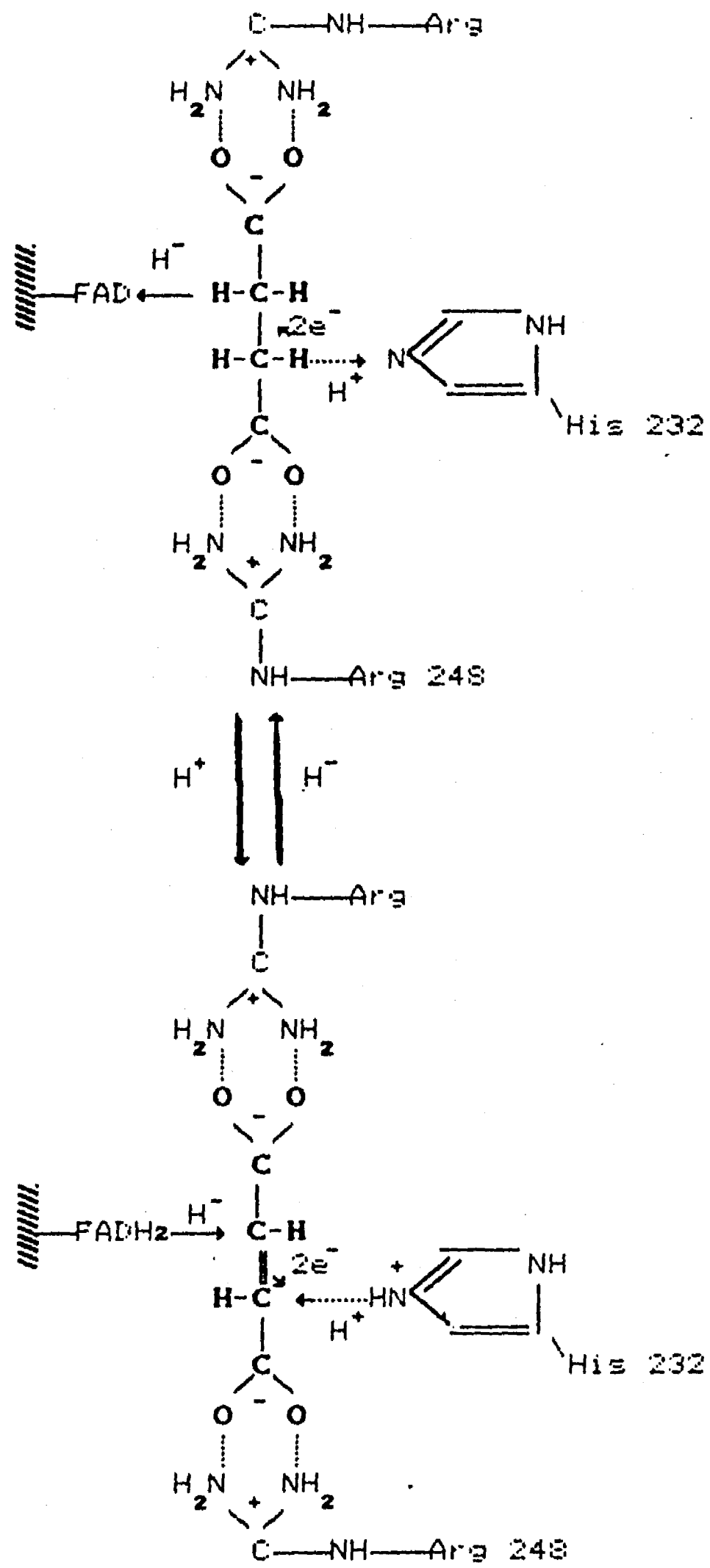
La única excepción es la DHS de *B. subtilis* en la cual este residuo de cisteína está reemplazado por uno de alanina. Estudios recientes han mostrado, sin embargo, que esta sustitución no tiene ningún efecto sobre la unión del oxaloacetato ni la actividad, únicamente evita la inhibición por reactivos para tioles

(Hedersted and Hedén, 1989). Estas observaciones han puesto en duda el papel esencial del tiol incluso en las enzimas que sí lo presentan. A este respecto, Schröder, *et al.*, (1991), en un estudio en el que la cisteína 247 de la FRD de *E. coli* fue sustituida por serina o por alanina, confirmaron que el tiol es responsable de la inhibición causada por N-etilmaleimida pero no es necesario para la actividad catalítica ni la unión del oxaloacetato. De esta manera los cambios originados en la enzima por los reactivos para sulfhidrilo que provocan la inhibición de la actividad catalítica permanecen sin ser completamente entendidos. Esta es una de las cuestiones que se abordan en el presente estudio.

Además del tiol, estudios de inactivación de la DHS por dietilpirocarbonato y la dependencia opuesta con respecto al pH de las actividades de DHS y FRD llevaron a Vik y Hatefi (1981) a proponer que el grupo imidazol de un residuo esencial de histidina funcionaba en una reacción de catálisis general ácido/base. En la oxidación del succinato, la forma no protonada del imidazol funcionaría aceptando un protón de uno de los metilenos del sustrato, mientras el segundo protón sería transferido del otro metileno hacia el FAD en forma de hidruro ( $H^-$ ). Por debajo de su valor de pKa, la histidina actuaría donando un protón al fumarato durante su reducción en la reacción inversa a la descrita arriba. En este proceso el  $FADH_2$  donaría un hidruro al fumarato para rendir un carbanión que sería entonces protonado por el imidazol no disociado:

(Esquema III)

Modelo del sitio activo para la FRD y la DHS



Este modelo se ha visto apoyado por estudios recientes de mutagénesis dirigida en FRD de *E. coli*, en donde la sustitución de la histidina 232 (en posición conservada en la subunidad mayor, ver esquema II), resultó en un patrón de inhibición similar al inducido por dietilpirocarbonato (Schröder, et al., 1991).

Finalmente, con base en estudios de modificación química (Kotlyar and Vinogradov, 1984) y mutagénesis dirigida hacia la arginina 248 (Schröder, et al., 1991), la cual está en posición conservada en la Fp de la FRD de *E. coli* (ver esquema II), se ha propuesto que el grupo guanidino de este residuo y posiblemente el de otra arginina también, estén en el sitio catalítico y participen en la unión del sustrato y de otros dicarboxilatos (esquema III).

## II. OBJETIVOS

### A. Objetivos generales.

El propósito del presente estudio fué el de ahondar, mediante la modificación química y la aplicación de la resonancia paramagnética electrónica, en el mecanismo por el cual los reactivos para thiol inhiben la actividad de transferencia de electrones y utilizar este enfoque para obtener información del papel de los grupos prostéticos en la DHS.

### B. Objetivos específicos.

- a) Mediante la cinética de inhibición establecer el sitio de inhibición de los distintos reactivos.
- b) Determinar el efecto de la modificación química sobre las señales paramagnéticas de los grupos transportadores de electrones en la DHS.



### III. DISCUSION

Desde hace mucho tiempo se sabe que la DHS es muy sensible a reactivos para sulfhidrilo (Hopkins and Morgan, 1938; Hopkins, *et al.*, 1938). A este respecto se ha presentado evidencia que indica que la inhibición de la enzima por este tipo de agentes resulta de la modificación de un grupo -SH situado en el sitio activo (Kenney, 1975; Vinogradov, *et al.* 1976; Kotlyar and Vinogradov, 1984; Phillips, *et al.*, 1987; Jay, 1991; Jay, *et al.*, 1991a y Jay, *et al.*, 1991c). La presencia del sulfhidrilo en la región del sitio activo ha sido, sin embargo, cuestionada por varios autores. Así, Sanborn, *et al.* (1971) observaron una inhibición compleja de la enzima soluble por agentes alquilantes y protección parcial por malonato. Resultados similares fueron publicados por Felberg y Hollocher en 1972. LeQuôc, *et al.*, (1981) observaron inhibición bifásica por N-etilmaleimida y derivados sustituidos de ésta en preparaciones membranales de DHS. Es posible que las cinéticas complejas de inhibición se hallan debido al hecho de que no todos los autores han utilizado preparaciones completamente activadas, libres de oxaloacetato. El oxaloacetato protege completamente al sitio activo contra reactivos que se combinan con tioles (Vinogradov, *et al.*, 1976 y Jay, 1991) y la velocidad de disociación del oxaloacetato es muy lenta (Kotlyar and Vinogradov, 1984). De esta manera, es factible esperar que cuando la concentración de reactivos para tiol es suficientemente grande para rendir velocidades de inhibición de pseudo primer orden mayores que las de disociación del oxaloacetato, se observe una

inhibición aparentemente bifásica con una saturación aparente de la velocidad de inhibición al incrementar la concentración de reactivo alquilante. De esta manera, cuando se utilizan preparaciones completamente activadas se obtienen inhibiciones simples de pseudo primer orden con agentes para sulfhidrilo y protección total e hiperbólica por ligandos del sitio activo (Vinogradov, *et al.*, 1976; Kotlyar and Vinogradov, 1984; Jay, 1991 y Jay, *et al.*, 1991a).

Las causas que inducen la pérdida de actividad cuando el grupo -SH del sitio activo es modificado no son del todo claras. Vinogradov, *et al.*, (1976) y Vinogradov, (1986) propusieron que el tiol podía estar directamente involucrado en el mecanismo catalítico como donador/aceptor de protones. Se encontró que el valor de pKa para este grupo era anormalmente bajo ( $\approx 7.0$ ) (Vinogradov, *et al.*, 1976 y Jay, *et al.*, 1991a) lo cual sugería que el sulfhidrilo estaba activado, posiblemente por la proximidad de una carga positiva (quizas el residuo de arginina 248 en FRD de *E. coli* -ver esquema II- u otro grupo de naturaleza no establecida, Schröder, *et al.*, 1991). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, estudios de mutagénesis dirigida en FRD de *B. subtilis* y en DHS de *E. coli* han mostrado que el tiol en posición conservada, responsable, de la sensibilidad a N-etilmaleimida, no es necesario para la actividad catalítica ni para la unión de los dicarboxilatos.

Con la idea de obtener más información sobre los cambios sufridos en la enzima durante el proceso de inhibición, se decidió analizar el efecto de los reactivos para -SH sobre los centros

responsables de la transferencia de electrones en la enzima (ver más adelante). Un enfoque similar fué seguido anteriormente por Krishnamoorthy y Hinkle en 1988 cuando determinaron el efecto de ciertos inhibidores en la transferencia de electrones a través de los centros Fe-S del complejo I mitocondrial. En el caso de la NADH: ubiquinona oxidoreductasa este tipo de aproximación permitió obtener información no solo del mecanismo de acción de las drogas, sino también, del papel en la catálisis de los grupos funcionales de la enzima.

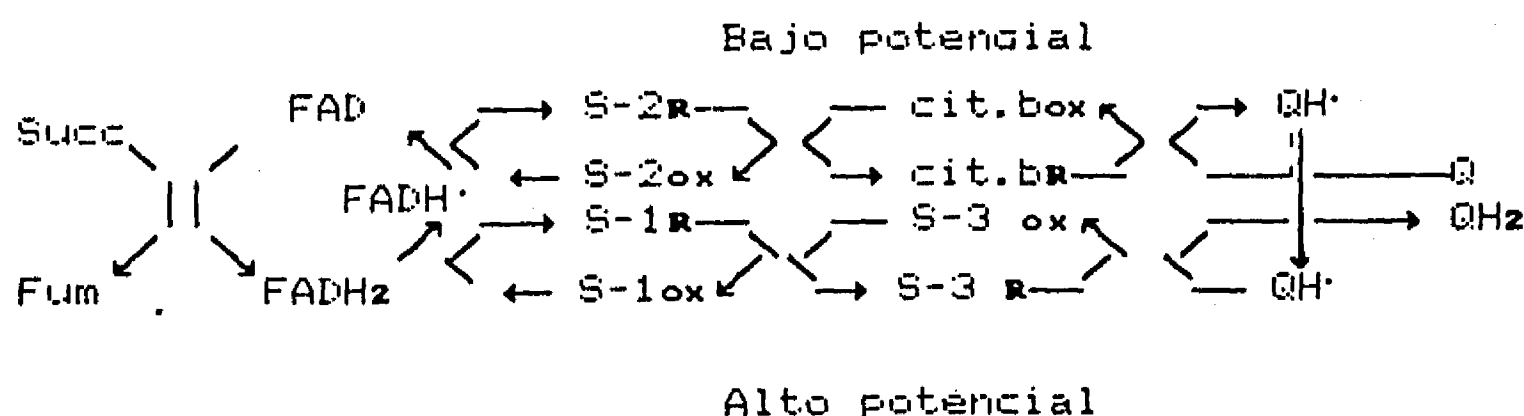
En lo que se refiere a los grupos prostéticos de la DHS son muchas las preguntas que aún permanecen sin solución. De esta manera no se ha determinado la secuencia temporal del paso de electrones a través de la enzima. En un primer estudio Dervartanian, *et al.*, (1969), utilizando técnicas de congelamiento rápido que permiten resolver intervalos de milisegundos y titulando a la enzima con metasulfato de fenazina en presencia de NADH encontraron que la primera señal paramagnética en aparecer era la de la forma semirreducida, semiquinona, del FAD. Sin embargo, en un estudio posterior, utilizando técnicas de cinética rápida y reducción por ditionita, Beinert, *et al.*, (1975) no encontraron ninguna diferencia significativa entre las velocidades de formación de la semiquinona y la reducción de los centros Fe-S indicando que la reducción de los centros redox de la enzima ocurre a velocidades mucho mayores que las que pueden resolverse con este tipo de experimentos. Es posible que los resultados obtenidos por Dervartanian, *et al.*, (1969) estuvieran alterados por la presencia de la forma semirreducida del metasulfato de

fenazina el cual presenta una señal isotrópica con un valor de  $g \approx 2$  típico de un radical libre (Jay, et al., 1991b) y muy similar al de la semiquinona del FAD pero con un tiempo de relajación menor (Jay, et al., 1990a).

Otro punto que no ha sido resuelto de manera definitiva es el del papel de los tres centros Fe-S en la transferencia de electrones. Puesto que los centros S-1 y S-3 pueden ser reducidos por el sustrato, muy probablemente desempeñen un papel como acarreadores de electrones. Sin embargo, un papel similar para el centro S-2 ha sido cuestionado (para una revisión ver Jay, et al., 1990b) ya que su potencial redox ( $E_m'$  entre -260 y -360 en DHS mitocondrial) es bastante menor que el del par succinato/fumarato. En 1986 Cammack, et al., propusieron un modelo no lineal de transferencia de electrones que involucra a los centros redox de alto y bajo potencial. En este esquema los centros S-1 y S-2 aceptan el primero y segundo electrones respectivamente del FAD reducido. Estos electrones son transferidos del centro S-1 al centro S-3 y de ahí a la ubisemiquinona y del centro S-2 al citocromo b del complejo II y de ahí a la ubiquinona:

(Esquema IV)

Modelo no lineal de transferencia de electrones en la DHS



Este modelo fué propuesto, como hipótesis de trabajo, para explicar la existencia en el complejo II de centro redox con potenciales distribuidos en un intervalo tan amplio:

(Tabla I)

(Tomada de Cammack, *et al.*, 1987)

Potenciales medios (en mV) de los centros redox en la DHS y la FRD de distintas especies

<u>DHS</u>	quinona usada*	Fe-S S-1	Fe-S S-2	Fe-S S-3	cit b C. II
corazón de res	UQ	0	-260	60	-180
<u>A. maculatum</u>	UQ	-7	-240	90	-30
<u>E. coli</u>	UQ	10	-175	65	
<u>M. luteus</u>	MQ	70	-295	10	
<u>B. subtilis</u>	MQ	80	-240	-25	
<u>R. rubrum</u>	UQ	50	-160		
<u>FRD</u>					
<u>E. coli</u>	MQ	-20	-320	-70	
		-50	-285	-50	
<u>W. succinogenes</u>	MQ	-125	-300	-130	-250

\*UQ = ubiquinona; MQ = menaquinona.

De esta manera, un camino de bajo potencial, constituido por el centro S-2 y el citocromo b conectaría a los pares redox

FAD/FADH<sup>•</sup>-UQ/UQH<sup>•</sup> de bajo potencial; mientras que un camino de alto potencial formado por los centros S-1 y S-3 conectaría a los pares redox FADH<sup>•</sup>/FADH<sub>2</sub>-UQH<sup>•</sup>/UQH<sub>2</sub> de alto potencial. El flujo electrónico a través de estas rutas estaría regulado por las constantes cinéticas de transferencia de electrones las cuales estarían determinadas por la localización espacial de los centros redox.

En favor de este modelo está la observación de que en el complejo II aparece rápidamente una señal de RPE durante la reoxidación de la DHS. Ruzicka, *et al.*, (1975) modelaron el espectro de esta señal asumiendo una interacción entre uno o dos radicales de ubisemiquinona con otra especie paramagnética con una velocidad de relajación elevada. En 1987 Cammack sugirió que esta especie podría ser el citocromo b oxidado.

Sin embargo, hasta ahora, no se había presentado ninguna evidencia en favor de un posible papel para el centro S-2 en la actividad de la DHS. Los datos de inactivación con NEM seguidos con RPE (Jay, *et al.*, 1991c) muestran que la inhibición de la actividad por modificación del tiol del sitio activo está acompañada de una pérdida en la interacción dipolar entre los centros S-1 y S-2 (para una explicación de las interacciones magnéticas entre los centros Fe-S de la DHS ver Jay, *et al.*, 1990b). De asumir que esta interacción entre centros es importante (y por lo tanto reconocer que el centro S-2 es necesario para la catálisis), estos datos definirían el tipo de cambios que sufre la DHS cuando es inhibida por reactivos para sulfhidrilo.

#### IV. CONCLUSIONES

En conclusión los resultados de este trabajo muestran que los reactivos para tiol inhiben a la DHS al modificar un residuo de cisteína localizado en la región del sitio activo. A pesar de que este residuo tiene un valor de  $pK_a$  anormalmente bajo muy probablemente no participe en el mecanismo catalítico. Sin embargo, al ser modificado, induce una conformación inactiva, la cual, está acompañada de una disminución en la interacción dipolar entre los centros S-1 y S-2. Asumiendo que este acoplamiento magnético entre centros es importante para la actividad, estos resultados brindarían, por primera vez, evidencia experimental directa en favor de un posible papel para el centro S-2. Así mismo, mostrarían el tipo de cambios que inducen los reactivos para tiol. Estos datos son consistentes con el modelo de transferencia de electrones propuesto por Cammack en 1986.

## V. PERSPECTIVAS

Se pretende ahondar en el papel específico de los grupos prostéticos. El análisis detallado (con espectroscopía de RPE operando en bandas distintas que la X) de las interacciones magnéticas entre centros contribuirá a este objetivo.

También, se intenta extender el estudio de modificación química de la DHS haciendo uso de reactivos específicos para distintos residuos. Por ejemplo, la modificación química de carboxilos seguramente dará información sobre la importancia de los ácidos glutámicos situados en posiciones conservadas en la subunidad mayor (Ver esquema II).

Finalmente, el conocimiento adquirido con la aplicación de las técnicas empleadas en este estudio, facilitará incursionar en campos de investigación relacionados. Por ejemplo, con la espectroscopía de RPE ha sido posible profundizar en los mecanismos de reacción de radicales libres (Jay, *et al.*, 1991b).



## VI. APENDICE

Esta sección incluye copias de los trabajos citados en el texto como:

Jay, *et al.*, 1990a

Jay, *et al.*, 1990b

Jay, 1991

Jay, *et al.*, 1991a

Jay, *et al.*, 1991b

Jay, *et al.*, 1991c

# ELECTRON PARAMAGNETIC RESONANCE OF THE MITOCHONDRIAL RESPIRATORY CHAIN IN THE PRESENCE OF PHENAZINE METHOSULFATE

DAVID JAY<sup>1</sup>\*, RAFAEL ZAMORANO<sup>2</sup>, EDUARDO MUÑOZ<sup>3</sup>,  
ROBERTO GLEASON<sup>3</sup>, JOSE LUIS BOLDU<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, México, D. F. 14080.

<sup>2</sup> Departamento de Física, Escuela Superior de Física y Matemáticas, I.P.N., México, D. F. 07738.

<sup>3</sup> Instituto de Física, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F. 04510.

## Summary

*The EPR spectra of phenazine methosulfate (PMS) generated under different conditions, as reduction or excitation with light were studied. In addition, results show the EPR spectra of reduced-submitochondrial particles and reduced-submitochondrial particles in the presence of PMS. Combined systems of this last type have been repeatedly utilized in EPR studies. This work proves that such systems give rise to characteristic signals around  $g = 2$ , which behaviour reflects the presence of particular prosthetic groups of the respiratory chain combined with the reduced dye. The consequences of these findings are discussed. (Bol. Estud. Méd. Biol. Méx. 1990; 38: 16-21)*

KEY WORDS: EPR, phenazine methosulfate, mitochondria, mitochondrial electron-carriers, succinate dehydrogenase, semiquinone radical.

## Resumen

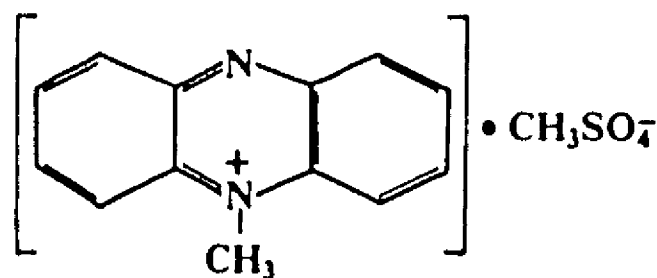
*En este trabajo se llevó a cabo la caracterización de los espectros de Resonancia Paramagnética del Electrón (RPE) del colorante metasulfato de fenazina (MSF) generado bajo diferentes condiciones, tales como reducción o excitación con luz. Asimismo se muestran los espectros de RPE de partículas submitocondriales reducidas y partículas submitocondriales reducidas en presencia del colorante MSF. Sistemas combinados de este tipo se han empleado con frecuencia en estudios de RPE. En este trabajo se muestra que tales sistemas dan lugar a señales características alrededor de  $g = 2$  cuyo comportamiento refleja la presencia de grupos prostéticos particulares de la cadena respiratoria junto con señales del colorante reducido. Se discuten algunas implicaciones de estos resultados. (Bol. Estud. Méd. Biol. Méx. 1990; 38: 16-21)*

## INTRODUCTION

The N-Methylphenazonium Methosulfate (PMS) is a dye of mol.wt. of 306.34 D that crystallizes as flat yellow to brown parallelepipeds. It has an oxidation reduction potential of  $E_h = +0.080$  Volts at

30° C and pH 7.0. Its chemical formula is  $C_{14}H_{14}N_2O_4S$  and its chemical structure is<sup>1</sup>:

\* Author to whom correspondance should be addressed: Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Juan Badiano No. 1, México, D.F. 14080.



PMS is typically used as mediator in redox reactions. This dye has proved to be useful in the assay of many respiratory chain-linked dehydrogenases, such as: succinic, choline,  $\alpha$ -glycerophosphate, galactono- $\gamma$ -lactono dehydrogenases, and many related flavoproteins and as a catalyst for photosynthetic phosphorylation<sup>2</sup>. Particularly it provides an assay method for succinic dehydrogenase in soluble as well as particulate preparations<sup>3,4</sup>.

In addition, the dye has been used as electron carrier in EPR studies of flavin dehydrogenases. As early as 1969, Dervartanian, et al<sup>5</sup> using PMS as mediator were able to redox titrate the enzyme succinate dihydrogenase (SDH) according to the method described by Van Gelder, et. al<sup>6</sup>.

In Dervartanian's work the observed "heights" of the EPR signals were taken to be proportional to the concentrations of the components present in the sample. Subsequent EPR studies on SDH have continued using the PMS either as mediator in redox titration experiments or general chemical oxidation reagent<sup>7-13</sup>.

Given the electron-carrier nature of the dye it is not very venturesome to suppose that it could be a thermodynamic equilibrium among the different oxidation states of the dye. In such a case, at least one oxidation form of the dye (in the form of a free radical) could give rise to an EPR signal. So it seems worthwhile to study the paramagnetic nature of PMS in systems where it is widely used.

In this work we report and characterize the EPR signals of the PMS under varying conditions of concentration and nature of the electron donors. Results show that by reduction, the dye generates an EPR signal with  $g = 2.0030$ . This signal is very close to the signals arising from organic free radicals present in mitochondria such as flavin semiquinone of SDH<sup>14-15</sup>.

## MATERIALS AND METHODS

**Sample preparation:** Mitochondria from bovine heart were prepared by the polytron method as reported before<sup>6</sup>. Bovine heart mitochondria were used for the preparation of submitochondrial particles (ETPH) according to the method described by Lee and Ernster<sup>17</sup>. Protein concentration was determined according to the method of Lowry, et al<sup>18</sup>.

The PMS dye, unless otherwise specified, was carefully protected from light by keeping it in amber tubes covered with aluminium foil. In addition the integrity of the dye was checked by measuring its capacity to react normally with succinate dehydrogenase according to the method in<sup>4,9</sup>.

**Reagents:** Phenazine methosulphate and NADH were purchased from SIGMA. Ferricyanide sodium hydrosulfite were from Fisher Scientific Co. All the reactants were analytical grade guaranteed by the suppliers.

**EPR measurements:** EPR spectra were recorded in an X-band Varian E 112. With a Varian microwave rectangular cavity TE 102, with modulation amplitude of 100 KHz. Typical microwave frequencies were 9.2312 GHz, the temperature of the EPR samples was controlled and monitored by the Varian Temperature Controller V4540. In this Spectrometer  $g$ -values were measured with nuclear resonance probes. The proton-NMR signal was processed through a Magnion gaussmeter and the frequency was displayed in a Hewlett-Packard counter. In order to obtain minimum uncertainty in the measurements both the EPR and the NMR signals were observed simultaneously in a dual beam oscilloscope. The microwave frequency was also displayed in a digital counter. All the spectra in this work are presented as the first derivative of the microwave absorption lines. All the samples and solutions for the EPR experiments were made anaerobic by repeated evacuation and flushing with nitrogen. The samples were prepared and put into EPR quartz tubes and then frozen in liquid nitrogen immediately before their spectra were recorded. All EPR quartz tubes did not give rise to any signal at any detectable level at the magnetic field values and temperatures used in this work.

## RESULTS

**EPR spectra at 80 K of reduced or illuminated PMS.** Figures 1a and 1b show X-band EPR spectra of PMS reduced with NADH and dithionite respectively. Both are singlets with  $g$  values of 2.0030 and line width of 8 Gauss. None of these singlets show signs of hyperfine splitting. In organic molecules structureless EPR singlets with  $g$  values close to the  $g$  value of the free electron are typical of organic free radicals, having an unpaired electron with highly delocalized spin density<sup>20</sup>. The intensity of the signals depends on the amount and potential of reducing agent present (figs. 1a and 1b).

Solutions with an excess of NADH or dithionite alone or in the presence of ferricyanide did not elicit any signal at any detectable level. Hence we consider the singlet as arising from a free radical of PMS.

It is important to emphasize that spectra 1.a and 1.b were obtained on light-protected dye samples. When dye solutions are exposed to light, an EPR singlet appears at  $g = 2.0030$  and line width of 19 Gauss. The light-induced PMS signal is proportional to the exposure time and intensity of the source. The fact that the line width of the light-induced signal is about 2.4 times the line width of the reduction-induced signal of the dye strongly suggests that these signals belong to different radical species as shown in figures 1b and 1c. The study of the power saturation of both signals (not shown) confirmed the above statement. In order to avoid complex interpretations of EPR spectra of sample systems containing PMS, all samples were carefully protected from light as described in Materials and Methods.

**EPR spectra of succinate-reduced submitochondrial particles.** In figure 2a the EPR spectrum of submitochondrial particles reduced with succinate is shown. The spectrum is mainly composed of signals at:  $g = 2.0236$ ,  $g = 2.0030$ ,  $g = 1.9350$ ,  $g = 1.9171$ . These signals have been previously characterized as arising from prosthetic groups of reduced complex II<sup>15,21,22</sup>.

The set of three lines at  $g = 2.0236$ ,  $g = 1.9350$ ,  $g = 1.9171$ , are typically assigned to a reduced binuclear Fe-S cluster consisting of two iron atoms anti-ferromagnetically coupled showing an effective

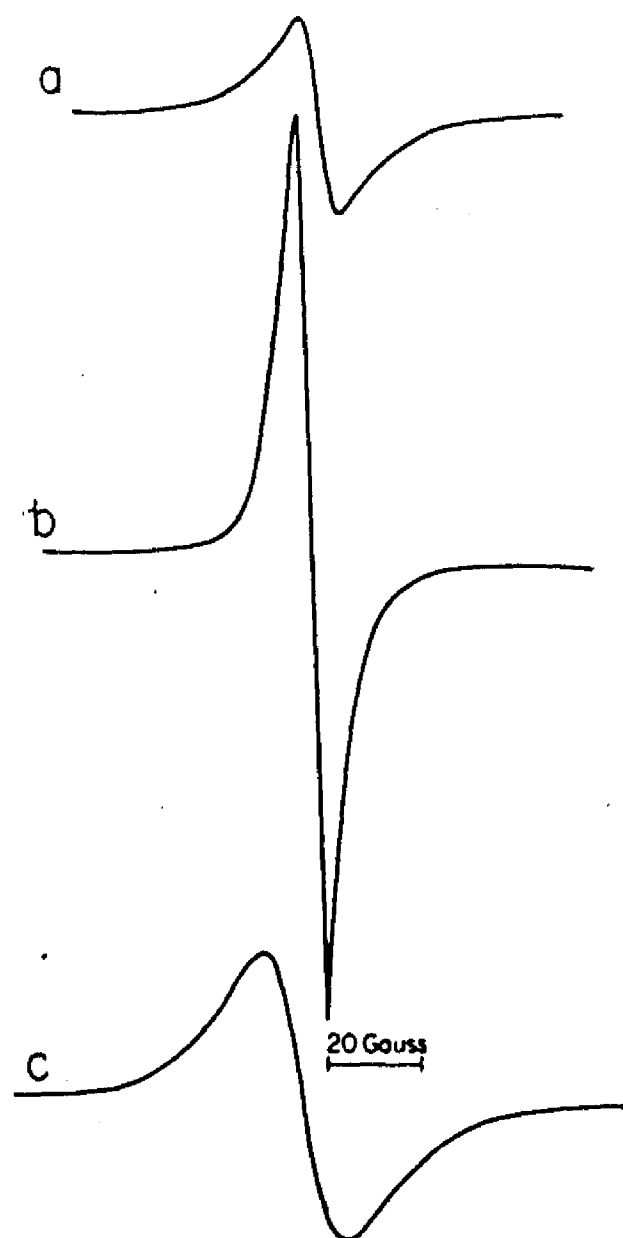


Fig. 1. EPR spectra of PMS reduced with NADH or with dithionite respectively and the spectrum of light-perturbed PMS. 5 mM PMS in HEPES buffer, (pH 7.4) was reduced with 1 mM NADH (a) or an excess of dithionite (b). Both samples were carefully protected from light. In (c) the sample was exposed 10 min to white light. All samples were frozen in liquid nitrogen and their spectra recorded. EPR conditions were as follows: microwave frequency 9.213 GHz, modulation amplitude, 2 Gauss; time constant 10 msec.; scanning rate 125 Gauss/min.; sample temperature, 80 K; microwave power 6.7 mW.

spin of  $S = 1/2$  in a rhombic distorted crystal field<sup>23,25,26</sup>. This cluster, usually called center S1, is of the ferredoxin type<sup>23,25,26</sup>.

The other important signal with  $g = 2.0030$  has been assigned to a free radical of flavin semiquinone of covalently-bound FAD in SDH<sup>24</sup>. For comparison in figure 2b the spectrum of NADH-reduced PMS signal is shown. The  $g$  values of the FAD-free radical and the reduced PMS radical are the same ( $g = 2.0030$ ) and their line widths are similar. However, the microwave power saturation behavior of the two signals is quite different as shown in figure 3. This diverging power saturation behavior allows a clear distinction between them.

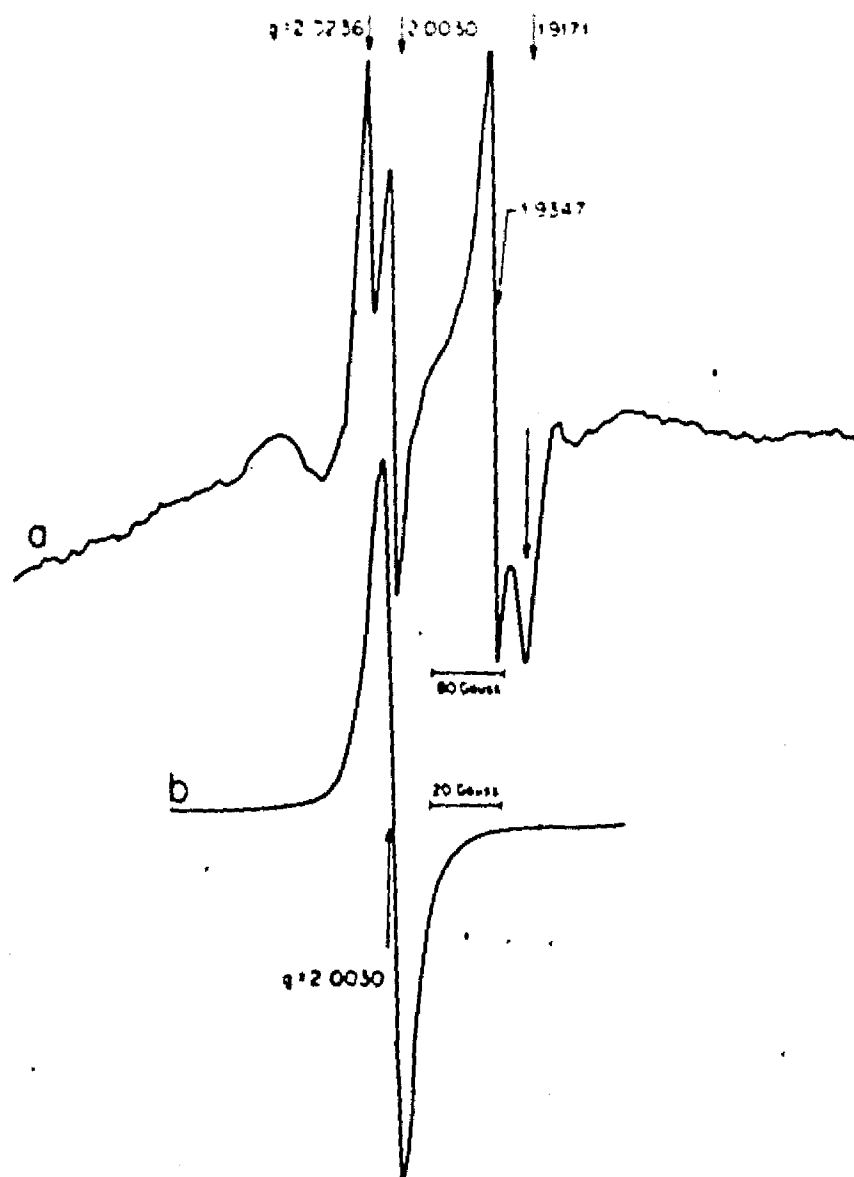


Fig. 2. EPR spectra of submitochondrial particles reduced with succinate and of PMS reduced with NADH. 7.2 mg of protein from submitochondrial particles were incubated for 2 min in 0.2 ml of a medium containing 200 mM sucrose; 20 mM HEPES, pH 7.4; 1 mM KCN; 10  $\mu$ g rotenone; 10  $\mu$ g antimycin A; and 50 mM succinate (a). In (b) the same spectrum of figure 1a is shown. EPR conditions as in figure 1 except that in (a) the gain was increased a factor of 250.

It is clear from figure 3 that the FAD signal decreases with increasing microwave power, according to previous reports<sup>14,27</sup> and saturates at or above 6 mW at 80 K. In contrast, the reduced PMS signal increases with increasing microwave powers up to 80 mW and yet not showing signs of saturation.

If we prepare a system consisting of SDH, PMS and a reductant, we could expect a spectrum with a composed signal at  $g = 2.0030$  and a power saturation behavior in which one component will tend to counterbalance the other one depending on the relative concentration of both paramagnetic centers, as long as these centers do not interact.

Therefore, we decided to carry out experiments on a system consisting of membrane-bound SDH plus PMS and an appropriate substrate. The samples prepared in this part have been used in previous EPR studies<sup>8</sup>. Figure 4 shows the power saturation sequence of spectra taken on this system. As it can be seen the height of the EPR line at  $g = 2.0030$  in this sequence remains essentially constant at varying microwave powers from 6.7 mW to 80 mW and this dependence is different from the one obtained for reduced PMS or succinate-reduced SDH by themselves. For a clearer comparison, figure 5 shows the graphical representation of the results described in figures 3 and 4.

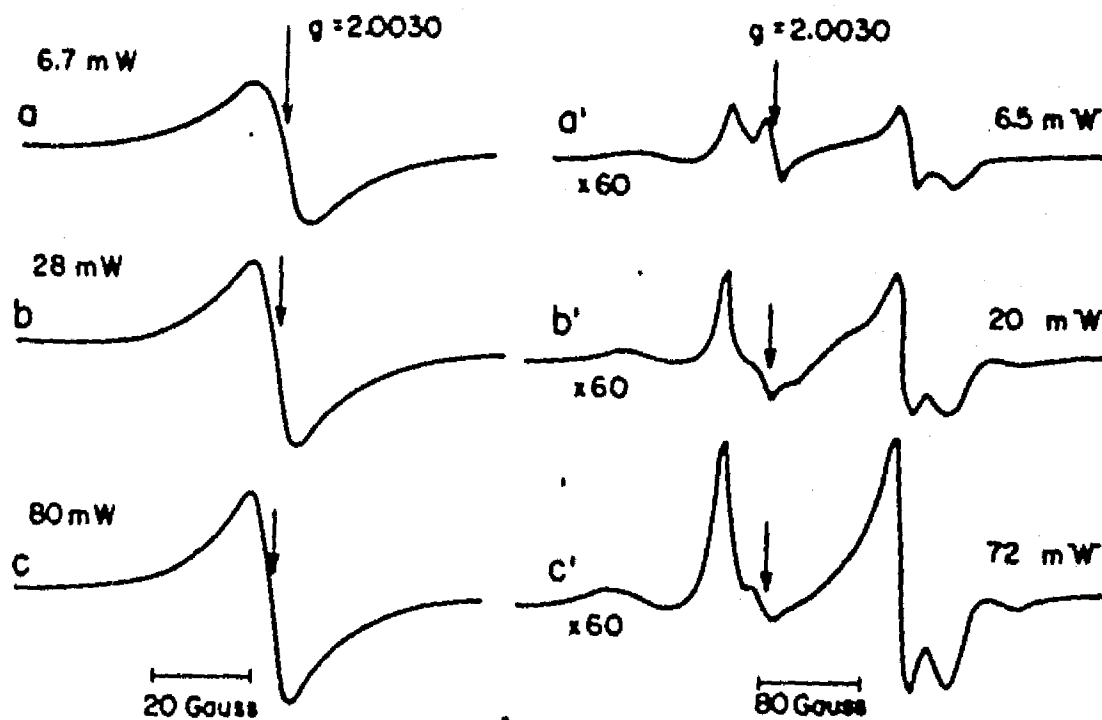


Fig. 3. Microwave power saturation behaviour of succinate-reduced submitochondrial particles and NADH-reduced PMS. The EPR conditions were similar to those described in figure 2 except for the microwave power which is as indicated.

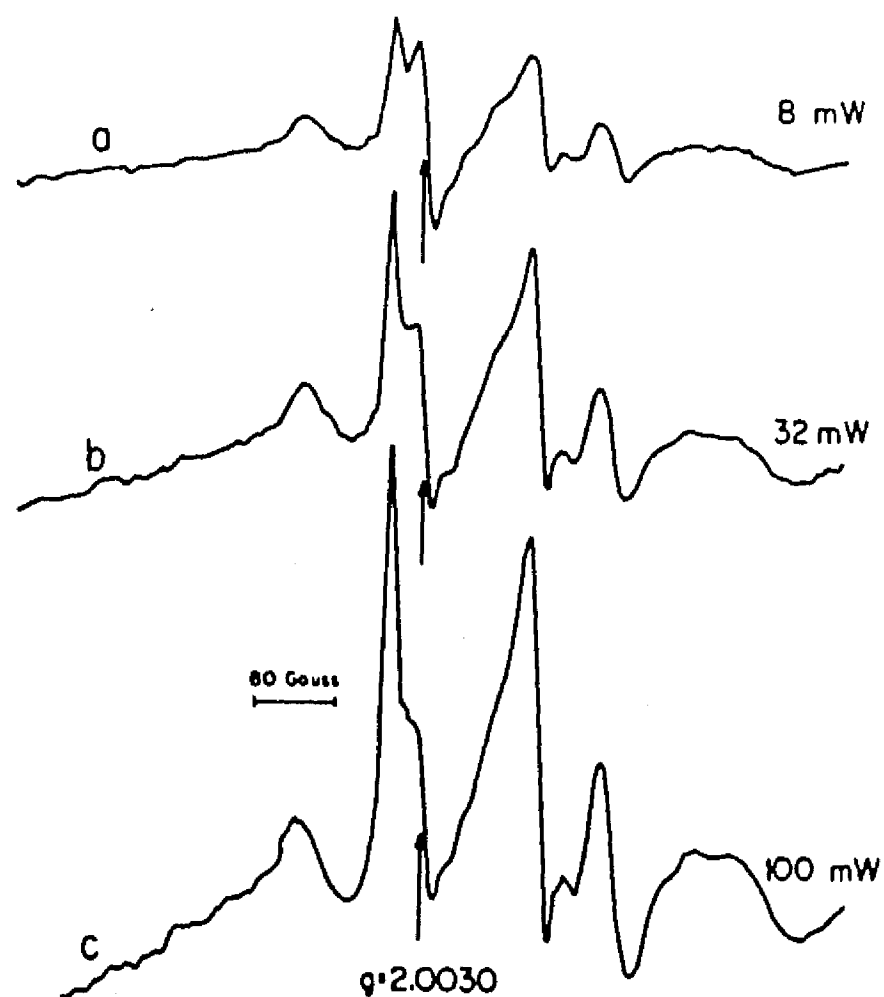


Fig. 4. EPR spectrum of succinate-reduced submitochondrial particles in the presence of PMS. Protein concentration and medium were as described in figure 2. 0.15 mM PMS was added to this medium and after 1 min of incubation time the sample was frozen and the spectrum recorded. EPR conditions as in figure 2.

## DISCUSSION

In this work the EPR measurements show undoubtedly that the reduced form of the PMS dye by itself generates a structureless EPR singlet at  $g = 2.0030$  (fig. 1). EPR signals with no hyperfine structure and  $g$  values close to that of the free electron ( $g$  value = 2.0023) are typical of organic free radicals having the unpaired electron spin density delocalized on a large fraction of the molecule<sup>20,24</sup>. The lack of an observable hyperfine splitting prevents a more detailed characterization of the chemical structure of the radical. Nevertheless, we can propose its chemical structure as:

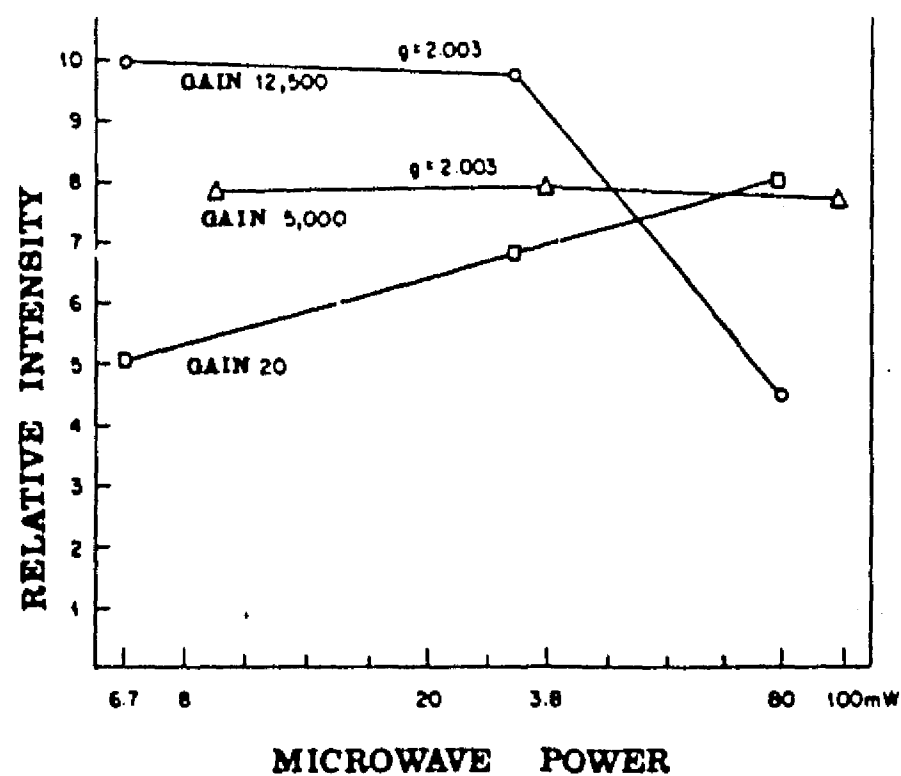
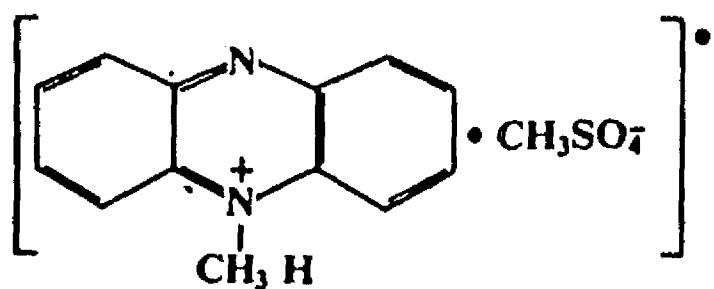


Fig. 5. Graphical representation of the data from figures 3 and 4. Here the height of the different signals vs. the microwave power is represented. (o) signal of semiquinone from FAD. (o) signal of NADH-reduced PMS. Both as in figure 3. (Δ) signal of a combined sample, FAD plus PMS as in figure 4.

Given that the reduced form of the dye generates an EPR singlet by itself, from the point of view of the EPR spectroscopy, a system composed of the dye and an enzyme able to reduce it, will render a spectrum containing the signal of the reduced dye in addition to any possible signal elicited by the enzyme. Moreover, if the enzymes in such systems give rise to signals at around  $g = 2.0030$ , then the spectrum will be a composed one for which the interpretation is at least complex and necessitates spectra manipulation. This issue has already been addressed by Ohnishi, *et al.*<sup>14</sup> who used dyes which undergo redox changes in processes involving the transference of 2 electrons.

It should be emphasized that the signal of the dye was detected even at concentrations as low as 50  $\mu$ M in the reduced PMS samples. Such concentrations are commonly used in titration experiments.

The results of the present report indicate that whenever a combined system is under study, as the one described in this work, complex signals around  $g = 2$  could be present. When the signals of this region are of interest, a microwave power saturation study could be useful in order to determine to what extent the signal of each component contributes to the total spectrum.

## REFERENCES

1. WINDHOLZ M, BUDAVARI S, BLUMETTI F, OTTERBEIN ES, eds. MERCK INDEX, Tenth edition. NJ, USA. Merck and Co; 1983: 874.
2. ARRIGONI O, SINGER TP. Limitations of the Phenazine Methosulphate Assay for Succinic and Related Dehydrogenases. *Nature*, 1962; 193: 1256-1258.
3. SINGER TP, KEARNEY EB, KENNEY WC. Succinate Dehydrogenase. *Adv. Enzimol.*, 1973; 37: 189-272.
4. CHAVEZ E, BRAVO C, JAY D. On the Role of K<sup>+</sup> on Succinic Dehydrogenase Activity. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 1986; 18: 93-99.
5. DERVARTANIAN DV, VEEGER C, ORME-JOHNSON WH, BEINERT H. Kinetic studies of succinate dehydrogenase by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, 1969; 191: 22-37.
6. VAN GELDER BF, SLATER EC. The extinction coefficient of cytochrome c. *Biochim. Biophys. Acta*, 1962; 58: 593-595.
7. OHNISHI T, WINTER DB, LIM J, KING TE. Low temperature electron paramagnetic resonance studies on two iron-sulfur centers in cardiac succinate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 1973; 53: 231-237.
8. ALBRACHT SJ. Some new paramagnetic centers in submitochondrial particles detectable by EPR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, 1974; 347: 183-192.
9. OHNISHI T, LEIGH S, WINTER DB, LIM J, KING TE. EPR Studies of two ferredoxin-type iron-sulfur centers in reconstitutively active, inactive, and reactivated soluble succinate dehydrogenases. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 1974; 61: 1026-1035.
10. BEINERT H, ACKRELL AC, VINOGRADOV AD, KEARNEY EB, SINGER TP. Interrelations of reconstitution activity, reactions with electron acceptors, and iron-sulfur centers in succinate Dehydrogenase. *Arch. Biochim. Biophys.*, 1977; 182: 95-106.
11. ACKRELL AC, KEARNEY EB, COLES CJ, SINGER TP, BEINERT H, WAN YP, FOLKERS K. Kinetics of the reoxidation of succinate dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1977; 182: 107-117.
12. CROWE BA, OWEN P, PATIL DS, CAMMACK R. Characterization of succinate dehydrogenase from *Micrococcus luteus* (lysodeikticus) by electron spin resonance spectroscopy. *Eur. J. Biochem.*, 1983; 137: 191-196.
13. MAGUIRE JJ, MAGNUSSON K, HEDERSTEDT L. *Bacillus subtilis* mutant succinate dehydrogenase lacking covalently bound flavin: identification of the primary defect and studies on the iron-sulfur clusters in mutated and wild-type enzyme. *Biochemistry*, 1986; 25: 5202-5208.
14. OHNISHI T, KING TE, SALERNO JC, BLUM H, BOWYER JR, MAIDA TJ. Thermodynamic and electron paramagnetic resonance characterization of flavin in succinate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 1981; 256: 5577-5582.
15. SINGER T and JOHNSON MK. The prosthetic groups of succinate dehydrogenase: 30 years from discovery to identification. *FEBS Lett.*, 1985; 190: 189-198.
16. JURKOWITZ M, SCOTT KM, ALTSCHULD R, MEROLA AJ, BRIERLEY GP. Ion transport by heart mitochondria. Retention and loss of energy coupling in aged heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1974; 165: 98-113.
17. LEE CP and ERNSTER L. In: Symposium on the regulation of metabolic process in mitochondria (Tager JM, Papa S, Quagliariello E and Slater EC Eds.). Vol. 7, 1965; pp. 2189-234, Elsevier/North Holland, New York/Amsterdam.
18. LOWRY OH, ROSENEROUGH NJ, FARR AL, RANDAL RJ. Protein measurement with the phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951; 193: 265-275.
19. JAY D, MICHEL B. Bases moleculares de la hipertensión arterial inducida por Cadmio. *Arch. Inst. Cardiol.*, 1986; 56: 205-210.
20. WERTZ JE, BOLTON JR. Electron spin elementary theory and practical applications (Hume DN, Stork G, King EL, Herschbach RD, Pople AJ), 1972; pp. 378-390, McGraw-Hill series in advances chemistry. New York.
21. BEINERT H, LEE W. Evidence for a new type of iron containing electron carrier in mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1961; 5: 40-45.
22. KING TE, HOWARD RL, MASON HS. An electron spin resonance study of soluble succinic dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1961; 5: 329-334.
23. GIBSON JF, HALL DO, THORNLEY JH, WHATLEY FR. The iron complex in spinach Ferredoxin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1966; 56: 987-990.
24. TSIBRIS JC, TSAI RL, GONSALUS IC, ORME-JOHNSON WH, HANSEN RE, BEINERT H. The number of iron atoms in the paramagnetic center ( $G = 1.94$ ) of reduced putidaredoxin, a nonheme iron protein. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1968; 59: 959-965.
25. ORME-JOHNSON WH, HANSEN RE, BEINERT H, TSIBRIS JC, BARTHOLOMAUS RC, GONSALUS IC. On the sulfur components of iron-sulfur proteins. I. The number of acid-labile sulfur groups sharing an unpaired electron with iron. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1968; 60: 368-372.
26. PALMER G. The electron paramagnetic resonance of Metalloproteins. *Biochem. Soc. Trans.* 1985; 13: 548-560.
27. BEINERT H, ACKRELL AC, KEARNEY EB, SINGER P. Iron-sulfur components of succinate dehydrogenase: stoichiometry and kinetic behavior in activated preparations. *Eur. J. Biochem.*, 1975; 54: 185-194.
28. ZAMORANO R, Ph.D. Dissertation. Tallahassee, FL. The Florida State University; 1986.

## Centros hierro-azufre de la cadena respiratoria mitocondrial

Una revisión de resultados de resonancia paramagnética electrónica

*David Jay,  
Rafael Zamorano,  
Eduardo Muñoz,  
Roberto Gleason  
y  
José Luis Boldú*

### RESUMEN

En este artículo examinaremos la información más relevante en el área de los centros hierro-azufre de la cadena respiratoria mitocondrial. Debido a que mucho del avance en este campo se ha dado por la aplicación de la espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica, se hará una breve mención de los conceptos básicos de la teoría de esta técnica.

Recibido el 22 de noviembre de 1989  
Aceptado en forma revisada el 11 de abril de 1990

El M en C David J Jay GF estudió la carrera de biología en la Facultad de Ciencias de la UNAM. En el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM realizó la maestría en investigación biomédica básica y actualmente está cursando el doctorado en la misma área. Ha publicado diversos artículos de investigación en el campo de la bioquímica. Actualmente es investigador del Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. Es candidato a investigador nacional.

El Dr Rafael Zamorano Ulloa obtuvo la licenciatura en física y matemáticas en la Escuela Superior de Física y Matemáticas del IPN y el doctorado en física del estado sólido en la Universidad del Estado de Florida, EUA. Actualmente se especializa en el estudio experimental de las propiedades paramagnéticas de sistemas biológicos como metalo-proteínas; es miembro del SNI; es profesor e investigador del Departamento de Física de la ESFM-IPN.

El Dr Eduardo Muñoz Picone (del Departamento de Estado Sólido del IFUNAM) realizó sus estudios de licenciatura y doctorado en física en la Facultad de Ciencias de la UNAM. Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores. Sus áreas de investigación incluyen propiedades magnéticas y ópticas de

### INTRODUCCIÓN

Las mitocondrias, organelos presentes en la gran mayoría de los tejidos animales y vegetales, contienen hierro no hemático en abundancia. Mucho de este hierro se encuentra asociado con azufre, formando centros hierro-azufre (Fe-S) capaces de transportar electrones. La unión de estos centros a la cadena polipeptídica está mediada, generalmente, por residuos de cisteína que establecen lazos con los átomos de hierro.

Las propiedades de las proteínas que contienen centros Fe-S han sido estudiadas mediante varias técnicas. Entre éstas, la espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (RPE) ha mostrado ser de mucha

sólidos (resonancia paramagnética electrónica). Ha publicado 40 trabajos de investigación en revistas especializadas.

El M en C Roberto Gleason estudió la licenciatura y la maestría en física en la Facultad de Ciencias de la UNAM. Ha publicado diversos artículos de investigación en el área de física del estado sólido. Actualmente trabaja como técnico académico en el Instituto de Física de la UNAM.

El Dr José Luis Boldú realizó sus estudios de licenciatura y doctorado en física en la Facultad de Ciencias de la UNAM. Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores. Sus áreas de investigación incluyen propiedades magnéticas y ópticas de sólidos (resonancia paramagnética electrónica). Ha publicado diversos artículos de investigación en revistas especializadas.



utilidad debido a que, en varios aspectos, es insustituible en el estudio de centros paramagnéticos, como los Fe-S. Avances recientes en la espectroscopía de RPE han permitido el descubrimiento y caracterización de muchos centros hierro-azufre mitocondriales y de sistemas fotosintéticos.

Actualmente se dispone de bastante información en cada una de las áreas de la biología en donde se ha podido aplicar la RPE. Así, hay volúmenes enteros (*Iron-Sulfur Proteins*) dedicados exclusivamente al tema de los centros Fe-S. Lamentablemente, mucha de esta información (indispensable en el campo de la bioenergética) pasa inadvertida para algunos de los investigadores bioquímicos mexicanos. Esto se debe, en parte, al grado de complicación de la técnica y a su alto costo. Otra razón es que la teoría de la RPE es compleja y constituye una rama de especialización dentro de la física. Sin embargo, con la revisión de algunos aspectos fundamentales de la teoría, se puede hacer una lectura crítica de mucha de la información disponible.

En este artículo se mencionan los conceptos básicos de la teoría de la RPE de utilidad para interpretar de los fenómenos biológicos, se da particular atención a la descripción de los avances más importantes y a los puntos que han suscitado discusión sobre los centros Fe-S mitocondriales. Los lectores interesados pueden consultar excelentes libros introductorios sobre el tema (Carrington y McLachlan, 1967; Wertz y Bolton, 1972; Feher, 1969; Squires, 1964; entre otros).

## I. PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA RPE

La Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE) es una técnica espectroscópica basada en la absorción de microondas por una sustancia paramagnética colocada en un campo magnético intenso. El paramagnetismo es la propiedad de ciertas sustancias de magnetizarse en presencia de un campo magnético en magnitud proporcional a éste. Dicha propiedad se asocia con los electrones no apareados de un material, de tal manera que sus momentos magnéticos ( $\bar{\mu}$ ) no están cancelados. Ejemplos de estas sustancias son los radicales libres orgánicos y los formados por irradiación de cristales. Los iones de transición también presentan el fenómeno de paramagnetismo debido a que pueden tener electrones desapareados en la capa electrónica  $d$ , que se encuentra incompleta.

Para ilustrar este fenómeno consideremos una molécula con un sólo electrón desapareado; en este caso su espín  $S$  es igual a  $1/2$ . En ausencia de campo magnético todos los electrones desapareados de la muestra tienen la misma energía. Al aplicar un campo magnético  $H$ , la energía de interacción entre  $\bar{\mu}$  y  $H$  ( $-\bar{\mu} \cdot H$ ) es de tal forma que los espines se cuantifican tomando los dos valores posibles  $m_s = 1/2$  y  $m_s = -1/2$ . Estos dos estados no tienen ahora la misma energía y su diferencia crece proporcionalmente al campo magnético (Fig 1). La energía correspondiente para cada uno de estos estados está dada por:

$$E_+ = E_0 + \frac{1}{2}g\beta H, \quad m_s = 1/2,$$

y

$$E_- = E_0 - \frac{1}{2}g\beta H, \quad m_s = -1/2,$$
(1)

en donde  $\beta$  es el magnetón de Bohr ( $\beta = 9.274078 \times 10^{-21}$  ergio gauss $^{-1}$ ) y  $g$  es igual a 2.0023 para el electrón libre. De esta manera, la diferencia de energía entre los dos estados ( $\Delta E = E_+ - E_-$ ) será:

$$\Delta E = g\beta H. \quad (2)$$

Es posible inducir transiciones entre los dos niveles por la aplicación de un campo electromagnético de frecuencia ( $\nu$ ) adecuada, es decir, tal que  $h\nu = \Delta E$ , en donde  $h$  es la constante de Planck ( $h = 6.6256 \times 10^{-27}$  ergs $^{-1}$ ). En el caso de un electrón libre en un campo magnético de  $\approx 3200$  gauss, esta condición se satisfará para microondas con una frecuencia de 9000 MHz. Este proceso de

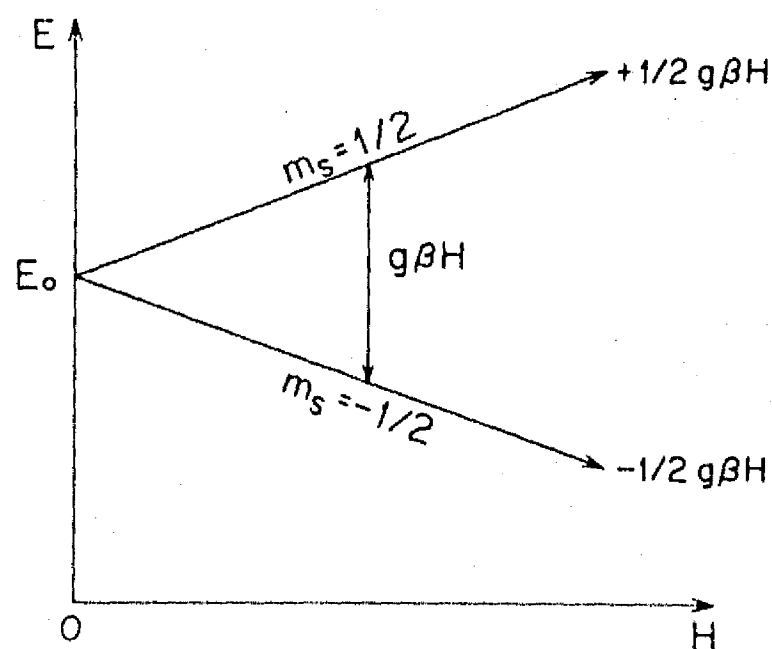


Figura 1. Efecto de un campo magnético sobre la energía de un electrón desapareado.

absorción selectiva de fotones de la energía dada por la ecuación (2), se denomina resonancia paramagnética electrónica.

#### A. Saturación y procesos de relajación

Las transiciones entre los dos estados de espín de una sustancia paramagnética dan lugar a procesos de absorción y de emisión de energía. Lo que se observa, usualmente, es una absorción neta de energía. Esto se debe a que en condiciones de equilibrio térmico el número de espines en el nivel inferior es mayor que el número de espines en el nivel superior en una proporción dada por el factor de Boltzmann:

$$\frac{N^1}{N_1} = \exp(-\Delta E/KT), \quad (3)$$

en donde  $N^1$  y  $N_1$  son las poblaciones del nivel superior y del nivel inferior, respectivamente, y  $K$  es la constante de Boltzmann, igual a  $1.380662 \times 10^{-16}$  ergio kelvin<sup>-1</sup>. A temperatura ambiente y en un campo magnético de 3000 gauss  $N^1/N_1 = 1.001$ , en consecuencia, el número de electrones que pueden absorber energía predomina, ligeramente, sobre el número de electrones que pueden emitirla. En esta diferencia se basa la espectroscopía de RPE.

Se podría suponer que la absorción neta de microondas por el sistema, tendería a igualar las poblaciones en los dos niveles, eliminando, de esta manera, la absorción de energía. Esta tendencia en realidad existe. Cuando una muestra es sometida a un campo electromagnético intenso (más fotones), la diferencia entre las poblaciones tiende a cero. En espectroscopía de RPE se denomina a esta condición saturación por microondas, y puede evitarse al disminuir la potencia de las microondas. La saturación de un espectro tiene el efecto de disminuir la amplitud de las líneas. Se pueden cometer errores importantes cuando se intenta estimar el número de centros paramagnéticos bajo condiciones de saturación. Sin embargo, bajo ciertas condiciones, no se observa el fenómeno de saturación; esto se da cuando los espines están en contacto con el medio (reservorio térmico), el cual tiende a restablecer el factor de Boltzmann mediante los diversos procesos de relajación.

Existen dos mecanismos principales mediante los cuales los espines del nivel superior

regresan al inferior sin emitir radiación: relajación longitudinal o espín-red, y relajación transversal o por interacción dipolo-dipolo. En el primer caso, los espines promovidos al nivel superior tienden a devolver parte de su energía al medio en forma de calor. La energía emitida simplemente aumenta la amplitud de la vibración térmica, lo cual corresponde a un aumento minúsculo de la temperatura de la muestra. La relajación longitudinal no ocurre de manera inmediata sino que está caracterizada por un tiempo de relajación  $T_1$ , que aumenta al disminuir la temperatura. El segundo mecanismo de relajación se debe a la presencia de núcleos magnéticos en la muestra. La interacción del espín electrónico con los momentos magnéticos de los núcleos reduce el tiempo de relajación. Una situación semejante ocurre en muestras muy concentradas en donde la interacción entre espines electrónicos proporciona un mecanismo de relajación. (Estos efectos generalmente se reúnen y describen para un tiempo de relajación  $T_2$ .) En general, la reducción de los tiempos de relajación tiende a ensanchar las líneas de RPE.

#### B. Niveles de energía y distribución de electrones en el átomo de hierro

En la cadena respiratoria mitocondrial el flujo electrónico desde los sustratos al oxígeno es la fuente de energía que se utiliza para sintetizar ATP. La transferencia de electrones se realiza por una serie de reacciones acopladas de óxido-reducción en las que intervienen átomos de hierro, ya sea como grupos prostéticos de citocromos (grupos hemo), o como centros hierro-azufre. Las propiedades del hierro, incluyendo las espectrales, así como su capacidad de transportar electrones están determinadas en gran medida por su estructura electrónica, que es función del ambiente en que se encuentra. En los centros hierro-azufre dos o más átomos de hierro se encuentran acoplados funcionando como una unidad. En estas condiciones no se pueden distinguir muchas de las propiedades individuales de los átomos de hierro. Sin embargo, conocer algunas de estas propiedades es útil cuando se estudian sistemas más complejos.

En el átomo de hierro los electrones de valencia que están involucrados en las reacciones de óxido-reducción son los del nivel  $3d$ . En los iones de transición la capa  $d$  está incompleta. En el caso del Fe hay cinco ( $\text{Fe}^{3+}$ ) o seis ( $\text{Fe}^{2+}$ ) electrones distribuidos en los

cinco orbitales (o funciones angulares)  $d$ :  $d_{xy}$ ,  $d_{xz}$ ,  $d_{yz}$ ,  $d_{z^2}$  y  $d_{x^2 - y^2}$ . En el ion libre la energía de los cinco orbitales es la misma. Sin embargo, en el átomo de Fe no aislado, la interacción diferente de los ligandos con cada uno de los orbitales  $d$  hará que las energías de estos últimos ya no sean necesariamente iguales.

En la mayoría de los iones de transición la coordinación es octaédrica. En cada uno de los vértices del octaedro se encuentra una carga negativa perteneciente al ligando. Si el octaedro es regular, el ion tiene simetría cúbica. Las distorsiones del octaedro dan lugar a simetrías más bajas. Es frecuente encontrar cuatro tipos básicos de simetría: cúbica, tetragonal, rómbica y trigonal. Dependiendo de la simetría del ambiente en que se encuentre el ion de hierro, los orbitales  $d$  tendrán diferentes energías, mismas que se resumen en la figura 2. A este desdoblamiento de niveles de energía en ausencia de campo magnético se le denomina "desdoblamiento a campo cero" y determina en gran medida la forma de los espectros de RPE de los metales de transición, como se verá más adelante.

La forma en que los electrones ocupen los orbitales dependerá de las diferencias de energía que existan entre ellos. Es decir, de la magnitud de la distorsión provocada por el campo de los ligandos o campo cristalino. Las distribuciones que requieran menor energía serán favorecidas. Dependiendo de estas consideraciones, hay varios estados posibles de espín para los iones  $Fe^{2+}$  y  $Fe^{3+}$  según se muestra en la tabla I.

### C. Sistemas acoplados. Centros hierro-azufre

Los centros hierro-azufre de la cadena respiratoria están formados por dos o más átomos de hierro unidos mediante átomos de azufre. Los espectros de RPE de estos centros no se pueden entender fácilmente

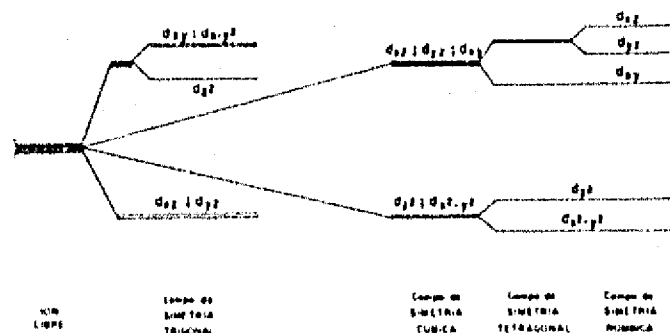


Figura 2. Niveles de energía de orbitales  $d$  en diferentes campos cristalinos.

Tabla I  
Posibles valores de espín del  $Fe^{2+}$  y del  $Fe^{3+}$ .

	Alto espín	Espín intermedio	Bajo espín
Cinco electrones $d$ $Fe^{3+}$	$\uparrow \uparrow \uparrow$ $s=5/2$	$\uparrow \uparrow$ $s=3/2$	$\uparrow$ $s=1/2$
Seis electrones $d$ $Fe^{2+}$	$\uparrow \uparrow \uparrow$ $s=2$	$\uparrow \uparrow$ $s=1$	$\uparrow$ $s=0$

Los valores de bajo y alto espín ocurren generalmente en campos cristalinos cúbicos mientras que los valores de espín intermedio se dan en simetrías más bajas.

en términos de átomos de Fe individuales. Actualmente se reconoce que la resonancia asociada a éstos es indicativa de sistemas acoplados en donde el centro paramagnético contiene, como mínimo, un ion de  $Fe^{3+}$  de alto espín ( $S = 5/2$ ) y un ion de  $Fe^{2+}$  también de alto espín ( $S = 4/2$ ) (tabla I). Si el centro contiene más de dos átomos de hierro, estos también presentan alto espín. El acoplamiento entre los espines de los átomos de Fe se da mediante un mecanismo de intercambio antiferromagnético según se describe adelante.

Las interacciones espín-espín entre centros paramagnéticos ocurren mediante dos mecanismos distintos (Cammack y col, 1985): a) interacción dipolo-dipolo, la cual es un fenómeno magnético y b) la interacción de intercambio, que es una consecuencia del principio de exclusión de Pauli y se puede considerar esencialmente como electrostática.

El tipo de interacciones entre espines depende de la distancia entre ellos. Cuando los centros están separados por distancias relativamente grandes, de aproximadamente 1.5 a 2 nm, la interacción espín-espín (dipolo-dipolo) se manifiesta como una disminución en el tiempo de relajación,  $T_2$ , lo que se acompaña de un ensanchamiento de línea, según se vió en el inciso A de la sección I.

Cuando el espín electrónico está separado de un núcleo magnético (espín nuclear =  $I$ ) por distancias de uno, dos o tres enlaces químicos, se da la interacción superhiperfina, que desdobra cada línea espectral en  $2I + 1$  componentes. Cuando el núcleo magnético se encuentra en el mismo átomo que el electrón desapareado, la interacción se denomina hiperfina. El desdoblamiento de las líneas es-

pectrales que provocan ambas interacciones se conoce como la estructura hiperfina del espectro. El estudio de esta multiplicidad de líneas brinda información muy útil sobre la naturaleza y la localización de los átomos vecinos.

Por último, los acoplamientos antiferromagnético y ferromagnético ocurren cuando dos centros paramagnéticos están suficientemente cerca para que sus orbitales se traslapen (dando lugar a integrales de traslape, de intercambio y de Coulomb, diferentes de cero) (Ginsberg, 1971). Esta interacción de intercambio se da con frecuencia cuando dos centros paramagnéticos están unidos mediante un puente de uno o dos ligandos, y su signo y magnitud son fuertemente dependientes de la longitud y ángulo de los enlaces involucrados. Los dos centros, acoplados por la interacción de intercambio, se comportan como un sistema de espín único.

Los centros Fe-S son sistemas de Fe de alto espín acoplados antiferromagnéticamente. La aplicación de un campo magnético a un sistema de dos átomos de Fe no acoplados causaría normalmente que los electrones desapareados de ambos fierros se orientaran independientemente con el campo. Sin embargo, cuando los dos átomos de hierro están acoplados antiferromagnéticamente, los espines en uno de los átomos están obligados a adoptar una posición antiparalela con respecto a los del otro. Sólo el espín resultante se alinearán con el campo. El acoplamiento de un Fe  $S = 5/2$  con otro Fe  $S = 4/2$  producirá un estado basal resultante con un espín total de  $S = 1/2$  (Gibson y col, 1966).

En la cadena respiratoria hay centros Fe-S formados por dos, tres o cuatro átomos de Fe. Si bajo determinadas condiciones de oxidación o reducción (presencia o ausencia de sustratos) el centro Fe-S es diamagnético (y por tanto no muestra espectro de RPE), por la aceptación o donación de un electrón se volverá paramagnético. Por ejemplo, un centro binuclear (2Fe) será diamagnético en el estado oxidado ( $1\text{Fe}^{5/2} + 1\text{Fe}^{5/2} \rightarrow S_{\text{total}} = 0$ ), y por la aceptación de un electrón se volverá paramagnético ( $1\text{Fe}^{5/2} + 1\text{Fe}^{4/2} \rightarrow S_{\text{total}} = 1/2$ ). Se ha visto que en el estado paramagnético el espín resultante de los centros Fe-S mitocondriales es de  $1/2$ ; independientemente del número de átomos de hierro de que estén constituidos (Guigliarelli y col, 1986a y b).

Finalmente, es necesario considerar otro aspecto antes de comenzar con la descripción

de los centros Fe-S mitocondriales. Muchos de los centros hierro-azufre muestran señales de RPE con varios valores de  $g$  (ver ecuación 2). Esto se debe a que el factor  $g$  es en realidad un tensor ( $\hat{g}$ ). En el caso de cristales, esto implicará que el valor obtenido para  $g$  dependerá de la orientación que tenga la muestra con respecto al campo magnético. Si cada una de las tres direcciones principales del cristal se orienta paralelamente al campo, se pueden obtener los tres valores principales correspondientes de  $g$ :  $g_x$ ,  $g_y$  y  $g_z$ .

La mayoría de las muestras biológicas que se estudian con RPE no son cristales sino soluciones congeladas de enzimas purificadas o de preparaciones membranales. La orientación al azar de los centros paramagnéticos y la falta de movimientos que caracterizan al estado líquido hace posible, en muchos casos, que se puedan obtener todos los valores de  $g$  en un solo espectro, llamado espectro de polvo policristalino.

El número de valores que muestre  $\hat{g}$  dependerá de la simetría del microambiente (campo cristalino) en que se encuentre el espín total del centro Fe-S. Existen tres situaciones básicas (Palmer, 1985), que se resumen en la figura 3:

1) El caso isotrópico en el cual los tres valores de  $g$  son iguales. Sólo se observa una línea simétrica de absorción.

2) El caso axial en el cual un valor de  $g$  es diferente al de los otros dos. Al valor único se le nombra  $g_{\parallel}$  y a los otros dos  $g_{\perp}$ . El valor de  $g_{\parallel}$  puede ser mayor o menor que el de  $g_{\perp}$ .

3) El caso rómbico en el cual los tres valores de  $g$  son diferentes.

## II. CENTROS Fe-S DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL

En las mitocondrias, los procesos de producción y almacenamiento de energía (en forma de ATP) son realizados por una serie de sistemas multienzimáticos localizados en la membrana interna del organelo. Se ha visto que sistemas similares de conservación de energía operan en células vegetales y de procariontes. Actualmente se reconoce la presencia de cinco complejos funcionales de proteínas y lípidos que dan lugar al sistema de fosforilación oxidativa (para una revisión véase Hatefi, 1985). Tres de estos complejos tienen centros Fe-S que participan en la transferencia de electrones:

A) NADH: ubiquinona oxidoreductasa o complejo I.

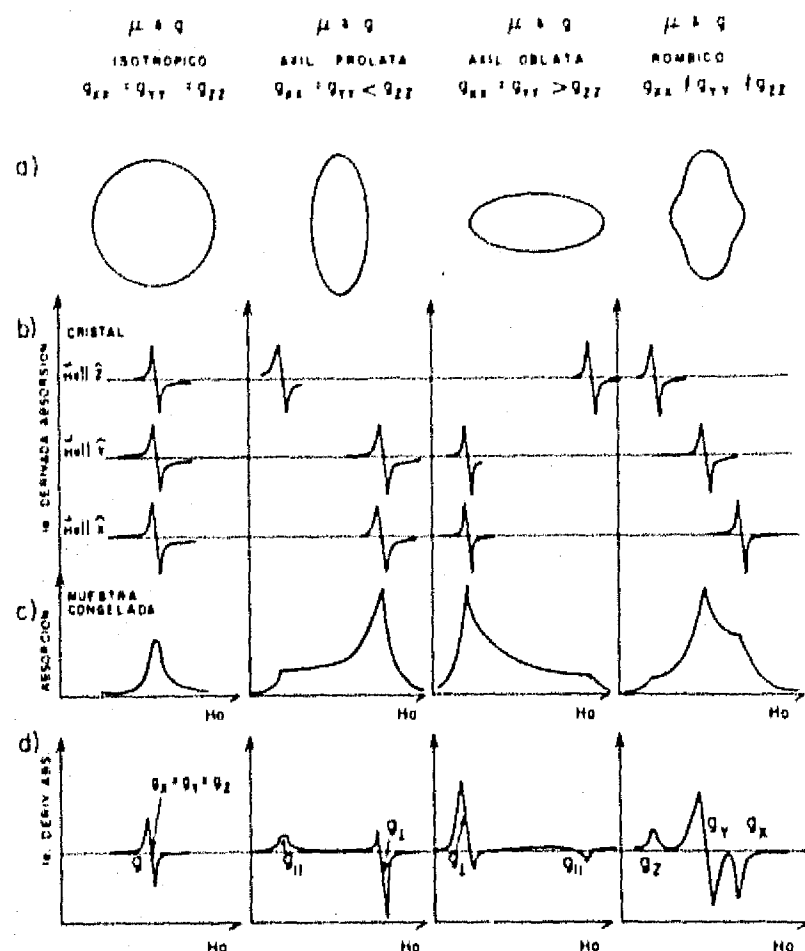


Figura 3. Representación esquemática del tensor  $g$  anisotrópico y de los correspondientes espectros de RPE. En a) las figuras muestran las formas geométricas asociadas con los momentos magnéticos isotrópico, axial (prolato u oblat) y rómbico. En b) se muestran las curvas de absorción (en primera derivada) que se obtendrían de un cristal orientando sus ejes principales paralelamente al campo magnético ( $H_0$ ). En c) se muestran las curvas de absorción que se obtendrían de una muestra líquida congelada "polvo policristalino" y en d) se muestran las curvas correspondientes de absorción en primera derivada, que es como normalmente se obtienen.

B) Succinato: ubiquinona oxidoreductasa o complejo II.

C) Ubiquinol: ferricitocromo e oxidoreductasa o complejo III.

La transferencia de electrones mediada por proteínas Fe-S se da en la región de potencial redox más baja de la cadena respiratoria (en las deshidrogenasas o cerca de la coenzima Q). Las proteínas con grupos hemáticos y cobre operan en la zona de alto potencial redox.

En las próximas secciones examinaremos la información referente a los centros Fe-S con que contamos. Prestaremos particular atención a los aspectos estructurales y termodinámicos que son importantes para la realización de la función biológica. Centraremos la revisión sobre los Fe-S mitocondriales; sin embargo, en donde sea útil para la discusión, describiremos los resultados obtenidos con otros organismos.

### A. NADH: ubiquinona oxidoreductasa

Actualmente se reconoce la presencia de seis o quizá siete centros Fe-S en el complejo I (Beinert, 1978 y 1982; Hatefi, 1985). Sus espectros de RPE se muestran en la figura 4. A continuación describimos cada uno de estos grupos.

**Centro 1.** Beinert y Sands (1960) observaron por primera vez la señal de RPE de este grupo. Posteriormente se propuso que la señal correspondía a un centro binuclear<sup>1</sup>  $[2Fe-2S]^{1+}$  (en donde el superíndice indica la valencia total del grupo, considerando la del S = -2) con un espín efectivo de 1/2 en un campo con simetría rómbica ( $g_{x,y,z} =$

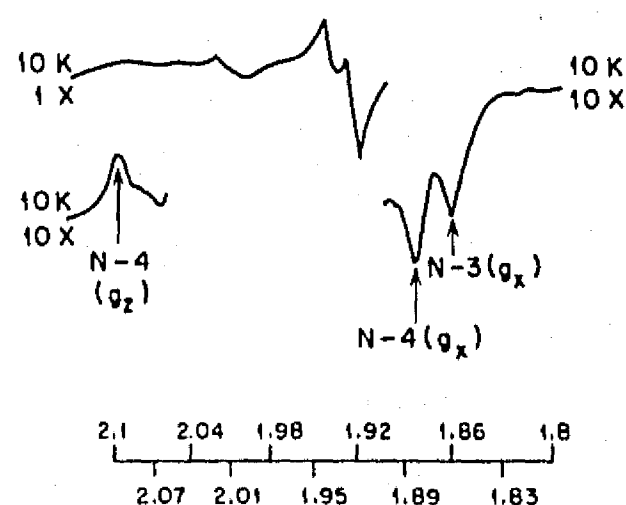
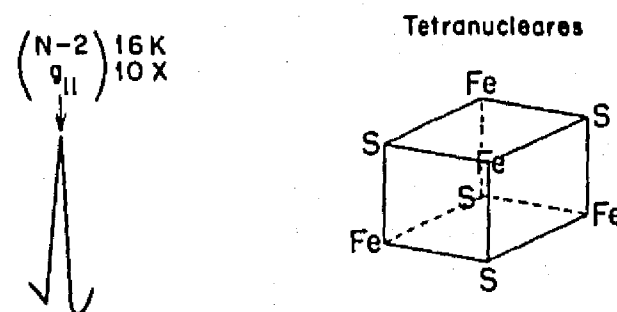
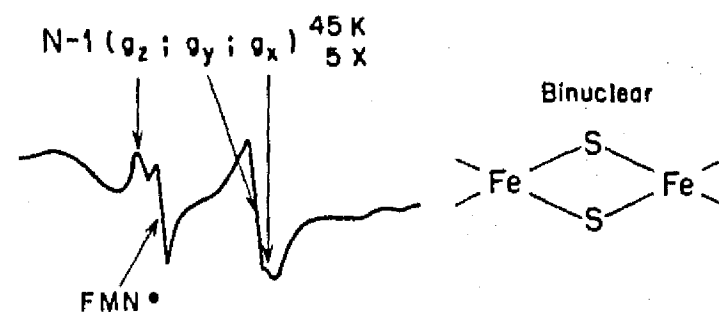


Figura 4. Espectros de RPE (en primera derivada) y esquemas de la estructura de los centros Fe-S del complejo I mitocondrial.

<sup>1</sup> Es conveniente mencionar que la asignación definitiva de las estructuras de los centros Fe-S se hace por comparación entre los espectros de RPE obtenidos en mitocondria y los obtenidos en bacterias, en donde la estructura tridimensional de los centros se ha determinado por difracción de rayos X.

1.923, 1.938, 2.022) (Orme-Johnson y col, 1971 y 1974). Sin embargo, Albracht y col (1977), en un intento por simular en la computadora la señal de este grupo, llegaron a la conclusión de que el mejor ajuste se daba considerando que la señal estaba formada por la superposición de dos componentes axiales (dos grupos). Ohnishi y col (1981) pudieron simular la señal considerando un solo componente con simetría rómbica. Esta última interpretación es la más aceptada actualmente (Hearshen y col, 1982).

La señal del centro 1 se puede observar en el complejo I o en partículas submitocondriales (PSM) reducidas con NADH. Tiene un potencial estándar de óxido-reducción ( $E'_0$ ) = -240 mV. Debido a sus propiedades de relajación (tiempo de relajación relativamente grande), se puede observar a temperaturas "altas" (nitrógeno líquido  $\approx$  80 K). La concentración de este centro en el complejo I es de 0.50/centro 2 o FMN. Debido a esto han surgido preguntas con relación a la unidad mínima que cataliza la reducción de la ubiquinona por NADH. Se ha postulado la participación de un dímero estructural en la deshidrogenación del NADH (Albracht y col, 1979).

Por otro lado, en 1981, Ohnishi y col observaron en PSM de paloma y de corazón de res una señal no inducible por NADH muy próxima a la del centro 1 ( $g_{x,y,z}$  = 1.91, 1.95, 2.03). A esta señal la nombraron  $N-1a$  y a la del primer centro  $N-1b$ . El potencial redox de este grupo es muy bajo ( $< -380$  mV) y sólo puede ser reducido con ditionita en presencia de benzil o metil viológeno como mediadores. La presencia de este centro ha sido cuestionada pues no todos los grupos de trabajo la han podido observar (Orme-Johnson y col, 1971 y 1974).

**Centro 2.** La señal de este centro fue detectada por Ohnishi y col en 1970. La señal ha sido asignada a un centro tetranuclear  $[4Fe-4S]^{1+}$  con simetría axial ( $g_{x,y,z}$  = 1.92, 1.92, 2.05) y puede ser observada en complejo I reducido por NADH a temperaturas menores o iguales a 30 K (helio líquido). El potencial redox varía mucho de preparación a preparación ( $E'_0$  = -20 mV a -140 mV) y depende del potencial de fosfato (Ingledew y Ohnishi, 1980). La mitad del área, a campo bajo, de la señal de  $g_z$  (2.05) se utiliza generalmente para evaluar la concentración de este centro (Albracht y col, 1979). El

centro 2 se encuentra a una concentración de  $\approx 0.9$ /FMN (Albracht y Subramanian, 1977).

**Centros 3 y 4.** Tres señales más de RPE se pueden observar ( $T \leq 30$  K) en el complejo I reducido con NADH. Por sus valores de  $g$  (2.1, 1.88 y 1.86) son fácilmente distinguibles de los centros  $N-1$  y  $N-2$ . Originalmente se pensó que estas señales correspondían a dos grupos diferentes con el mismo valor de  $g_z$  a 2.1 (Orme-Johnson y col, 1971 y 1974). Observaciones posteriores de Albracht y Subramanian (1977) a temperaturas más bajas ( $T < 15$  K) mostraron que la señal a  $g = 2.1$  era parte de la señal a  $g = 1.88$  junto con parte de la señal a  $g = 1.93$  del centro 1. A este grupo ( $g_{x,y,z}$  = 1.88, 1.93 y 2.1) se le nombró centro 3 (según la nomenclatura de Ohnishi es el  $N-4$ ). El  $N-4$  corresponde a un centro tetranuclear con un  $E'_0 = -240$  mV (Salerno y col, 1977).

Por otro lado, Albracht y Subramanian (1977) observaron por primera vez una señal a  $g = 2.037$ . Experimentos de saturación por microondas (véase el inciso A de la sección I) a 9.3 K mostraron que las señales a  $g = 2.037$  y  $g = 1.86$  se saturaban de manera paralela (ver el principio del párrafo anterior). Esto indica su pertenencia al mismo grupo (centro 4 según Albracht, centro  $N-3$  según la nomenclatura de Ohnishi) (Ohnishi y col, 1976). Titulaciones redox muestran que la amplitud de la señal de este grupo disminuye cuando se equilibra a potenciales redox menores que -240 mV. Sin embargo, al alcanzar un potencial de -340 mV la amplitud de la señal vuelve a crecer. Esto se ha interpretado como una disminución en el tiempo de relajación del centro  $N-3$  causada por la interacción dipolo-dipolo con un centro paramagnético que aparece a un potencial más bajo (-340 mV). Se ha sugerido una interacción espín-espín entre el centro  $N-3$  y la forma semirreducida del FMN (ver más adelante y los incisos A y C de la sección I) (Salerno y col, 1977). Las intensidades de las señales combinadas de los centros  $N-3$  y  $N-4$  corresponden a una concentración de 1.8/FMN (Orme-Johnson y col, 1974). Al parecer el centro  $N-3$  se encuentra en relación 1:1 con el FMN mientras que el centro  $N-4$  está presente en una relación un poco menor (Albracht y Subramanian, 1977).

**Centro 5.** Se ha observado una señal adicional en el complejo I y en PSM de corazón de res y de paloma. Esta señal ( $g_{x,y,z}$  = 1.89, 1.92, 2.06) aparece rápidamente por re-

ducción con NADH ( $E'_0 = -270$ ). Sin embargo, parece estar a una concentración mucho menor que la del FMN (6-25%) (Salerno y col, 1977). Debido a sus propiedades de relajación (tiempo de relajación muy corto), sólo ha sido observada por algunos autores a bajas temperaturas y con alta potencia de microondas (Ingledey y Ohnishi, 1980). La señal no fue observada en *C utilis* (Albracht y col, 1977) por lo que se cuestiona su participación como componente funcional del complejo I.

No se ha establecido la secuencia en el paso de electrones a través de los distintos centros Fe-S del complejo I. La reducción con NADH induce la aparición simultánea (dentro del tiempo de resolución alcanzado) de todas las señales de RPE bien establecidas (Orme-Johnson y col, 1971). Recientemente, Krishnamoorthy y Hinkle (1988), en un estudio de RPE sobre el efecto de diversos inhibidores en los grupos prostéticos del complejo I, sugirieron una distribución topográfica y una ruta en el paso de electrones acoplada al transporte vectorial de protones. El esquema sugerido es muy similar al "ciclo b" del complejo III mitocondrial, con el FMN y algunos Fe-S actuando en lugar de la coenzima Q y de los citocromos b, respectivamente. De esta manera, el FMNH<sub>2</sub> donaría un electrón al centro N - 2 (de alto potencial  $\approx -20$  mV) y éste a su vez lo donaría a la coenzima Q (actuando de manera análoga al Fe-S del complejo III que dona un electrón al citocromo c<sub>1</sub>). El FMN<sup>-</sup> resultante donaría su electrón desapareado al conjunto Fe-S de bajo potencial (N - 1, N - 2, N - 3) que actuaría de manera análoga al conjunto de citocromos b. En esta transferencia el centro N - 3 sería el aceptor primario, en concordancia con la interacción espín-espín propuesta entre ambos centros. La oxidación de FMNH<sub>2</sub> se acopla al transporte vectorial de protones (con una estequiometría de H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> = 2 hacia el lado citosólico mitocondrial. En este esquema el FMN actúa como un "transformador" entre un acarreador de dos electrones, el NADH, y acarreadores de un electrón.

#### B. Succinato: ubiquinona oxidoreductasa

En el complejo II mitocondrial todos los centros Fe-S están en la enzima deshidrogenasa succínica (DHS) (EC 1, 3, 99, 1). Esta enzima tiene dos tipos de subunidades, una de 70 000 daltones y otra de 30 000.

La subunidad mayor tiene un FAD unido covalentemente al sitio de unión del sustrato (Davis y Hatefi, 1971). Ambas subunidades tienen hierro y azufre. El contenido total de estos elementos en la enzima varía (4-8 de Fe y S) dependiendo de la preparación (Davis y Hatefi, 1971; Ackrell y col, 1977; Singer y col, 1956 y 1957; Wang y col, 1956; Lusty y col, 1965; Baginsky y Hatefi, 1969; Singer y Ramsay, 1985). En las preparaciones en donde se considera que la enzima está más intacta, el hierro, el azufre y el FAD están en proporción de 8:8:1.

La primera señal observada de esta enzima ( $T \approx 80$  K) fue la de un centro binuclear [2Fe-2S]<sup>1+</sup> con simetría rómbica ( $g_{x,y,z} = 2.030, 1.935, 1.910$ ) (Beinert y Sands, 1960; Sands y Beinert, 1960). Esta señal (S - 1 según la nomenclatura de Ohnishi) se obtiene al reducir a la enzima con succinato ( $E'_0 \approx 0$  mV). Posteriormente, cuando se dispuso de técnicas de obtención de espectros a más bajas temperaturas, se observó una señal casi isotrópica ( $g_{x,y,z} = 2.015, 2.014, 1.990$ ) en la enzima oxidada ( $E'_0 \approx +65$  mV). Muchas de las características de esta señal (S - 3) son similares a las observadas en los centros Fe-S de alto potencial de las ferredoxinas (HIPIP), por lo que en un principio se pensó que su estructura correspondía a la de un centro tetranuclear paramagnético [4Fe-4S]<sup>3+</sup> en el estado de oxidación 3+ (Ruzicka y Beinert, 1974; Beinert y col, 1974; Ohnishi y col, 1974a y b). En preparaciones de la enzima ligada a la membrana, la intensidad de esta señal es similar a la del centro S - 1 y ambas están presentes con una concentración cercana a la del FAD (Albracht, 1980; Beinert y col, 1975). En la enzima soluble, sin embargo, la intensidad del centro S - 3 es muy pequeña o incluso está ausente; esto se debe a la inestabilidad del grupo en presencia de oxígeno. Al destruirse este centro la enzima pierde la capacidad de reconstituirse en membrana y la actividad de ferricianuro reductasa de baja  $K_m$  (Vinogradov y col, 1975).

Por otro lado, Ohnishi y col (1973, 1974b y 1976) observaron, a bajas temperaturas (< 30 K), que la reducción de la enzima soluble con ditionita produce un incremento de intensidad del centro S - 1 de aproximadamente el doble (1.6-1.75 espines/FAD). Este aumento en la señal sólo aparece cuando el potencial redox disminuye a -400 mV. La interpretación de estos resultados por Ohnishi es que la señal extra se debe a

la presencia de un centro binuclear similar al  $S - 1$ , en cantidades similares a las del FAD, pero de potencial mucho más bajo (centro  $S - 2$ ). Observaciones similares fueron publicadas por Beinert y col (1974, 1975 y 1977). Sin embargo, estos investigadores nunca encontraron concentraciones mayores que 1.5 espines/FAD.

Además de aumentar la señal del centro  $S - 1$ , la reducción con ditionita modifica sus propiedades de relajación. A bajas temperaturas ( $< 30$  K), la señal del centro  $S - 1$  inducida por succinato se satura fácilmente al aumentar la potencia de las microondas. La reducción con ditionita evita la saturación de esta señal. Ohnishi y col (1973, 1974b y 1976) han interpretado esto como un aumento en la velocidad de relajación del centro  $S - 1$  debido a una interacción espín-espín con el centro  $S - 2$  que en estas condiciones (reducción por ditionita) sería paramagnético.

Durante algún tiempo se pensó que en la enzima había dos centros binucleares ( $S - 1$  y  $S - 2$ ) y uno tetranuclear ( $S - 3$ ), lo que correspondía bien a una estequiometría de Fe, S y FAD de 8:8:1. Sin embargo, Albracht (1980), no pudo reproducir en PSM el incremento en la señal inducido por ditionita y concluyó que el centro  $S - 2$  no existía. Para racionalizar esta explicación, Albracht supuso que el centro  $S - 3$  estaba en la subunidad mayor mientras el centro  $S - 1$  estaba en la subunidad menor de la enzima. Además asumió que en las preparaciones de enzima soluble analizadas la subunidad menor estaba presente en una estequiometría de 2:1 con relación a la subunidad mayor; lo cual ya había sido observado antes en algunas preparaciones (Coles y col, 1972a y b). Esto indicaba que el contenido real de Fe, S y FAD de la enzima era de 6:6:1. Albracht pensó que el cambio en las propiedades de relajación del centro  $S - 1$  se debía a una modificación en la estructura de la enzima inducida por la ditionita.

Estudios posteriores con técnicas más complicadas derivadas de la RPE (el llamado efecto lineal del campo eléctrico<sup>2</sup> en el espectro de RPE) mostraron señales en la enzima

<sup>2</sup> El efecto lineal de campo eléctrico se observa en espectros de RPE cuando una muestra con iones paramagnéticos en sitios no-centro-simétricos se sujeta simultáneamente a un campo eléctrico y a uno magnético. Mims y Peisach (1976), Peisach y Mims (1977), han observado este efecto en ferredoxinas [2Fe-2S] y en otras proteínas hierro-azufre. El efecto se manifiesta como un corrimiento en  $g$  proporcional al campo eléctrico aplicado (del orden de  $10^7$  Volts/metro).

oxidada muy similares a las producidas por proteínas que contienen centros trinucleares [3Fe- $x$ S] (en donde  $x$  puede ser 3 o 4) (Ackrell y col, 1984). Estos centros se caracterizan por ser paramagnéticos en el estado de oxidación 3+, en el cual dan una señal de RPE casi isotrópica centrada en  $g = 2.01$ , por lo que sugirieron que el centro  $S - 3$  era de este tipo. En estos centros, la reducción por ditionita (a un potencial bajo  $\approx -130$  mV) induce un estado paramagnético de  $S = 2$  que es silencioso en RPE. Beinert y Albracht (1982) habían sugerido antes que, de estar presente en la DHS, este estado podía ser el que modificaba las propiedades de relajación del centro  $S - 1$ , lo cual implicaba que el centro  $S - 2$  en realidad no existía.

En 1985 Johnson y col, haciendo uso del dicroísmo circular magnético a bajas temperaturas, encontraron, por comparación con observaciones hechas en bacterias, señales correspondientes a tres centros Fe-S diferentes. Una correspondía a un centro binuclear [2Fe-2S]<sup>1+</sup> (centro  $S - 1$ ), otra correspondía a un centro tetranuclear de bajo potencial paramagnético en estado de oxidación 1+, [4Fe-4S]<sup>1+</sup> (centro  $S - 2$ ) y la tercera correspondía a un centro trinuclear [3Fe- $x$ S]<sup>1+</sup> (centro  $S - 3$ ).

Hasta entonces, por tanto, no se había observado la señal de RPE del centro  $S - 2$ , [4Fe-4S]<sup>1+</sup>. En 1985 Maguire y col detectaron por primera vez la señal de RPE del centro  $S - 2$ . Sus observaciones en el complejo II mitocondrial y en enzima soluble mostraban la aparición de un centro [4Fe-4S]<sup>1+</sup> en preparaciones reducidas con ditionita. La titulación redox, seguida con RPE, indicaba que este centro aparecía al mismo potencial redox en que se modificaban las propiedades de relajación del centro  $S - 1$ . Esto constituía evidencia directa de la interacción espín-espín entre ambos grupos. Además, el centro  $S - 2$  reducido no exhibía una señal rómbica simple asociada a un sistema aislado de espín 1/2. Su espectro ( $g = 2.270, 2.064, 1.992, 1.874$  y  $1.630$ ) se extendía en una amplia zona de campo magnético ( $\approx 1500$  gauss). Espectros igualmente complejos se han observado en ferredoxinas con 8 Fe completamente reducidas (Mathews y col, 1974). En estos espectros se ha probado que el espectro deriva de una interacción espín-espín entre dos centros [4Fe-4S]<sup>1+</sup>, cada uno con un espín de 1/2, dando lugar a un espín efectivo intercentros diferente de 1/2. De esta manera, el espectro



del centro  $S-2$  se puede entender suponiendo una interacción espín-espín entre este centro y alguno de los centros paramagnéticos restantes. Una interacción dipolar entre los centros  $S-1$  y  $S-2$  no es suficiente para explicar la multiplicidad de líneas del nuevo espectro ya que la señal del centro  $S-1$  no se desdobla por reducción con ditionita. Es posible que el centro  $S-2$  también interaccione, por intercambio, con el centro  $S-3$  [En su estado base paramagnético, pero silencioso en RPE ( $S=2$  reducido por ditionita), como se mencionó antes.] Las interacciones entre centros tri y tetranucleares han sido estudiadas en ferredoxinas con 7 Fe (Hagan y col, 1985). Desde que se encontró en mitocondrias, el centro  $S-2$  también ha sido observado en otros organismos y sistemas enzimáticos homólogos, como la fumarato reductasa de *E coli* (Cammack y col, 1986).

Los espectros de RPE de los tres centros Fe-S de la deshidrogenasa succínica que se muestran en la figura 5 corresponden a los grupos:  $[2\text{Fe}-2\text{S}]^{1+}$ , ( $S-1$ );  $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{1+}$ , ( $S-2$ ); y  $[3\text{Fe}-x\text{S}]^{1+}$ , ( $S-3$ ). Cabe mencionar que estudios de difracción de rayos X de alta resolución, para determinar las estructuras de los centros trinucleares de las ferredoxinas de *A vinelandii* (Stout y col, 1988; Stout, 1988), mostraron que la incertidumbre en el número de azufres del centro, normalmente indicada como  $x\text{S}$  es de 4. Como la asignación de la estructura de estos centros en las mitocondrias se había hecho por comparación de los espectros de RPE de bacterias, la estructura del centro  $S-3$  de la DHS quedaría como  $[3\text{Fe}-4\text{S}]$ . Suponiendo que éstas son las estructuras de los centros Fe-S en la DHS, la relación final de Fe, S y FAD en la enzima sería de 9:9-10:1. En nuestra opinión hay que reconsiderar los valores de Fe y S dados por análisis químico antes de reconocer las estructuras de estos centros como definitivas.

La razón por la cual la DHS tiene tres centros Fe-S diferentes no es clara. Puesto que los centros  $S-1$  y  $S-3$  pueden ser reducidos por succinato, muy probablemente desempeñan un papel como acarreadores de electrones. Sin embargo, un papel similar para el centro  $S-2$  parece improbable, ya que su potencial redox ( $E'_0$  entre  $-260$  y  $-360$  mV) es bastante menor que el del par succinato/fumarato. Un estudio más detallado de las interacciones espín-espín entre estos grupos ayudará a esclarecer sus funciones. De la misma manera, se necesita información estructural de cómo

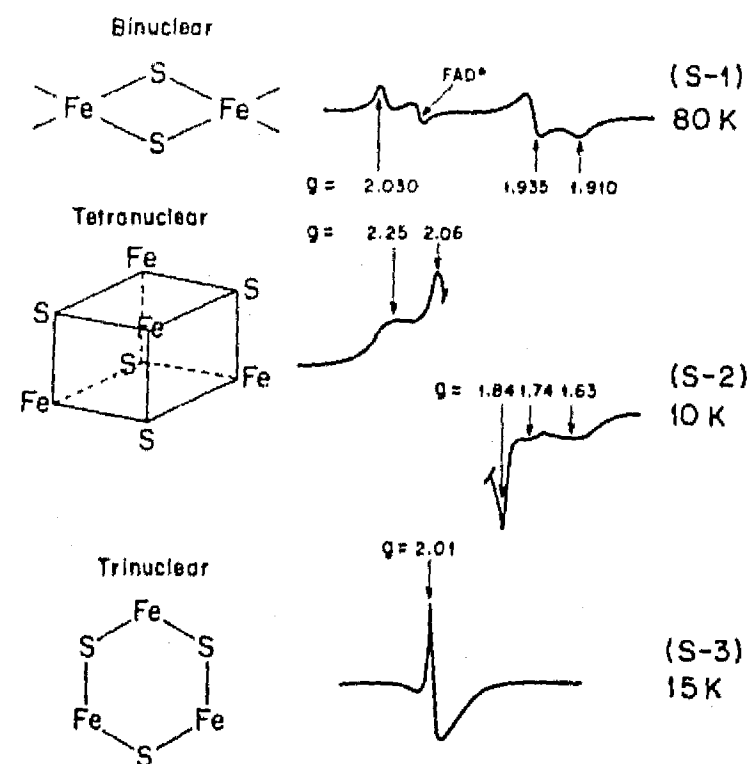


Figura 5. Espectros de RPE (en primera derivada) y esquemas de la estructura de los centros Fe-S del complejo II mitocondrial.

están arreglados los centros Fe-S y el FAD en la enzima. A este respecto Avarsson y Hederstedt (1988), mostraron que el centro  $S-1$  estaba en la subunidad menor de la DHS de *B subtilis*, asimismo Johnson y col (1988), mostraron que los centros  $S-1$  y  $S-3$  estaban en la subunidad menor de la fumarato reductasa de *E coli*, y que el centro  $S-2$  estaba en la subunidad mayor o enlazado entre las dos subunidades. Estudios de nuestro laboratorio han mostrado que el centro  $S-1$  interactúa con algunos residuos de cisteínas del sitio activo de la enzima.

### C. Ubiquinol: ferricitocromo c oxidoreductasa

El centro Fe-S de esta parte de la cadena respiratoria ha sido muy estudiado; existe vasta información en revisiones previas (Beinert, 1977 y 1978; Trumpower, 1981; Rich, 1984; Hatefi, 1985). Actualmente se reconoce que la proteína Fe-S del complejo III se requiere para la transferencia de electrones desde el ubiquinol hacia el citocromo  $c_1$ , y para la oxidación de los citocromos  $b$  por el citocromo  $c$  y la citocromo  $c$  oxidasa. En muestras tratadas con antimicina, la remoción del Fe-S evita la reducción de los citocromos  $b$  por el ubiquinol. Asimismo, el Fe-S es necesario para la reducción de los citocromos  $b$  por agentes oxidantes en presencia de antimicina (Trumpower, 1981). Estos hechos se han reunido en un esquema de transferencia de electrones no lineal que involucra un ciclo  $Q$

de bombeo de protones similar al descrito por Mitchel en 1976 (para una revisión del ciclo *Q* ver Hatefi, 1985).

El Fe-S de este complejo muestra una señal con características rómbicas ( $g = 2.03, 1.90, 1.77$ ) típicas de un centro binuclear reducido similar al de las ferredoxinas,  $[2\text{Fe}-2\text{S}]^{1+}$ . En un estudio de RPE de este grupo, De Vries y col (1979), se llegó a la conclusión, que la forma de línea de esta señal podía ser simulada al superponer dos señales rómbicas con distinto valor de  $g$ . También se observó que la forma de línea de una de estas señales (centro 1) se modificaba en función del potencial redox, lo cual sugería que la forma oxidada de la coenzima *Q* estaba en la vecindad de este centro Fe-S.

Más evidencia de la existencia de dos especies distintas de centros Fe-S en el complejo III fue aportada por De Vries y col (1982), quienes encontraron que la velocidad de reducción de sólo la mitad de los Fe-S del complejo III era afectada por la presencia de antimicina.

Sin embargo, no todos los autores están de acuerdo con la existencia de dos centros Fe-S localizados en distintos lugares y participando en funciones diferentes en el complejo III. Hearshen y col (1982) propusieron que cuando el centro Fe-S se reduce, el electrón tiene la misma probabilidad de dirigirse a cualquiera de los dos  $\text{Fe}^{3+}$ . Sin embargo, el ambiente que ve cada uno de estos fierros no es igual, resultando así una mezcla 1:1 de centros paramagnéticos ligeramente distintos espectroscópicamente. Con estas consideraciones Hearshen y col (1982) pudieron simular la señal del centro Fe-S del complejo III de *S. lividus*.

#### REFERENCIAS

- Årvarsson, A, y L Hederstedt, *FEBS Lett* (1988) 232, 298-302.
- Ackrell, BAC, EB Kearney y CJ Coles, *J Biol Chem* (1977) 252, 6963-6965.
- Ackrell, BAC, EB Kearney, WB Mims, J Peisach y H Beinert, *J Biol Chem* (1984) 259, 4015-4018.
- Albracht, SPJ, G Dooijewaard, FJ Leeuwerik y B Van Swol, *Biochim Biophys Acta* (1977) 459, 300-317.
- Albracht, SPJ, y J Subramanian, *Biochim Biophys Acta* (1977) 462, 36-48.
- Albracht, SPJ, FJ Leeuwerik y B Van Swol, *FEBS Lett* (1979) 104, 197-200.
- Albracht, SPJ, *Biochim Biophys Acta* (1980) 612, 11-28.
- Baginsky, ML, y Y Hatefi, *J Biol Chem* (1969) 244, 5313-5319.
- Beinert, H, y SPJ Albracht, *Biochim Biophys Acta* (1982) 683, 245-277.
- Beinert, H, y RH Sands, *Biochem Biophys Res Commun* (1960) 3, 41-43.
- Beinert, H, BAC Ackrell, EB Kearney y TP Singer, *Biochem Biophys Res Commun* (1974) 58, 564-572.
- Beinert, H, BAC Ackrell, EB Kearney y TP Singer, *Eur J Biochem* (1975) 54, 185-194.
- Beinert, H, *Iron-Sulfur Proteins* Vol 3. W Lovenberg (Ed) (Academic Press, Nueva York, 1977) pp 61-100.
- Beinert, H, BAC Ackrell, AD Vinogradov, EB Kearney y TP Singer, *Arch Biochim Biophys* (1977) 182, 95-106.
- Beinert, H, *Methods Enzymol* (1978) 53, 133-150.
- Cammack, R, DS Patil y VM Fernández, *Biochem Soc Trans* (1985) 13, 572-578.
- Cammack, R, DS Patil y JH Weiner, *Biochim Biophys Acta* (1986) 870, 545-551.
- Carrington, A, y DA McLachlan, *Introduction to Magnetic Resonance* (A Harper International Edition, Harper & Row, Nueva York, 1967).
- Coles, CJ, H Tisdale, WC Kenney y TP Singer, *Biochem Biophys Res Commun* (1972) 46, 1843-1849.
- Coles, CJ, H Tisdale, WC Kenney y TP Singer, *Physiol Chem Phys* (1972) 4, 301-306.
- Davis, AK, y Y Hatefi, *Biochemistry* (1971) 10, 2509-2516.
- De Vries, S, SPJ Albracht y FJ Leeuwerik, *Biochim Biophys Acta* (1979) 546, 316-333.
- De Vries, S, SPJ Albracht, JA Berden y EC Slater, *Biochim Biophys Acta* (1982) 681, 41-53.
- Feher, G, *Electron Paramagnetic Resonance with applications to selected problems in Biology* (Les Houches Lectures, Gordon and Breach, Science Publishers, U of C, San Diego, Nueva York, 1969).
- Ginsberg, AP, *Chem Rev* (1971) 75, 45-68.
- Guigliarelli, B, P Bertrand y JP Gayda, *J Chem Phys* (1986) 85, 1689-1692.
- Guigliarelli, B, C More, P Bertrand y JP Gayda, *J Chem Phys* (1986) 85, 2774-2778.
- Hagan, WR, WR Dunham, MK Johnson y JA Fee, *Biochim Biophys Acta* (1985) 828, 369-374.
- Hatefi, Y, *Ann Rev Biochem* (1985) 54, 1015-1069.
- Hearshen, DO, WR Dunham, RH Sands y HJ Grande, *Interaction between Iron and Protein in Oxygen and Electron Transport*. C Ho (Ed) (Elsevier/North-Holland, Amsterdam, 1982).
- Ingledeu, WJ, y T Ohnishi, *Biochem J* (1980) 186, 111-117.
- Johnson, MK, JE Morningstar, DE Benett, BAC Ackrell y EB Kearney, *J Biol Chem* (1985) 260, 7368-7378.
- Johnson, MK, AT Kowal, JE Morningstar, ME Oliver, K Whitaker, RP Gunsalus, BAC Ackrell y G Cecchini, *J Biol Chem* (1988) 263, 14732-14738.
- Krishnamoorthy, G, y PC Hinkle, *J Biol Chem* (1988) 263, 17566-17575.
- Lusty, CJ, JM Machinist y TP Singer, *J Biol Chem* (1965) 240, 1804-1810.
- Maguire, JJ, MK Johnson, JE Morningstar, BAC Ackrell y EB Kearney, *J Biol Chem* (1985) 260, 10909-10912.
- Mathews, R, S Charlton, RH Sands y G Palmer, *J Biol Chem* (1974) 249, 4326-4328.
- Mims, WB, y J Peisach, *J Chem Phys* (1976) 64, 1074-1077.
- Mitchell, P, *J Theor Biol* (1976) 62, 327-367.
- Ohnishi, T, T Asakura, H Wohlrab, T Yonetani y B Chance, *J Biol Chem* (1970) 245, 901-902.
- Ohnishi, T, DB Winter, J Lim y TE King, *Biochem Biophys Res Commun* (1973) 53, 231-237.
- Ohnishi, T, S Leigh, DB Winter, J Lim y TE King, *Biochem Biophys Res Commun* (1974) 61, 1026-1035.
- Ohnishi, T, DB Winter, J Lim y TE King, *Biochem Biophys Res Commun* (1974) 60, 1017-1025.
- Ohnishi, T, CJ Salerno, DB Winter, J Lim, C Yu, A Yu y TE King, *J Biol Chem* (1976) 251, 2094-2104.
- Ohnishi, T, H Blum, YM Galante y Y Hatefi, *J Biol Chem* (1981) 256, 9216-9220.

- Orme-Johnson, NR, WH Orme-Johnson, RE Hansen, H Beinert y Y Hatefi, *Biochem Biophys Res Commun* (1971) 44, 446-452.
- Orme-Johnson, NR, RE Hansen y H Beinert, *J Biol Chem* (1974) 249, 1922-1927.
- Palmer, G, *Biochem Soc Trans* (1985) 13, 548-560.
- Peisach, J, y WB Mims, *Biochemistry* (1977) 16, 2795-2799.
- Rich, PR, *Biochim Biophys Acta* (1984) 768, 53-79.
- Ruzicka, FJ, y H Beinert, *Biochem Biophys Res Commun* (1974) 58, 556-563.
- Salerno, JC, T Ohnishi, J Lim, R Widger y TE King, *Biochem Biophys Res Commun* (1977) 75, 618-624.
- Singer, TP, EB Kearney y P Bernath, *J Biol Chem* (1956) 233, 599-613.
- Singer, TP, V Massey y EB Kearney, *Arch Biochem Biophys* (1957) 69, 405-421.
- Singer, TP, y RR Ramsay, *The Enzymes of Biological Membranes* Vol 4. AM Martonosi (Ed) (Plenum, Nueva York, 1985) pp 301-332.
- Squires, LT, *An Introduction to Electron Spin Resonance*. IRE AM Brit (Ed) (Academic Press, Nueva York, 1964).
- Stout, CD, *J Biol Chem* (1988) 263, 9256-9260.
- Stout, GH, S Turley, LC Sieker y LH Jensen, *Proc Natl Acad Sci USA* (1988) 85, 1020-1022.
- Trumpower, LB, *Biochim Biophys Acta* (1981) 639, 129-155.
- Vinogradov, AD, EV Gavrikova y VG Foloveshkina, *Biochem Biophys Res Commun* (1975) 65, 1264-1269.
- Wang, TY, CL Tsou y YL Wang, *Sci Sin* (1956) 5, 73-90.
- Wertz, JE, y JR Bolton, *Electron Spin Resonance Elementary Theory and Practical Applications*. DN Hume, G Stork, EL King, RD Herschbach y AJ Pople (Eds) (McGraw-Hill series in advanced chemistry, Nueva York, 1972).

#### ABSTRACT

In this paper we will examine the most relevant information available to us in the field of the mitochondrial iron-sulfur centers. Since many of the experimental advances in this area have been made by the application of electron paramagnetic resonance spectroscopy, we will provide a brief description of the theoretical basis underlying this technique.

## Captopril Does Not Scavenge Superoxide: Captopril Prevents $O_2^-$ Production by Chelating Copper

David Jay,<sup>\*1</sup> Adela Cuéllar,<sup>\*</sup> Rafael Zamorano,<sup>†2</sup> Eduardo Muñoz,<sup>‡</sup> and Roberto Gleason<sup>‡</sup>

<sup>\*</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez, México City 14080, México;

<sup>†</sup>Departamento de Física, Escuela Superior de Física y Matemáticas, México; and <sup>‡</sup>Instituto de Física, Universidad Nacional Autónoma de México, Alvaro Obregón 04510, México

Received April 22, 1991, and in revised form July 12, 1991

The purpose of this study was to use a direct method, that of electron spin resonance spectroscopy, to evaluate the ability of captopril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, to prevent the superoxide-mediated formation of phenyl radicals. Results indicate that, under certain conditions, captopril is a potent inhibitor of the generation of phenyl radicals, produced by the autoxidation of phenylhydrazine. The inhibitory effect of captopril, however, was better understood as a direct interaction of the drug with the metals that catalyze the autoxidation process rather than as a reaction of captopril with the free radicals generated. This last conclusion was supported by the finding that captopril was not able to inhibit the superoxide anion-mediated reduction of nitroblue tetrazolium. © 1991 Academic Press, Inc.

Captopril (CAP)<sup>3</sup> is an orally active compound that was specifically designed to bind to the active site of angiotensin-converting enzyme (1). One of the most important characteristics of CAP, which forms the basis of its high affinity for angiotensin-converting enzyme (ACE), is the presence of a sulfhydryl group that complexes the zinc ion of the enzyme. The competitive inhibition of ACE by CAP resulted in a reduction of hypertension (2). More recently, CAP has been found to provide protection against reperfusion-induced arrhythmias (3-5). However, this last property is not shared by other ACE inhibitors

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed at Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez, Juan Badiano No. 1 México, D.F. 14080, México. Fax: (525) 573-0926.

<sup>2</sup> COFFA fellow, IPN.

<sup>3</sup> Abbreviations used: CAP, captopril; ACE, angiotensin-converting enzyme; phhy, phenylhydrazine; PBN,  $\alpha$ -phenyl-*N*-*t*-butyl nitron; DETAPAC, diethylenetriaminepentaacetic acid; NBTZ, nitroblue tetrazolium.

such as enalaprilat or teprotide (4, 5), which lack the active thiol, indicating that this process is independent of an action on ACE. Recent studies have provided evidence that postischemic myocardial dysfunction is mediated, at least in part, by the generation of free radicals derived from oxygen (6-13). In this regard, CAP and other thiol-containing drugs such as penicillamine, SQ 14,534, *N*-acetylcysteine, and *N*-(2-mercaptopropionyl)-glycine were found, by chemical means, to inhibit reactions mediated by the superoxide anion or other reactive oxygen species (5, 12, 14-16). Thus, it was proposed that their beneficial effects could be related to an ability to scavenge free radicals (5, 10, 12, 14-16).

The experiments described in the present study were conducted to gain further insight into the mechanism by which CAP inhibits reactions mediated by the superoxide anion.

### MATERIALS AND METHODS

**Materials.** All reagents were of the highest quality commercially available. The hydrochloride salt of phenylhydrazine (phhy) was obtained from Eastman Chemicals and was recrystallized twice from ethanol. Captopril was a kind gift of Dr. Diego González of E. R. Squibb and Sons de México S.A. de C.V. The spin trap  $\alpha$ -phenyl-*N*-*t*-butyl nitron (PBN), diethylenetriaminepentaacetic acid (DETAPAC), superoxide dismutase from bovine erythrocytes, and bovine hemoglobin were supplied by Sigma Chemical Co. Oxyhemoglobin was prepared, immediately prior to use, as in (17). Briefly, hemoglobin was reduced with dithionite, flushed with oxygen, and then purified on a Sephadex G-25M gel filtration chromatograph. The concentration of oxyhemoglobin was estimated on the basis of a molar extinction of  $15.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  at 540 nm (18). At the concentrations utilized in this study, CAP did not induce any change in the oxyhemoglobin spectrum.

**Oxidation of phenylhydrazine.** The aerobic autoxidation of phenylhydrazine was initiated by  $\text{Cu}^{2+}$  or by oxyhemoglobin (18, 19). Reaction media contained 3 mM PBN, 1 mM phhy, 10  $\mu\text{M}$   $\text{CuCl}_2$  or 10.4  $\mu\text{M}$  oxyhemoglobin in 25 mM sodium borate/sodium hydroxide buffer at pH 10.2, final volume 1 ml. The borate buffer was passed through a Chelex-100 column. The phenyl radical spin adducts produced in these reactions

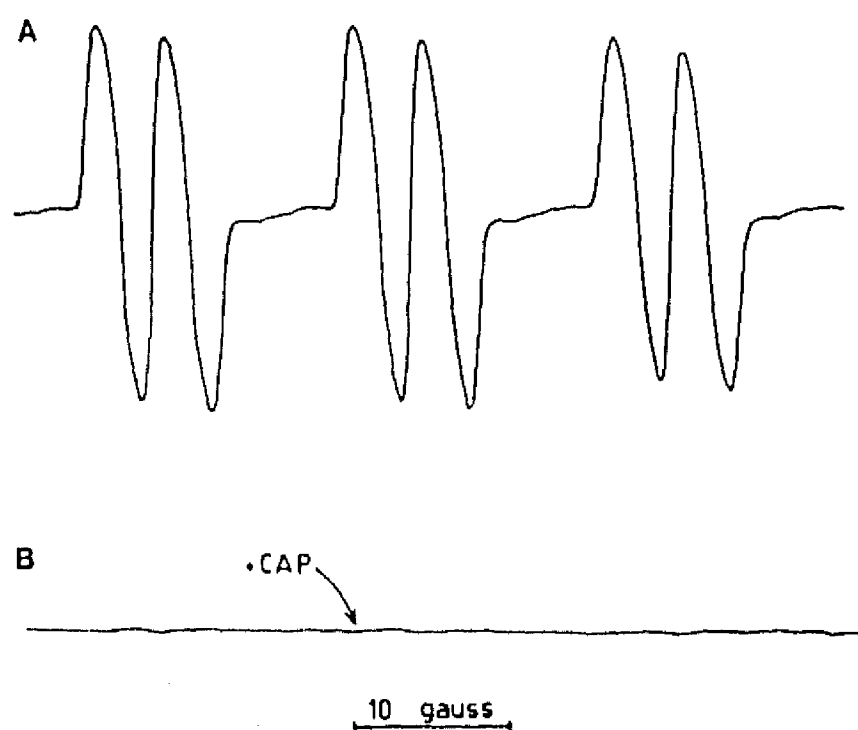


FIG. 1. Effect of captopril on the ESR signal of the phenyl radical spin adduct generated during the copper-initiated autoxidation of phenylhydrazine. The reaction mixtures contained: (A) 3 mM PBN, 1 mM phhy, 10  $\mu\text{M}$   $\text{CuCl}_2$  in 25 mM sodium borate/sodium hydroxide buffer at pH 10.2; final volume 1 ml. In (B) 50  $\mu\text{M}$  captopril was also added. Incubation conditions are indicated under Materials and Methods. The instrumental details were: field set 3339 G, field scan 100 G, modulation frequency 100 kHz, modulation amplitude 0.63 G, receiver gain  $2 \times 10^3$ , time constant 0.250 s, scan time 240 s, microwave frequency 9.4265, microwave power 10 mW.

were monitored 4 min after the start of each experiment. The temperature was 20°C.

**Spin trapping.** The ESR spectra of the nitroxide spin adducts were recorded using an X-band Varian E 112 with a Varian microwave rectangular cavity TE 102.

**Aerobic reduction of nitroblue tetrazolium.** The reaction mixtures contained, in a total volume of 2.0 ml, 25 mM Tris-HCl, pH 8.3, 108  $\mu\text{M}$  nitroblue tetrazolium (NBTZ), and 200  $\mu\text{M}$  NADH. The reaction was initiated by adding 32  $\mu\text{M}$  phenazine methosulfate and production of formazan was followed at 560 nm at 20°C (20). We checked that CAP, without NADH added, did not reduce NBTZ in the presence or absence of phenazine methosulfate. Neither was there observed any reduction of NBTZ by NADH in the absence of phenazine methosulfate.

**Light absorption spectra.** Difference spectra were recorded using an UV-Vis Aminco spectrophotometer.

## RESULTS

The autoxidation of phhy in buffered aqueous solutions is a complex process involving several intermediates (18). Hill and Thornalley (17, 19, 21) demonstrated that, in the presence of a spin trap, the reaction produced nitroxide spin adducts derived from phenyl radicals, providing a way to follow the reaction by means of ESR spectroscopy.

This reaction can be initiated by metal cations, such as  $\text{Cu}^{2+}$ , in which case chelating agents act as inhibitors (18). Figure 1A shows the ESR spectra generated when the reaction was started by 10  $\mu\text{M}$   $\text{CuCl}_2$ . The spin adduct

is characterized by the ESR parameters  $g = 2.0054$ ,  $a_N = 16.2$  G, and  $a_H = 4.3$  G, which are identical to those reported for the phenyl spin adduct of PBN (17). In the absence of  $\text{Cu}^{2+}$  or in the presence of  $\text{Cu}^{2+}$  without phhy, no ESR signal was observed.

When the reaction was started in the presence of 50  $\mu\text{M}$  CAP, the ESR signal was completely abolished (Fig. 1B). This effect of CAP cannot be ascribed to a modification of PBN for several reasons: (a) PBN was in great excess over CAP, (b) PBN in the presence of CAP alone did not give rise to any ESR signal, (c) the addition of CAP, after the signal of the phenyl adduct of PBN was formed, had no effect on it, and (d) the phenyl radical spin adduct of PBN could be formed under other conditions even in the presence of CAP (see below).

Since the intensities of the ESR peaks observed are directly proportional to the free radical concentration, the height of the third line of each spectrum was taken to evaluate the effect of increasing concentrations of CAP on the free radical production. Figure 2 (●) shows that CAP suppressed the formation of the spin adduct in a dose-dependent manner. The concentrations of CAP required to inhibit the reaction ( $\text{IC}_{50} \approx 30$   $\mu\text{M}$ ) were similar to those required to inhibit other reactions mediated by the superoxide anion (5, 15, 16).

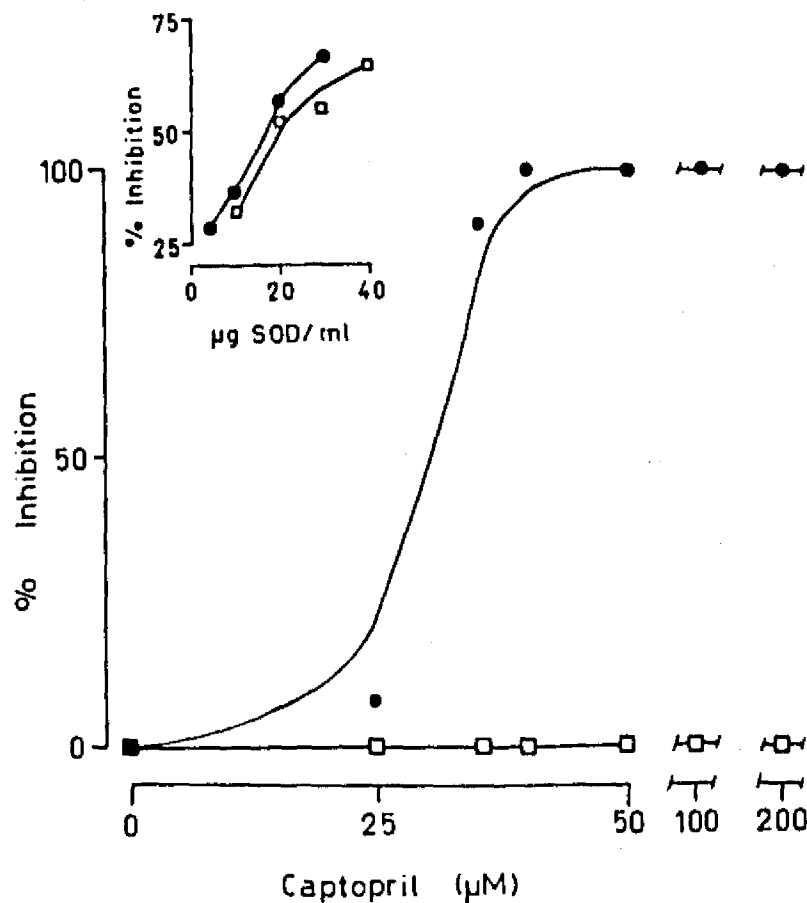


FIG. 2. Effect of increasing concentrations of captopril on the copper or oxyhemoglobin-initiated autoxidation of phenylhydrazine. The aerobic autoxidation of phenylhydrazine was initiated by 10  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  (●) or by 10.4  $\mu\text{M}$  oxyhemoglobin (□) in a medium similar to that described in the legend to Fig. 1. Incubation conditions are detailed under Materials and Methods. The effect of increasing concentrations of captopril or SOD (inset) is shown.

The inhibition of the reaction by superoxide dismutase (SOD) (Fig. 2, inset, ●) showed the generation of  $O_2^-$  in our system as it has been demonstrated by kinetic studies (18, 22, 23). Since the reaction can also be prevented by chelating ligands (18) (we observed 96% inhibition in the presence of 1 mM DETAPAC), CAP could have acted by means of either mechanism, to scavenge any of the radicals which are intermediates in the autoxidation of phenylhydrazine or by forming an inactive complex with the catalytic metal.

In order to clarify this point the reaction was initiated with oxyhemoglobin. It has been reported that oxyhemoglobin can also initiate the autoxidation of phhy (18); in this case chelating agents do not interfere (we did not observe any modification of the ESR signal by 1 mM DETAPAC). Experiments identical to those described above with the exception that oxyhemoglobin replaced  $Cu^{2+}$  give rise to the same PBN adduct, trapped in approximately the same yield. Figure 2 (□) shows that under these conditions CAP (25–200  $\mu M$ ) did not have any effect on the ESR signal, yet the reaction could be inhibited by SOD (Fig. 2 inset, □). In the presence of 50  $\mu M$  CAP, 40  $\mu g$  SOD/ml equally prevented the reaction (65% inhibition) (data not shown). All these results suggest that CAP could inhibit the formation of phenyl radicals by a direct interaction with the catalytic metal ions present and not by scavenging the free radicals that propagate the reaction.

Considering the above conclusion, we predicted that CAP would not be able to inhibit other superoxide-mediated reactions in which metal ions were not required as catalytic agents.

It has been reported that a mixture of NADH and phenazine methosulfate induces reduction of NBTZ in a superoxide-mediated manner which is inhibitable by SOD (20). Figure 3 (●) shows the effect of increasing concentrations of SOD (0.1–0.5  $\mu g/ml$ ) on the rate of formazan production. At the same time, Fig. 3 (□) shows that CAP (10–200  $\mu M$ ) had no effect on the reaction; a similar result was observed after adding 1 mM DETAPAC. In the presence of 100  $\mu M$  CAP, 1  $\mu g$  SOD/ml almost completely inhibited the reaction (data not shown).

Finally, Fig. 4 shows the difference spectra, obtained at the pH values of 7.4 and 10.2, of captopril, copper, and captopril–copper complex. It is evident from these data that the interaction of CAP with copper produces a complex with spectral characteristics fairly different from those of CAP or copper alone. This constitutes direct evidence for the interaction of both reagents. Using dithiobis(2-nitrobenzoic acid) to determine the initial rate of loss of –SH groups in the presence of different concentrations of copper (12, 24), the value of the dissociation constant ( $K_D$ ; pH 7.0 and 25°C) of this complex was estimated to be 3.0  $\mu M$ .

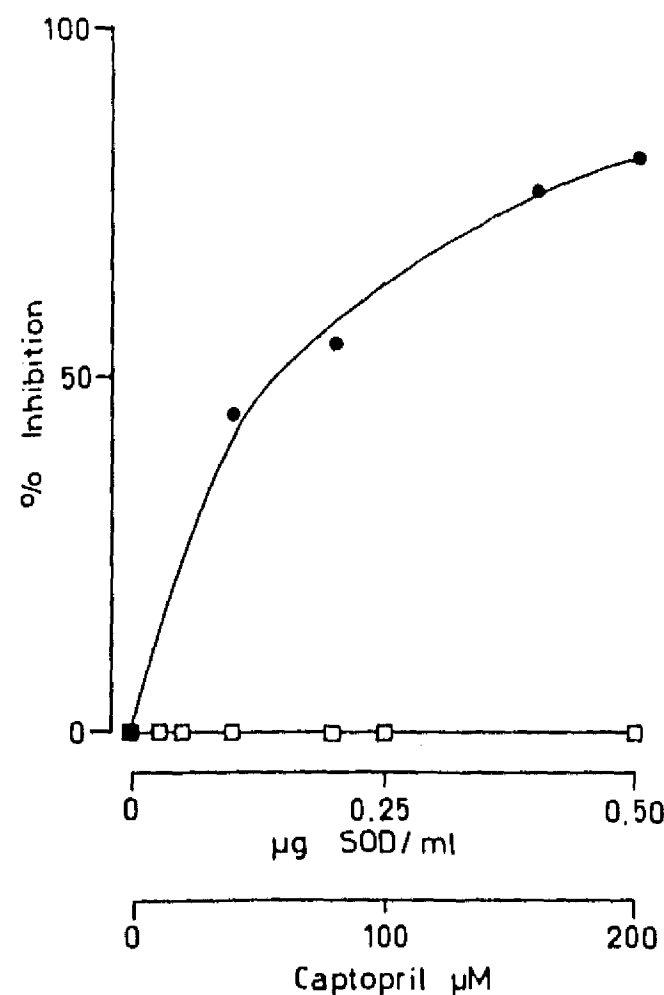


FIG. 3. Effect of captopril and SOD on reduction of nitroblue tetrazolium by  $O_2^-$ . Assays were carried out as described under Materials and Methods. Where indicated, increasing concentrations of SOD (●) or captopril (□) were added.

## DISCUSSION

There is a growing interest in the use of antioxidant drugs inasmuch as numerous studies have provided evidence that free radicals might be involved in various human disease processes (25). Many substances have been proposed to act as antioxidants *in vitro* and *in vivo*. However, not all of these compounds have been definitively proven to support antioxidant activity against the biologically relevant reactive oxygen species (26).

In this regard, Cuperus *et al.* (14) found that antiarthritic drugs containing thiol groups scavenged hypochlorite produced by myeloperoxidase. Likewise, Bagchi *et al.* (15) found CAP to be a potent free radical scavenger of superoxide anion, hydroxyl radical, and hypochlorite. Similar results were obtained by Mak *et al.* (16) utilizing sulfhydryl-containing ACE inhibitors. In addition, Westlin and Mullane (5) reported that CAP and other thiol-containing drugs scavenged superoxide anions generated by different methods.

In accordance with these data our *in vitro* analysis showed that CAP, at concentrations similar to those utilized in other works (5, 12, 16), suppressed the superoxide anion-mediated production of phenyl spin adducts when the autoxidation of phhy was initiated by  $Cu^{2+}$ . However, it seems much more likely that this interference of CAP was not by scavenging, but by acting on the transition

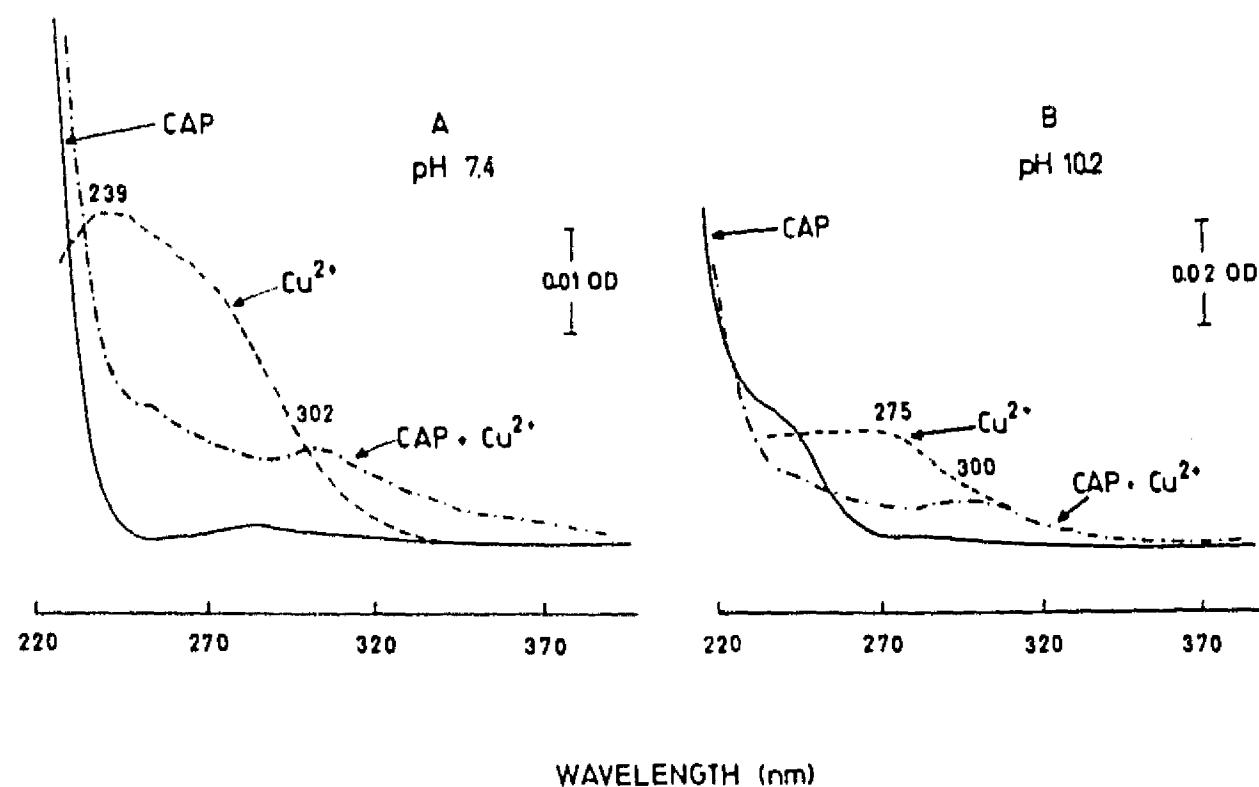


FIG. 4. Difference spectra of captopril, copper, and captopril-copper complex at pH 7.4 and pH 10.2. Spectra were recorded in 25 mM Tris-HCl buffer at pH 7.4 (A) or in 25 mM sodium borate/sodium hydroxide buffer at pH 10.2 (B); final volume, 2.5 ml. Where indicated, buffer was added to the sample and reference cuvettes and the baselines were obtained, then 10  $\mu$ M CAP (—) or 10  $\mu$ M  $\text{CuCl}_2$  (---) was added to the sample cuvette and the difference spectra were recorded. (- · - ·) Baselines were obtained with a buffer solution containing 10  $\mu$ M copper, and then 10  $\mu$ M CAP was added to the sample cuvette and the difference spectra were recorded.

metal ions needed for free radical formation. Indeed, CAP had no effect on free radical production when metal ions were not needed for the reaction (Figs. 2,  $\square$  and 3,  $\square$ ). This lack of an inhibitory effect of CAP, found by us and in contrast to that reported in the literature, could be rationalized by considering that, in many of the systems studied, traces of transition metals present were needed to initiate the reactions.

Here it is worthwhile to mention that thiols can react with  $\text{O}_2^-$ , but the rate constants for these reactions are low, usually  $<10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (12, 26-28). Thus very high thiol concentrations, in the millimolar range, would be required to achieve significant scavenging.

An implication of these results can be seen in relation to the protective effect of CAP found in the reperfusion-induced myocardial injury (3-5) since, as mentioned above, many studies have provided evidence that the postischemic dysfunction is caused by free radicals derived from  $\text{O}_2$ . Although the molecular sources of these radicals remain to be fully established (29), it has been proposed that transition metal ions, as iron and copper, could play a relevant role in the oxidative damage (10, 30-32). Thus, it is possible that CAP could exert a beneficial action at this point by preventing a metal-catalyzed (33) generation of active oxygen species.

In conclusion, the present results do not provide evidence for a reaction of CAP with  $\text{O}_2^-$  radicals. In contrast, our *in vitro* analysis strongly suggests that an interaction of CAP with the metal ions present is the central mechanism whereby CAP interfered with the superoxide-me-

diated process studied. This mechanism could be of biological relevance.

#### ACKNOWLEDGMENT

We thank Dr. E. Chávez for discussions, suggestions, and encouragement.

#### REFERENCES

1. Cushman, D. W., Cheung, H. S., Sabo, E. F., and Ondetti, M. A. (1981) in *Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors* (Horovitz, Z. P., Ed.), pp. 3-25, Urban & Schwarzenberg, Baltimore/Munich.
2. Rubin, B., Antonaccio, M. J., and Horovitz, Z. P. (1981) in *Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors* (Horovitz, Z. P., Ed.), pp. 27-53, Urban & Schwarzenberg, Baltimore/Munich.
3. Ertl, G., Kloner, R. A., Alexander, W., Braunwald, E. (1982) *Circulation* **65**, 40-47.
4. Van Gilst, W. H., DeGraeff, P. A., Wesseling, H., DeLangen, C. D. J. (1986) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **8**, 722-728.
5. Westlin, W., and Mullane, K. (1988) *Circulation* **77**, 130-139.
6. Zweier, J. L., Flaherty, J. T., and Weisfeldt, M. L. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 1404-1407.
7. Garlick, P. B., Davies, M. J., Hearse, D. J., and Slater, T. F. (1987) *Circ. Res.* **61**, 757-760.
8. Arroyo, C. M., Kramer, J. H., Dickens, B. F., and Weglicki, W. B. (1987) *FEBS Lett.* **221**, 101-104.
9. Bolli, R., and Facc, M. D. (1988) *JACC* **12**, 239-249.
10. Mullane, K. M. (1989) in *New Frontiers in Cardiovascular Therapy: Focus on Angiotensin Converting Enzyme Inhibition* (Sonnenblick, E. H., Laragh, J. H., and Lesch, M., Eds.), pp. 235-270, Excerpta Medica, New York.
11. Pietri, S., Culcasi, M., and Cozzone, P. J. (1989) *Eur. J. Biochem.* **186**, 163-173.

## **Inhibition of Membrane-Bound Succinate Dehydrogenase By Disulfiram**

David Jay<sup>1</sup>

*Received April 4, 1990; revised June 15, 1990*

### **Abstract**

The effect of disulfiram on succinate oxidase and succinate dehydrogenase activities of beef heart submitochondrial particles was studied. Results show that disulfiram inhibits both functions. Succinate and malonate suppress the inhibitory action of disulfiram when succinate dehydrogenase is stabilized in an active conformation. Disulfiram is not able to inhibit the enzyme when succinate dehydrogenase is inactivated by oxaloacetate. The inhibitory effect of disulfiram is reverted by the addition of dithiothreitol. From these results, it is proposed that disulfiram inhibits the utilization of succinate by a direct modification of an -SH group located in the catalytically active site of succinate dehydrogenase.

**Key Words:** Disulfiram; antabuse; heart mitochondria; submitochondrial particles; succinate dehydrogenase; sulfhydryl groups.

### **Introduction**

Disulfiram is an orally active compound that has long been used in the treatment of alcoholism. Since the introduction of disulfiram (Dis) in the management of the alcoholic illness, many *in vivo* and *in vitro* studies have been carried out with the intention of clarifying the mechanism of the disulfiram-ethanol reaction. In this regard, evidence has been provided which indicates that the drug interferes with many important enzyme systems such as liver aldehyde dehydrogenase (Graham, 1951), xanthine oxidase (Richert *et al.*, 1950), and dopamine- $\beta$ -hydroxylase (Goldstein *et al.*, 1964). Disulfiram also inhibits NAD<sup>+</sup>-dependent mitochondrial oxygen consumption and oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria (Hassinen, 1966). It has been proposed that the inhibitory action of Dis is related to its ability

<sup>1</sup>Departamento de bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez, Juan Badiano No. 1 Mexico, D.F. 14080, Mexico.



to react with the sulfhydryl groups of proteins to form mixed disulfides (Eneanya *et al.*, 1981; Kelner and Alexander, 1986).

Recently, studies in our laboratory have shown that Dis interferes directly with the elements that establish the mitochondrial calcium balance (Chávez *et al.*, 1989). In order to further characterize the effect of disulfiram on the mitochondrial homeostasis, we studied the influence of the drug on the activities of succinate oxidase and succinate dehydrogenase. The results are discussed in terms of the participation of an -SH group, located in the active site of SDH, in the binding of the inhibitor disulfiram.

### Materials and Methods

Mitochondria from bovine heart were prepared by the polytron technique as reported before (Jurkovitz *et al.*, 1974). Bovine-heart mitochondria were used for the preparation of submitochondrial particles (ETP<sub>II</sub>) as indicated by Lee and Ernster (1966). As obtained, membrane-bound SDH contained tightly bound oxaloacetate which inactivates the enzyme (Wojtczak, *et al.*, 1969). In order to remove oxaloacetate from the enzyme, the precipitated particles were suspended in a solution containing 200 mM sucrose, 5 mM malonate-Tris (pH 7.3), and 25 mM Hepes, pH 7.3 (5 mg protein per ml). The mixture was incubated for 1 h at 30°C, cooled on ice, and centrifuged. Then, in order to achieve complete removal of malonate, which is a powerful competitive inhibitor of the enzyme, the ETP<sub>II</sub> were washed twice in 200 mM sucrose, 25 mM HEPES (pH 7.3) and 500 mM NaBr. Finally the ETP<sub>II</sub> were washed with the same buffer without NaBr, since the anion (Br<sup>-</sup>) itself is inhibitory at high concentrations (Ackrell *et al.*, 1978). The level of activity reached by the malonate-activated ETP<sub>II</sub> was not modified by a subsequent incubation with succinate, indicating that the enzyme was fully activated without any bound oxaloacetate (Kearney, 1957; Kearney *et al.*, 1974). Also, the catalytic activity (phenazine methosulfate) measured at 3°C did not show a lag period, indicating that the preparation did not contain malonate (Coles and Singer, 1977).

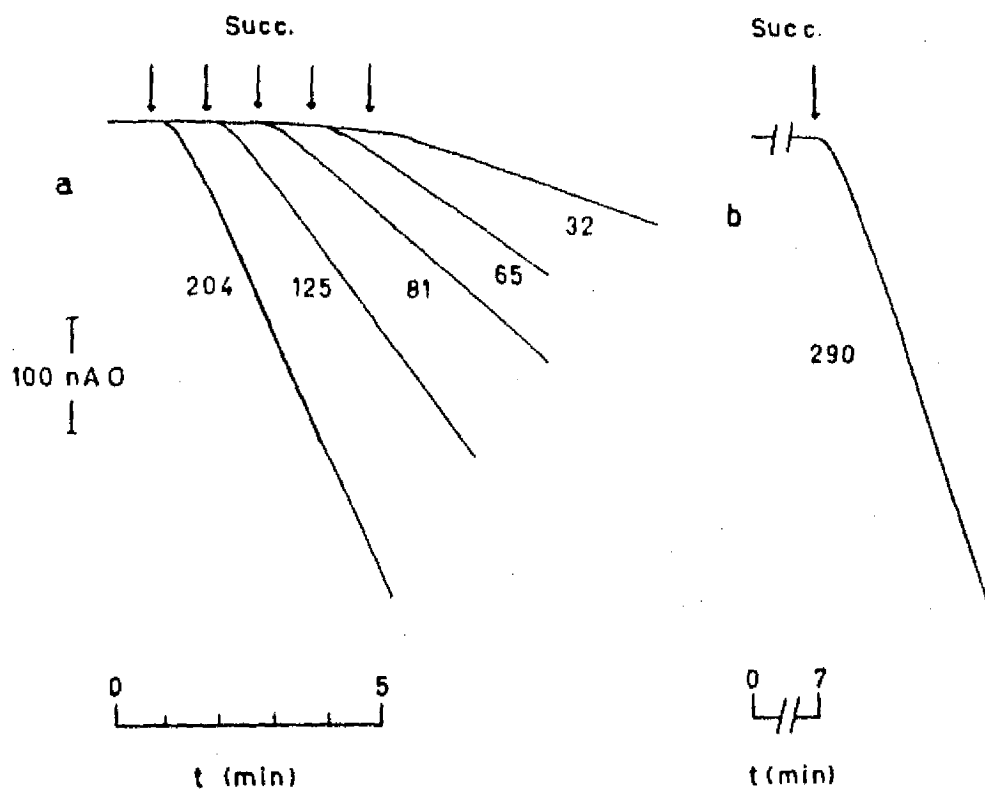
Analysis of the respiratory rate was carried out polarographically with a Clark-type electrode in a medium containing 200 mM sucrose/25 mM Tris-HCl (pH 7.35). Succinate dehydrogenase activity was measured spectrophotometrically (Mowery *et al.*, 1977) at 25°C in a mixture comprising 200 mM sucrose, 25 mM Tris-HCl (pH 7.35), 5 mM succinate (or the amount needed to complete this concentration in the case of medium already having succinate), 1 mM NaCN, 50 μM dichloroindophenol (DCIP), and 1.4 mM phenazine methosulfate (PMS). The reaction was started by the addition of an appropriate amount (41.7 μg/ml) of the ETP<sub>II</sub>

preparation. Protein was determined according to the method of Lowry *et al.* (1951).

### Results

As demonstrated by the experiment in Fig. 1a, the incubation of ETP<sub>II</sub> with 60  $\mu$ M disulfiram in sucrose medium at pH 7.35 resulted in a time-dependent loss of succinate oxidase activity. This inhibition could be the consequence of the binding of disulfiram at multiple sites of the respiratory chain. In order to evaluate a direct interaction between disulfiram and SDH, the effect of the incubation of ETP<sub>II</sub> with disulfiram on the SDH activity was measured. As observed in Fig. 2, increasing concentrations of disulfiram (10–100  $\mu$ M) added to the ETP<sub>II</sub> incubation mixture induce a progressive increment on the rate of inactivation of SDH activity.

The inactivation of membrane-bound SDH by disulfiram does not directly imply that a specific residue is being modified nor that such residue



**Fig. 1.** Effect of disulfiram on the aerobic oxidation of succinate. (a) Protein (0.5 mg) from ETP<sub>II</sub> was preincubated for different times in a medium (final volume 2 ml) as described in Materials and Methods, which also contained 60  $\mu$ M disulfiram. After the preincubation, 5 mM succinate-Tris, pH 7.35 ( $\downarrow$ ), was added to the mixture in order to determine the remaining rate of oxygen consumption. The activity without added disulfiram was constant during the experiment. (b) The respiratory rate of the control, after preincubation for 7 min in the same medium without added disulfiram, is shown. The numbers indicate the number of atoms of oxygen consumed per minute per milligram of protein. Temperature 25°C.

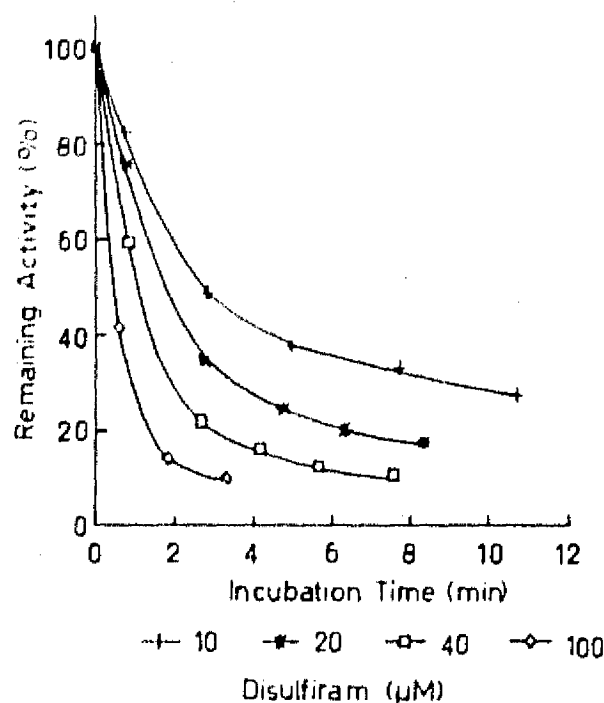


Fig. 2. Inactivation of membrane-bound SDH by disulfiram. Submitochondrial particles (43.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) were incubated in a mixture containing 200 mM sucrose, 25 mM Tris-HCl (pH 7.35), 1 mM NaCN, and the indicated concentrations of disulfiram. At the times indicated on the abscissa, the appropriate amount of the ETP<sub>II</sub> was withdrawn and their succinate dehydrogenase activity was assayed as described in Materials and Methods. The activity without added disulfiram was constant during the experiment (0.75  $\mu\text{M}$  succinate oxidized per min per mg protein).

lies at the catalytically active site. However, protection of an enzyme by substrate or by competitive inhibitor would suggest that the amino acid residues that are protected belong to the active site. Figure 3 shows that increasing concentrations of succinate (50–400  $\mu\text{M}$ ) progressively diminish the rate of enzyme inactivation by disulfiram (50  $\mu\text{M}$ ). Similar results with malonate (2.5–20  $\mu\text{M}$ ) are shown in Fig. 4. Thus, succinate and malonate protect membrane-bound SDH against inhibition by disulfiram.

The experiments described so far were carried out with ETP<sub>II</sub> in which SDH had been previously activated with malonate (see Materials and Methods). However, in mitochondria, succinate dehydrogenase is subjected to a complicated regulatory mechanism (Singer *et al.*, 1973). The enzyme can exist under two forms: an inactive state stabilized by the binding of oxaloacetate and other negative modulators (Wojtezak *et al.*, 1969; Chávez *et al.*, 1986) and an active state stable in the presence of different positive modulators such as succinate or malonate (Kearney, 1957; Kearney *et al.*, 1974; Gutman, 1977).

The question arises whether the inactive form of SDH is also able to readily react with disulfiram to inhibit the enzyme activity. Figure 5 shows that when ETP<sub>II</sub> were incubated for 20 min in the presence of oxaloacetate

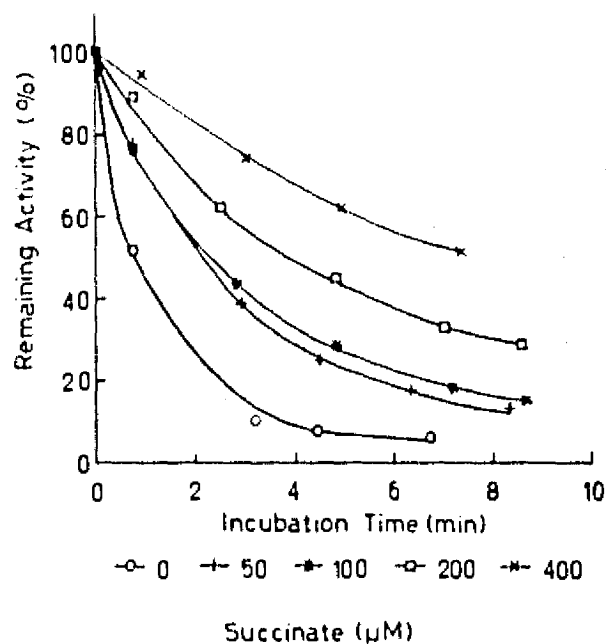


Fig. 3. Effect of succinate on the inactivation of membrane-bound SDH by disulfiram. ETP<sub>II</sub> were modified by disulfiram (50  $\mu$ M) as described in Fig. 2 but in the presence of the indicated concentrations of succinate. In the absence of disulfiram, the enzyme was perfectly stable in the presence or absence of succinate.

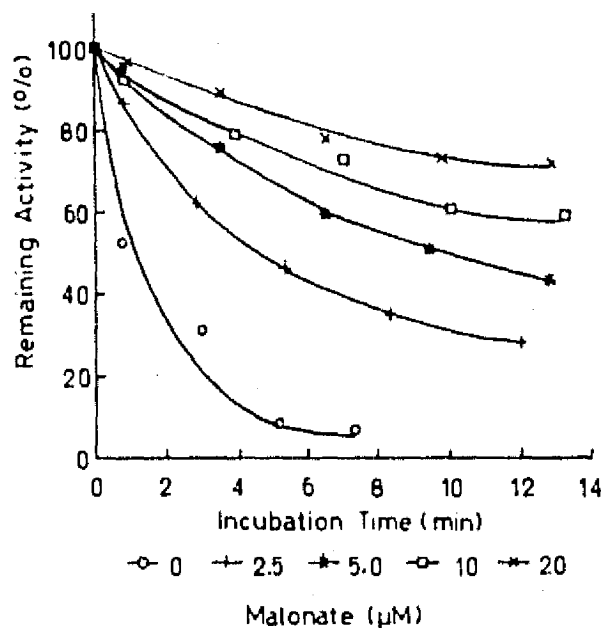


Fig. 4. Effect of malonate on the inactivation of membrane-bound SDH by disulfiram. ETP<sub>II</sub> were modified by disulfiram (50  $\mu$ M) as described in Fig. 2 but in the presence of the indicated concentrations of malonate. In the absence of disulfiram, the enzyme was perfectly stable in the presence or absence of malonate.

and then spun down, the specific activity of the enzyme was very low, indicating that SDH was stabilized under the inactive form (Fig. 5, solid bar, Ox). Under these conditions, reactivation of the enzyme could be achieved by further incubation with succinate (Fig. 5, hatched bar, Ox). When disulfiram was added to oxaloacetate-treated ETP<sub>II</sub> and the suspension was centrifuged,

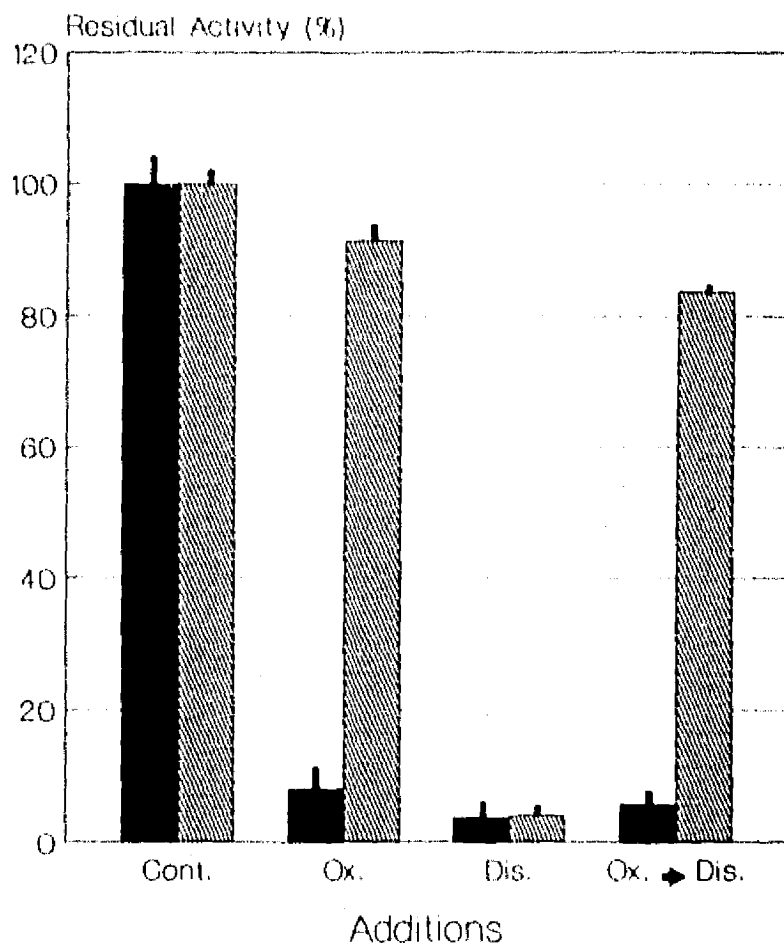


Fig. 5. Comparative inhibition of membrane-bound succinate dehydrogenase by disulfiram measured with activated or deactivated enzyme. Membrane-bound SDH (0.5 mg/ml) was activated with malonate as indicated in Materials and Methods or deactivated by incubation for 20 min with 1.0 mM oxaloacetate (Ox). Then, where indicated, 60  $\mu$ M disulfiram (Dis) was added and the suspensions were allowed to react for 10 min at 25°C. All the samples were cooled on ice, centrifuged, and their activities measured without (solid bars) or with further activation (hatched bars) for 20 min at 25°C in a medium containing 200 mM sucrose, 25 mM Tris-HCl (pH 7.35), 20 mM succinate, and 1 mM NaCN. Values are mean  $\pm$  standard deviation of three experiments.

the recovered activity was also low (Fig. 5, solid bar, Ox  $\rightarrow$  Dis). However, when succinate was added to activate this last preparation, it was observed that the catalytic activity of the reactivated SDH was not inhibited by disulfiram (Fig. 5, hatched bar, Ox  $\rightarrow$  Dis), indicating that the group which is modified by Dis in the active enzyme (Fig. 5, solid bar, Dis and hatched bar, Dis), became unreactive in the oxaloacetate-inactivated SDH.

Since disulfiram binds to protein sulfhydryl groups (Eneanya *et al.*, 1981; Kelner and Alexander, 1986), the ability of the reducing agent dithiothreitol (DTT) to revert the inhibitory action of Dis was tested. Figure 6 (hatched bar, Dis  $\rightarrow$  DTT) shows that the addition of 1 mM DTT restored 76% of the activity in the ETP<sub>H</sub> that had been previously treated with disulfiram.

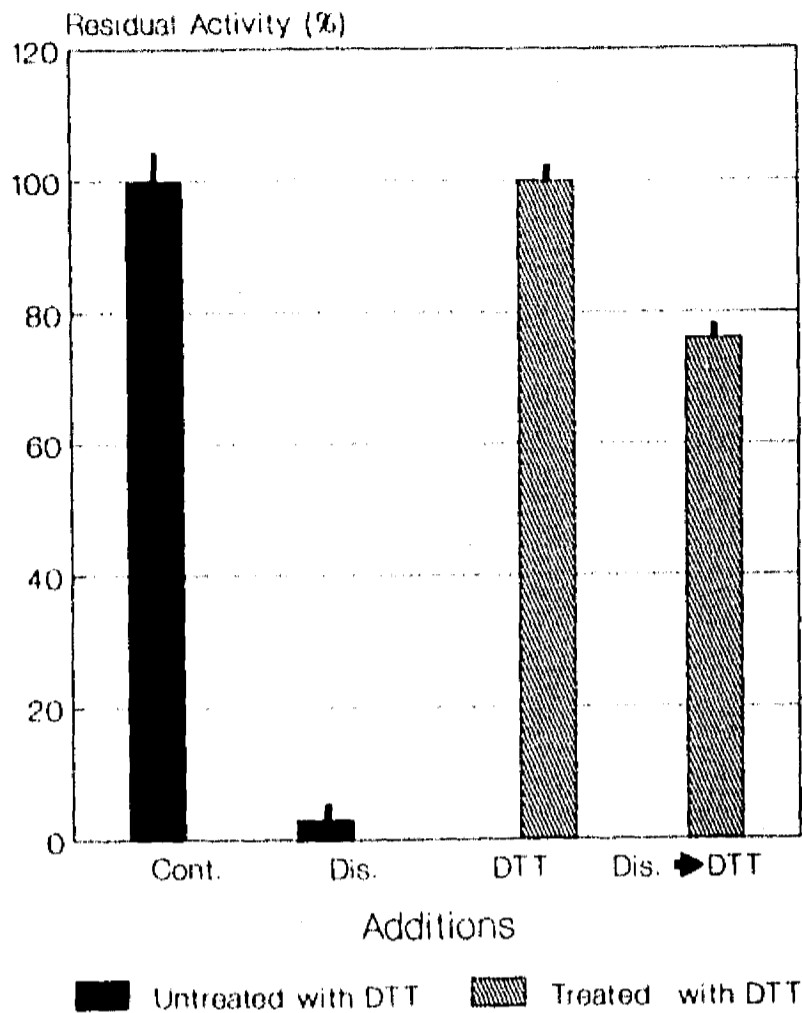


Fig. 6. Reversal by dithiothreitol of disulfiram inhibition of succinate dehydrogenase activity. ETP<sub>H</sub> (0.5 mg/ml) were incubated in 200 mM sucrose and 25 mM Tris-HCl (pH 7.35). Where indicated, membrane-bound SDH was allowed to react for 10 min at 25°C with 60  $\mu$ M disulfiram (Dis). Then, where indicated, 1 mM dithiothreitol was added (DTT) and the reaction allowed to proceed for 4 min more. All the samples were cooled on ice, centrifuged, and their activities measured. Values are mean  $\pm$  standard deviation of four experiments.

### Discussion

The evidence presented in this study shows that disulfiram inhibits the oxidation of succinate by submitochondrial particles. As has been indicated, this inhibitory action of Dis parallels the inhibition of the succinate dehydrogenase activity. In this regard, it was found in an early study by Hassinen (1966) on the effect of disulfiram on mitochondrial oxidations that Dis did not affect the rate of oxygen consumption by submitochondrial particles while utilizing succinate as substrate. Our present results provide an explanation for this apparent discrepancy since, as indicated in Figs. 3 and 4, the presence of ligands of the active site, such as succinate or malonate, in the incubation medium protects the SDH enzyme against the inhibitory action of disulfiram.

The protective effect of succinate and malonate cannot be ascribed to an activation of the enzyme since the above experiments were carried out with fully activated membrane-bound SDH. The results rather suggest that the inhibition of the activated SDH by Dis is the consequence of the modification of a group located in the catalytically active site.

Concerning the nature of the group modified by Dis, it has been reported that disulfiram can react with the protein -SH groups yielding mixed disulfides (Eneanya *et al.*, 1981; Kelner and Alexander, 1986). The finding that dithiothreitol reverts the inhibition induced by Dis strongly suggests that the binding site of the drug is a sulfhydryl group. For succinate dehydrogenase, there is well-documented proof for the presence, in the active site, of an -SH group essential for activity which becomes reactive when the enzyme is stabilized in the active conformation (Kenney, 1975; Vinogradov *et al.*, 1976; Kotlyar and Vinogradov, 1984). Ligands of the active site of SDH prevent the reaction of the -SH group with sulfhydryl-binding reagents, so that it is possible that the active-site -SH group is modified when disulfiram inhibits SDH activity. Supporting this proposal is the fact that the essential -SH group of SDH is not reactive when the enzyme is inactivated by oxaloacetate (Lê-Quôc *et al.*, 1981; Gutman, 1978; Kenney, 1975; Vinogradov *et al.*, 1976; Kotlyar and Vinogradov, 1984). In this regard, it has been suggested that oxaloacetate reacts with the active-site cysteinyl residue via a thiohemiacetal formation (Vinogradov *et al.*, 1971, 1972).

The present results produce better understanding as to the action of disulfiram on the respiratory chain. In addition, they prove the usefulness of Dis as a tool for the study of the active site of SDH. On the other hand, it has to be considered that the inhibition of the Krebs cycle by disulfiram, at the level of SDH, may be one of the important factors contributing to the manifestation of the disulfiram-ethanol reaction. At this point, one may well inquire whether disulfiram can inhibit SDH under all metabolic situations. The data presented here indicate that Dis inhibits the utilization of succinate only when SDH is present in an active conformation. In mitochondria a number of normal constituents (succinate, reduced CoQ<sub>10</sub>, ATP) act as positive modulators of succinate dehydrogenase (Singer *et al.*, 1973). It is at once evident that just when the physiological conditions of the cell permit accumulation of these mitochondrial metabolites, SDH would be vulnerable to disulfiram. In this regard, it is noteworthy that full activation of the enzyme is achieved under conditions of reversed electron flow (Gutman *et al.*, 1971) in which succinate dehydrogenase plays a basic role. This process has been found to be implicated in fatty acid chain elongation (Whereat *et al.*, 1967), a condition otherwise commonly present in the liver during the early stages of alcoholic intoxication (Feinman and Lieber, 1974).

## References

- Ackrell, A. C. B., Kearney, B. E., and Singer, T. P. (1978). *Methods Enzymol.* **53**, 466-483.
- Chávez, E., Bravo, C., and Jay, D. (1986). *J. Bioenerg. Biomembr.* **18**, 93-99.
- Chávez, E., Zazueta, C., and Bravo, C. (1989). *J. Bioenerg. Biomembr.* **21**, 335-345.
- Coles, C. J., and Singer, T. P. (1977). *FEBS Lett.* **82**, 267-268.
- Eneanya, D. I., Bianchine, J. R., Duran, D. O., and Andersen, B. D. (1981). *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **21**, 575-596.
- Feinman, L., and Lieber, C. S. (1974). Liver disease in alcoholism. In *The Biology of Alcoholism*. Vol. 3, *Clinical Pathology*. (Kissin, B., and Begleiter, H., eds.), Plenum Press, New York, pp. 303-338.
- Goldstein, M., Mussacchio, J., Kopin, I., and Axelrod, J. (1964). *Life Sci.* **3**, 763-767.
- Graham, W. D. (1951). *J. Pharm. Pharmacol.* **3**, 160-164.
- Gutman, M. (1977). *Biochemistry* **16**, 3067-3072.
- Gutman, M. (1978). *Mol. Cell. Biochem.* **20**, 41-60.
- Gutman, M., Kearney, E. B., and Singer, T. P. (1971). *Biochemistry* **10**, 2726-2733.
- Hassinen, I. (1966). *Biochem. Pharmacol.* **15**, 1147-1153.
- Jurkowitz, M., Scott, K. M., Altschuld, R., Merola, A. J., and Brierley, G. P. (1974). *Arch. Biochem. Biophys.* **165**, 98-113.
- Kearney, E. B. (1957). *J. Biol. Chem.* **229**, 363-375.
- Kearney, E. B., Ackrell, B. A. C., Mayer, M., and Singer, T. P. (1974). *J. Biol. Chem.* **249**, 2016-2020.
- Kelner, M. J., and Alexander, N. M. (1986). *J. Biol. Chem.* **261**, 1636-1641.
- Kenney, W. C. (1975). *J. Biol. Chem.* **250**, 3089-3094.
- Kotlyar, A. B., and Vinogradov, A. D. (1984). *Biochim. Biophys. Acta* **784**, 24-34.
- Lee, C. P., and Ernster, L. (1966). In *Symposium on the Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria* (Tage, J. M., Papa, S., Quagliariello, E., and Slater, E. C., eds.), Vol. 7, Elsevier North-Holland, New York, pp. 218-234.
- Le-Quôc, K., Le-Quôc, D., and Gaudemer, Y. (1981). *Biochemistry* **20**, 1705-1710.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. (1951). *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Mowery, P. C., Steckamp, D. J., Ackrell, B. A. C., Singer, T. P., and White, G. A. (1977). *Arch. Biochem. Biophys.* **178**, 495-506.
- Richert, D., Vanderlinde, R., and Westerfeld, W. (1950). *J. Biol. Chem.* **183**, 261-274.
- Singer, T. P., Kearney, B. E., and Kenney, C. W. (1973). *Adv. Enzymol.* **5**, 189-271.
- Vinogradov, A. D., Zimakova, N. I., and Solntseva, T. I. (1971). *Dokl. Akad. Nauk. USSR* **201**, 359-362.
- Vinogradov, A. D., Winter, D. W., and King, T. E. (1972). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **49**, 441-444.
- Vinogradov, A. D., Gavrikova, E. V., and Zuevsky, V. V. (1976). *Eur. J. Biochem.* **63**, 365-371.
- Whereat, A. F., Hull, F. E., Orishimo, M. W., and Rabinowitz, J. (1967). *J. Biol. Chem.* **242**, 4013-4022.
- Wojtczak, L., Wojtczak, A. B., and Ernster, L. (1969). *Biochim. Biophys. Acta* **191**, 10-21.



## **Study of the Interaction of Cadmium with Membrane-Bound Succinate Dehydrogenase**

David Jay,<sup>1,4</sup> Rafael Zamorano,<sup>2</sup> Eduardo Muñoz,<sup>3</sup> Roberto Gleason,<sup>3</sup>  
and José Luis Boldu<sup>3</sup>

*Received July 26, 1990*

### **Abstract**

Cadmium ions inhibit membrane-bound succinate dehydrogenase with a second-order rate constant of  $10.42 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  at pH 7.35 and 25°C. Succinate and malonate protect the enzyme against cadmium ion inhibition. The protection pattern exerted by succinate and malonate suggests that the group modified by cadmium is located at the active site. The pH curve of inactivation by  $\text{Cd}^{2+}$  indicates the involvement of an amino acid residue with pKa of 7.23.

**Key Words:** Mitochondria; phosphorylating electron transport particles; succinate dehydrogenase; heart succinate dehydrogenase; respiratory chain; cadmium; substrate-binding site.

### **Introduction**

It has been known for a long time that succinate dehydrogenase (SDH) (EC 1.3.99.1) is very sensitive to reagents that modify thiol groups (Hopkins and Morgan, 1938; Hopkins *et al.*, 1938). In this regard, evidence has been provided on the presence of a highly reactive sulfhydryl group at the active site of the enzyme (Kenney, 1975; Vinogradov *et al.*, 1976; Kotlyar and Vinogradov, 1984; Phillips *et al.*, 1987; Jay, 1991), which Vinogradov *et al.* (1972) suggested was involved in the tight binding of the inhibitor oxaloacetate. The presence of the sulfhydryl at the active site, however, has been questioned by some authors, based on the finding that the inhibition of the

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez, Mexico.

<sup>2</sup>Departamento de Física, Escuela Superior de Física y Matemáticas, IPN, Mexico.

<sup>3</sup>Instituto de Física, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico.

<sup>4</sup>To whom correspondence should be addressed: Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez, Juan Badiano No. 1, México, D.F. 14080, Mexico.

enzyme by thiol-binding reagents follows complex kinetics (Sanborn *et al.*, 1971; Felberg and Hollocher, 1972; Lê-Quôc *et al.*, 1981).

During the course of experiments involving the effect of  $\text{Cd}^{2+}$  on mitochondrial calcium transport, it was found that succinate dehydrogenase was particularly sensitive to the action of this cation (Chávez *et al.*, 1985). As cadmium is reported to be a thiol reagent (Valle and Ulmer, 1972; Ochiai, 1977), such findings were consistent with the important role that -SH groups play in the enzyme.

In order to gain further insight into the effect of  $\text{Cd}^{2+}$  on succinate dehydrogenase, we studied the kinetics of inhibition of membrane-bound enzyme by cadmium. The results indicate that the binding of the metal at the catalytically active site induces loss of the activity. Inactivation kinetics was used to obtain the  $pK_a$  value for the group modified by cadmium. The possible involvement of an -SH group in the binding of  $\text{Cd}^{2+}$  to the active site is discussed.

### Experimental

Beef heart mitochondria were isolated as reported (Jurkovitz *et al.*, 1974). Submitochondrial particles (ETP<sub>II</sub>) were prepared as indicated by Lee and Ernster (1966). Since this membrane preparation contained a significant amount of tightly bound oxaloacetate, which inactivates SDH (Wojtezak *et al.*, 1969; Singer *et al.*, 1973), the ETP<sub>II</sub> were activated with malonate as previously described (Jay, 1991). Then, in order to achieve complete removal of malonate, the ETP<sub>II</sub> were washed twice in 200 mM sucrose-25 mM Hepes (pH 7.3), and 500 mM NaBr. Finally, the ETP<sub>II</sub> were washed with the same buffer without NaBr, since the anion ( $\text{Br}^-$ ) itself inhibits at high concentrations (Ackrell *et al.*, 1978). The level of activity reached by the malonate-activated ETP<sub>II</sub> was not modified by a subsequent incubation with succinate, indicating that the enzyme was fully activated without any bound oxaloacetate (Kearney, 1957; Ackrell *et al.*, 1974). Also, the catalytic activity measured at 3°C did not show a lag period, indicating that the preparation did not contain malonate (Coles and Singer, 1977).

The inactivation experiments were carried out at 25°C in a standard medium containing 200 mM sucrose, 25 mM Tris (pH 7.35), 1 mM cyanide, 8.5 μM rotenone, and succinate or malonate, at the concentrations indicated in the figures. The reaction was started by the addition of the ETP<sub>II</sub> (42 μg protein/ml) followed by the addition of  $\text{CdCl}_2$ , the concentrations of which are indicated in the legends of the figures. Aliquots from these media were withdrawn at the indicated times and the dehydrogenase activity was measured by adding 5.0 mM succinate (or the amount needed to complete

this concentration in the case of the media already having succinate), 0.064 mM dichloroindophenol (DCIP), and 1.4 mM phenazine methosulfate (PMS) (final volume 3 ml) (Mowery *et al.*, 1977). For the determination of the pH dependence of the rate constant of inhibition, the medium was prepared with a mixture of 10 mM MOPS plus 10 mM Tris at all pH values, in order to avoid the effect of different salts at different pH.

All the kinetic constants were determined by fitting the experimental data, by the least-squares method, to the respective equations. Protein concentration was determined by the method of Lowry *et al.* (1951).

## Results

Incubation of the ETP<sub>II</sub> with cadmium in a sucrose medium at pH 7.35 resulted in a time-dependent loss of succinate dehydrogenase activity. Despite the fact that the amount of Cd<sup>2+</sup> needed to inactivate the enzyme is low, semilog plots of residual enzyme activity versus time yielded straight lines. Thus, it was not necessary to fit the data to a second-order scheme characteristic of a bimolecular process (Tian *et al.*, 1985). Figure 1a shows the data obtained from inactivation experiments at different concentrations

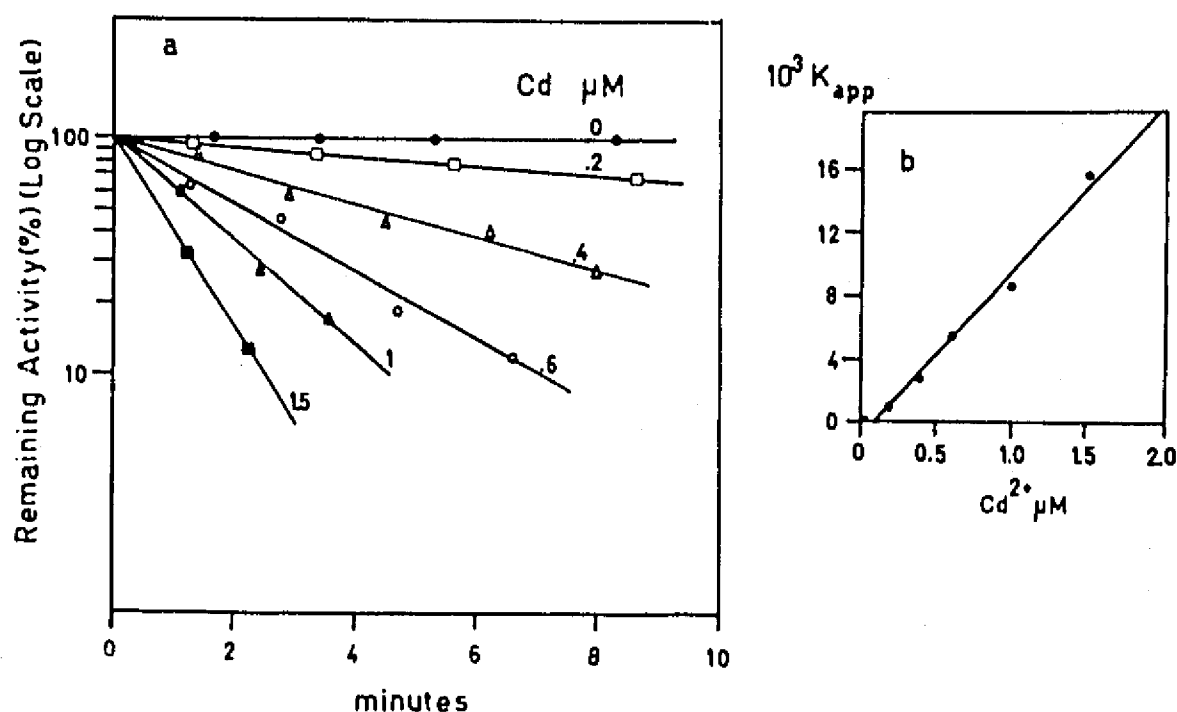


Fig. 1. Inactivation of SDH by cadmium. (a) Semilog plot of percent of remaining activity versus incubation time. Protein (42  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) from ETP<sub>II</sub> was incubated with different concentrations of CdCl<sub>2</sub> in a sucrose medium, pH 7.35, at 25°C. At time intervals, aliquots were removed for measurement of the residual enzyme activity (see Experimental). The numbers on the slopes indicate cadmium concentration ( $\mu\text{M}$ ). (b) Apparent rate constant for inactivation ( $K_{app}$ ) versus cadmium concentration. The  $k_{app}$  was evaluated by multiplying the slopes in (a) by 2.303.

of cadmium. The slopes of these plots were linearly related to the concentration of the reagent (Fig. 1b), suggesting that there is no reversible complex formed prior to the inactivation process (Kitz and Wilson, 1962; Jabalquinto *et al.*, 1983; Mas and Colman, 1983; Dominici *et al.*, 1985). Therefore, the data can be analyzed using a pseudo-first-order scheme for an irreversible inhibitor, where the inactivation velocity is given by

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

where  $[E_t]$  is the concentration of active enzyme at time  $t$  and  $K_{app}$  (apparent pseudo-first-order rate constant) =  $K_1[Cd^{2+}]$ , where  $K_1$  is the second-order rate constant, which can be obtained from the slope of the plot in Fig. 1b ( $k_1 = 10.42 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ).

The inactivation of membrane-bound SDH by  $Cd^{2+}$  does not directly imply that a specific residue is being modified nor that such residue is present at the active site. However, protection of an enzyme by substrate or by a competitive inhibitor would suggest that the amino acid residues that are

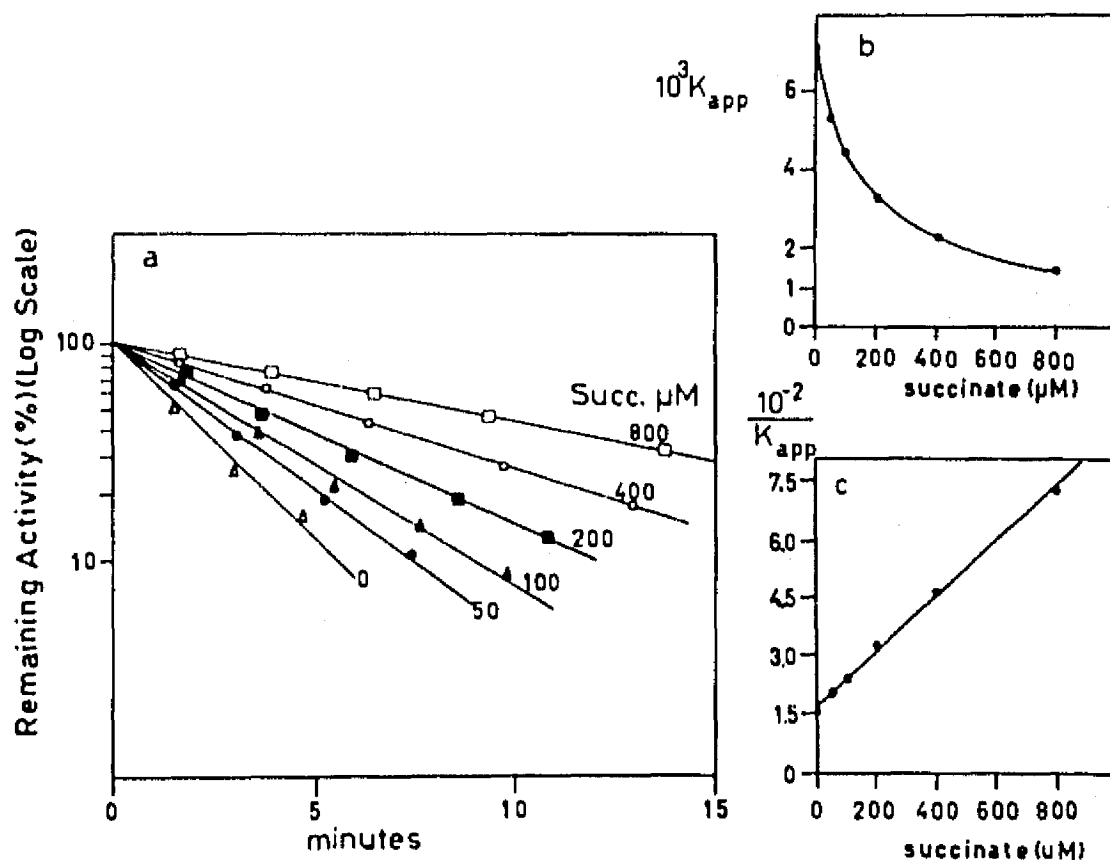


Fig. 2. Effect of succinate on the inactivation of SDH by cadmium. (a) Semilog plot of percent of remaining activity versus incubation time. The incubation conditions were similar to those described in Fig. 1 in the presence of  $1 \mu\text{M } Cd^{2+}$  except for the presence of succinate, the concentrations of which are indicated on the slopes. In the absence of cadmium, the enzyme was perfectly stable in the presence or absence of succinate. (b) Apparent rate constant for inactivation ( $K_{app}$ ) versus succinate concentration. (c) Plot of  $1/K_{app}$  versus succinate concentration.

protected lie at the active site. The observed pseudo-first-order rate constant for the enzyme inactivation in the presence of a ligand of the active site ( $K'_{app}$ ) is given by (Mildvan and Leigh, 1964)

$$(K'_{app}) = \frac{K_1[I] \times K_D}{K_D + A} \quad (2)$$

and in reciprocal form,

$$\frac{1}{K'_{app}} = \frac{1}{[I]K_1} + \frac{A}{[I]K_1K_D} \quad (3)$$

where  $A$  represents either a substrate or a competitive inhibitor of the enzyme,  $K_D$  is its dissociation constant, and the irreversible inhibitor ( $I$ ) will only bind to the free enzyme. Equations (2) and (3) predict a rectangular hyperbola and a straight line when  $1/K'_{app}$  is plotted against the concentration of  $A$ , thus providing a way to know if  $I$  ( $Cd^{2+}$ ) reacts with the EA complex. When Eq. (3) applies,  $K_D$  can be obtained from the extrapolated abscissa intercept of the plot. Figures 2 and 3 show the experiments, with succinate

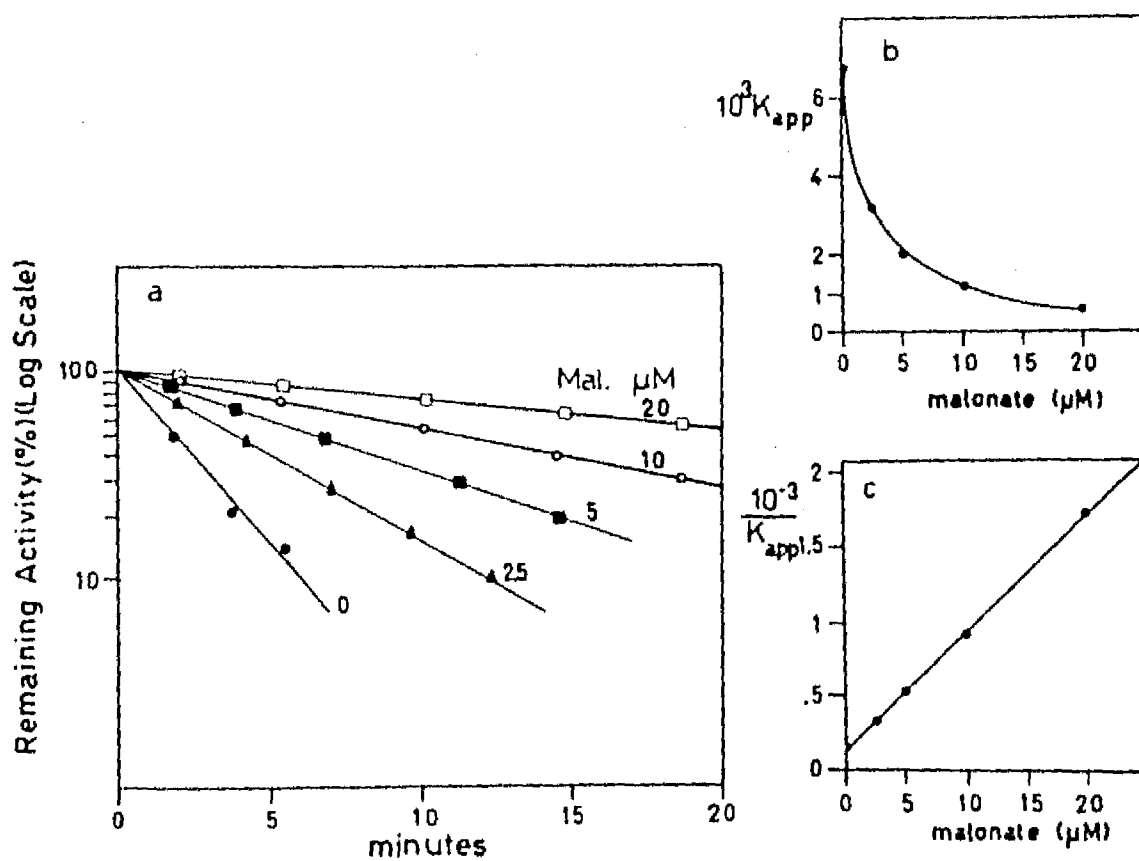


Fig. 3. Effect of malonate on the inactivation of SDH by cadmium. (a) Semilog plot of percent of remaining activity versus incubation time. The incubation conditions were similar to those described in Fig. 1 in the presence of  $1 \mu M Cd^{2+}$  except for the presence of malonate, the concentrations of which are indicated on the slopes. In the absence of cadmium, the enzyme was perfectly stable in the presence or absence of malonate. (b) Apparent rate constant for inactivation ( $K_{app}$ ) versus malonate concentration. (c) Plot of  $1/K_{app}$  versus malonate concentration.

and malonate respectively, carried out under these considerations. Figure 2a shows that increasing concentrations of succinate progressively diminish (initial value  $6.9 \times 10^{-3} \times \text{s}^{-1}$ ) the rate of enzyme inactivation by cadmium. The plot of  $K'_{\text{app}}$  versus [succinate] was hyperbolically descending (Fig. 2b) as predicted by Eq. (2). The plot of  $1/K'_{\text{app}}$  versus [succinate] was linear (Fig. 2c), in accord with Eq. (3). From this plot a  $K_D$  value of  $267 \mu\text{M}$  for succinate was obtained. Similar results, with malonate, are shown in Fig. 3. In this case a  $k_D$  value of  $1.7 \mu\text{M}$  was found. Similar values of  $K_D$  for succinate ( $300 \mu\text{M}$ ) and malonate ( $1.3 \mu\text{M}$ ) have been previously reported (Vinogradov *et al.*, 1976; Kotlyar and Vinogradov, 1984). Thus, succinate and malonate completely protect membrane-bound SDH against inactivation by cadmium.

Information on the residues modified by cadmium was derived from the study of the rate of inactivation as a function of pH. If a cysteine residue is

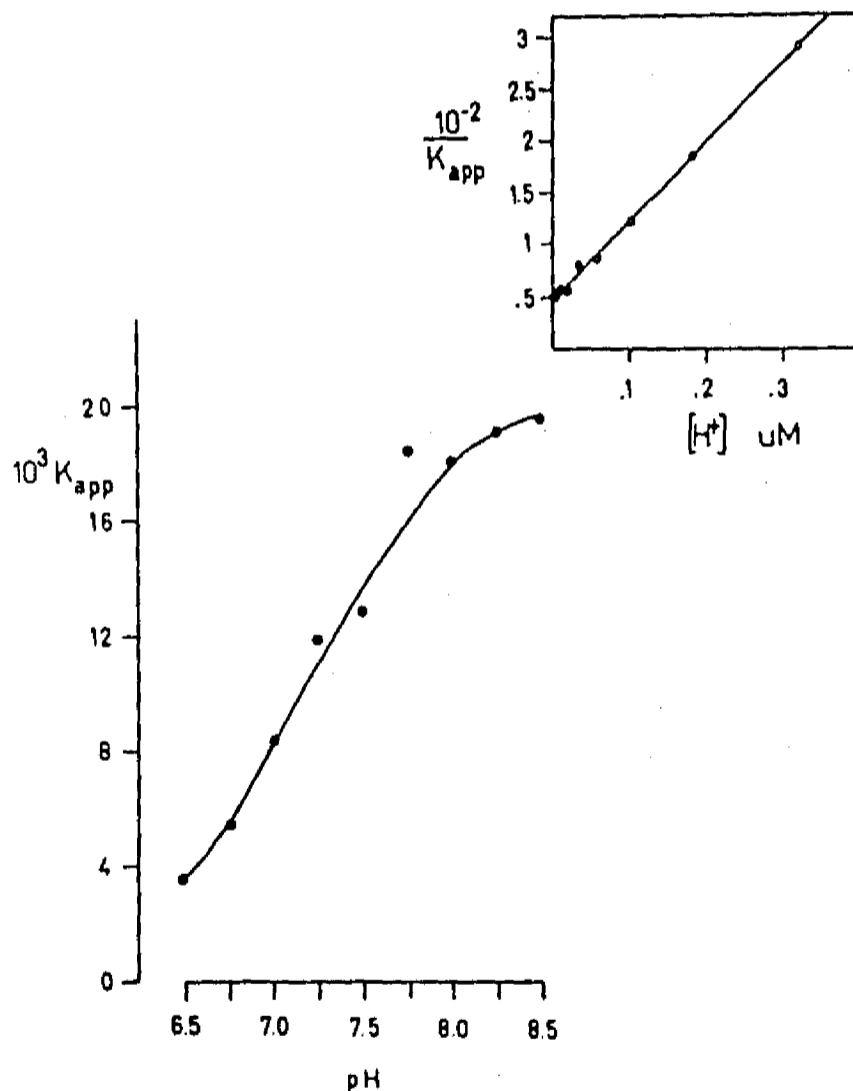


Fig. 4. Inactivation of SDH by cadmium as a function of pH. Apparent rate constant for inactivation ( $K_{\text{app}}$ ) versus pH ( $1 \mu\text{M Cd}^{2+}$ ). In the absence of cadmium, the enzyme was stable during the assay at all the pH tested. Inset: Plot of  $1/K_{\text{app}}$  versus  $[H^+]$ . The incubation conditions are detailed in Experimental.

required for the binding of cadmium, the rate of inactivation of the enzyme will depend on the degree of protonation of the -SH group, provided the unprotonated cysteine is modified at a substantially faster rate than the protonated cysteine. The pseudo-first-order rate constants for inactivation were determined at different pH (Fig. 4) and plotted against  $[H^+]$  (Fig. 4, inset) according to the following equation, which is analogous to Eq. (3):

$$\frac{1}{K_{app}} = \frac{[H^+]}{K_{max} K_a} + \frac{1}{K_{max}} \quad (4)$$

where  $K_{max}$  is the maximal rate constant and  $K_a$  is the ionization constant of the group involved. A plot of  $1/K_{app}$  versus  $[H^+]$  should thus give a straight line and allows the determination of the apparent  $K_a$ . From the data of Fig. 4b, an apparent  $pK_a$  value of the inactivation was found to be 7.23. The fact that there does not occur any appreciable deviation from linearity at any pH suggests that just the unprotonated form of the group involved is modified and that just such a group reacts with cadmium to inactivate the enzyme (Cardemil, 1987).

### Discussion

The evidence presented here indicates that cadmium inhibited succinate dehydrogenase activity with a pseudo-first-order kinetics (Fig. 1). In addition, the experiments, with fully activated membrane-bound preparations, showed that malonate and succinate provide complete and hyperbolic protection against inhibition by cadmium (Figs. 2 and 3). These results suggest that the inhibitory action of  $Cd^{2+}$  was the consequence of the modification of a group located in the region of the catalytically active site of the enzyme. This conclusion is in accord with the proposal that thiol-binding reagents inhibit SDH by a direct interaction with an active-site -SH group (Kenney, 1975; Vinogradov *et al.*, 1976; Kotlyar and Vinogradov, 1984; Jay, 1991). It has been contended (Kenney, 1975; Kotlyar and Vinogradov, 1984) that the finding (Lê-Quôc *et al.*, 1981; Felberg and Hollocher, 1972; Sanborn *et al.*, 1971) of complex kinetics of inhibition by alkylating and mercaptide-forming thiol reagents could be due in part to the presence of a significant amount of oxaloacetate in the incompletely activated preparations utilized.

Another question that arose from the use of  $Cd^{2+}$  was the actual number of groups that bound cadmium to the active site. It is known that cadmium forms stable compounds with dithiols (Rasheed *et al.*, 1984), but it has also been reported that it can form one-ligand complexes analogous to the mercury(I) derivatives (Okada *et al.*, 1964; Mundy, 1965). The linear plot of Fig. 1b suggests a stoichiometry of 1  $Cd^{2+}$ /enzyme. However, if two or more

groups simultaneously react with one molecule of inhibitor, a similar stoichiometry would be obtained. At present, therefore, we lack conclusive evidence regarding the actual number of groups that participate in the binding of cadmium during the inactivation process.

Although it is known that cadmium can react with several amino acids in proteins (Perkins, 1961), the stability constants show that the introduction of sulfur into the ligands leads to much stronger complexes, especially when the -SH group is deprotonated (Valle and Ulmer, 1972; Ochiai, 1977; Percovaro *et al.*, 1984; Sillen, 1964; Smith and Martell, 1974, 1975, 1976). From the data of Fig. 4, a  $pK_a$  value of 7.23 was obtained for the residue modified by cadmium. The  $pK_a$  value for this residue is lower than that for free cysteine. However, it is noteworthy that a similar low  $pK_a$  (7.0) value for the active-site sulfhydryl of SDH has been reported (Vinogradov *et al.*, 1976). The increment in the dissociation constant for this group has been taken as evidence for the involvement of the sulfhydryl in the mechanism of succinate oxidation (Vinogradov *et al.*, 1976; Vinogradov, 1986). More recently, however, Hederstadt and Heden (1989) have demonstrated that the active-site cysteine is not essential for either substrate binding or catalysis. The *B. subtilis* succinate dehydrogenase binds succinate and oxalacetate normally; yet it has alanine replacing cysteine. Thus, the cysteine near the active site can influence catalytic activity only indirectly, probably by steric hindrance when a larger group or a charged group, such as cadmium, are attached. On the other hand, the increment in the dissociation constant for this group provides a rational explanation for the great affinity of the enzyme for cadmium.

Further investigation to determine the factors responsible for the anomalous  $pK_a$  value of the active-site thiol and the reasons for this phenomenon will produce a better understanding of the structural organization of SDH.

### Acknowledgment

We wish to thank Dr. E. Chávez for discussions, suggestions, and encouragement.

### References

- Ackrell, A. C. B., Kearney, B. E., and Mayer, M. (1974). *J. Biol. Chem.* **249**, 2021-2027.
- Ackrell, A. C. B., Kearney, B. E., and Singer, T. P. (1978). *Methods Enzymol.* **53**, 466-483.
- Cardemil, E. (1987). In *Chemical Modification of Enzymes: Active Site Studies* (Eyzaguirre, J., ed.), Ellis Horwood Limited, England, pp. 23-34.
- Chávez, E., Briones, R., Michel, B., Bravo, C., and Jay, D. (1985). *Arch. Biochem. Biophys.* **242**, 493-497.
- Coles, C. J., and Singer, T. P. (1977). *FEBS Lett.* **82**, 267-268.
- Dominici, P., Tancini, B., and Voltattorni, C. B. (1985). *J. Biol. Chem.* **260**, 10583-10589.



- Felberg, N. T., and Hollocher, T. C. (1972). *J. Biol. Chem.* **247**, 4539-4542.
- Hederstedt, L., and Hedén, L. (1989). *Biochem. J.* **260**, 491-497.
- Hopkins, F. G., and Morgan, E. J. (1938). *Biochem. J.* **32**, 611-620.
- Hopkins, F. G., Morgan, E. J., and Lutwak-Mann, C. (1938). *Biochem. J.* **32**, 1829-1848.
- Jabalquinto, A. M., Eyzaguirre, J., and Cardemil, E. (1983). *Arch. Biochem. Biophys.* **225**, 338-343.
- Jay, D. (1991). *J. Bioenerg. Biomembr.* **23**, 335-343.
- Jurkovitz, M., Scott, K. M., Altshuld, R., Merola, A. J., and Brierley, G. P. (1974). *Arch. Biochem. Biophys.* **165**, 98-113.
- Kearney, E. B. (1957). *J. Biol. Chem.* **229**, 363-375.
- Kenney, W. C. (1975). *J. Biol. Chem.* **250**, 3089-3094.
- Kitz, R., and Wilson, I. B. (1962). *J. Biol. Chem.* **237**, 3245-3249.
- Kotlyar, A. B., and Vinogradov, A. D. (1984). *Biochim. Biophys. Acta* **784**, 24-34.
- Lee, C. P., and Ernster, L. (1966). In *Symposium on the Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria* (Tage, J. M., Papa, S., Quagliariello, E., and Slater, E. C., eds.), Vol. 7, Elsevier North-Holland, New York, pp. 218-234.
- LeQuôc, K., LeQuôc, D., and Gaudemer, Y. (1981). *Biochemistry* **20**, 1705-1710.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. (1951). *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Mas, M. T., and Colman, R. F. (1983). *J. Biol. Chem.* **258**, 9332-9338.
- Mildvan, A. S., and Leigh, R. A. (1964). *Biochim. Biophys. Acta* **89**, 393-397.
- Mowery, P. C., Steekamp, D. J., Ackrell, B. A. C., Singer, T. P., and White, G. A. (1977). *Arch. Biochem. Biophys.* **178**, 495-506.
- Mundy, T. C. F. (1965). *Dissert. Abstr.* **26**, 6426.
- Ochiai, E. (1977). In *Bioinorganic Chemistry. An Introduction* (Busch, D. H., and Shull, H., eds.), Allyn and Bacon, Boston, pp. 462-487.
- Okada, M., Yoshida, H., and Hisamatsu, Y. (1964). *J. Electrochem. Soc. Jpn.* **32**, 99-103.
- Percovaro, V. L., Hermes, J. D., and Cleland, W. W. (1984). *Biochemistry* **23**, 5262-5271.
- Perkins, D. J., (1961). *Biochem. J.* **80**, 668-672.
- Phillips, M. K., Hederstedt, L., Hasnain, S., Rutberg, L., and Guest, J. R. (1987). *J. Bacteriol.* **169**, 864-873.
- Rasheed, B. K. A., Diwan, J. J., and Sanadi, D. F. (1984). *Eur. J. Biochem.* **144**, 643-647.
- Sanborn, B. M., Felberg, N. T., and Hollocher, T. C. (1971). *Biochim. Biophys. Acta* **227**, 219-231.
- Sillen, L. G. (1984). In *Stability Constants of Metal-Ion Complexes*, Chemical Society, London.
- Singer, T. P., Kearney, B. E., and Kenney, C. W. (1973). *Adv. Enzymol.* **5**, 189-271.
- Smith, R. M., and Martell, A. E. (1974). In *Critical Stability Constants*, Vol. 1, Plenum Press, New York.
- Smith, R. M., and Martell, A. E. (1975). In *Critical Stability Constants*, Vol. 2, Plenum Press, New York.
- Smith, R. M., and Martell, A. E. (1976). In *Critical Stability Constants*, Vols. 3 and 4, Plenum Press, New York.
- Tian, W. X., Hsu, R. Y., and Wang, Y. S. (1985). *J. Biol. Chem.* **260**, 11375-11387.
- Valle, B. L., and Ulmer, D. D. (1972). *Annu. Rev. Biochem.* **41**, 91-128.
- Vinogradov, A. D. (1986). *Biokhimiya* **51**, 1944-1973.
- Vinogradov, A. D., Winter, D. W., and King, T. E. (1972). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **49**, 441-444.
- Vinogradov, A. D., Gavrikova, E. V., and Zuevsky, V. V. (1976). *Eur. J. Biochem.* **63**, 365-371.
- Wojtczak, L., Wojtczak, A. B., and Ernster, L. (1969). *Biochim. Biophys. Acta* **191**, 10-21.

12. Bolli, R., Jeroudi, M. O., Patel, B. S., Aruoma, O. I., Halliwell, B., Lai, E. K., and McCay, P. B. (1989) *Circ. Res.* **65**, 607-622.
13. Kuzuya, T., Hoshida, S., Kim, Y., Nishida, M., Fuji, H., Kitabatake, A., Tada, M., and Kamada, T. (1990) *Circ. Res.* **66**, 1160-1165.
14. Cuperus, R. A., Muijsers, A. O., and Wever, R. (1985) *Arth. Rheum.* **28**, 1228-1233.
15. Bagchi, D., Prasad, R., and Das, D. K. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **158**, 52-57.
16. Muk, I. T., Freedman, A. M., Dickens, B. F., and Weglicki, W. B. (1990) *Biochem. Pharmacol.* **40**, 2169-2175.
17. Hill, H. A. O., and Thornalley, P. J. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* **762**, 44-51.
18. Misra, H. P., and Fridovich, I. (1976) *Biochemistry* **15**, 681-687.
19. Hill, H. A. O., and Thornalley, P. J. (1981) *FEBS Lett.* **125**, 235-238.
20. Nishikimi, M., Rao, N. A., and Yagi, K. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46**, 849-854.
21. Hill, H. A. O., and Thornalley, P. J. (1982) *Canad. J. Chem.* **60**, 1528-1531.
22. Goldberg, B., and Stern, A. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 2401-2403.
23. Goldberg, B., Stern, A., and Peisach, J. (1976) *J. Biol. Chem.* **251**, 3045-3051.
24. Jay, D., Zamorano, R., Muñoz, E., Gleason, R., and Boldu, J. (1991) *J. Bioenerg. Biomembr.* **23**, 381-389.
25. Southorn, P. A., and Powis, G. (1988) *Mayo Clin. Proc.* **63**, 390-408.
26. Halliwell, B. (1990) *Free. Radical Res. Commun.* **9**, 1-32.
27. Auroma, O. I., Halliwell, B., Hoey, B. M., and Butler, J. (1989) *Free. Radical Biol. Med.* **6**, 593-597.
28. Bielski, B. H. J. (1985) *J. Phys. Chem. Ref. Data.* **14**, 1041-1100.
29. Werns, S. W., and Lucchesi, B. R. (1990) *TIPS* **11**, 161-165.
30. Artman, M., Olson, R. D., Boucek, R. J., Boerth, R. C. (1984). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **72**, 324-332.
31. Babbs, C. F. (1985) *Ann. Emerg. Med.* **14**, 777-783.
32. Weglicki, W. B. (1989) in *New Frontiers in Cardiovascular Therapy: Focus on Angiotensin Converting Enzyme Inhibition* (Sonnenblick, E. H., Laragh, J. H., and Lesch, M., Eds.), pp. 271-276, Excerpta Medica, New York.
33. Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. (1984) *Biochem. J.* **219**, 1-14.

EPR STUDY OF THE CHEMICAL MODIFICATION OF MEMBRANE-BOUND  
SUCCINATE DEHYDROGENASE

David Jay<sup>1,4</sup>, Rafael Zamorano<sup>2</sup>, Eduardo Muñoz<sup>3</sup>  
and Roberto Gleason<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología,  
Ignacio Chávez, México.

<sup>2</sup>Departamento de Física, Escuela Superior de Física y Matemáticas,  
IPN, México. COFFA fellow.

<sup>3</sup>Instituto de Física, Universidad Nacional Autónoma de México,  
México.

<sup>4</sup>To whom correspondance should be addressed: Departamento de  
Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio  
Chávez, Juan Badiano No. 1, México, D.F. 14080, México. FAX  
(525) 573-0926.

**Running Title:** EPR Study of the Chemical Modification of Succinate  
Dehydrogenase.

**Subject:** Biomembranes and Bioenergetics.

**Key Words:** Succinate dehydrogenase, chemical modification,  
N-ethylmaleimide, iron-sulfur center, EPR  
spectroscopy, submitochondrial particles.

### Abstract

The effect of N-ethylmaleimide (NEM) on the Fe-S centers of membrane-bound succinate dehydrogenase was evaluated by means of EPR spectroscopy. NEM-treatment did not modify the spectra of the reduced S-1 nor the oxidized S-3 centers. However, cluster S-1, in the NEM-inhibited enzyme, lacked the spin relaxation properties attributable to an adjacent center S-2. Preincubation of the enzyme with oxaloacetate, before the addition of NEM, prevented the loss of both the dehydrogenase activity and the magnetic interaction between clusters S-1 and S-2, suggesting that the changes originated in the enzyme with NEM were the consequence of the modification of an -SH group located in the region of the catalytically active site.

## Introduction

It has been known for many years that succinate dehydrogenase (SDH) (EC 1.3.99.1) is an enzyme very sensitive to thiol-specific reagents (Hopkins and Morgan, 1938; Hopkins, *et al.*, 1938). Substrate and substrate analogues provide protection against such agents indicating that the inactivation of SDH results from the modification of a cysteine residue located near the active site (Kenney, 1975; Vinogradov *et al.*, 1976; Kotlyar and Vinogradov, 1984; Jay, 1991 and Jay *et al.*, 1991a). Vinogradov *et al.*, (1976) and Vinogradov, (1986) proposed that the active-site sulphhydryl could be involved in the mechanism of succinate oxidation. However, Hederstedt and Hedén (1989) and Schröder *et al.*, (1991) found that the active-site cysteine is not essential for either substrate binding or catalysis. The *B. subtilis* SDH and the *E. coli* fumarate reductase (FRD) bind succinate normally; yet the cysteine residues of these enzymes was replaced for other groups. Thus, the structural changes which occurred in the enzyme, when SDH is inhibited by thiol-binding reagents, remain to be completely clarified.

SDH is an iron-sulphur flavoenzyme with three different iron-sulfur clusters designated as cluster S-1, [2Fe-2S]; cluster S-2, [4Fe-4S]; and cluster S-3, [3Fe-4S] (Singer and Johnson, 1985). Studies of other iron-sulfur enzymes of the respiratory chain have shown that a great deal of information can be gained into the mechanisms of drug action and enzyme catalysis if chemical modification is followed with EPR spectroscopy (Krishnamoorthy and Hinkle, 1988). The purpose of this study was

to further characterize the chemical modification of SDH induced by a thiol-specific reagent utilizing this technique.

## Materials and Methods

Mitochondria from bovine heart were prepared by the polytron technique as reported before (Jurkowitz *et al.*, 1974). Bovine-heart mitochondria were used for the preparation of submitochondrial particles (ETPM) as indicated by Lee and Ernster (1966). Since membrane-bound SDH is normally inactivated by the presence of oxaloacetate (Wojtczak *et al.*, 1969) which is tightly bound to the active site, the enzyme was, unless otherwise indicated, activated with malonate and NaBr as previously described (Jay, 1991; Jay *et al.*, 1991a).

Chemical modifications were carried out by the addition of NEM (1 mM) to a suspension of ETPM (final protein concentration 1 mg ml<sup>-1</sup>) in 200 mM sucrose, 25 mM HEPES, pH 7.4 and incubation at 25°C for 30 min. The excess reagents were removed by pelleting the suspension at 105,000 x g for 1 h. and resuspending the pellet in 200 mM sucrose, 25 mM HEPES, pH 7.4, buffer to final concentrations of 35 to 40 mg of protein ml<sup>-1</sup>, appropriate for EPR measurements.

Protection by oxaloacetate against inhibition of SDH by NEM was carried out as follows. The ETPM (1 mg protein ml<sup>-1</sup>) were incubated, for 20 min at 25°C, in a buffer containing: 200 mM sucrose, 25 mM HEPES, pH 7.4, and 2.5 mM oxaloacetate. Then the suspension was divided into two parts. One part was treated with 1 mM NEM as indicated above. Both fractions were centrifuged for 1 h. at 105,000 x g and the pellets were suspended in 200 mM sucrose, 25 mM HEPES, pH 7.0 buffer supplemented with 500 mM NaBr and 100 mM semicarbazide-HCl, for activation for 1 h. at 25°C. The preparations were centrifuged once again and resuspended (35-40 mg

protein  $\text{ml}^{-1}$ ) in the sucrose/HEPES buffer for EPR and activity measurements.

For the EPR measurements the concentrated soluble preparations were treated with the appropriate substrates in a cell flushed with nitrogen. EPR spectra were obtained using an X-band Varian E 112 with a Varian microwave rectangular cavity TE 102 as previously reported (Jay *et al.*, 1991b). The temperature of the sample was controlled by means of a close-circuit helium refrigerator and a Digital temperature indicator/controller, Air Products displax 208.

The succinate dehydrogenase activity was measured with the phenazine methosulfate/dichloroindophenol assay as reported (Mowery *et al.*, 1977). Protein concentration was determined by the method of Lowry *et al.* (1951).



## Results

The presence of three different iron-sulfur centers in SDH has been well established (Singer and Johnson, 1985). In figure 1 typical EPR spectra of centers S-1 and S-3 are shown. Figure 1a illustrates the spectrum of the iron-sulfur center S-1 recorded at 80 K in the succinate-reduced ETPM. This is a rhombic signal with  $g$  values (2.026, 1.935 and 1.912) characteristic of a ferredoxin-type cluster (Bainert and Sands, 1960 and Ohnishi, *et al.*, 1976a). In addition, figure 1b presents the spectrum of the iron-sulfur center S-3 recorded at 16 K in the oxidized membrane preparations. In the oxidized state center S-3 exhibits, at temperatures  $\leq 30$  K, an EPR signal fairly isotropic centered around  $g = 2.01$  (Ohnishi, *et al.*, 1976b).

In order to test the effect NEM on the above described signals, the ETPM were treated with the reagent (1 mM NEM for 30 min) until dehydrogenase activity was completely lost. Under these conditions the addition of succinate did not elicit the signal of center S-1. However, reduction with dithionite completely reversed the spectrum (no change in the shape or the intensity of the signal recorded at 80 K was observed) indicating that the cluster itself was not affected by NEM. A similar situation was observed with center S-3. Reaction with NEM did not alter the EPR spectrum of the oxidized membranes (data not shown).

To further characterize the inhibition, we decided to study the effect of NEM on the power saturation behavior of the  $g = 1.935$  feature of the S-1 signal at 16 K. It has been established that the presence of cluster S-2 can be inferred from the spin relaxation properties of cluster S-1 (at temperatures  $\leq 30$ ) in

preparations reduced with succinate or dithionite (Ohnishi, *et al.*, 1976b and Maguire, *et al.*, 1985). When succinate is added to ETP<sub>H</sub> clusters S-1 and S-3 are reduced. Under these conditions the EPR signal of center S-1 is readily saturated with the microwave power as shown in figure 2 x. However, if cluster S-2 is reduced with dithionite, the spin relaxation rate of cluster S-1 is increased and its spectrum is not so easily saturated (Fig. 2 o). Figure 2 ● shows that NEM-treated ETP<sub>H</sub> (1 mM 30 min.) when reduced with dithionite had a much lower spin relaxation rate than the control particles reduced with dithionite indicating a modification in the magnetic interaction between clusters S-1 and S-2. It was interesting to observe that when the catalytic activity was protected by 2.5 mM oxaloacetate (80-90 % of activity was recovered in the reactivated samples) against NEM inhibition, the change induced with NEM in the spin relaxation profile was reversed (Fig. 2 Δ).

## Discussion

Since the finding that SDH was sensitive to sulphhydryl reagents (Hopkins and Morgan, 1938; Hopkins *et al.*, 1938) many studies have been carried out in order to determine the site and mechanism of inhibition. In this regard kinetic studies have shown the involvement of an active-site thiol in the inactivation process (Kenney, 1975; Vinogradov *et al.*, 1976; Kotlyar and Vinogradov, 1984; Jay, 1991 and Jay *et al.*, 1991a) which probably corresponds to an invariant cysteine found in the flavoprotein subunit of *E. coli* FRD and SDH (Cole, 1982 and Wood *et al.*, 1984). The thiol of this cysteine was suggested to be directly involved, as a proton donor/acceptor, in the catalytic mechanism (Vinogradov *et al.*, 1976; Vinogradov, 1986); an abnormally low pK<sub>a</sub> value for this group was reported (Vinogradov *et al.*, 1976; Vinogradov, 1986; Jay, *et al.*, 1991a), indicating that the sulphhydryl is activated probably by a positively charged group located close to the -SH (Vinogradov *et al.*, 1976). More recently, however, site-directed mutagenesis studies on *E. coli* FRD and *B. subtilis* SDH have shown that substitution of this cys residue resulted in enzymes with normal catalytical properties (Hederstedt and Hedén 1989; Schröder *et al.*, 1991). These last results suggested that the lack of enzyme activity of SDH modified at the thiol may be the consequence of a blockage of essential conformational changes in the enzyme.

The results of the present work show that reaction with NEM inhibits succinate dehydrogenase activity without any detectable alteration of the paramagnetic signals of centers S-1 and S-3. On the other hand, the modified enzyme manifested at 16 K a reduction

of the spin relaxation rate of center S-1 in the ETPH reduced with dithionite indicating a modification of the magnetic interaction between clusters S-1 and S-2. In addition, results indicate that protection of the catalytically active site with oxaloacetate against NEM-inhibition restored the magnetic interaction. These data suggest that the loss of activity and the change in the magnetic properties are phenomena occurring when the active-site thiol is modified.

At this point some questions arise. First, it is not clear why the modified enzyme exhibits altered magnetic properties. Since the signal of the center S-1 is not disturbed by incubation with NEM, the binding site of the reagent is probably not located in a position whose chemical modification could directly change the properties of this cluster. However, with the present evidence, the same assumption can not be discarded in the case of center S-2. Another question arises as to whether the enzyme activity is somehow related with the integrity in the relation between clusters S-1 and S-2. Since the discovery of center S-2 (Ohnishi, *et al.*, 1973) its role in the enzyme has been in controversy (Beinert and Albracht, 1982; Maguire, *et al.*, 1985 and Singer and Johnson, 1985) because, unlike centers S-1 and S-3, this cluster is not reducible by succinate. On the other hand, Cammack *et al.*, (1986) and Cammack *et al.*, (1987) proposed a kinetic mechanism of electron transfer in which the low-potential electron carriers of complex II, i.e. center S-2 and cytochrome b, could have a relevant role. In this model center S-1 and center S-2 accept the first and second electrons from reduced flavin.

In conclusion, the evidence presented in this study indicates

that membrane-bound SDH, modified at the active-site thiol by NEM, exhibits a normal EPR spectra of center S-1 and center S-3. In addition, the modified enzyme manifested altered magnetic properties of center S-1 in the dithionite reduced preparations. The meaning of these results in relation to the role of center S-2 in the catalytical activity of SDH should be evaluated by considering the current state of ideas.

## Figures

**Figure 1. EPR spectra of center S-1 and center S-3.** To a suspension of activated membrane-bound SDH (final protein concentration  $38 \text{ mg ml}^{-1}$ ), there was added  $1 \text{ mM}$  thenoyltrifluoroacetone and  $50 \text{ mM}$  succinate (A) or  $250 \text{ }\mu\text{M}$  ferricyanide and  $10 \text{ }\mu\text{M}$  phenazine methosulfate (B). Preparations were frozen after a 3-min incubation at  $25^\circ\text{C}$ . EPR operating conditions were: (A) modulation frequency,  $100 \text{ kHz}$ ; modulation amplitude,  $1 \text{ gauss}$ ; microwave frequency  $9.1432 \text{ GHz}$ ; time constant,  $0.250 \text{ s}$ ; field scan,  $500 \text{ G}$ ; scan time,  $8 \text{ min}$ ; microwave power,  $2 \text{ mW}$ ; temperature,  $80 \text{ K}$  (A). In (B) similar conditions were used with the exception of: microwave frequency,  $9.27 \text{ GHz}$ ; field scan,  $1000 \text{ G}$  and temperature,  $16 \text{ K}$ . The indicated  $g$  values are those of succinate dehydrogenase groups.

**Figure 2. Microwave power saturation profiles of the S-1 EPR signal in normal and NEM-modified SDH.** The  $g = 1.935$  signal heights (S) of the different samples were measured at the microwave powers indicated at  $16 \text{ K}$ . Scan rate was  $3.1 \text{ mT/min}$ . All other EPR settings were similar to those described in fig. 1. Where indicated (o), ( $\Delta$ ) and ( $\bullet$ ) samples were reduced with excess dithionite or with succinate (x) as indicated in fig. 1. Samples treated with NEM ( $\bullet$ ) or with oxaloacetate followed by NEM ( $\Delta$ ) are also shown. Incubation with oxaloacetate and reactivation did not modify the saturation profile (data not shown). Incubation conditions are detailed under Materials and Methods.

## References

- Beinert, H., Sands, R. H. (1960). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **3**, 41-46.
- Beinert, H., Albracht, S. F. J. (1982). *Biochim. Biophys. Acta.* **683**, 245-277.
- Cammack, R., Crowe, B.A. and Cook, N.D. (1986). *Biochem. Soc. Trans.* **14**, 1207-1208.
- Cammack, R., Maguire, J.J. and Ackrell, B.A.C. (1987), In: *Cytochrome Systems: Molecular Biology and Bioenergetics* (Fapa, S., Chance, B. and Ernster, L., eds.), pp. 485-491, Plenum Press, New York, London.
- Cole, S.T. (1982). *Eur. J. Biochem.* **122**, 479-484.
- Hedersted, L. and Hedén, L.O. (1989). *Biochem. J.* **260**, 491-497.
- Hopkins, F. G., Morgan, E. J. (1938). *Biochem. J.* **32**, 611-620.
- Hopkins, F. G., Morgan, E. J. and Lutwak-Mann, C. (1938). *Biochem. J.* **32**, 1829-1848.
- Jay, D. (1991). *J. Bioenerg. Biomembr.* **23**, 335-343.
- Jay, D., Zamorano, R., Muñoz, E. and Gleason, R. (1991). *J. Bioenerg. Biomembr.* **23**, 381-389.
- Jay, D., Cuéllar, A., Zamorano, R., Muñoz, E. and Gleason, R. (1991). *Arch. Biochem. Biophys.* **290**, in press.
- Jurkovitz, M., Scott, K. M., Altschuld, R., Merola, A. J., Brierley, G. P. (1974). *Arch. Biochem. Biophys.* **165**, 98-113.
- Kenney, W. C. (1975). *J. Biol. Chem.* **250**, 3089-3094.
- Kotlyar, A. B., Vinogradov, A. D. (1984). *Biochim. Biophys. Acta.* **784**, 24-34.
- Krishnamoorthy, G. and Hinkle, P. C. (1988). *J. Biol. Chem.* **263**, 17566-17575.

- Lee, C. F. and Ernster, L. (1966) in: Symposium on the Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria (Tage, J. M., Papa, S., Quagliariello, E., and Slater, E. C., eds.), Vol. 7, pp. 218-234, Elsevier North-Holland, New York.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. (1951). *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Maguire, J. J., Johnson, M. K., Morningstar, J. E., Ackrell, B. A. C., and Kearney, E. B. (1985). *J. Biol. Chem.* **260**, 10909-10912.
- Mowery, P.C., Steekamp, D.J., Ackrell, B.A.C., Singer, T.P. and White, G.A. (1977). *Arch. Biochem. Biophys.* **178**, 495-506.
- Ohnishi, T., Winter, D.B., Lim, J. and King, T.E. (1973). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **53**, 231-237.
- Ohnishi, T., Salerno, J.C., Winter, D.B., Lim, J., Yu, C.A., Yu, L. and King, T.E. (1976). *J. Biol. Chem.* **251**, 2094-2104.
- Ohnishi, T., Lim, J., Winter, D.B. and King, T.E. (1976). *J. Biol. Chem.* **251**, 2105-2109.
- Schröder, I., Gunsalus, R.F., Ackrell, B.A.C., Cochran, B. and Cecchini, Gary. (1991). *J. Biol. Chem.* **266**, 13572- 13579.
- Singer, T.P., Johnson, M. K. (1985). *FEBS*, **190**, 189-198.
- Vinogradov, A. D., Gavrikova, E. V., Zuevsky, V. V. (1976). *Eur. J. Biochem.* **63**, 365-371.
- Vinogradov, A.D. (1986). *Biokhimiya* **51**, 1944-1973.
- Wojtczak, L., Wojtczak, A. B., Ernster, L. (1969). *Biochim. Biophys. Acta.* **191**, 10-21.
- Wood, D., Darlison, M. G., Wilde, R. J., Guest, J. R. (1984). *Biochem. J.* **222**, 519-534.



2.030

1.935

1.910

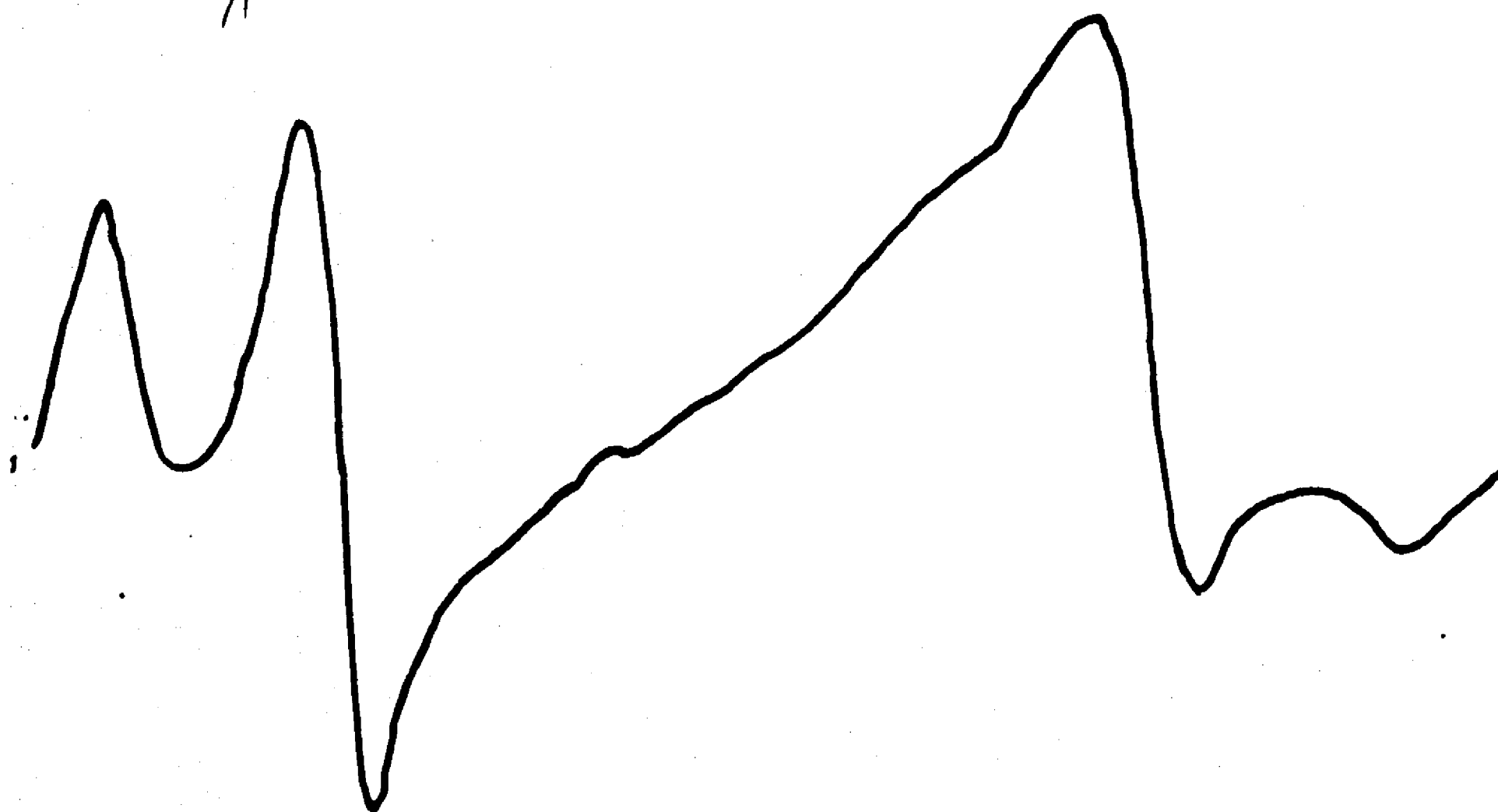
2.017

g

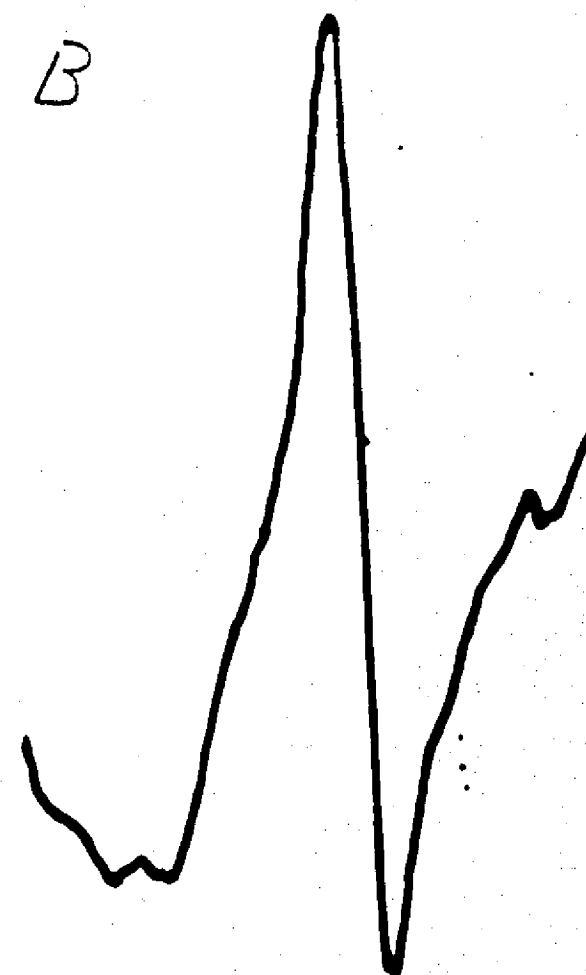
T

A

B



Succinate reduced



$\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ -oxidized

Fig. 1

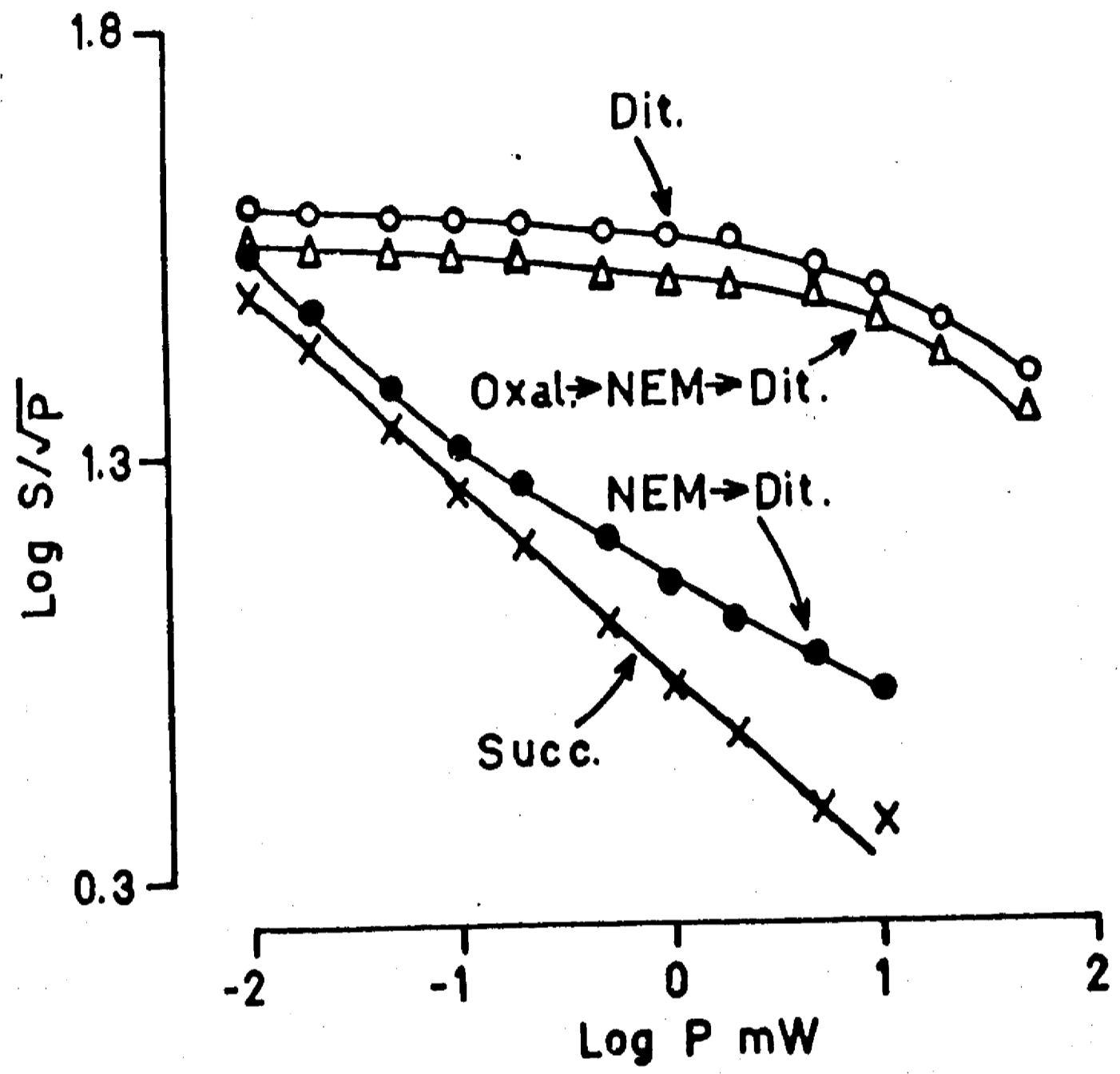


Fig. 2

## VII. REFERENCIAS

- Beinert, H., Ackrell, B.A.C., Kearney, E.B. and Singer, T.P. (1975). *J. Biochem.* **54**, 185-194.
- Bertrand, P. and Gayda, J.F. (1979). *Biochim Biophys. Acta* **570**, 107-121.
- Cammack, R. (1983). *Chemica Scripta*, **21**, 87-95.
- Cammack, R., Crowe, B.A. and Cook, N.D. (1986). *Biochem. Soc. Trans.* **14**, 1207-1208.
- Cammack, R. (1987). In: Iron-sulfur protein research. (H. Matsubara, ed.), pp. 223-240, Japan Scientific Societies Press/ Spinger-Verlag, Tokyo and Berlin.
- Cammack, R., Maguire, J.J. and Ackrell, B.A.C. (1987), In: Cytochrome Systems: Molecular Biology and Bioenergetics (Papa, S., Chance, B. and Ernster, L., eds.), pp. 485-491, Plenum Press, New York, London.
- Cole, S.T. (1982). *Eur. J. Biochem.* **122**, 479-484.
- Darlison, M.G. and Guest, J.R. (1984). *Biochem. J.* **223**, 507-517.
- Davis, A.K., Hatefi, Y. (1971). *Biochemistry*, **10**, 2509-2516.
- Dervartanian, D.V., Veeger, C., Orme-Johnson, W.H. and Beinert, H. (1969). *Biochim. Biophys. Acta.* **191**, 22-37.
- Felberg, N. T., Hollocher, (1972). *J. Biol. Chem.* **247**, 4539-4542.
- Gould, S.J., Subramani, S. and Scheffler, I.E. (1989). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **86**, 1934-1938.
- Hatefi, Y. (1985). *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 1015-69.
- Hedersted, L. and Hedén, L.O. (1989). *Biochem. J.* **260**, 491-497.
- Hopkins, F. G., Morgan, E. J. (1938). *Biochem. J.* **32**, 611-620.

- Hopkins, F. G., Morgan, E. J. and Lutwak-Mann, C. (1938). *Biochem. J.* **32**, 1829-1848.
- Johnson, M. K., Kowal, A. T., Morningstar, J. E., Oliver, M. E., Whittaker, K., Gunsalus, R. F., Ackrell, B. A. C. and Cecchini, G. (1988). *J Biol. Chem.* **263**, 14732-14738.
- Kenney, W. C. (1975). *J. Biol. Chem.* **250**, 3089-3094.
- Kita, K., Oya, H., Gennis, R.B., Ackrell, B.A.C. and Kasahara, M. (1990). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **166**, 101-108.
- Kotlyar, A. B., Vinogradov, A. D. (1984). *Biochim. Biophys. Acta.* **784**, 24-34.
- Krishnamoorthy, G. and Hinkle, P. C. (1989). *J. Biol. Chem.* **263**, 17566-17575.
- Lauterbach, F., Körtner, C., Albracht S.P.J., Unden, G. and Kröger, A. (1990) *Arch. Microbiol.* **154**, 386-393.
- LeQuôc, K., LeQuôc, D., Gaudemer, Y. (1981). *Biochemistry* **20**, 1705-1710.
- Maguire, J.J. and Hederstedt, L. (1989). *FEBS Lett.* **256**, 195-199.
- Ohnishi, T., King, E.T., Salerno, C.J., Blum, H., Bowyer, R.J., Maida, T. (1981). *J. Biol. Chem.* **10**, 5577-5582.
- Ohnishi, T. (1987). In: *Current Topics in Bioenergetics*, vol. **15** (Lee, C.F. ed. ) pp. 37-65, Academic Press, New York
- Phillips, M. K., Hederstedt, L., Hasnain, S., Rutberg, L., Guest, J. R. (1987). *J. Bacteriol.* **169**, 864-873.
- Ruzicka, F.J., Beinert, H., Schepler, K.L., Dunham, W.R. and Sands, R.H. (1975). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 2886-2891.
- Sanborn, B. M., Felberg, N. T., Hollocher, T. C. (1971). *Biochim. Biophys. Acta.* **227**, 219-231.

- Schröder, I., Gunsalus, R.P., Ackrell, B.A.C., Cochran, B. and Cecchini, Gary. (1991). *J. Biol. Chem.* **266**, 13572- 13579.
- Singer, T.P., Johnson, M. K. (1985). *FEBS*, **190**, 189-198.
- Vik, S. B., Hatefi, Y. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**, 6749-6753.
- Vinogradov, A. D., Winter D. W., King T. E. (1972). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **49**, 441-444.
- Vinogradov, A. D., Gavrikova, E. V., Zuevsky, V. V. (1976). *Eur. J. Biochem.* **63**, 365-371.
- Vinogradov, A.D. (1986). *Biokhimiya* **51**, 1944-1973.
- Walker, W. H., Singer, T. P., Ghisla, S., and Hemerich, P. (1972). *Eur. J. Biochem.* **26**, 279-289.
- Werth, M.T., Cechini, G., Manodori, A., Ackrell, B.A.C. Schröder, I., Gunsalus, R.P. and Johnson, M.K. (1990). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **87**, 8965-8969.
- Yao, Y., Wakabayashi, S., Matsubara, H., Yu, L. and Yu, C.A. (1986). In: *Iron sulfur Protein Research* (Matsubara, *et al.*, eds.) Japan Sci. Soc., Tokyo, pp. 240-244, Springer, Berlin.