

197
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE
EL COMPLEJO II MITOCONDRIAL DE
CORAZON DE BOVINO"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

BIOLOGA

P R E S E N T A :
ROSA ILEANA SILVA CARDENAS

MEXICO, D. F.

1971

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.

I N D I C E

	Pag.
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
I. Las mitocondrias: organelos especializados en la obtención y conservación de la energía.	2
II. La extracción de energía de las sustancias de reserva.	5
III. La respiración aerobia: el mecanismo mas eficiente de obtención de energía en las células.	5
1. Glucólisis.	6
2. Ciclo de los ácidos tricarbóxicos.	6
3. Cadena Respiratoria.	8
4. Síntesis de ATP.	12
IV. Inhibición del transporte de electrones y de la síntesis de ATP.	14
V. La Succinato deshidrogenasa y el Complejo II mitocondrial.	16
1. Características generales de la Succinato deshidrogenasa.	17
2. Las subunidades hidrofóbicas del Complejo II mitocondrial.	18
VI. Presencia del complejo II a lo largo de la evolución.	23
1. El complejo II mitocondrial de <u>Escherichia coli</u> .	23
2. El complejo II mitocondrial de <u>Paracoccus denitrificans</u> .	23
3. El complejo II mitocondrial de <u>Neurospora crassa</u> .	25
4. El complejo II de <u>Ascaris suum</u> .	27
VII. Reconstitución de complejos respiratorios en liposomas.	28

OBJETIVOS	32
MATERIALES Y METODOS	34
I. Aislamiento del Complejo II mitocondrial.	34
II. Caracterización del Complejo II mitocondrial:	44
III. Reconstitución del transporte de electrones en un sistema de liposomas.	47
Determinación de Proteína	49
Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS	49
RESULTADOS	50
DISCUSION	74
CONCLUSIONES	82
BIBLIOGRAFIA	84

RESUMEN

El complejo II mitocondrial (succinato-coenzima Q óxido-reductasa) es un componente del ciclo de Krebs y de la cadena respiratoria de procariontes y eucariontes y es la única proteína de este ciclo que se encuentra embebida en la membrana interna mitocondrial. Su función es oxidar al succinato y generar equivalentes reductores en forma de $FADH_2$, que son donados hasta la poza de ubiquinona de la cadena respiratoria.

El complejo está constituido por una flavoproteína hidrofílica (succinato deshidrogenasa) y dos péptidos hidrofóbicos. La succinato deshidrogenasa cuenta con dos subunidades, una de tamaño mayor que contiene un FAD, 4 átomos de Fe y 4 de azufre lábiles al ácido y que presenta un peso molecular en geles de poliacrilamida en presencia de SDS de 70 kDa. La subunidad pequeña contiene 9 átomos de Fe y 10 de azufre también lábiles al ácido, agrupados en 3 centros Fe-S y su peso molecular es de 27 kDa. Los dos péptidos hidrofóbicos presentan pesos moleculares de 15.5 y 13.5 kDa y su función se plantea como la de anclar a la succinato deshidrogenasa a la membrana, así como la de proporcionar equivalentes reductores a la poza de quinona.

Varias de las técnicas de purificación del complejo II reportadas en la literatura emplean solventes orgánicos. En el presente trabajo se encontró que este paso es irreproducible, ya que el rendimiento de la purificación es muy bajo y la pérdida de la actividad del complejo en algunos casos es total. Por lo anterior, se llevaron a cabo una serie de modificaciones a las técnicas de purificación reportadas, omitiendo el uso de dichos solventes, lo que condujo a la obtención de un complejo II con un grado de pureza muy alto (evidenciable por el patrón electroforético en geles de poliacrilamida-SDS y por el espectro de absorción) y valores de actividad (38 μ molas DCIP red/min/mg prot) comparables con los mas altos reportados en la literatura del campo.

El complejo aislado por esta técnica permitió también la reconstitución de una parte del transporte de electrones llevada a cabo desde el succinato hasta el citocromo c soluble, a través de los complejos respiratorios II y III mitocondriales incorporados en liposomas; lo que abre la posibilidad de llevar a cabo la reconstitución del transporte de electrones a través de algunos segmentos de la cadena respiratoria y de poder medir el bombeo de protones llevado a cabo por éstos.

INTRODUCCION

Todos los organismos requieren energía para su crecimiento, reproducción y manutención. Los sustratos primarios en prácticamente todas las formas de vida son los carbohidratos y uno de los principales mecanismos de extracción de energía de estos combustibles es a través de los procesos de la respiración aerobia (Avers, 1986).

En las células procarióticas la membrana plasmática lleva la responsabilidad de la conservación de la energía química, mientras que en las células eucarióticas estas funciones se llevan a cabo en un orgánulo especializado llamado mitocondria (Karp, 1984).

I. Las mitocondrias: orgánulos especializados en la obtención y conservación de la energía.

Las mitocondrias son orgánulos especializados de forma esférica u ovoide con dimensiones de aproximadamente 1 a 2 μm de largo y 0.5 a 1 μm de ancho, cuyas funciones son la conservación de la energía formada oxidativamente y su posterior utilización en la síntesis de ATP. Están constituidas por dos membranas: una externa limitante con el citoplasma y una interna (Tzagoloff, 1982). La membrana externa es lisa e ininterrumpida, mientras que la interna se invagina a lo largo de su superficie. Estas invaginaciones llamadas crestas son una característica que identifica a las mitocondrias al observarlas en el microscopio electrónico. Esta forma de la membrana es un recurso que permite la inserción de muchas de las enzimas respiratorias y por lo

tanto incrementa la eficiencia metabólica en un espacio reducido (AVERS, 1986).

Algunas de las actividades de la mitocondria se llevan a cabo en las membranas, debido a que en ellas se encuentran integradas las proteínas que las realizan. Las membranas de la mitocondria dividen el orgánulo en dos compartimientos principales, uno en el centro de la mitocondria y el otro entre las membranas interna y externa. El espacio central se denomina matriz y tiene consistencia gelatinosa debido a que está constituida por una alta concentración de proteínas solubles. Además de algunas enzimas, la matriz mitocondrial contiene ribosomas (de menor tamaño que los encontrados en el citoplasma) y hebras circulares de ADN.

El espacio intermembranal está representado por dos compartimientos continuos, uno localizado dentro de los plegamientos de las crestas y el otro entre la membrana interna y la externa en la periferia del orgánulo.

Las propiedades de las membranas son muy diferentes aún cuando aparecen similares en microscopia electrónica. La membrana externa está compuesta de aproximadamente un 50% de lípidos que incluyen al colesterol que se encuentra en muy altas concentraciones, además de una mezcla de enzimas que intervienen en diversas actividades, tales como la oxidación de epinefrina, la degradación de triptofano y el alargamiento de los ácidos grasos.

La membrana interna tiene una relación lípido/proteína alta (aproximadamente 4:1 por peso, lo que corresponde a 1 molécula de proteína por cada 15 de fosfolípido). Se han encontrado

aproximadamente 60 proteínas diferentes dentro de la compleja estructura de esta membrana. En ésta, prácticamente no se encuentra colesterol, mientras que la fosfatidil-colina y la fosfatidil-etanol-amina se encuentran aproximadamente en el mismo porcentaje (40%). La distribución de estos dos últimos componentes es asimétrica, ya que la fosfatidil-etanol-amina se encuentra predominantemente en la parte de la bicapa lipídica expuesta hacia la matriz, mientras que la fosfatidil-colina se localiza en la parte expuesta hacia el lado citoplásmico. Por otro lado, la cardiolipina está asociada íntimamente con algunas de las proteínas integrales y aparentemente se requiere para su actividad, su distribución se centra hacia el lado de la matriz mitocondrial (Capaldi, 1982).

En relación a la permeabilidad, la membrana externa es prácticamente permeable, permite el paso hacia el espacio intermembranal de moléculas de hasta 10 kDa. La membrana interna en contraste, es muy impermeable y solo permite el paso de moléculas muy pequeñas y sin carga. Las moléculas más grandes y los iones, requieren de sistemas especiales de transporte para entrar a la matriz.

Como la parte principal de la membrana interna integra las crestas mitocondriales, es de esperarse que en células muy activas, se presente una proporción mayor de invaginaciones, como es el caso del músculo cardíaco.

La mitocondria tiene por sí misma material genético y la capacidad de producir ARN además de sintetizar algunas de sus propias proteínas (Karp, 1984).

II. La extracción de energía de las sustancias de reserva.

La energía necesaria para las células se deriva de las sustancias de reserva. Algunas de estas reacciones que transforman sustratos en componentes utilizables, son dependientes de oxígeno (aerobias) pero otras son anaeróbicas y pueden ocurrir en presencia o ausencia de oxígeno.

La obtención de energía en las células, se lleva a cabo mediante dos procesos principales. Uno de ellos es el denominado glucólisis que incluye transformaciones químicas de sustancias solubles en el citosol realizadas por enzimas solubles, en esta etapa no participan las membranas ni se forman gradientes. El otro proceso lo realizan las mitocondrias, que utilizan gradientes electroquímicos a través de la membrana como fuente para la síntesis de ATP (fosforilación oxidativa).

III. La Respiración Aerobia: uno de los mecanismos mas eficientes de obtención de energía en las células.

En la respiración aerobia, que ocurre en la membrana interna y la matriz de las mitocondrias de los eucariontes, los productos de la glucólisis se oxidan completamente hasta CO_2 y agua. La energía de estos sustratos se incorpora finalmente al ATP, en reacciones acopladas al transporte de electrones a través de acarreadores oxidorreductores hacia el oxígeno molecular.

Las reacciones anteriores se realizan mediante procesos muy complejos que involucran varios pasos pero pueden agruparse en 4 grandes grupos de reacciones:

1. Fraccionamiento de las macromoléculas en unidades más pequeñas (proteínas en aminoácidos, polisacáridos en azúcares simples y

grasas en glicerol y ácidos grasos).

2. Oxidación de piruvato en forma de Acetil CoA a CO_2 asociado a la reducción de acarreadores de electrones (NAD^+ y FAD a NADH y FADH_2). Estas reacciones ocurren en la matriz o en proteínas embebidas en la membrana expuestas hacia la matriz.

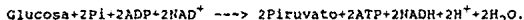
3. Transferencia de electrones del NADH y FADH_2 al oxígeno. Estas reacciones ocurren a través de complejos proteicos asociados a la membrana interna y están acopladas a la generación de un gradiente electroquímico de protones a través de dicha membrana.

4. Síntesis de ATP.

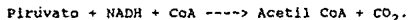
Cada uno de los dos últimos grupos de reacciones interrelacionadas, incluye proteínas con múltiples subunidades con orientación asimétrica en la membrana interna. La figura 1 resume la secuencia anterior.

1. Glucólisis.

Comprende una secuencia de reacciones que transforman a la glucosa en piruvato con la generación de 2 moléculas de ATP. La reacción general de este proceso es la siguiente:



Una vez formado el piruvato, sufre descarboxilaciones oxidativas catalizadas por el complejo piruvato deshidrogenasa que da lugar a la Acetil CoA mediante la reacción general:



2. Ciclo de Krebs (CK).

Este ciclo se inicia con la condensación de la Acetil CoA con oxalacetato que genera citrato, el cuál es metabolizado a través de 5 reacciones de oxidación y descarboxilación para regenerar al

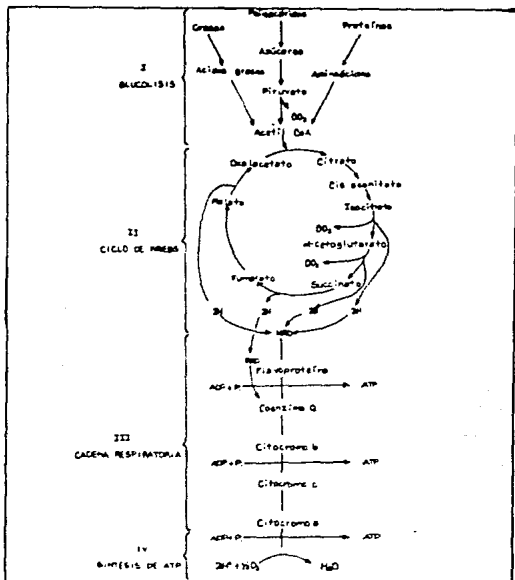


Figura 1. El proceso de la extracción de energía de las sustancias de reserva se realiza en varias etapas: I) fraccionamiento en unidades más sencillas, II) oxidación completa de estas unidades hasta CO_2 en el ciclo de Krebs con la formación de equivalentes reductores ($NADH$ y $FADH_2$), III) transferencia de electrones desde los equivalentes reductores hasta el oxígeno molecular a través de los componentes de la cadena respiratoria y IV) síntesis de ATP (Avers, 1982).

oxalacetato. Estas reacciones están acopladas a la reducción de NAD^+ a NADH (en las reacciones de oxidación de piruvato, isocitrato, α -cetoglutarato y malato), así como a la de FAD hacia FADH_2 durante la oxidación del succinato realizada por la succinato deshidrogenasa (Preeble, 1981).

Con excepción de la succinato deshidrogenasa, todas las enzimas del CK se encuentran libres en la matriz mitocondrial. La succinato deshidrogenasa se encuentra unida a la membrana interna mitocondrial y es la única enzima que participa tanto en el CK como en la cadena respiratoria (Whittaker y Danks, 1978). La figura 2 resume esta vía metabólica.

3. Cadena Respiratoria.

La cadena respiratoria es una secuencia de reacciones responsables de la transferencia de electrones desde los sustratos hasta el oxígeno molecular que generan un gradiente de protones suficiente para la síntesis de ATP. En los organismos eucariontes este proceso se lleva a cabo por complejos oligoméricos localizados en la membrana interna mitocondrial, los cuales tienen grupos prostéticos capaces de llevar a cabo la oxidación o reducción por adición o eliminación de electrones o átomos de hidrógeno. Los electrones son proporcionados a la cadena por equivalentes reductores generados durante el CK y que entran a diferentes niveles de ésta, según su potencial redox, que se inicia con sustratos de potencial muy negativo (Complejo I aproximadamente -350 mV de Em) hasta llegar al oxígeno con $+800$ mV. (Preeble, 1981; Skulachev, 1986; Whittaker y Danks 1978). La figura 3 muestra los valores medios de potencial redox para cada complejo mitocondrial.

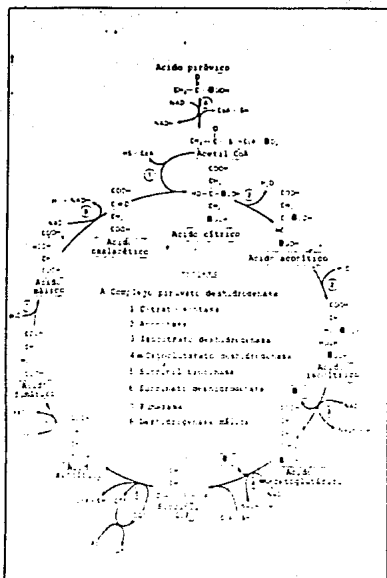


Figura 2. Ciclo de Krebs. Oxidación del piruvato hasta CO₂, a través de complejos enzimáticos asociada a la generación de NADH y FADH₂ (Avers, 1982).

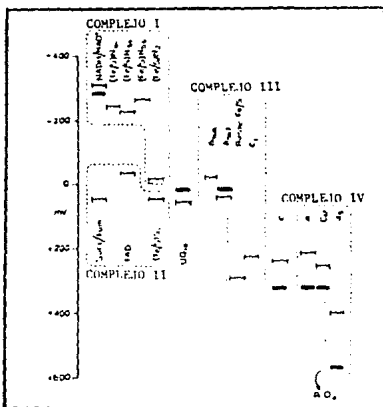


Figura 3. Potencial redox medio de los principales componentes de la cadena respiratoria (Nicholls, 1982).

La cadena respiratoria se realiza en varias etapas llevadas a cabo por 4 complejos transportadores de electrones (Nicholls, 1982):

1. NADH Ubiquinona reductasa (Complejo I)
2. Succinato-Ubiquinona reductasa (Complejo II)
3. Ubiquinol-citocromo c reductasa (Complejo III) y
4. Citocromo c oxidasa (Complejo IV).

La figura 4 muestra la disposición en la membrana de los complejos que participan en la cadena respiratoria.

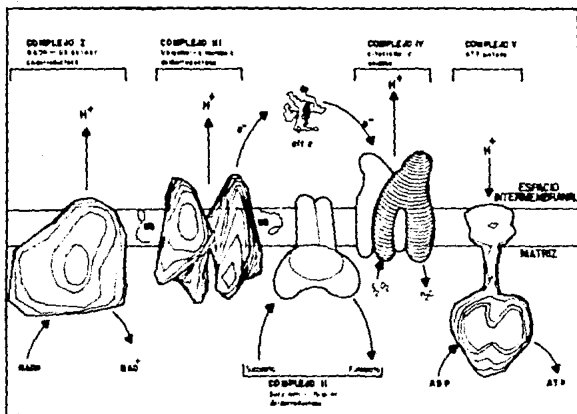


Figura 4. Disposición en la membrana interna mitocondrial de los complejos que participan en el transporte de electrones mitocondrial (González-Halphen, 1990).

La NADH-Ubiquinona reductasa (Complejo I) lleva a cabo la oxidación del NADH proveniente del CK, los dos electrones aceptados por el grupo FMN de la enzima, son transferidos hacia la ubiquinona, que es el único componente de la cadena que no se encuentra covalentemente unido a otra proteína y funciona como acarreador móvil de electrones entre las flavoproteínas y los citocromos.

El $FADH_2$ generado durante el CK, también reduce a la ubiquinona a través del complejo II (Succinato-ubiquinona óxido-reductasa) que participa en ambas rutas.

Una vez reducida la quinona, tanto por el complejo I como por el II, ésta transfiere sus electrones hacia los citocromos b y c_1 del complejo III mitocondrial. El citocromo c transfiere los electrones desde el citocromo c_1 hasta los citocromos a y a_3 de la citocromo c oxidasa (Complejo IV) y éstos finalmente son aceptados por el oxígeno molecular (Stryer, 1975; Nicholls, 1982; Preeble, 1981). La figura 5 resume este proceso.

4. Síntesis de ATP.

El proceso de transporte de electrones desde el NADH hasta el oxígeno molecular, está acoplado a la translocación de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal de las mitocondrias. Esta translocación se lleva a cabo por tres de los complejos respiratorios (I, III y IV) que son por tanto sitios generadores de $\Delta\mu H^+$ (Mitchell, 1975).

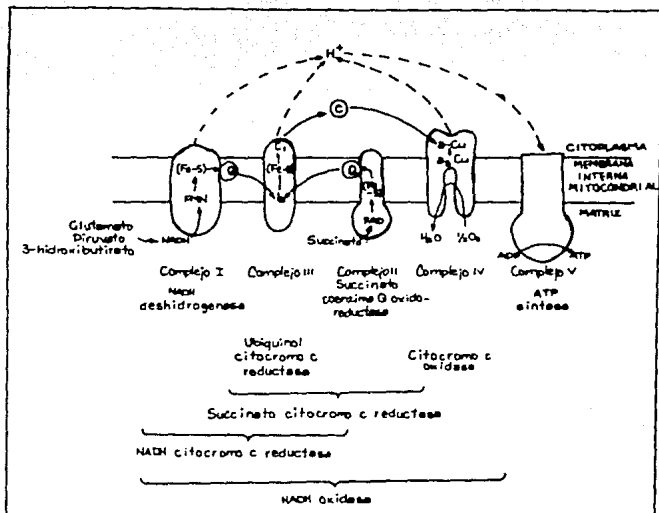


Figura 5. Representación esquemática de la cadena transportadora de electrones mitocondrial (Kennaway, 1988).

El gradiente de protones generado en cada sitio por el flujo de 1 par de electrones desde el NADH es utilizado por la ATP sintasa en la generación de una molécula de ATP. (Nicholls, 1982; Skulachev, 1988). La tabla I resume las características de cada uno de los complejos transportadores de electrones, así como de la ATP sintasa, de la ubiquinona y del citocromo c.

La respiración y la fosforilación son dos procesos que se relacionan íntimamente en la mitocondria, por lo que a su conjunto se le conoce como fosforilación oxidativa.

IV. Inhibición del transporte de electrones y de la síntesis de ATP.

Tanto la cadena respiratoria como la síntesis de ATP pueden ser inhibidos por compuestos específicos clasificados en tres grupos, según el efecto que tengan sobre estos procesos:

1. Inhibidores de la cadena: que detienen las reacciones redox que generan el potencial (fosforilación oxidativa) (amital, rotenona, antimicina, azida de sodio, cianuro de sodio y monóxido de carbono).
2. Desacoplantes: que inhiben la fosforilación y estimulan la respiración. Como su nombre lo indica, desacoplan el proceso respiratorio de la síntesis de ATP (CCCP).
3. Oligomicina: que inhibe la fosforilación y la respiración en mitocondrias acopladas, la adición de desacoplantes libera la respiración. Dicho agente químico inhibe directamente a la ATP sintasa.

Tabla I. Componentes del transporte de electrones en la membrana interna mitocondrial (González-Halphen, 1990).

Componentes	Peso molecular del monómero (Da)	Concentración nmol/mg prot	Subunidades nuc/mt		Grupos prostéticos
Complejo I	700,000	0.06-0.13	25	7	FMN, Fe-S
Complejo II	200,000	0.19	5	0	FAD, hemo b ₅₆₀ y centros Fe-S
Complejo III	250,000	0.25-0.53	10	1	hemo c ₁ , hemo b ₅₆₂ , hemo b ₅₆₆ y centro Fe-S
Complejo IV	208,000	0.6-1.00	10	3	hemos aa ₃ , Cu a y Cu a ₂
ATP sintasa	550,000	0.52-0.54	14	2	adenín nucleótidos Mg ²⁺
Ubiquinona	860	6-8	—	—	—
Citocromo c	12,000	0.8-1.02	1	—	hemo c

Coficiente de difusión lateral (cm ² s ⁻¹)	Molécula, por membrana interna	Frecuencia de colisiones (colisiones ⁻¹ cm ⁻²)
4 × 10 ⁻¹⁰	1,960	5.04 × 10 ¹³
4 × 10 ⁻¹⁰	3,781	2.07 × 10 ¹³
4.4 × 10 ⁻¹⁰	5,743	2.02 × 10 ¹³
3.7 × 10 ⁻¹⁰	17,089	—
—	—	—
3 × 10 ⁻⁹	119,763	1.19 × 10 ¹⁴
1.9 × 10 ⁻⁹	17,089	4.15 × 10 ¹⁴

Datos recopilados por Capaldi y col (1986), Scholtz (1985) y Hackenbrock y col (1986).
 * Se refiere a las subunidades de origen nuclear y mitocondrial respectivamente.

V. La Succinato Deshidrogenasa y el Complejo II Mitocondrial.

El complejo II (succinato-coenzima Q oxido-reductasa) es un componente del ciclo de los ácidos tricarbóxicos y de la cadena respiratoria tanto de procariontes como de eucariontes. El complejo se encuentra asociado a la membrana interna de la mitocondria y es la única proteina del ciclo de los ácidos tricarbóxicos que tiene esta característica. Su función es proporcionar equivalentes reductores en forma de $FADH_2$ a la cadena respiratoria y en especial a la poza de quinonas, en donde la ubiquinona reducida forma una poza móvil de ubiquinol, que a su vez, es oxidada por el complejo III (González-Halphen, 1990).

El complejo II de corazón de bovino está constituido por una proteina hidrofílica relativamente grande (succinato deshidrogenasa) localizada con cara hacia la matriz mitocondrial y anclada por dos proteínas hidrofóbicas de menor tamaño embebidas en la membrana y que constituyen al citocromo b del complejo (Figura 6).

1. Características generales de la Succinato Deshidrogenasa.

La succinato deshidrogenasa es una flavoproteina que contiene hierro no hémico y azufre lábil al ácido. Está formada por dos subunidades desiguales, una subunidad mayor (Fp) que contiene al grupo funcional flavina, tiene una molécula de FAD covalentemente unida por el grupo imidazol de un residuo de histidina y 4 átomos de hierro y 4 de azufre lábiles al ácido. El peso molecular de esta subunidad (obtenida de mitocondrias de corazón de bovino) en geles de SDS poliacrilamida es de aproximadamente 70 kDa y presenta pequeñas variaciones entre las especies (Figura 7).

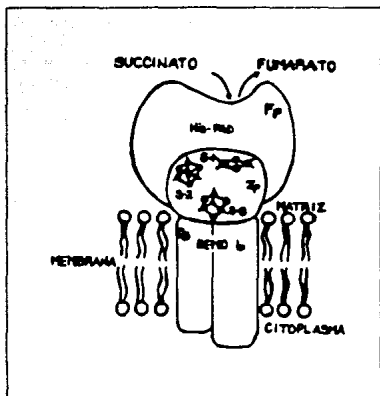


Figura 6. Representación esquemática de la distribución en la membrana interna de los componentes del complejo II mitocondrial (Succinato deshidrogenasa con sus dos subunidades: Fp e Ip y los dos péptidos hidrofóbicos) (Ohnishi, 1987).

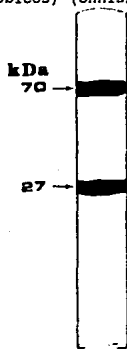


Figura 7. Patrón electroforético de la succinato deshidrogenasa en gels de poliacrilamida en presencia de SDS (Hatefi y Stigall, 1978).

La subunidad pequeña (Ip) contiene 9 átomos de hierro y 10 de azufre lábiles al ácido, asociados a centros fierro-azufre, uno binuclear (S-1), uno tetranuclear (S-2) y uno trinuclear (S-3) encontrados por estudios de resonancia paramagnética del electrón. El peso molecular de esta subunidad en geles de poliacrilamida-SDS es de aproximadamente 27 kDa en corazón de bovino (Figura 7).

2. Las subunidades hidrofóbicas del complejo II Mitocondrial.

El citocromo b del complejo II mitocondrial está constituido por dos subunidades hidrofóbicas, (Pm 15.5 y 13.5 kDa) cuya función fue motivo de especulación durante algún tiempo. Actualmente se conoce la secuencia de ambos polipéptidos, ésta cuenta con tres secuencias hidrofóbicas asociadas a alfa hélices transmembranales, lo que explica la función de anclaje a la membrana que presenta este citocromo.

Los estudios de actividad del complejo II completo y de la succinato deshidrogenasa aislada indican que esta última no presenta sensibilidad a la tenoil-trifluoro-acetona (TFA, inhibidor específico de Complejo II). Hatefi y Galante en 1980 encontraron que el citocromo b de bovino sólo es reducido parcialmente por succinato y puede ser reoxidado por fumarato, después de reducirlo con ditionita, esta reoxidación es bloqueada por mersalil, un inhibidor de la succinato deshidrogenasa. Otro dato importante es que la succinato deshidrogenasa soluble no puede transferir electrones a la quinona, ésta transferencia sólo se lleva a cabo en presencia de las dos subunidades hidrofóbicas (que constituye de esta forma al complejo II) (ver figura 6).

Todas estas evidencias apuntan hacia la idea de que las dos subunidades hidrofóbicas presentes en el complejo II constituyen al citocromo b y que éste presenta alguna influencia en la actividad catalítica de la enzima o que al menos participa en el transporte de electrones que lleva a cabo el complejo (Ackrell y col 1977; Ackrell, 1980; Hatefi y Galante, 1980; Ohnishi, 1987; Yu y col, 1987; Pennoyer y col, 1988). Otra característica de este citocromo b es su espectro de absorción, que muestra un patrón bastante distinto al del citocromo b del complejo III. En un espectro diferencial (reducido con ditionita vs oxidado) el citocromo b del complejo II exhibe dos picos alfa, uno a 557.5 nm y el otro a 550 nm, dos picos beta, uno pequeño a 531 nm y el otro mayor a 523 nm y una banda Soret a 422 nm. La figura 8a muestra el espectro comparativo de los complejos I, II y III (Davis y col, 1973; Yu y col, 1987). El espectro del complejo II completo, muestra además en forma oxidada un hombro correspondiente a las flavinas, aproximadamente a 450 nm, el cuál desaparece en la forma reducida. Fig. 8b (Ackrell y col, 1980; Hatefi y Galante, 1980; Yu y Yu, 1980; Yu y Yu, 1982).

Yu y col (1982) lograron purificar el citocromo b del complejo II, realizaron experimentos de reconstitución de éste con la succinato deshidrogenasa aislada y compararon los datos obtenidos con los que presenta el complejo II íntegro. El citocromo b presente en el complejo II no reacciona con el CO, mientras que la forma reducida del citocromo aislado es completamente reactiva (Yu y Yu, 1982). En un sistema reconstituido con citocromo b y succinato deshidrogenasa, solo el 50 % del citocromo presenta reactividad al CO, además, el citocromo de este sistema presenta

las mismas características espectrales del citocromo en el complejo intacto.

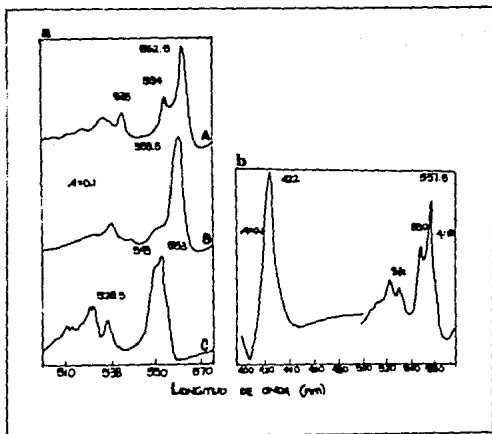


Figura 8. Espectro de absorción de los complejos I (A), II (B) y III (C) de corazón de bovino en forma reducida con ascorbato-TMPD, este espectro no presenta la zona de absorción del Soret. En b se encuentra el espectro diferencial (reducido - oxidado) completo del complejo II (Davis y col, 1973).

En experimentos de reconstitución en que se utiliza succinato deshidrogenasa inactiva se encontró que todo el citocromo reconstituído era insensible a monóxido de carbono, lo que sugiere que la pérdida de sensibilidad a CO no es sólo resultado de una interacción física entre ambos componentes del complejo, sino que debe existir una interacción funcional específica entre ellos que con la succinato deshidrogenasa inactiva no puede llevarse a cabo (Yu y col, 1987).

Los potenciales redox constituyen otro factor que encuentra variación en el citocromo aislado. El potencial medio redox del citocromo b es -144 mV, mientras que en el complejo intacto tiene un valor de -185 mV (Ohnishi, 1979; Yu y col, 1987; Takamiya y col, 1990). Al reconstituir al citocromo b con la succinato deshidrogenasa aislada, el valor del potencial se modifica a -164 mV que corresponde a un valor intermedio entre éstos (Yu y col, 1987). Este valor sugiere la interacción entre este citocromo y la succinato deshidrogenasa.

Se ha propuesto la interacción del citocromo b con el centro Fe-S (S-2) de la enzima debido a que ambos componentes del complejo presentan en forma disociada valores de potencial muy cercanos (-144 y -260 mV respectivamente) y aún en la forma reconstituída (-185 y -400 mV). Esto explica también la presencia del centro S-2 con un potencial tan lejano de los centros S-1 y S-3 con potenciales de -5 y +65mV respectivamente (Ohnishi y Salerno, 1976; Ohnishi, 1979).

Con base en los valores de potencial redox de los centros Fe-S se ha propuesto que el transporte de electrones se lleva a cabo desde el succinato hasta la quinona ($E_m = +50$ mV) a través de los

centros S-1 y S-3 como se muestra en la figura 9. Los centros Fe-S S-1 y S-2 son de tipo ferredoxina (binucleares) y al ser paramagnéticos, presentan una señal de EPR en estado reducido de $g=1.94$. El centro S-3, por ser trinuclear, presenta un espectro de EPR isotrópico en la forma oxidada alrededor de $g=2.01$, mientras que la forma reducida no presenta señal (Hatefi y Stigall, 1976; Ohnishi, 1976; Tushurashvili y col., 1985; Ohnishi, 1987; Fridén y col., 1990; Jay y col, 1990). La función del centro S-2 y del citocromo aún no han sido esclarecidas (Skulachev, 1988; Ohnishi, 1979; Fridén y col, 1990; Ohnishi y Salerno, 1976; Takamiya y col, 1990; Ohnishi y col, 1981; Ohnishi, 1976).

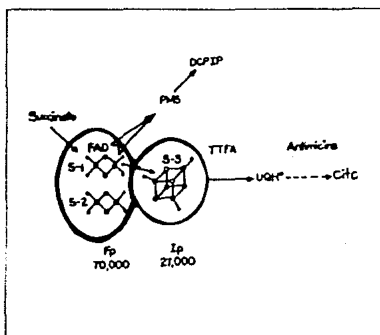


Figura 9. Modelo del transporte de electrones desde el succinato hasta la quinona a través de los centros Fe-S de la succinato deshidrogenasa (Ohnishi, 1979.)

VI. Presencia del Complejo II a lo largo de la escala filogenética.

El complejo II mitocondrial es el más conservado a lo largo de la evolución y éste se ha encontrado tanto por datos de actividad del complejo, como por sus características estructurales y por las secuencias de sus subunidades. Por este motivo, vale la pena revisar brevemente las características de esta enzima purificada a partir de varios organismos.

1. El complejo II de Escherichia coli.

El complejo II de E. coli está constituido por dos subunidades hidrofílicas grandes (64 y 28 kDa) asociadas a la membrana mediante dos subunidades hidrofóbicas pequeñas (19.5 y 17.5 kDa). Las subunidades hidrofílicas contienen todos los grupos prostéticos del complejo (FAD y 3 centros Fe-S) con excepción del protohemo IX que se encuentra asociado a las subunidades pequeñas. El FAD se encuentra asociado a la subunidad de mayor peso (Fp) y los tres centros hierro-azufre se localizan en la subunidad de 28 kDa (Ip) (Figura 10). Las secuencias de las subunidades Fp e Ip se encuentran altamente conservadas entre las especies. La subunidad Ip de E. coli presenta aproximadamente un 50% de similitud con la equivalente de bovino (Kita y col, 1989).

2. El Complejo II Mitocondrial de Paracoccus denitrificans.

La succinato deshidrogenasa de Paracoccus denitrificans está formada por dos subunidades periféricas asociadas a la membrana mediante dos polipéptidos membranales que constituyen el complejo succinato-ubiquinona-oxidoreductasa. La succinato deshidrogenasa

ha sido aislada mediante agentes caotrópicos o por incremento del pH. Los péptidos membranales se han purificado en presencia de detergentes. Cuando la succinato deshidrogenasa se encuentra en forma soluble, contiene dos subunidades de 64.9 y 28.9 kDa. La subunidad pequeña (Ip) contiene tres centros Fe-S y la grande (Fp) un FAD. La enzima soluble transfiere electrones hacia aceptores artificiales, pero no hasta la quinona; cuando se reconstituye en la membrana con los péptidos hidrofóbicos (Pm 13.4 y 12.5 kDa), esta actividad reductora se regenera. Se ha encontrado que los anticuerpos contra la flavoproteína de *E. denitrificans* presentan reacción cruzada con la misma subunidad de corazón de bovino (Figura 11). La sensibilidad a inhibidores que presenta el complejo II de esta especie es muy semejante a la que se presenta en el complejo de corazón de bovino ($K_i=5.52$ mM para TTFA y 0.25 mM para mersalil). En cuanto al espectro de absorción del complejo reducido, presenta un pico Soret a 424 nm, uno α a 557.8 y uno β a 526 nm que corresponden a los valores encontrados para la mitocondria de corazón de bovino, que son: 422 nm para el Soret y 557.5 nm para α y 523 nm para β (Davis y col, 1973; Pennoyer y col, 1988).

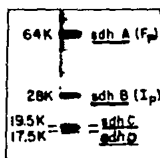


Fig 10. Patrón electroforético en geles de poliacrilamida en presencia de SDS del complejo II mitocondrial de *E. coli*. (Kita y col, 1989).

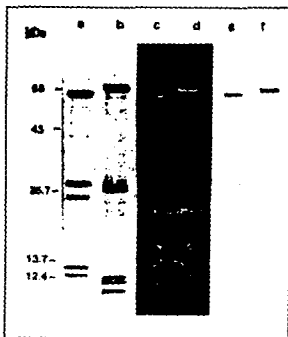


Figura 11. Electroforesis en gels de poliacrilamida en presencia de SDS del complejo II mitocondrial de a) *P. denitrificans* y b) corazón de bovino. Los carriles c y d muestran la fluorescencia de ambos complejos a pH bajo; los carriles e y f la inmunotransferencia en nitrocelulosa de los mismos complejos, probados contra anticuerpos policlonales de la subunidad Fp de *P. denitrificans* (Pennoyer y col, 1988).

3. El Complejo II Mitocondrial de *Neurospora crassa*.

En *Neurospora crassa* el complejo II mitocondrial ha sido purificado, utilizando detergentes no iónicos como el Tritón X-100. Este complejo presenta tres subunidades con pesos moleculares de 72, 28 y 14 kDa que corresponden a las subunidades Fp, Ip y al citocromo b respectivamente. El espectro de absorción de las formas oxidada y reducida de este complejo se presenta en la figura 12 y es muy similar al obtenido para otros organismos. En la forma oxidada, muestra un sobrelapamiento del pico del

citocromo b (413 nm) con las flavinas (450 nm) y presenta un pico a 557 nm con un hombro a 552, similares al espectro para corazón de bovino con bandas a 557.5 y 550 nm.

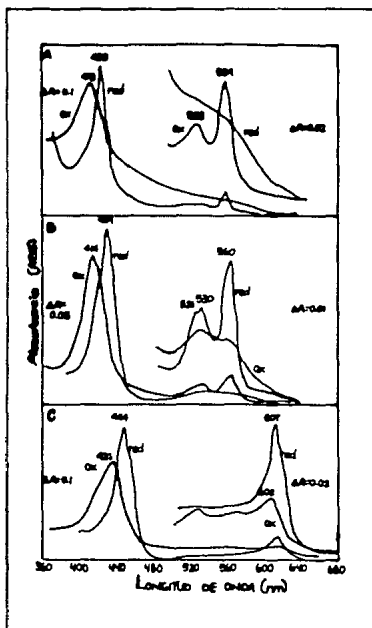


Figura 12. Espectro de absorción de los complejos I (A), II (B) y III (C) mitocondriales de *Neurospora crassa* (Weiss y Kolb, 1979).

4. El Complejo II de Ascaris suum.

Ascaris suum es un nemátodo que vive en el intestino de sus hospederos, por lo que la cantidad de oxígeno de la que dispone no es muy elevada, no obstante lo anterior, presenta respiración aerobia y la presencia de complejo II en sus mitocondrias.

El complejo II de este organismo, cuenta con una subunidad Fp con peso de 68 kDa que contiene flavina como grupo prostético, una subunidad Ip de 26 kDa a la que están asociados los centros Fe-S y dos péptidos hidrofóbicos de tipo hemo b con pesos de 15 y 13.5 kDa (Fig 13).

La composición de aminoácidos de la flavoproteína de esta especie fue analizada por Furushima y col en 1990, encontrando que es muy similar a la de corazón de bovino y E. coli (Tabla II). Por otro lado, los estudios inmunológicos, en los que se realizaron reacciones cruzadas con anticuerpos contra la Fp en E. coli y corazón de bovino, apoyan la similitud que presenta esta subunidad a lo largo de la escala evolutiva. El índice de polaridad calculado para la flavoproteína es otro factor que apoya la similitud entre los diversos organismos (45% para E. coli, 48.3% para A. suum y 44% para corazón de bovino) (Davis y col, 1973; Wood y col, 1981; Furushima y col, 1990). Este valor sugiere que la subunidad Fp no se encuentra embebida en la membrana y que por tanto está accesible a los substratos solubles. La secuencia alrededor del residuo de histidina que une al FAD se encuentra altamente conservada a lo largo de la escala filogenética. Esta subunidad cuenta además con un sitio de unión al AMP, que presenta gran cantidad de residuos conservados en diferentes especies.

Recientemente se clonó y secuenció el ADNc de la subunidad Ip del complejo II del humano, la secuencia de ésta es muy similar a la de corazón de bovino y *E. coli* (Ackrell en prensa).

El complejo II mitocondrial presenta 4 subunidades; en casi todas las especies de las que ha sido aislado, se presenta prácticamente el mismo número de éstas, mientras que para otros complejos mitocondriales, este patrón no se conserva, como ejemplo se encuentran la citocromo oxidasa con 11 subunidades en mitocondria de corazón de bovino y sólo 3 en bacterias y el complejo III, con 11 subunidades en mitocondria y sólo 3 en bacterias (Pennoyer y col, 1988).

La tabla II resume la comparación de las características de la subunidad Fp de varias especies. (Furushima y col, 1988).

Por todo lo anterior, podemos decir que a lo largo de la escala filogenética, el complejo II presenta gran similitud en varios aspectos tales como número de subunidades, grupos prostéticos, actividad enzimática, sensibilidad a inhibidores y composición de aminoácidos; presenta también aminoácidos conservados alrededor del sitio de unión del grupo FAD y un sitio de unión al AMP.

VII. Reconstitución de complejos respiratorios en liposomas.

Los complejos proteicos que participan en el transporte de electrones en la mitocondria, se encuentran parcial o totalmente embebidos en la membrana interna de este orgánulo, lo que habla de la relación que existe entre éstos y los lípidos que constituyen a la membrana.

Tabla II. Comparación de la composición de aminoácidos de la subunidad Fp de organismos distintos (Furushina y col, 1990).

Aminoácido	No. de residuos			
	<u>Ascaris</u>	Corazón	<u>E.coli</u>	<u>E.coli</u>
	<u>suum</u>	bovino	SDH	FRD
Lisina	34.5	26	22	27
Histidina	18.2	17	29	21
Arginina	12.8	41	40	38
Aspártico	54	57	32	35
Asparangina	54	57	25	23
Treonina	39.3	38	33	36
Serina	29.2	37	29	20
Glutámico	52.6	67	43	44
Glutamina	52.6	67	21	22
Prolina	25.6	30	24	22
Glicina	60.9	65	59	66
Alanina	48.4	59	56	61
Valina	28.9	45	41	41
Metionina	6.1	14	15	20
Isoleucina	30.3	31	26	23
Leucina	44.2	55	51	48
Tirosina	13.9	21	14	17
Fenilalanina	19.8	22	19	20
Polaridad	48.3	44	45	44
Peso molecular	68,000	70,000	64,268	65,835

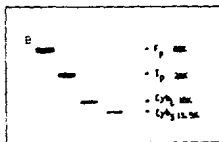


Figura 13. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS de las subunidades del complejo II mitocondrial de A. suum obtenidas por cromatografía de alta resolución (Furushina y col, 1990).

Todas las técnicas de purificación de complejos respiratorios utilizan detergentes o sales de amonio, lo que provoca la extracción parcial o total de los lípidos, (delipidación) y por tanto, la disminución de la actividad y la modificación de algunas de sus propiedades. En el caso particular de los citocromos b mitocondriales, se ha encontrado que sufren una serie de alteraciones cuando son delipidados, aún cuando permanezcan como parte del complejo respiratorio. Las interacciones lípido-proteína no se llevan a cabo directamente con el sitio hemo, pero sí ofrecen efecto estabilizador sobre la conformación nativa del resto del complejo, lo que afecta la geometría del sitio hemo y la función del citocromo. Los estudios realizados por Salerno y col en 1986 indican que estas interacciones son de mayor relevancia funcional para los citocromos b que para los a que constituyen a la citocromo oxidasa.

El efecto de inactivación por delipidación se explica debido a la ubicación que presentan los citocromos, ya que se ha encontrado que los grupos hemo, así como los centros Fe/S de los citocromos tienen una orientación específica con respecto al plano de la membrana; estos grupos prostéticos se unen a dos pares de residuos de histidina que se localizan entre hélices transmembranales. Se ha encontrado también que la simple adición de lípidos a las proteínas aisladas provoca su reactivación. (Racker y col, 1975; Racker, 1979; Salerno y col., 1986).

Lo anterior ha conducido a estudios de reconstitución de estos complejos en sistemas lipídicos, que simulen las condiciones de la membrana en que se encuentra la proteína in vivo para

acercarse al conocimiento de sus propiedades en un ambiente cuyas condiciones están definidas. Las reconstituciones de complejos respiratorios generalmente se realizan al incorporar a éstos en sistemas de liposomas a través de varios métodos, pero el principio general de todos es la purificación de la enzima, la incorporación de ésta a un medio que contenga detergente y liposomas y su diálisis o dilución posterior (Penefski y col, 1960; Kagawa y Racker, 1971; Perlin, 1984; Ramírez y col, 1987).

Se han realizado numerosas reconstituciones de complejos proteicos en diversos sistemas y condiciones y se ha podido encontrar que la reconstitución de cada proteína en un sistema "biológico" requiere de condiciones particulares tales como el pH, la temperatura, la proporción proteína/lípido, el tipo de lípidos, la concentración de sales y de detergentes, etc.

En general, los resultados obtenidos de la reconstitución de complejos mitocondriales en liposomas muestran que el comportamiento de éstos es muy semejante al que presentan las partículas submitocondriales, lo que sugiere que el sistema reconstituido tiene muchas de las características del sistema in vivo (Kagawa y Racker, 1971; Solioz y col, 1982; Perlin y col, 1984; Ramírez y col, 1987; Gabellini y col, 1989).

OBJETIVOS

El interés por conocer la función de los complejos que constituyen la cadena respiratoria, tanto de organismos procariontes como eucariontes, ha llevado a varios grupos de investigación a desarrollar diversos métodos para aislar a cada uno de estos complejos en forma pura y activa.

Los métodos reportados indican que los complejos I y IV se separan con facilidad, mientras que la purificación de los complejos II y III ha sido más difícil, debido a que las preparaciones del complejo II muestran contaminación de algunas subunidades del complejo III y viceversa. Esto ha sugerido que estos dos complejos están unidos tanto estructural como funcionalmente, formando probablemente un supracomplejo en la membrana interna mitocondrial.

El objetivo general en el laboratorio ha sido el de investigar las posibles interacciones, tanto estructurales como funcionales, entre los complejos II y III mitocondriales por medio de reactivos de entrecruzamiento; así como la reconstitución del transporte de electrones llevado a cabo por estos complejos incorporados en sistemas de liposomas. Para esto se debe contar con ambos complejos puros y activos. En el laboratorio se ha establecido un método para la obtención del complejo III con un grado de pureza, rendimiento y actividad altos. Sin embargo, era necesario desarrollar un método (con las mismas características que el anterior), para aislar al complejo II mitocondrial, ya que los rendimientos y las actividades obtenidos con los métodos reportados en la literatura son muy bajos.

Por lo anterior, para la realización del presente trabajo de tesis se plantearon los siguientes objetivos:

1. Aislamiento del complejo II mitocondrial (Succinato-coenzima Q óxido-reductasa) puro y activo.
2. Caracterización del complejo II mitocondrial por medio de espectros de absorción y mediciones de actividad enzimática.
3. Reconstitución del transporte de electrones desde el succinato hasta el citocromo c en un sistema con los complejos II y III mitocondriales incorporados en liposomas.

MATERIALES Y METODOS

I. AISLAMIENTO DEL COMPLEJO II MITOCONDRIAL.

La primera fase del presente trabajo consistió en el aislamiento del complejo II mitocondrial a partir de la reproducción de varias técnicas reportadas y la modificación de algunas de ellas, para obtener finalmente una enzima purificada a través de una técnica nueva montada en el laboratorio como resultado de la fusión de los métodos propuestos por Kita y col, 1989; Ljungdahl y col, 1987 y Yu y Yu, 1982.

1. OBTENCION DE MITOCONDRIAS (L6w y Vallin, 1963).

Para realizar la obtención de mitocondrias se requirió preparar dos amortiguadores:

Amortiguador 1:	Sacarosa	250 mM	
	Tris	5 mM	Ajustado a pH 7.5 con HCl
	EDTA	2 mM	

Amortiguador 2:	Sacarosa	250 mM	
	Tris	5 mM	Ajustado a pH 7.5 con HCl

Para llevar a cabo la obtención de mitocondrias, se utilizaron corazones frescos de bovino. Cada corazón se limpió de tejido graso, se trató de dejar sólo el músculo, el cuál se cortó en trozos pequeños que se molieron en un molino manual de carne.

El tejido cardíaco, ya molido, se colocó en vasos de precipitado de 4 litros a los que se adicionó amortiguador 1 (1,200 ml por cada 400 g de carne) y se le ajustó el pH a 7.5 con Tris saturado, una vez ajustado el pH se procedió a homogenizar la mezcla en una licuadora (Waring Commercial Blendor) en pulsos de 6 segundos por 5 segundos de descanso hasta completar 10

segundos de licuado, ajustando nuevamente el pH a 7.5.

La mezcla licuada se centrifugó durante 10 minutos a 3,000 rpm en el rotor GS-3, en una centrifuga Sorvall RC2-B. El sobrenadante obtenido de esta centrifugación, se filtró a través de una doble capa de gasa y se centrifugó 10 minutos a 10,000 rpm en el rotor GSA. El sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió en amortiguador 2 con un pincel, posteriormente se homogenizó en un homogenizador de teflón-vidrio de 50 ml. El homogenizado se centrifugó 10 minutos a 3,000 rpm en el rotor GSA y el sobrenadante resultante se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm durante 10 minutos en el mismo rotor. El último sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió en un volumen pequeño de amortiguador 2 con un pincel. Las mitocondrias obtenidas de esta forma se guardaron a -70°C hasta su utilización.

Todos los procedimientos anteriores se llevaron a cabo a 4°C.

2. PURIFICACION DEL COMPLEJO II POR EL METODO DE Ziegler y Rieske, 1967.

Para establecer el método de purificación del Complejo II, se siguieron los procedimientos descritos por Ziegler y Rieske, 1967 y por Hatefi y Stigall, 1978.

Las mitocondrias obtenidas por la técnica antes mencionada, se trataron con succinato de sodio 0.5 mM final y cloruro de calcio 10 μ m final con la finalidad de activarlas por el desplazamiento del oxaloacetato que se encuentra pegado al complejo II. A la muestra activada se le adicionó fosfato de potasio 1M (pH 7.4) (40 ml/100 ml de suspensión). La mezcla diluida se pasó por un homogenizador de vidrio-teflón y se ajustó la concentración de

proteína a 70 mg/ml con sacarosa 0.25 M, se procedió a incubar durante 15 minutos a 38°C. Posteriormente, se adicionó colato de potasio al 20% (pH 8.0) (0.6 mg/mg proteína) y se prosiguió la incubación por 15 minutos más.

La muestra se fraccionó con sulfato de amonio, que se adicionó poco a poco, 16.4 g por cada 100 ml de muestra incubada y se agitó en frío hasta su disolución total. Se centrifugó a 30,000 rpm durante 30 minutos en un rotor 60 Ti en una ultracentrífuga Beckman L8-55M. El sobrenadante de esta centrifugación se trató con 5.6 g/100ml de sulfato de amonio y se centrifugó de la forma antes mencionada. El precipitado se lavó con sacarosa 0.25 M, se resuspendió en la misma solución hasta una concentración de 85 mg/ml de proteína y se dializó en frío durante 5 horas contra 500 ml de amortiguador de fosfato de potasio 10 mM, sacarosa 0.25 M (pH 7.4), con 2 cambios de amortiguador (1 y 3 horas).

La extracción del solvente se llevó a cabo con la adición a la muestra dializada de 0.75mg/mg prot de desoxicolato de potasio al 10% (pH 8.0 a 9.0). A la muestra solubilizada se le ajustó el pH a 7.4 con HCl 1 N y se adicionaron 46 ml de etanol frío (enfriado en un baño de hielo seco-etanol) por cada 100 ml de muestra, se cuidó que la temperatura no subiera por arriba de 2°C. La mezcla se centrifugó durante 30 minutos a 30,000 rpm utilizando un rotor 60 Ti. El sobrenadante se homogenizó con un volumen igual de ciclohexano frío y se centrifugó durante 45 minutos a 30,000 rpm en el mismo rotor que en las precipitaciones anteriores.

La remoción del detergente y del sulfato de amonio, así como el aislamiento del complejo II se llevaron a cabo al filtrar el

sobrenadante obtenido de la última centrifugación a través de una columna de Sephadex G-25 equilibrada y eluida con amortiguador de fosfato de potasio 20 mM (pH 7.4). Las fracciones colectadas se centrifugaron durante 1 a 2 horas a 40,000 rpm en el rotor 60 Ti. El precipitado de esta centrifugación contenía al complejo II, que se resuspendió en amortiguador de fosfatos 20 mM (pH 7.4) y se guardó a -70°C.

PURIFICACION DEL COMPLEJO II POR EL METODO DESCRITO POR Mowery y col, 1977.

El siguiente método de purificación del complejo II que se probó fue el propuesto por Mowery y col en 1977, que consistió básicamente en una serie de modificaciones a la técnica propuesta por Hatefi y Stigall, 1978 descrita previamente.

Las modificaciones que presenta este método son las siguientes: las mitocondrias se resuspendieron hasta una concentración de 55 mg/ml en lugar de 70 mg/ml. La precipitación con sulfato de amonio se llevó hasta 43% de saturación, en lugar de 40% de la técnica antes mencionada. Para realizar la precipitación con alcohol, se adicionaron 44 ml en vez de 46 por cada 100 ml de muestra.

PURIFICACION DEL COMPLEJO II MEDIANTE CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO (Ljungdahl y col, 1987).

En 1987, Ljungdahl y colaboradores desarrollaron un método para aislar el complejo III mitocondrial de varias especies (Rhodobacter sphaeroides, Rhodobacter capsulatus, corazón de bovino y levadura) con alto grado de pureza y actividades altas.

Este método consistió en el tratamiento del complejo II

(parcialmente purificado con detergentes aniónicos y precipitaciones secuenciales con sulfato y acetato de amonio previamente descritas) con un detergente sintético no iónico (0.5 mg de dodecil β maltósido/mg de proteína) que había probado ser eficaz en la extracción de complejos proteicos membranales (Van Aken y col, 1986; Rosevear y col, 1980). El complejo II obtenido antes de la precipitación con alcohol (metodología previamente descrita) se solubilizó adicionando 0.3 mg de lauril maltósido/mg de proteína y se centrifugó durante 10 min a 30,000 rpm en un rotor 50 Ti. El sobrenadante se cargó a una columna de intercambio aniónico (DEAE Biogel-A) con 7 ml de resina, que había sido equilibrada previamente con Tris 50 mM, sulfato de magnesio 1 mM y lauril maltósido 1 mg/ml (pH 8.0). La columna con la muestra se lavó con dos volúmenes de este amortiguador y posteriormente se hizo pasar un gradiente de 0 a 300 mM de NaCl (dos volúmenes de columna en el mismo amortiguador). Al terminar el gradiente, se lavó la columna con un volumen adicional del amortiguador que contenía 300 mM de NaCl. Se colectaron fracciones de 1 ml y se obtuvo el perfil de elución al leer la absorbancia (ABS) de las muestras a 280 y a 415 nm para estimar la cantidad de proteína y de citocromos respectivamente (Ljungdahl y col, 1987).

Se probaron distintas concentraciones de lauril maltósido (0, 0.05, 0.1, 0.2 y 0.3 mg det/mg de prot) según el método antes mencionado con la finalidad de purificar el complejo sin desnaturalizar y obtener el mejor rendimiento posible.

PURIFICACION DE COMPLEJO II A PARTIR DE COMPLEJO II-III.

La siguiente fase en la purificación del complejo consistió en seguir el método propuesto por Yu y Yu en 1982 para obtener una preparación de Complejo II-III.

Para llevar a cabo la purificación del complejo II mitocondrial a partir del supracomplejo II-III, se introdujo a esta técnica la obtención de partículas submitocondriales, con la finalidad de partir de una preparación más pura.

Preparación de partículas submitocondriales (Lee y Ernster, 1967).

Para preparar partículas submitocondriales, primero se descongelaron las mitocondrias obtenidas con la técnica mencionada en la página 34. Se cuantificó la concentración de proteína presente en éstas, con el método del Biuret (Garnall y col, 1949) y se llevó la concentración hasta 20 mg/ml con amortiguador de fosfato de potasio 100 mM (pH 7.8). Las mitocondrias diluidas, se sonicaron en un baño de hielo, en 5 pulsos de 45 segundos por 15 de descanso por cada 50 ml (en un sonicador Branson 250 a 20 watts). La mezcla sonicada se centrifugó 15 minutos a 15,000 rpm en el rotor 60 Ti utilizando la ultracentrífuga Beckman L8-55M. El sobrenadante obtenido, se centrifugó nuevamente a 45,000 rpm durante 45 minutos en el rotor 60 Ti. El precipitado pardo resultante, se resuspendió en amortiguador de fosfato de potasio 100 mM con un pincel y se guardó a -70°C.

Preparación de complejo II-III crudo.

Las partículas submitocondriales se descongelaron y se les

cuantificó proteína por el método del Biuret (Garnall y col, 1949). La concentración de proteína se ajustó a 20 mg/ml con amortiguador de fosfato de potasio 100 mM (pH 7.8). Una vez ajustada la concentración de proteína se solubilizó con colato de potasio al 20%, con la adición de 4 ml de colato por cada 100 ml de suspensión. Al solubilizado se le agregó succinato de sodio 1 M (pH 7.4) (20 µl/ml) y se incubó 30 minutos a 37°C en agitación.

Posteriormente, la muestra se incubó en un baño de hielo y se precipitó con sulfato de amonio al 15% de saturación, se agregaron 19.65 g de sulfato por cada 100 ml de suspensión y se dejó reposar 60 minutos en frío. La suspensión anterior se centrifugó 90 minutos a 12,000 rpm en el rotor 60 Ti. El sobrenadante rojo obtenido de este paso, se precipitó con sulfato de amonio al 50% de saturación, al adicionar 8.9 g de esta sal por cada 100 ml de suspensión, se dejó reposar 15 minutos en frío y se centrifugó por 20 minutos a 14,000 rpm. El precipitado se resuspendió en amortiguador de fosfato de potasio 50 mM, 0.5% de colato de sodio y 1 mM de EDTA de potasio (pH 7.4) y se centrifugó 40 minutos a 30,000 rpm. El sobrenadante de la última centrifugación, que es el complejo II-III, se dializó contra 500 ml de amortiguador de fosfato de potasio 1 mM y EDTA de potasio (pH 7.4), durante toda la noche con dos cambios de amortiguador.

Preparación de Complejo II-III puro.

El complejo II-III crudo obtenido de la fase anterior de purificación, se centrifugó a 20,000 rpm durante una hora en el rotor 50 Ti y se obtuvo un botón rojo que se resuspendió con un

píncel en el mínimo volumen posible de Tris-HCl 50 mM, Sacarosa 0.67 M (pH 7.8). Una vez cuantificada la proteína por Biuret, se diluyó la muestra hasta una concentración de 20 mg/ml con el mismo amortiguador utilizado para resuspenderla.

El paso siguiente consistió en la solubilización de la proteína con desoxicolato de potasio al 10%, se añadieron 0.5 mg de detergente por cada mililitro de suspensión; este solubilizado se incubó durante 20 minutos a 0°C. Se procedió a realizar precipitaciones secuenciales de la proteína presente en el solubilizado con fracciones de 0 a 8, 8 a 13, 13 a 15 y 15 a 16% de saturación de acetato de amonio. Para llevar a cabo lo anterior, se adicionaron las siguientes cantidades de acetato de amonio líquido, al 50% de saturación, a los distintos sobrenadantes:

Fracción 0-8%	8.69 ml por cada 100 ml de sobrenadante.
Fracción 8-13%	5.74 " " " " " " "
Fracción 13-15%	2.35 " " " " " " "
Fracción 15-16%	1.19 " " " " " " "

Todas las precipitaciones se realizaron colocando el sobrenadante obtenido de la centrifugación anterior en un baño de hielo en agitación y se agregó gota a gota el volumen correspondiente de acetato. Una vez concluido ésto, se dejó reposar la suspensión durante 15 minutos a 0°C y se procedió a centrifugar durante 20 minutos a 20,000 rpm en el rotor 50 Ti.

La última fase de la precipitación secuencial correspondió a la fracción 16 a 33.5% de saturación de acetato de amonio, la cuál se completó al agregar gota a gota 26.31 ml de una solución al

50% de acetato de amonio por cada 100 ml de sobrenadante. La suspensión se dejó reposar 15 minutos a 0°C, al cabo de los cuales se centrifugó a 35.000 rpm durante 30 minutos en el mismo rotor.

El precipitado de cada una de las fracciones se resuspendió en amortiguador de fosfato de potasio 50 mM, sacarosa 0.25 M (pH 7.4) y se dializó independientemente contra 500 ml del mismo amortiguador con dos cambios durante toda la noche.

El complejo II-III puro se obtuvo en la fracción 8-13% de saturación de acetato de amonio y se guardó a -70°C.

Se realizó toda la serie de precipitaciones con acetato de amonio con la finalidad de conocer en cuál de ellas se obtendría el complejo, ya que se partió de una preparación mas pura (PSM) que la reportada para ésta técnica.

Todos los procedimientos de purificación del complejo II-III se llevaron a cabo a 4°C, con excepción de los pasos en que se especifica un cambio de temperatura.

PURIFICACION DEL COMPLEJO II POR UNA NUEVA TECNICA.

La fase final de purificación del complejo II mitocondrial consistió en la unión de varias técnicas. A la técnica de purificación del complejo II-III (Yu y Yu, 1982) se le introdujo el tratamiento de este supracomplejo II-III con Lubrol PX (Kita y col, 1989) y su cromatografía posterior en una resina de intercambio iónico (DEAE BioGel A) descrita por Ljungdahl y col (1987).

A partir del complejo II-III obtenido de la manera antes mencionada, se purificó el complejo II mitocondrial cono se

describe a continuación:

En primer lugar, se determinó la concentración de proteína del complejo II-III de acuerdo al método de Lowry (Lowry y col, 1951 con las modificaciones realizadas por Markwell y col, 1978) y se ajustó a una concentración final de 10 mg/ml con un amortiguador que contenía fosfato de potasio 50 mM y sacarosa 0.25 M (pH 7.4). Una vez ajustada la concentración de proteína, el complejo II-III se solubilizó durante 10 minutos con 0.2 mg/mg prot de lauril maltósido o con 1% final de Lubrol PX con o sin la adición de Ubiquinona-10 (UQ10) (0.1 mg/mg de proteína) y asolectina (0.5 mg/mg de proteína), incubándose en agitación durante 1 hora a 4°C. La muestra incubada, se centrifugó a 32,000 rpm durante 10 minutos en un rotor TLA 100.3 en la ultracentrífuga Beckman TL 100. El sobrenadante obtenido de la centrifugación se diluyó 1:2 con amortiguador de Tris 20 mM, lauril maltósido 0.3 mg/mg prot, PMSF 2mM o con Tris 20 mM, Lubrol PX 0.1%, PMSF 2 mM (pH 7.4), según el detergente utilizado durante la solubilización. Posteriormente se cargó a una columna Econocolumn BioRad que contenía 7 ml de una resina de intercambio aniónico (DEAE BioGel A de BioRad), equilibrada con el mismo amortiguador utilizado para diluir la muestra y se colectaron fracciones de 1 ml. Una vez cargada la muestra, se lavó con dos volúmenes del amortiguador utilizado para equilibrar y se procedió a realizar un gradiente de 0 a 150 mM de NaCl en 4 volúmenes del amortiguador original en un formador de gradientes, serie SG de Hoeffer Scientific Instruments, de 30 mililitros. Al concluir el gradiente, se lavó la columna con dos volúmenes de amortiguador

Tris 20 mM, (Lubrol 0.1% o lauril maltósido 1 mg/ml), PMSF 2 mM, NaCl 150 mM (pH 7.4). Se corrió un nuevo gradiente de 150 a 400 mM de NaCl de la manera antes mencionada y se procedió a lavar la columna con dos volúmenes de amortiguador con 400 mM de NaCl.

A todas las fracciones colectadas se les determinó absorbancia a 280 y 415 nm para obtener el perfil de elución. Las fracciones correspondientes a los picos de interés se concentraron en una cámara de ultrafiltración Amicon de 10 ml con una membrana Diaflo YM 30 y se guardaron a -70°C. Al concentrado se le determinó proteína (Markwell y col, 1978) así como actividad (Hatefi y Stigall, 1978; Ziegler y Rieske, 1967) y se analizó por medio de geles de poliacrilamida en presencia de SDS (Schägger y von Jagow, 1987).

II. CARACTERIZACION DEL COMPLEJO II MITOCONDRIAL.

1. ACTIVIDAD.

El complejo II mitocondrial cataliza la reducción de ubiquinonas, ferricianuro y dicloro-fenol-indofenol (DCIP) por succinato. La actividad reductora de quinona se mide indirectamente, al seguir la reducción de DCIP mediada por metasulfato de fenanzina (PMS). Esta actividad es sensible a la tenoil-trifluoro-acetona (TTFA) (Hatefi y Stigall, 1978).

Reactivos.

- Fosfato de potasio 1 M (pH 7.4)
- Succinato de sodio 1 M (pH 7.4)
- EDTA 0.01 M (pH 7.3)
- 2,6-Dicloroindofenol (DCIP) 4.65 mM (1.35 mg/ml)
- Ubiquinona-10 2.5 mM en etanol
- Albúmina sérica de bovino 1% (w/v)
- Metasulfato de fenanzina (PMS) 65 mM (20 mg/ml)
- Tenoil-trifluoro-acetona 0.1 M en etanol

- Complejo II en Fosfatos 50 mM, Sacarosa 0.25 mM (pH 7.4).

Las mediciones de actividad se realizaron como se menciona a continuación:

A una celda de cuarzo se adicionaron 200 μ l de amortiguador de fosfatos, 100 μ l de albúmina, 40 μ l de succinato, 20 μ l de EDTA y 1608 μ l de agua, esta mezcla se incubó durante 10 minutos a 37°C. La enzima se incubó con 20 mM de succinato durante 10 minutos a 37°C. Una vez incubada la mezcla de reacción se le adicionaron 16 μ l de DCIP y 25 μ l de PMS, se agitó y se colocó en la cámara para celdas del espectrofotómetro, Aminco DW 2a UV/VIS, que se mantuvo a 37°C por medio de un baño de circulación continua de agua, Brinkman RC6 Lauda, se trazó la basal con esta muestra. Realizado lo anterior, se adicionó la enzima y se siguió el cambio de densidad óptica a 600 nm. El tiempo total de medición de actividad fue de 150 segundos.

De cada trazo de actividad, sólo se consideró la sección lineal de éste y se determinó la pendiente en 10 seg. El coeficiente de extinción utilizado para la reducción de DCIP fue de $21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 600 nm (Hatefi y Stigall, 1978).

Se realizaron curvas de titulación de proteína por incubación 1, 5, 10 y 20 μ g de enzima con 20 mM de succinato de sodio y se adicionó cada concentración al ensayo previamente mencionado.

Para elaborar la tabla de rendimiento de la purificación, se llevaron a cabo mediciones de actividad con 10, 20 y 40 μ l de mitocondrias, partículas submitocondriales, complejo II-III crudo, complejo II-III puro y de complejo II purificado según el método anterior.

Con la finalidad de encontrar la temperatura y tiempo óptimos

de incubación del complejo II puro, se realizaron curvas de cada uno de estos factores, al probar 5 y 10 min de incubación a 4, 20 y 37°C con la adición de concentraciones crecientes de enzima (1, 5, 10 y 20 µg).

2. DETERMINACION DEL ESPECTRO DE ABSORCION DEL COMPLEJO II MITOCONDRIAL.

Reactivos

- Amortiguador de fosfato de potasio 50 mM (pH 7.4)
- Ascorbato de sodio 1 M
- TMPD 10 mM
- Ditionita de sodio en polvo
- Complejo II puro 3.5 mg/ml

Para realizar la determinación del espectro del complejo II se colocaron 500 µl de amortiguador de fosfatos en una celda de cuarzo de 500 µl, se leyó esta muestra contra aire en un espectrofotómetro, UV/VIS Beckman DU50, y se realizó un barrido de longitud de onda desde 350 hasta 700 nm. Se retiraron 175 µl de amortiguador y se adicionó esta cantidad de complejo II puro (dilución 1:3.5), se realizó la lectura dentro del mismo intervalo y se obtuvo de esta forma el espectro oxidado. Una vez realizado lo anterior, se llevó a cabo la reducción del complejo II al adicionar 2.5 µl de ascorbato de sodio (concentración final 5mM) y leer nuevamente la absorbancia. Se adicionaron 5 µl de TMPD (concentración final 100 µM) a la muestra anterior y se midió nuevamente la ABS. La fase final consistió en reducir completamente al complejo al adicionar un poco de ditionita en polvo, la absorbancia se midió de 280 nm a 750 nm y de esta forma se obtuvo el espectro completamente reducido de este complejo.

III. RECONSTITUCION DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES EN UN SISTEMA DE LIPOSOMAS.

La reconstitución del transporte de electrones desde el succinato hasta el citocromo c, vía los complejos II y III mitocondriales, se realizó en tres etapas:

1. Preparación de los liposomas.

Para constituir los liposomas, se adicionaron 350 ug de ubiquinona 10 a 14 mg de fosfatidil colina en ciclohexano, 4 mg de cardiolipina en etanol y 2 mg de fosfatidil-etanol-amina en cloroformo, se evaporó el disolvente y se resuspendió la mezcla en fosfato de potasio 50 mM, EDTA 1 mM (pH 7.2). Una vez resuspendida, se sonicó 4 pulsos de 15 segundos por 15 segundos de descanso a 20 watts en un sonicador Branson 250.

2. Incorporación de los complejos II y III mitocondriales aislados a los liposomas.

A 500 ul de la suspensión de liposomas se le adicionaron 250 ug de complejo II, 250 µg de complejo III (ambos purificados en el laboratorio) y desoxicolato de potasio (0.3% final), llevándose el volumen a 1 ml. La muestra anterior, se homogenizó con un agitador tipo Vortex durante 1 minuto y se aplicó a una columna de Biogel P10 previamente equilibrada con fosfato de potasio 50 mM, EDTA 0.1 mM (pH 7.2) a un flujo de 1 ml/min. Se colectaron fracciones de 2 ml. La primera fracción con liposomas se diluyó 40 veces con amortiguador de fosfato de potasio 50 mM para eliminar todo lo que no se incorporó a los liposomas y se centrifugó 45 minutos a 40,000 rpm en el rotor 60 T1. El sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió en un volumen final de 500 µl de fosfato de potasio 50 mM (pH 7.2).

3. Medición de la actividad de transporte de electrones.

Una vez lograda la incorporación de los complejos mitocondriales II y III en los liposomas, se determinó su actividad desde el succinato hasta el citocromo c. El transporte de electrones se determinó espectrofotométricamente al seguir la reducción del citocromo c a 550/540 nm en el espectrofotómetro de doble rayo Aminco DW 2a UV/VIS (modo dual).

Reactivos

- Fosfato de potasio 50 mM (pH 7.2)
- Succinato de sodio 1 M
- Liposomas
- Citocromo c de caballo 2 mM
- Antimicina 10 ug/ml
- Desoxicolato de potasio al 10%
- Tenoil-trifluoro-acetona 0.1 M en etanol.

En una celda de cuarzo se colocaron 2 ml de fosfato de potasio 50 mM (pH 7.2), 10 µl de succinato de sodio 1 M y 25 µl de liposomas y se incubaron a 37°C durante 5 minutos. Una vez incubada la muestra, se trazó la basal (para comprobar que no existía reducción química) y se inició la reacción con 30 µl de citocromo c de caballo oxidado. La reducción del citocromo c se siguió por el cambio de densidad óptica a 540-550 nm en un espectrofotómetro UV/VIS AMINCO DW 2a.

La inhibición del transporte de electrones se midió al agregar al ensayo 10 µl de antimicina (inhibidor específico del complejo III) o 5 µl de TTFA (inhibidor específico del complejo II). Una tercera forma de detener el transporte de electrones fue adicionar 20 µl de desoxicolato de potasio (concentración final 0.1%).

Determinación de Proteína.

Las determinaciones de proteína se llevaron a cabo de acuerdo al método del Biuret (Garnall y col, 1949) y Lowry (Lowry y col, 1951) con las modificaciones realizadas por Markwell y col en 1978 en donde introduce la utilización de dodecil sulfato de sodio (SDS) para solubilizar proteínas de membrana y evitar la la interferencia de otros detergentes, utilizando albúmina sérica de bovino como estándar.

Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.

La electroforesis se realizó de acuerdo al método de Schägger y von Jagow (1987) que resuelve eficientemente proteínas con pesos moleculares menores a 100 kDa. La separación se llevó a cabo con dos concentraciones distintas de acrilamida. El gel separador contenía 16% de acrilamida y el de muestra 4%, las muestras se digirieron con una mezcla de SDS, Tris, glicerol, azul de Coomasie G y B mercapto-etanol. Una vez digeridas las muestras se cargaron al gel y se corrieron a 100 volts durante toda la noche. Terminada la electroforesis, los geles se fijaron, tñeron y destñeron hasta que las bandas de interés se observaron con claridad (Schagger y von Jagow, 1987). Se realizaron también tinciones de plata de acuerdo al método descrito por Oakley y col (1980).

RESULTADOS

Los resultados que se presentan en este trabajo incluyen un compendio de varios métodos de purificación del complejo II mitocondrial reportados, así como una serie de modificaciones realizadas a dichas técnicas, que condujeron a establecer una nueva técnica de aislamiento del complejo.

El primer objetivo planteado para la realización del trabajo consistió en la purificación del complejo II mitocondrial con un alto grado de pureza y de forma activa. Para llevar a cabo lo anterior, primero se siguieron diversas técnicas de purificación de esta proteína ya reportadas en la literatura.

La primera de ellas fue la propuesta por Ziegler y Rieske (1967) que consistió básicamente en la solubilización de las mitocondrias con colato de potasio y precipitaciones diferenciales con sulfato de amonio, para posteriormente precipitar la proteína con etanol, centrifugarla y homogenizar el sobrenadante con ciclohexano. Las precipitaciones con solventes orgánicos mostraron ser irreproducibles, ya que produjeron rendimientos bajos tanto de la proteína como de su actividad. Por lo anterior, se omitieron estos pasos y se cargó directamente la proteína obtenida por la metodología anterior, a una columna de filtración en gel (Sephadex G-25) de la que se obtuvo el perfil de elución que muestra la figura 14a. Se juntaron las fracciones 11 a 15, y se les determinó actividad, obteniéndose un valor para la actividad específica de $0.772 \mu\text{molas DCIP red/min/mg prot.}$ La figura 14b muestra el patrón electroforético de la proteína obtenida por esta técnica (en el carril 6), el cuál presenta un enriquecimiento en la banda de 70 kDa, sin embargo, se presentan

7 bandas contaminantes.

El rendimiento de la purificación por este método fue bajo, ya que a partir de 1269 mg totales de proteína, se obtuvieron 6.04 mg de enzima parcialmente purificada, lo que representa un rendimiento de la purificación de 0.47%.

El siguiente intento por aislar el complejo II lo constituyeron las modificaciones realizadas por Mowery y col en 1977 a la técnica de Rieske previamente mencionada. Los resultados de esta técnica fueron prácticamente los mismos que con la técnica anterior, la homogenización con ciclohexano de esta técnica tampoco se realizó. La figura 15 muestra el patrón electroforético del complejo II obtenido por esta técnica.

La siguiente fase en el proceso de purificación del complejo II la constituyó la introducción de una columna de intercambio iónico (DEAE Biogel-A). Con este fin, se aisló el complejo II de acuerdo con la técnica de Rieske (1967) hasta antes de la precipitación con etanol, es decir, al solubilizar la proteína con colato de potasio y precipitarla con sulfato de amonio. La muestra anterior se trató con 0.3 mg de lauril maltósido/mg de proteína y se cargó a la columna de intercambio iónico, lo que permitió obtener el perfil de elución y el patrón electroforético que se muestran en la figura 16. El gradiente utilizado para eluir esta proteína fue de 0 a 300 mM de NaCl de acuerdo con lo reportado por Ljungdahl y col (1987).

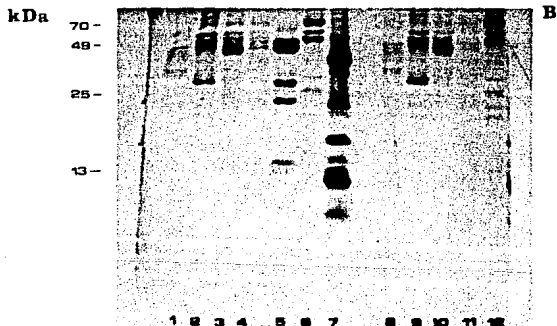
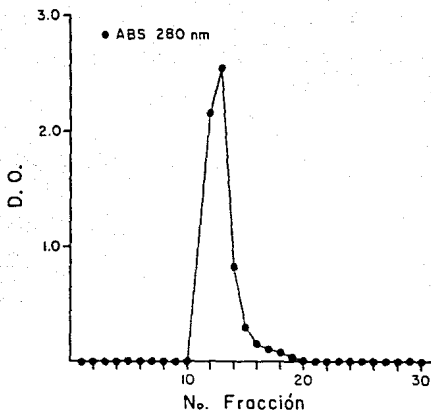


Figura 14. Perfil de elución del complejo II de una columna de filtración, en gel (Sephadex G-25) (A). Patrón electroforético (B) en geles de poliacrilamida al 16% en presencia de SDS de las fracciones obtenidas durante la purificación del complejo II según la técnica de Ziegler y Rieske, 1967: 1) y 8) sobrenadante de la precipitación al 23.5%, 2) y 9) pp de la misma fracción, 3) y 10) sobrenadante de la fracción 56% de saturación con sulfato de amonio, 4) y 11) precipitado de la misma fracción, 5) bc_1 , 6) y 12) fracciones 11 a 15 obtenidas de la columna y 7) citocromo oxidasa.

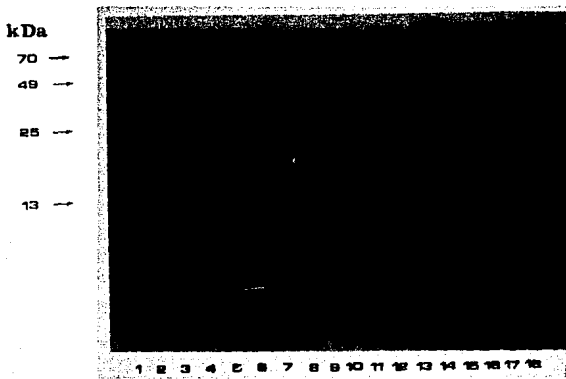


Figura 15. Patrón electroforético en geles de poliacrilamida al 16% en presencia de SDS del concentrado de las fracciones obtenidas de la cromatografía en Sephadex G-25 (1) de acuerdo al método descrito por Mowery y col (1977) (carriles nones). Los carriles pares contienen complejo bc_1 como marcador de peso molecular.

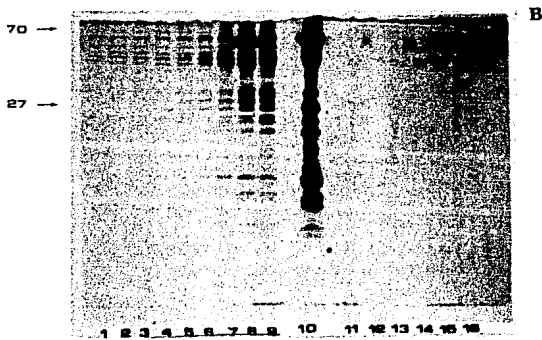
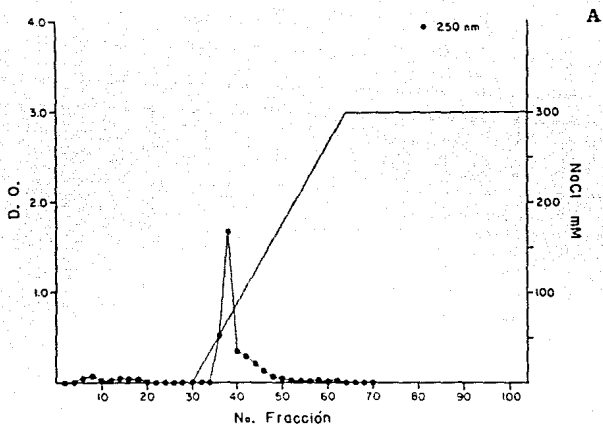


Figura 16. Aislamiento del complejo II (Ziegler y Rieske, 1967 y Ljungdahl y col, 1987). Perfil de elución del complejo II mitocondrial (A), eluido de una columna DEAE-Biogel A con 0.3 mg lauril maltósido/mg prot y un gradiente de NaCl de 0 a 300 mM. (B) Patrón electroforético en geles de poliacrilamida-SDS al 16% del complejo II obtenido de la cromatografía anterior, los carriles 1 a 9 contienen las fracciones 44 a 36 y los carriles 11 a 16 las fracciones 10 a 5 y el carril 10 contiene 20 μ g de bc_1 .

El complejo II obtenido por esta técnica mostró también contaminación por algunas de las subunidades del complejo III. Probablemente este último complejo se disgregó debido a la concentración relativamente alta de detergente utilizado en la solubilización. La presencia de las subunidades del complejo III como contaminantes se confirmó por medio de inmunotransferencias de el complejo II obtenido de la cromatografía, con anticuerpos específicos contra las subunidades I, II, Fe-S, b, c₁ y VI del complejo III (resultados no mostrados).

Para solucionar el problema anterior, se probaron concentraciones menores de lauril maltósido (0, 0.05, 0.1, 0.2 y 0.3 mg det/mg prot) y se cambiaron las condiciones de elución, ya que se pensó que un gradiente discontinuo en dos secciones (0 a 150 y 150 a 400 mM de NaCl) permitiría separar mejor al complejo II del III, ya que éstos eluyen en condiciones distintas de fuerza iónica: el complejo II lo hace a concentración baja y el III a concentraciones mayores de NaCl. Del experimento anterior realizado en columnas pequeñas de DEAE-Biogel A (2.5 ml), se obtuvieron los perfiles de elución comparativos de la figura 17, donde se observa que un incremento en la concentración de detergente, permite una mayor unión de la proteína a la resina, así como la obtención de picos mayores de proteína correspondiente a los complejos II y III al eluir con las sales. El mejor perfil de elución obtenido fue el de 0.3 mg det/mg prot (ya que el pico correspondiente al complejo II es el más grande), sin embargo, dicha concentración aún disocia a las subunidades del complejo III (resultados no mostrados) por lo que se decidió incubar las preparaciones subsecuentes con 0.2 mg det/mg prot.

PERFILES DE ELUCIÓN DE LA SUCCINATO DESHIDROGENASA ELUIDA DE UNA
COLUMNA DEAE-BIOGEL CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LAURIL MALTOSIDO

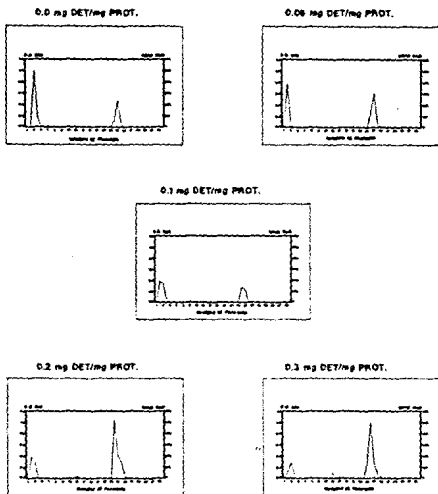


Figura 17. Perfil de elución comparativo del complejo II solubilizado con diferentes concentraciones de lauril maltosido y eluido de columnas DEAE BioGel-A con gradientes de NaCl de 0 a 150 mM.

El perfil de elución, así como el patrón electroforético del complejo II obtenido con 0.2 mg de lauril maltósido se presentan en la figura 18. El valor de actividad obtenido para el complejo II purificado por esta técnica fue de 0.4 μ moles DCIP red/min/mg prot. Por lo tanto, el grado de pureza que se obtuvo al combinar las técnicas de Ziegler y Rieske (1967) y Ljungdahl y col (1987) fue bastante alto, ya que se presentó muy enriquecida la subunidad de 70 kDa y menor cantidad de bandas contaminantes. Sin embargo, los valores de actividad encontrados para esta preparación fueron relativamente bajos.

Con la finalidad de obtener valores más altos de actividad, se utilizó la técnica reportada por Yu y Yu (1982) para la obtención del complejo II-III. A esta técnica se le introdujo la obtención de partículas submitocondriales y se llevó a cabo en dos etapas: 1) la preparación del supracomplejo II-III crudo, que consiste básicamente en activar las partículas submitocondriales con succinato de sodio y precipitarlas secuencialmente con sulfato de amonio y 2) la preparación de supracomplejo II-III puro que implica la solubilización de la proteína obtenida de la fase anterior con desoxicolato y la precipitación secuencial de ésta con acetato de amonio. El gel de la figura 19 muestra que la fracción 8 a 13 $\frac{1}{2}$ de acetato de amonio presenta mayor enriquecimiento en el complejo II, evidente por la presencia de las subunidades mayores de éste (70 y 27 kDa). El resto de las fracciones contenía muy baja concentración de proteína, por lo que no se consideraron para continuar con la purificación.

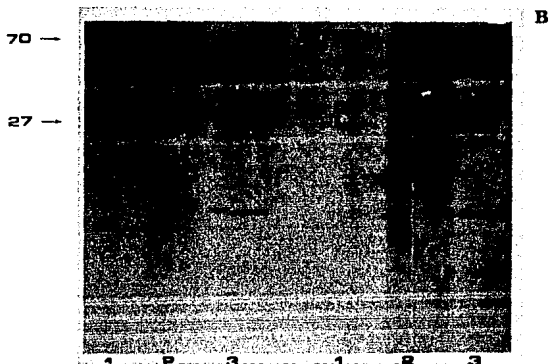
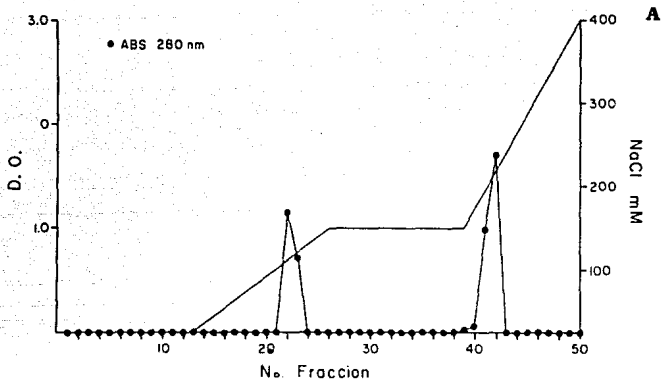


Figura 18. Aislamiento del complejo II. (Ziegler y Rieske, 1967 y Ljungdahl y col, 1987). Perfil de elución (A) de los complejos II y III solubilizados con 0.2 mg de lauril maltósido/mg prot y eluidos de una columna DEAE Biogel-A con gradientes de NaCl de 0 a 150 y 150 a 400 mM. (B) Patrón electroforético en gels de poliacrilamida-SDS al 16% de los complejos aislados: 1) complejo II (fracciones 21 y 22) (20 µg), 2) complejo III (fracciones 41 y 42) (20 µg) y 3) bc_1 (20 µg).

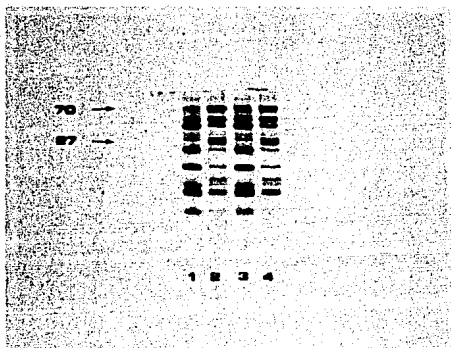


Figura 19. Purificación del supracomplejo II-III (Yu y Yu, 1982). Precipitaciones secuenciales con acetato de amonio: 1) y 3) fracción 0 a 8%, 2) y 4) fracción 8 a 13%.

La fase siguiente consistió en incubar el supracomplejo II-III con distintas concentraciones de lubrol PX, CHAPS y de lauril maltósido en un ensayo comparativo, ya que se pensó que el detergente podía ser el causante de la inactivación del complejo. La figura 20 presenta los valores de actividad obtenidos de la incubación con estos detergentes: el lauril maltósido y el CHAPS presentaron un comportamiento muy semejante, un pico de activación a 0.1 mg de detergente/mg de proteína y la disminución de ésta a concentraciones mayores, sin llegar a inactivarse completamente.

ACTIVIDAD DEL COMPLEJO II-III INCUBADO CON LAURIL MALTOSIDO, LUBROL Y CHAPS

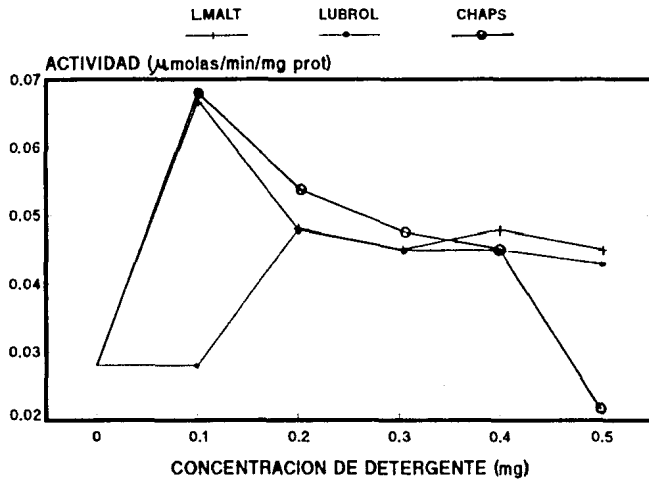


Figura 20. Actividad reductora de DCIP del complejo II-III mitocondrial solubilizado con distintas concentraciones de los detergentes lauril maltósido, CHAPS y Lubrol PX.

El experimento anterior en que se emplearon concentraciones crecientes de lauril maltósido, indicó que una relación de 0.2 mg de lauril maltósido/mg de proteína permitía obtener buenos rendimientos en la columna y como la curva de activación para ambos detergentes era muy semejante, se decidió probar 0.2 mg de CHAPS para solubilizar la muestra obtenida por la técnica de Rieske y posteriormente cromatografiarla. El patrón electroforético de la figura 21 muestra la pobre solubilización que se logra con este detergente. No se probaron otras concentraciones de este detergente porque la curva de actividad indicaba que la actividad disminuía conforme se incrementaba el detergente.

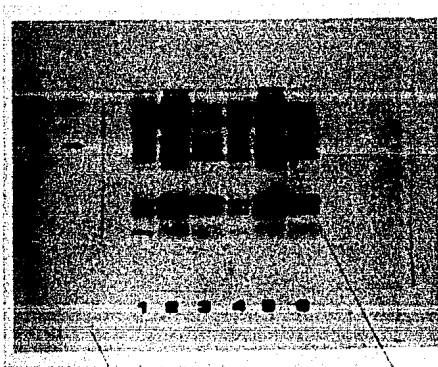


Figura 21. Patrón electroforético en geles de poliacrilamida-SDS al 16% del complejo II-III solubilizado con 0.2 mg CHAPS/mg prot, 1) y 4) sobrenadante, 2) y 5) precipitado, 3) y 6) bc_1 .

La siguiente opción fue la utilización del detergente Lubrol PX, ya que Kita y col en 1989, reportaron la utilización de este surfactante en el aislamiento del complejo II de E. coli. La concentración utilizada por Kita y col para solubilizar las membranas de la bacteria fue de 4% final de detergente y 1% para eluir la columna. La incubación del complejo II-III se llevó a cabo con concentraciones menores del detergente, con 1% final de Lubrol PX y la elución se realizó con una concentración de 0.1% en el amortiguador de corrida. La columna y los gradientes de elución tuvieron las mismas condiciones que en los experimentos anteriores, la única variación la constituyó el detergente en el amortiguador. El perfil de elución, así como el patrón electroforético del complejo II obtenido por esta técnica se muestran en la figura 22.

El grado de pureza del complejo II obtenido por esta última técnica fue mucho mayor al combinar los diversos métodos de purificación, aunque la preparación siguió presentando valores de actividad bajos. Se realizó una curva de titulación de actividad en función de la concentración de proteína, que se muestra en la figura 23, donde se observa un incremento de la actividad en función de la cantidad de proteína.

Los valores bajos de actividad obtenidos con todas las técnicas de purificación se atribuyeron a la delipidación del complejo debida a la utilización de detergentes y sales de amonio durante el proceso de aislamiento. Salerno y col (1986), reportaron que la adición de lípidos a complejos proteicos membranales permite reactivarlos. En adición, una sugerencia del Dr. Carlos Gómez Lojero (CINVESTAV del I.P.N.) durante una presentación parcial

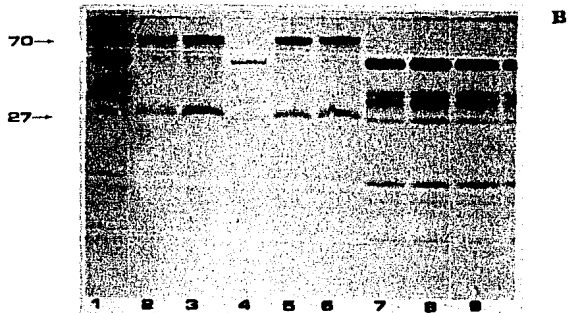
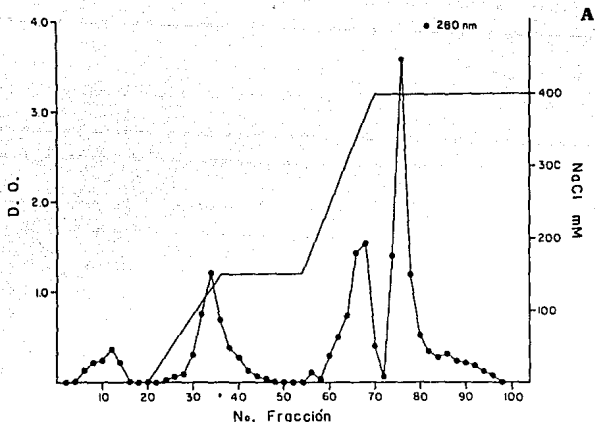


Figura 22. Aislamiento del complejo II mitocondrial (Yu y Yu, 1982; Ljungdahl y col, 1987 y Kita y col, 1989). (A) Perfil de elución del complejo II-III solubilizado con 1% de Lubrol PX y eluido de la columna DEAE-Biogel-A con un gradiente de NaCl de 0 a 150 mM. (B) Patrón electroforético en geles de poliacrilamida-SDS al 16% de las fracciones obtenidas de la cromatografía de intercambio iónico. 1) Complejo II-III solubilizado (10 μ g), 4) bc₁ (10 μ g), 2), 3), 5) y 6) fracciones 31 a 39: complejo II puro (20 μ g), 7), 8) y 9) fracciones 61 a 89: bc₁ puro (20 μ g).

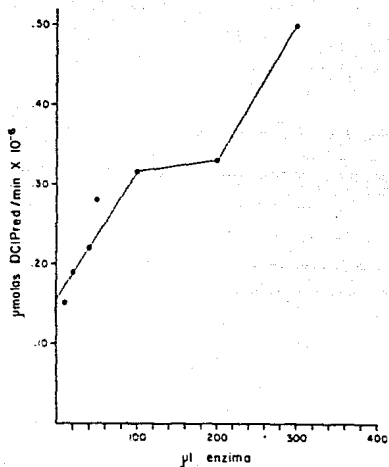


Figura 23. Actividad del complejo II puro en función de la concentración de proteína. El complejo II se aisló en presencia de 1% de Lubrol PX.

del presente trabajo en el XVIII Congreso Nacional de Bioquímica, (11 a 16 Nov. 1990, SLP, México), nos llevó a incluir tanto lípidos como ubiquinona 10 durante la resolubilización con el detergente Lubrol PX y la cromatografía de intercambio iónico. Con este fin, el complejo II-III aislado por la técnica de Yu y Yu (1982), se incubó con 1% de Lubrol PX, 0.5 mg de asolectina/mg prot y 0.1 mg de ubiquinona 10/mg prot y se cromatografió en una columna de DEAE Biogel-A previamente equilibrada con un amortiguador que contenía Tris 20 mM, PMSF 2 mM, 0.1% de Lubrol PX, 0.5 mg de asolectina/ml de amortiguador y 0.1 mg de ubiquinona 10/ml de amortiguador (pH 7.4). El perfil de elución, así como el patrón electroforético del complejo II obtenido por esta técnica se presentan en la figura 24, donde se observa que el complejo está prácticamente puro, las subunidades de alto peso se encuentran muy enriquecidas y las de bajo peso molecular se encuentran presentes en esta preparación. El valor de actividad encontrado para esta muestra fue de 17.9 μ molas DCIP/min/mg prot, es decir, más de 25 veces los valores obtenidos con los métodos descritos anteriormente.

Para comprobar el efecto de los fosfolípidos y la quinona adicionados al complejo II durante su purificación, se purificó este complejo en presencia y ausencia de asolectina y quinona, manteniendo el resto de las condiciones constantes con la finalidad de que ambos sistemas tuvieran las mismas condiciones y pudieran compararse confiablemente. Los perfiles de elución y el gel comparativo se presentan en la figura 25. No se presentó variación en el perfil de elución ni en el patrón electroforético de los complejos aislados con y sin la adición de fosfolípidos y

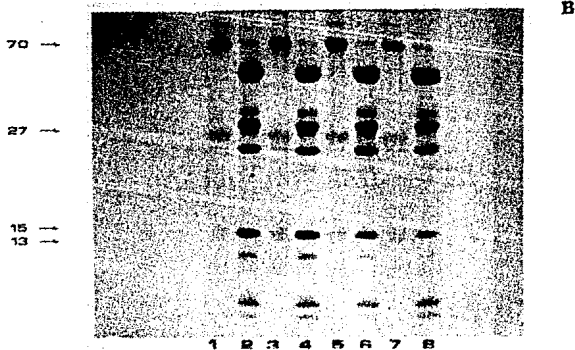
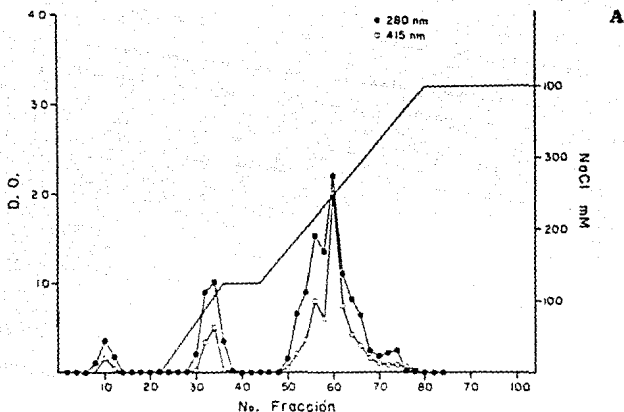


Figura 24. Aislamiento del complejo II mitocondrial en presencia de fosfolípidos y quinona (Yu y Yu, 1982; Ljungdahl y col, 1987 y Kita y col, 1989). (A) Perfil de elución de los complejos II y III solubilizados con 1% de Lubrol PX en presencia de 0.5 mg de asolectina/mg de complejo II-III y 0.1 mg de UQ10/mg de complejo II-III y eluidos con gradientes de NaCl de 0 a 150 y 150 a 400 mM. (B) Patrón electroforético en geles de poliacrilamida-SDS de las fracciones 30 a 38: complejo II (1, 3, 5 y 7) y 51 a 70; complejo III (2, 4, 6 y 8); todos los carriles contienen 10 μ g de proteína. Tinción con plata.

quinona. La actividad, sin embargo, si presentó gran diferencia, ya que el valor de ésta para el complejo aislado sin fosfolípidos fue de 4.11 μ molas DCIP red/min/mg prot, mientras que para el complejo aislado en presencia de fosfolípidos fue de 22.23 μ molas DCIP red/min/mg prot, lo que significa 5 veces más actividad en presencia de lípidos y quinona, ésto indica que la presencia de estos dos factores brinda estabilidad al complejo y por tanto es necesaria durante su aislamiento. Se realizaron mediciones de actividad en presencia de fosfolípidos y quinona del complejo II aislado en ausencia de éstos, donde se encontró que no se presenta activación por la adición de estos factores.

La tabla III resume el proceso de purificación del complejo II empleando la técnica desarrollada a partir de conjuntar las técnicas de Yu y col (1982), Ljungdahl y col (1987) y Kita y col (1989).

TABLA III

PASO DE PURIFICACION	PROTEINA			ACTIVIDAD				
	Vol. (ml)	mg/ml	Prot. tot.	Unid. /ml	Unid. tot.	Act. esp.	Rend. (%)	Veces purif
Mitocondrias	128	42.5	5540	0.47	61.3	0.24	100	1
PSM	53	45.5	2411	0.57	30.3	0.28	43.5	1.2
C II-III crudo	2.5	63.0	157.5	10.44	27.4	5.49	2.8	23
C II-III puro**	2.6	13.6	35.4	15.23	39.7	8.08	0.63	33
C II-III puro ac*	3.5	10	35	28.56	49.9	23.4	0.63	96
C II puro	3.2	1.2	3.84	39.95	63.9	32.0	0.07	132

Ensayo de proteína: Garnall y col, 1949.

Markwell y col, 1978.

Ensayo de actividad: Hatefi y Stigall, 1978.

Mitocondrias: Löw y Vallin, 1963.

PSM: Lee y Ernster, 1967.

Complejo II-III crudo y puro: Yu y Yu, 1982.

Complejo II-III puro activado: Kita y col, 1989.

Complejo II puro: Ljungdahl y col, 1987.

** Complejo II-III puro.

* Complejo II-III puro y activado con 1% de Lubrol PX, 0.5 mg asolectina/mg prot y 0.1 mg ubiquinona 10/mg prot.

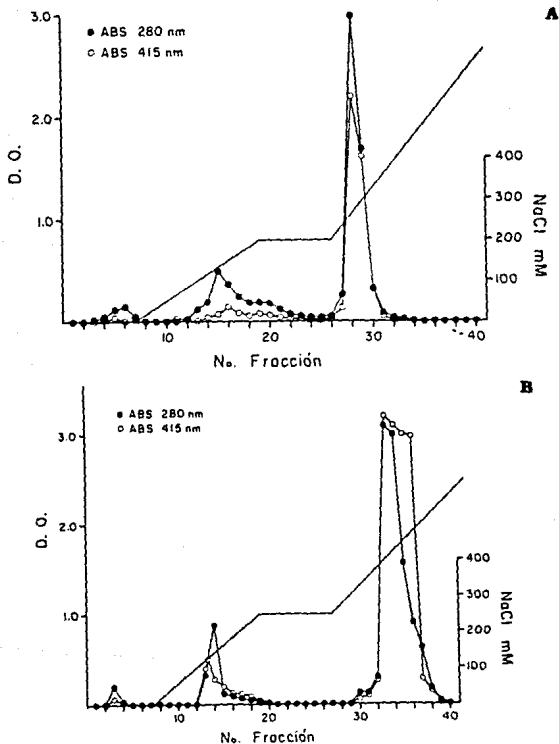


Figura 25. Aislamiento del complejo II mitocondrial en presencia y ausencia de fosfolípidos y ubiquinona. Perfiles de elución de los complejos II y III mitocondriales, solubilizados con 1 μ l de Lubrol PX en presencia (A) o ausencia (B) de 0.5 mg asolectina/mg complejo II-III y 0.1 mg UQ10/mg complejo II-III y eluidos de columnas DEAE Bioigel-A con gradientes de NaCl de 0-150 mM.

Caracterización parcial.

El segundo de los objetivos lo constituyó la caracterización parcial del complejo II mitocondrial aislado. La caracterización se centró en dos aspectos: 1) actividad reductora de la quinona medida indirectamente al seguir la reducción del DCIP, mediada por PMS y 2) determinación del espectro de absorción del complejo.

1) Actividad.

La actividad reductora de la quinona llevada a cabo por el complejo II mitocondrial purificado, se cuantificó a diferentes temperaturas, se encontró que la incubación a 37°C brindaba los valores más altos de ésta.

Se cuantificó el efecto del tiempo de incubación en la actividad del complejo II incubado a 37°C. El tiempo óptimo de incubación encontrado fue de 10 minutos (63.2 μ molas DCIP red/min/mg prot), ya que a tiempos menores y mayores que éste, se obtenían valores de actividad menores (42.1 μ molas DCIP red/min/mg prot para 5 minutos y 28.1 μ molas DCIP red/min/mg prot para 20 minutos). Lo anterior indica que en nuestras condiciones experimentales, la incubación a 37°C durante 10 minutos, permite alcanzar la máxima activación del complejo.

Se obtuvieron curvas de titulación de actividad por incremento de la concentración del complejo (de 0 a 200 μ g) y se encontró que el valor de actividad era proporcional a la cantidad de enzima pura adicionada al ensayo (resultados no mostrados).

2. Espectro de Absorción.

La figura 26 contiene el espectro de absorción diferencial (reducido vs. oxidado) del complejo II mitocondrial.

En la forma oxidada (en presencia de ascorbato), la zona del Soret presenta un máximo de absorción a 414 nm, desplazándose hacia 424 en la forma reducida con ditionita. El pico presenta absorción máxima a 560 nm en la forma reducida. Los centros Fe-S y las flavinas presentes en el complejo II, no tienen un espectro definido, pero en forma oxidada o parcialmente reducida, presentan espectro poco definido en la zona entre 430 y 520 nm. En la forma reducida, la señal de estas especies, se pierde casi completamente (blanqueo). Lo anterior explica la disminución aparente que presenta el pico Soret del citocromo b.

Reconstitución del transporte de electrones.

La reconstitución del transporte de electrones desde el succinato hasta el citocromo c soluble, a través de los complejos II y III mitocondriales, se llevó a cabo en colaboración con Jorge Ramírez Salcedo (IFC, UNAM), se incorporaron estos complejos en liposomas que contenían fosfatidil-colina, fosfatidil-etanol-amina y cardiolipina, ya que la proporción de los dos primeros en la membrana interna mitocondrial es de aproximadamente 40% para cada uno de ellos, aún cuando su distribución no sea la misma, la fosfatidil-colina se localiza hacia el lado citoplásmico, mientras que la fosfatidil-etanol-amina lo hace hacia la matriz mitocondrial (Capaldi, 1982).

La ubiquinona constituye un elemento de unión entre las deshidrogenasas y el complejo III mitocondrial, el citocromo c realiza el mismo papel entre los complejos III y IV, ambos elementos móviles de la cadena transportadora de electrones se

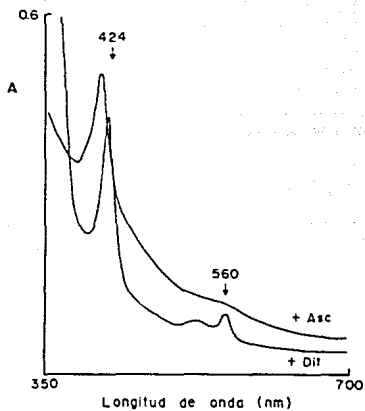


Figura 26. Espectro de absorción diferencial (oxidado vs. reducido) del complejo II mitocondrial puro.

encuentran libres en la membrana, pero no tienen la misma distribución, ya que la quinona se encuentra completamente embebida en ésta, mientras que el citocromo c se encuentra en la superficie externa de la membrana interna mitocondrial (Gupte y Hackenbrock, 1988).

Una vez que se logró la incorporación de los complejos en los liposomas por sonicación, filtración en gel y centrifugación, se determinó el transporte de electrones llevado a cabo por la partícula reconstituída. La figura 27 muestra el trazo de esta actividad, donde se sigue la reducción del citocromo c por succinato, mediada por ambos complejos. La actividad presentó sensibilidad a la TTFA y a la antimicina (inhibidores específicos de los complejos II y III respectivamente). La adición de desoxicolato inhibió el transporte de electrones debido a que solubiliza los liposomas y disminuye por dilución la frecuencia de colisión entre los elementos de unión (citocromo c y ubiquinona) y los complejos respiratorios (II y III). La frecuencia de estos acercamientos es determinante para que se lleve a cabo el transporte de electrones y está determinada por muchos factores entre los que se pueden mencionar la composición lipídica, la temperatura, la concentración de las proteínas que se incorporan a los liposomas, etc. (Chazotte y col., 1989).

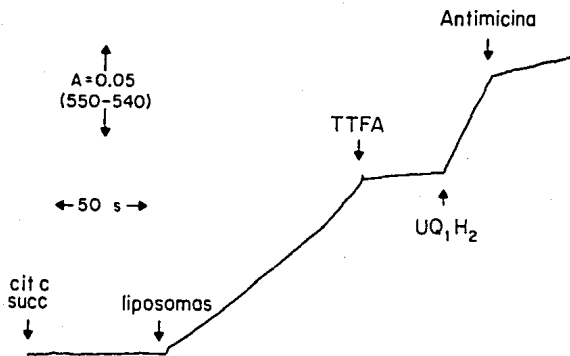


Figura 27. Reconstitución del transporte de electrones desde el succinato hasta el citocromo c a través de los complejos II y III mitocondriales incorporados en liposomas.

DISCUSION

La purificación de una proteína o complejo proteico constituye uno de los pasos esenciales a seguir para su conocimiento bioquímico.

El presente trabajo se centra en una serie de modificaciones a una técnica establecida de purificación del complejo II mitocondrial, lo que permitió el aislamiento de este complejo respiratorio, así como su caracterización parcial y la reconstitución del mismo en liposomas que contenían quinona y complejo III mitocondrial.

Durante el aislamiento del complejo II, se requiere el desplazamiento del oxalacetato que se encuentra pegado a éste a través de un puente tio-hemi-acetal entre el sulfhidrilo del sitio activo y el oxaloacetato tanto en forma aislada como cuando se encuentra en la membrana de las mitocondrias. Este desplazamiento se lleva a cabo al incubar las PSM con succinato de sodio a 37°C durante 30 minutos (Cecchini y col., 1986).

El proceso de obtención del supracomplejo II-III se lleva a cabo con detergentes aniónicos (colato y desoxicolato de potasio), que tienen cadenas laterales muy rígidas, lo que eleva aún más la concentración a la cuál forman micelas, por tanto, es muy fácil eliminarlos mediante diálisis.

Para cromatografiar el supracomplejo en una columna de intercambio aniónico, se requiere intercambiar el detergente cargado (desoxicolato) por uno neutro. Ljungdahl y col en 1989 obtuvieron buenos resultados en la purificación de complejo III con el lauril maltósido. El efecto de este detergente en la columna puede explicarse como la sustitución del desoxicolato por

el lauril maltósido, que de este modo evidenciaría mejor las cargas parciales negativas de la proteína conforme se incrementa la concentración de lauril maltósido y por lo tanto, favorece que se pegue mejor ésta a la resina; de cualquier forma, las cromatografías se ven afectadas por muchos factores, por lo que uno solo de ellos no explica en su totalidad el comportamiento cromatográfico.

La utilización de lauril maltósido permitió la obtención de complejo II con alto grado de pureza, pero con valores de actividad muy bajos, por lo que se utilizó otro detergente no iónico (Lubrol PX) reportado por Kita y col (1989), para aislar complejo II de *E. coli*, lo que permitió obtener una preparación muy pura de este complejo y con valores de actividad altos. Ambos detergentes tienen concentraciones micelares críticas muy bajas, por lo que su eliminación no puede llevarse a cabo fácilmente por diálisis.

El rendimiento de la purificación calculado con base en la proteína presente en las mitocondrias y la proteína (complejo II) recuperada, podría parecer muy bajo, ya que este valor corresponde tan solo a un rendimiento de 0.07%. Sin embargo, al utilizar el valor encontrado por Hackenbrock y col (1986), sobre el contenido de complejo II/mg de proteína en las mitocondrias (0.027 nmol/mg) y relacionarlo con el peso molecular del complejo, obtenido por la suma de los pesos de sus subunidades (126,000 Da); se encontró que la técnica modificada en el laboratorio para el aislamiento del complejo II permite recuperar el 20.4% del complejo total presente en las mitocondrias, lo cual

es comparable con los mejores rendimientos reportados por Rieske en 1967 (aproximadamente el 20%) para el aislamiento del complejo III mitocondrial, lo que indica que el método desarrollado en el laboratorio permite obtener complejo II con muy buenos rendimientos tanto de proteína como de actividad.

Una vez obtenido el complejo puro y activo, se procedió a su caracterización electroforética, al seguir su actividad de diaforasa y determinar su espectro de absorción.

1. Caracterización electroforética.

La caracterización electroforética reveló la presencia de 4 subunidades, una de 70 kDa y una de 27 kDa, correspondientes a las subunidades Fp e Ip respectivamente y 2 pequeñas correspondientes a las subunidades de anclaje (citocromo b), éstas dos últimas son muy hidrofóbicas y poco evidenciables en tinciones con Coomassie y plata, debido tal vez a que durante la electroforesis pegan mas SDS que las subunidades solubles y por lo tanto interaccionan más débilmente con los colorantes. Otro efecto puede deberse directamente a la baja o nula presencia de grupos cargados en estas subunidades, que se tiñen con menos resolución que las subunidades cargadas.

2. Espectro de Absorción.

El espectro de absorción (oxidado con aire vs reducido con ditionita) de la proteína purificada reveló la presencia del citocromo b, sin embargo, experimentos realizados con succinato como agente reductor (no incluidos), mostraron que este citocromo no es reducible por este agente, como tampoco lo es el citocromo b del complejo de la fumarato reductasa. Ambos citocromos presentan potenciales redox medios negativos (-200 y -15 mV

respectivamente), mientras que el Em para el succinato es de +0.19 mV, por lo que en principio, estos citocromos no presentan un potencial redox lo suficientemente positivo como para ser reducidos por el succinato. Sin embargo resulta interesante que en el caso de *E. coli* y de levadura el citocromo b sí es reducible por succinato (Ackrell y col, en prensa) lo anterior permite preguntarnos: ¿es este citocromo una reminiscencia del pasado? ¿Cuál es su papel en la actividad del complejo y en su ensamblaje a la membrana? Es solo un elemento que se adicionó a la enzima soluble para anclarse a la membrana y además modificar las propiedades de la enzima citoplásmica y con el tiempo perdió o modificó estas características? Todo lo anterior constituyen interrogantes que aún no tienen una respuesta concreta para nosotros. Sin embargo es importante notar que el complejo II mitocondrial presenta muchas características semejantes al complejo de la fumarato reductasa, tales como el número de subunidades, los grupos prostéticos, la reactividad a inhibidores, la secuencia de algunas subunidades, etc. Esto permite hacer una suposición sobre el posible origen, evolución y relación de estos complejos.

El complejo fumarato reductasa (FRD) se encuentra en organismos anaeróbicos y facultativos, pudiendo localizarse tanto en la membrana como en el citoplasma. La especie membranal cataliza la fase terminal en el transporte anaeróbico cuando el fumarato se utiliza como oxidante de la cadena respiratoria. Su función es regenerar el succinato a partir de fumarato a través de una quinona, para lograr la reincorporación del succinato al

ciclo de Krebs y por tanto, generar mas potencial reductor (Uندن y Kröger, 1981).

Estructuralmente, la FRD de membrana está constituida por dos subunidades hidrofílicas con Mr de 66 y 27 kDa y dos subunidades hidrofóbicas con Mr de 15 y 13 kDa en *E. coli* (Cecchini y col, 1986). La ubicación de esta enzima en la membrana es muy semejante a la que presenta el complejo II mitocondrial, ya que las subunidades hidrofílicas se encuentran ancladas a la membrana por el citocromo b.

Diversos estudios reportados en la literatura (Ackrell y col en prensa) muestran que existen muchas semejanzas entre el complejo FRD y el complejo II mitocondrial, proteínas que llevan a cabo funciones inversas.

Las semejanzas entre estos dos complejos no sólo se limitan al aspecto estructural, sino a las secuencias, a los grupos prostéticos de las subunidades catalíticas, reactividad a inhibidores, etc (Cecchini y col, 1986).

Morfológicamente ambas enzimas están constituidas por dos subunidades mayores e hidrofílicas, que contienen los mismos grupos prostéticos (FAD y 3 centros Fe-S) y una o dos subunidades de anclaje a la membrana y que presentan características de los citocromos b. El malonato resulta ser un inhibidor competitivo que presenta efectos sobre la actividad de las dos enzimas.

De lo anterior, se puede inferir que existe una relación evolutiva muy cercana entre estos dos complejos proteicos, se puede pensar que la FRD soluble se encontraba en los organismos que vivieron mientras las condiciones del medio no fueron oxidantes y reciclaba NAD mediante la fermentación y el

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

ciclo de Krebs. El siguiente paso consistió quizá en acoplar la fosforilación al transporte de electrones al asociar la enzima a la membrana mediante una subunidad hidrofóbica que contuviera también al citocromo b, así como en la introducción de un transportador de electrones membranar (quinonas).

Para que la enzima pudiera llevar a cabo la reducción del succinato, se requirió que el tipo de unión del sitio FAD al resto de la subunidad Fp fuera covalente, lo que quizá causó la capacidad de modular su potencial medio de óxido-reducción. Lo anterior se realizó a través de la introducción de un residuo de histidina que pudiera llevar a cabo la unión de tipo 8 -N histidil-FAD, cuyo propósito sería cambiar el estado de transición de la reacción, lo que permitió la oxidación del succinato por incremento del potencial redox de la flavina. (Ackrell y col. en prensa). Lo anterior se ha comprobado con mutantes de E. coli que carecen de este residuo (y por tanto del enlace covalente) tampoco pueden oxidar succinato (Ackrell y col, en prensa).

En estudios del genoma de E. coli se han encontrado los genes que codifican para ambas enzimas, su expresión depende de las condiciones del medio, ya que en condiciones de anaerobiosis la expresión del complejo II se encuentra reprimida, mientras que cuando se incorpora el oxígeno, la expresión de la FRD se reprime (Ackrell y col, en prensa).

La presencia del complejo FRD en organismos considerados como ancestrales como las arqueobacterias, aunada a la información anterior, hace suponer que la FRD se presentó primero durante la

evolución, cuando la atmósfera no contenía oxígeno y que con la aparición de este elemento, se favoreció la generación de poder reductor a partir de un complejo que funcionara en el sentido inverso al de la FRD, ya que el acoplamiento de esta fase al mecanismo de obtención de energía desarrollado a partir de la presencia del oxígeno (fosforilación oxidativa) era mucho más eficiente que la fermentación o que el ciclo de Krebs en forma aislada (Gómez Lojero, 1989).

3. Actividad de diaforasa.

La actividad de diaforasa que se encontró en el complejo II aislado presentó valores comparables con los más altos reportados en la literatura (31 y 50 a 55 μ molas DCIP red/min/mg prot respectivamente) (Ackrell, 1980; Capaldi, 1982; Hatefi, 1978).

El centro Fe-S 3 del complejo II mitocondrial es el donador directo de los electrones hacia la quinona, este centro presenta una sensibilidad muy marcada a la presencia de oxígeno, sufre degradación oxidativa, por lo que muchas de las preparaciones realizadas anteriormente no presentaban actividad reductora de quinona. Se ha propuesto que este centro está expuesto directamente hacia el medio y por tanto es mucho más sensible a la presencia de solventes o de oxígeno. La enzima aislada por el método desarrollado en el laboratorio presenta actividad reductora de quinona, tanto en el ensayo colorimétrico como en experimentos con la enzima reconstituída en liposomas, lo que implica que aún sin utilizar condiciones de anaerobiosis se puede obtener un complejo II puro sin dañar los centros Fe-S. La obtención de la enzima sin dañar dicho centro puede deberse a que en nuestro método se incluyen los fosfolípidos y la quinona

(aceptor endógeno de los electrones) lo que permite mantener la asociación con el citocromo b membranar, lo cuál hace conservar un microambiente más semejante a las condiciones *in vivo* de la enzima. Se han realizado estudios que indican que la extracción de la quinona resta el 50% de la actividad reductora de PMS de la enzima en un ensayo colorimétrico (Rossi y col., 1970).

Reconstitución del transporte de electrones.

La reconstitución del transporte de electrones se realizó incorporando dos complejos respiratorios (II y III) en liposomas, así como los elementos de unión entre estos complejos (ubiquinona y citocromo c) cuya función es la de mediar el paso de electrones entre dichos complejos. Se han descrito diversas técnicas para incorporar complejos proteicos membranales en estas vesículas artificiales. Entre otros, podemos distinguir la incorporación por diálisis, por dilución o por congelamiento-descongelamiento (Racker, 1975; Ramírez y col., 1987; Hacker y Racker, 1979). En nuestras manos, el método que proporcionó mejores resultados fue la formación de los liposomas en una columna de filtración en gel, la cuál permitió la incorporación de ambas proteínas simultáneamente y la remoción del Lubrol PX remanente. La introducción de la ubiquinona 10 a este sistema permitió seguir la actividad real que lleva a cabo el complejo II en las mitocondrias, ya que este compuesto es su substrato endógeno. La alta hidrofobicidad de este componente impide su utilización directa en ensayos acuosos, sin embargo, su incorporación junto con los fosfolípidos durante la formación de los liposomas evita este problema. Lo anterior implica una ventaja mas en este

sistema, ya que la medición de actividad del complejo II reconstituido nos permite acercarnos un poco mas al conocimiento de la enzima en condiciones muy semejantes a las que tiene in vivo.

CONCLUSIONES

La realización del presente trabajo permitió concluir lo siguiente:

1. La combinación de diversas técnicas para la obtención de los complejos proteicos respiratorios II y III, (Yu y col, 1979; Kita y col, 1989 y Ljungdahl y col, 1987) permitió el establecimiento de un nuevo método para el aislamiento del complejo II mitocondrial sin la utilización de solventes orgánicos, ya que éstos se usan en un paso difícil de reproducir en las técnicas reportadas, debido a que disminuyen notablemente el rendimiento de la purificación, así como inactivan parcialmente a la proteína.
2. El método establecido en el presente trabajo para el aislamiento del complejo II permitió obtener un complejo con alto grado de pureza (evidenciable por el patrón electroforético y el espectro de absorción del complejo), así como con un valor de actividad comparable con los más altos reportados en la literatura.
3. La presencia de fosfolípidos y quinona es esencial para el aislamiento del complejo II mitocondrial en forma pura y activa, la ausencia de estos elementos disminuye de forma notable la actividad, pero no afecta el grado de pureza con que se obtiene dicho complejo.
4. En nuestras condiciones experimentales, la temperatura de activación del complejo II mitocondrial para la reducción del DCIP es de 37°C y el tiempo de incubación óptimo a esta temperatura es de 10 minutos.
5. La reconstitución del transporte de electrones llevado a cabo

por los complejos II y III mitocondriales incorporados en liposomas, realizada en el presente trabajo, abre la posibilidad a futuro de incorporar los 5 complejos respiratorios mitocondriales a un sistema lipídico y por lo tanto, reconstituir el transporte de electrones a través de éstos, así como la síntesis de ATP en un sistema bien caracterizado.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Ackrell, B.A., Bethany Ball, M. y Kearney, E.B. (1980) *J. Biol. Chem.* 225:2761-2769.
2. Ackrell, B.A. Kearney, E.B. y Coles, Ch.J. (1977) *J. Biol. Chem.* 252:6961-6965.
- 3.- Ackrell, B.A. Johnson, M.K., Gunsalus, R.P. y Cecchini. G. Structure and Function of Succinate Dehydrogenase and Fumarate Reductase. en prensa. 4.- Avers, Ch. J. (1986) *Molecular Cell Biology*. Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc. NY, USA. pp 67-99 y 305-358.
- 5.- Capaldi, R.A. (1982) *Biochim. Biophys. Acta.* 694:291-306.
- 6.- Chazotte, B. y Hackenbrock, C.R. (1989) *J. Biol. Chem.* 264:4978-4985.
- 7.- Cecchini, G., Ackrell, B.A.C., Deshler, J.O. y Gunsalus, R.P. (1986) *J. Biol. Chem.* 261:1808-1814.
- 8.- Davis, K.A., Hatefi, Y. Poff, K.L. y Butler, W.L. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 325:341-356.
- 9.- Fridén, H., Cheesman, M.R., Hederstedt, L., Anderson, K.K. y Thomson, A.J. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 104:207-215.
- 10.- Furushima, R., Kita, K., Takamiya, Sh., Konishi, K., Aoki, T. y Oya, H. (1990) *FEBS Lett.* 263:325-328.
11. Gabellini, N., Gao, Z., Oesterhelt, D., Venturoli, G. y Melandri, A. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 974:202-210.
- 12.- Garnall y col. (1949) *J. Biol. Chem.* 177:751-766.
- 13.- Gómez-Lojero, C. (1989) *Avance y Perspectiva.* (CINVESTAV) 38:13-20.
- 14.- González-Halphen, D. (1990) *Ciencia* 41:133-152.
- 15.- Gupte, S.S. y Hackenbrock, C.R. (1988) *J. Biol. Chem.* 263:5241-5247.
- 16.- Hackenbrock, Ch.R., Chazotte, B. y Gupte Sh. (1986) *J. Bioenerg. Biomebr.* 18:331-368.
- 17.- Hacker, H. y Racker, E. (1979) *J. Biol. Chem.* 254:6589.
- 18.- Hatefi, Y. y Galante, Y.M. (1980) *J. Biol. Chem.* 255:5530-5537.
- 19.- Hatefi, Y. y Stigall, D.L. (1976) En; *The Enzymes*. Vol 13. (Boyer, P.D. Ed.) Academic Press. New York, USA.

- 20.- Hatefi, Y. y Stigall, D.L. (1978) *Methods Enzymol.* 53 Parte D:21-27.
- 21.- Jay, D., Zamorano, R., Muñoz, E., Gleason, R. y Boldú, L. (1990) *Ciencia* 41:265-276.
- 22.- Kagawa, Y. y Racker, E. (1971) *J. Biol. Chem.* 246:5477-5487.
- 23.- Karp, G. (1984) *Cell Biology.* Mc Graw-Hill Book Company. Segunda edición, NY, USA. pp 309-348.
- 24.- Kita, K., Vibat, C.R.T., Meinhardt, S., Guest, J.R. y Gennis, R.B. (1989) *J. Biol. Chem.* 264:2672-2677.
- 25.- Lenaz, G., Fato, R., Battino, M., Mandriolli, E. y Parenti, C.G. (1987) En: *Biogenesis: Structure and Function of Energy Transduction Systems* (eds. T. Ozawa y S. Papa) pp 49-61. Japan Sci. Press, Tokio.
- 26.- Ljungdahl, Per. O., Pennoyer, J.D., Robertson, D.A. y Trumpower, B.L. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 891:227-241.
- 27.- Lee, C.P. y Ernster, L. (1967) *Methods Enzymol.* 10:543-548.
- 28.- Löw, H. y Vallin, I. (1963) *Biochem. Biophys. Acta* 69:361-374.
- 29.- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R. (1951) *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- 30.- Markwell, M.A.K., Hass, S.M., Breber, L.L. y Tolbert, N.E. (1978) *Anal. Biochem.* 87:206-210.
- 31.- Mitchell, P. (1975) *FEBS Lett.* 56:1-6.
- 32.- Mowery, P.C., Steenkamp, D.J., Ackrell, B.A.C., Singer, Th.P. y White, G.A. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 178:495-506.
- 33.- Nicholls, D.G. (1982) *Bioenergetics. An Introduction to the Chemiosmotic Theory.* Academic Press, London. 190 pp.
- 34.- Oakley, B.R., Kirsh, D.R. y Morris, N.R. (1980) *Anal. Biochem.* 105:361-363.
- 35.- Ohnishi, T. (1976) *J. Biol. Chem.* 7:2105-2109.
- 36.- Ohnishi, T. (1979) En: *Membrane Proteins in Energy Transduction* (Capaldi, R.A. Ed.) Marcel Dekker, New York, USA. pp 1-8.
- 37.- Ohnishi, T. (1987) *Curr. Top. Bioenerg.* 15:37-65.
- 38.- Ohnishi, T., King, T.E., Salerno, J.C., Blum, H., Bowyer, J.R. y Maida, T. (1981) *J. Biol. Chem.* 256:5577-5582.

- 39.- Ohnishi, T., Lim, J., Winter, D.B. y King, T.E. (1976) J. Biol. Chem. 251:2105-2109.
- 40.- Ohnishi, T. y Salerno, J.C. (1976) J. Biol. Chem. 251:2094-2104.
- 41.- Penefsky, H.S., Pullman, M.E., Datta, A. y Racker, E. (1960) J. Biol. Chem. 235:3330-3336.
- 42.- Pennoyer, J.D., Tomoko, O. y Trumpower, B.L. (1988) Biochim. Biophys. Acta 935:195-207.
- 43.- Perlin, D.S., Kasamo, K., Brooker, R.J. y Slayman, C.W. (1984) J. Biol. Chem. 259:7884-7892.
- 44.- Preeble, J.N. (1981) Mitochondria, Chloroplasts and Bacterial Membranes. Logman Group Limited, U.K. pp 24-134.
- 45.- Rabinowitz, J.C. (1978) Methods Enzymol. 53:275-277.
- 46.- Racker, E., Chien, T.F. y Kandrach, A. (1975) FEBS Lett. 57:14-16.
- 47.- Racker, E. (1979) Methods Enzymol. 55:699-711.
- 48.- Ramírez, J., Calahorra, M. y Peña, A. (1987) Anal. Biochem. 163:100-106.
- 49.- Rieske, J.S. (1967) Methods Enzymol. 10:239-245.
- 50.- Rossi, E., Norling, B., Persson, B. y Ernster, L. (1970) Eur. J. Biochem. 16:508.
- 51.- Rosevear, P., Van Aken, T., Baxter, J. y Ferguson-Miller, S. (1980) Biochem. 19:4108-4115.
- 52.- Salerno, J.C., Yoshida, S. y King, T.E. (1986) J. Biol. Chem. 261:5480-5486.
- 53.- Schägger, H. y von Jagow, G. (1987) Anal. Biochem. 166:368-379.
- 54.- Skulachev, V.P. (1988) Membrane Bioenergetics. Springer Verlag, Germany. pp 33-155.
- 55.- Solioz, M., Carafoli, E. y Ludwig, B. (1982) J. Biol Chem. 257:1579-1582.
- 56.- Stryer, L. (1975) Biochemistry. Freeman and Company, San Francisco. pp 233-431.
- 57.- Takamiya, Sh., Kita, K., Matsura, K., Furushima, R. y Oya H. (1990) Biochem. Int. 10:73-108.

- 58.- Trumpower, B.L. (1990) *J. Biol. Chem.* 265:11409-11412.
- 59.- Trumpower, B.L. y Katki, L. (1979) En: *Membrane Proteins in Energy Transduction*. (Ed. R.A. Capaldi) Marcel Dekker, Inc. New York, USA. pp 89-125.
- 60.- Tushurashvili, P.A., Gavrikova, E.B., Ledenev, A.N. y Vinogradov, A.D. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 809:145-159.
- 61.- Tzagoloff, A. (1982) *Mitochondria*. Plenum Press. NY, USA. pp 1-232.
- 62.- Unden, G. y Kröger, A. (1981) *Eur. J. Biochem.* 120:577-584.
- 63.- Van Aken, T., Foxall-Van Aken, S., Castleman, S. y Ferguson-Miller, S. (1986) *Methods Enzymol.* 125:27-35.
- 64.- Weiss, H. y Kolb, J.H. (1979) *Eur. J. Biochem.* 99:139-149.
- 65.- Whittaker, P.A. y Danks, S.M. (1978) *Mitochondria, estructura, función y formación*. CECSA, México. 174 pp.
- 66.- Wood, D., Darlison, M.G., Wilde, R.J. y Guest, J.R. (1981) *Anal. Biochem.* 118:197-203.
- 67.- Yu, Ch-A. y Yu, L. (1980) *Biochemistry* 19:379-386.
- 68.- Yu, L., Xu, J-X., Haley, P.E. y Yu, Ch-A. (1987) *J. Biol. Chem.* 262:1137-1143.
- 69.- Yu, L. y Yu, Ch-A. (1982) *J. Biol. Chem.* 257:2016-2021.
- 70.- Ziegler, D. y Rieske, J.S. (1967) *Methods Enzymol.* 10:231-235.