

69
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

PURIFICACION DE LOS CITOCROMOS b Y c₁ DEL COMPLEJO III
MITOCONDRIAL CON EL DETERGENTE TRITON X - 114

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

BERENICE GARCIA PONCE DE LEON

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D.F.

OCTUBRE 1992



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.

ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADP	Adenosina difosfato
ARN	Acido ribonucleico
Asc	Ascorbato
ATP	Adenosina trifosfato
bc ₁	Ubiquinol-citocromo c óxido-reductasa
BCIP	Fosfato de 5-bromo 4-cloro 3-indolil
B.D.	Barrido densitométrico
C. III	Complejo III
C ₁₂ F ₈	Dodecil octaetilén glicol monoéter
Cit	Citocromo
CMC	Concentración micelar crítica
CoA	Coenzima A
DBH	2,3-dimetoxi 5-metil 6-decil 1,4-benzoquinona
DEAE-	Dietil amino etil-
Dit	Ditionita
DMF	Dimetil formamida
DOCNa	Desoxicolato de sodio
DOCK	Desoxicolato de potasio
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilén diamino tetracético
Em	Potencial medio de óxido-reducción
EPR	Resonancia paramagnética del electrón
FAD	Flavín adenín dinucleótido

FADH ₂	Flavín adenín dinucleótido reducido
FeS	Proteína fierro-azufre (o de Rieske)
FMN	Flavín mononucleótido
GDP	Guanosina difosfato
GTP	Guanosina trifosfato
HFIL	Hidrofílico
HFOB	Hidrofóbico
KDa	Kilodaltones
NAD ⁺	Nicotinamida-adenín-dinucleótido
NADH	Nicotinamida-adenín-dinucleótido reducido
NBT	Azul de nitrotetrazolio
ox	Oxidado
Pi	Fosfato inorgánico
PM	Peso molecular
ppm	Partes por millón
Qn	Sitio de unión de la ubiquinona (lado negativo)
Qp	Sitio de unión del ubiquinol (lado positivo)
red	Reducido
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TX	Tritón (polioxietilén p-t-octil fenol)
UHDBT	Undecil hidroxí dioxobenzotiazol

INDICE

	Pag
RESUMEN	1
INTRODUCCION	
I.- Obtención y conservación de la energía en las células	2
1) Glucólisis	4
2) Ciclo de Krebs	6
3) Fosforilación oxidativa y la cadena respiratoria	8
II.- Generalidades sobre el complejo III	
1) Grupos oxidorreductores	13
2) Composición polipeptídica y topología del complejo	17
3) Cristalografía	21
4) Biología molecular y filogenia	22
5) Otras aportaciones	28
III.- Antecedentes directos	29
OBJETIVOS	34
MATERIALES Y METODOS	
1) Purificación del complejo III mitocondrial	35
2) Separación de fases con el detergente Tritón X-114	38
3) Purificación de los citocromos b y c,	41
4) Determinación de proteína	44
5) Remoción del detergente Tritón X-114 asociado a las proteínas	45
6) Caracterización electroforética	46
7) Caracterización espectroscópica	49
8) Ensayo de reconstitución de la actividad ubiquinol-citocromo c óxido-reductasa con el subcomplejo bc, y la proteína FeS	50

RESULTADOS	52
DISCUSION	81
CONCLUSIONES	92
BIBLIOGRAFIA	93
APENDICE	98

RESUMEN

El complejo III mitocondrial o complejo bc₁, de eucariontes (ubiquinol-citocromo c óxido-reductasa) es uno de los cinco complejos redox que constituyen la cadena respiratoria. Su función es la de transportar los electrones desde el ubiquinol-10 hasta el citocromo c con la concomitante translocación de protones del lado negativo (matriz) al lado positivo (espacio intermembranal) de la membrana, generando un cambio de energía suficiente que es aprovechado por la ATP-sintetasa para generar ATP, por lo que se le ha denominado el sitio II de acoplamiento de la cadena respiratoria.

Este complejo oligomérico se constituye de 11 subunidades en los mamíferos, pero solo tres de ellas son componentes óxido-reductores: un cit b, con dos grupos hemo tipo b unidos no covalentemente denominados b-562 y b-566 según sus máximos de absorción; un cit c, con un hemo tipo c unido covalentemente y la proteína FeS (o de Rieske) con un centro 2Fe:2S.

Los citocromos se han purificado independientemente por distintas metodologías para su estudio estructural y funcional, sin embargo, dichas técnicas son largas y conllevan la pérdida de alguna de las partes además de presentar daño en los hemos, especialmente para el cit b. En el presente trabajo se usó el detergente no iónico Tritón X-114 bajo dos enfoques metodológicos distintos para la obtención de ambos citocromos tratando de conservar sus características espectroscópicas: primero se utilizó la separación de fases reportada por Payne y Trumpower (1987) y para una mayor depuración se trabajó con cromatografías de intercambio aniónico e hidrofobicidad según técnicas modificadas de Ljungdahl (1987) y Shimomura (1986) respectivamente.

El cit b y el cit c, se obtuvieron en forma pura según se demuestra por el patrón electroforético (gel de poliacrilamida-SDS), el barrido densitométrico del mismo e inmunorréclicas tipo Western. Se estimó un contenido hémico de 53.27% para el cit b y 77.14% para el cit c, aunque no reconstituyen actividad en presencia de la proteína FeS.

La metodología implementada acorta pasos en la purificación de ambos citocromos obteniéndolos con alto grado de pureza y rendimientos medianos en cuanto a contenido hémico y abre la posibilidad del estudio funcional de los citocromos del complejo III de bovino y de su relación con el resto de las subunidades estructurales.

INTRODUCCION

I.- Obtención y conservación de la energía en las células.

El metabolismo en todos los organismos, consiste en reacciones que liberan energía y reacciones que necesitan de ésta, por lo que la energía liberada durante la degradación de los nutrientes (catabolismo) puede ser utilizada en los requerimientos de trabajo celular, entre los que se incluye la biosíntesis (anabolismo). La eficiencia celular, se basa en gran medida en la capacidad de transferir dicha energía ya sea por un grupo fosforilo o por electrones.

El adenosintrifosfato (ATP) es un compuesto que ocupa una posición intermedia en la escala termodinámica y que por tanto conecta reacciones entre compuestos de alto y bajo nivel energético. Ya que el ATP y el ADP (adenosindifosfato) participan en casi todas las transferencias de grupo fosforilo, sirve en general como moneda de intercambio de energía química en el mundo viviente (Avers, 1986).

Todos los organismos aerobios, extraen eficientemente la energía mediante el proceso de respiración, el cual es responsable de la mayoría del ATP sintetizado en las células. A continuación se hará una descripción de las etapas implicadas desde la degradación de alimentos hasta la fosforilación oxidativa según se esquematiza en la figura 1.

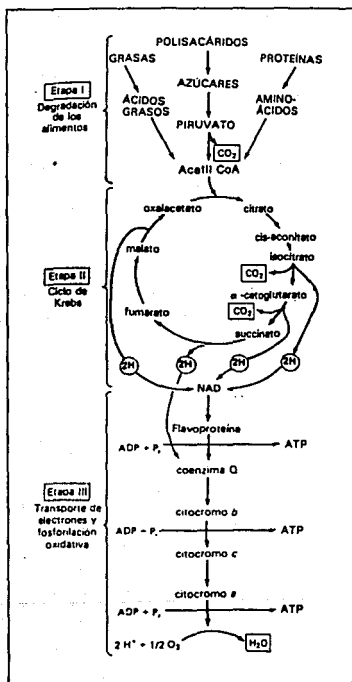


Fig. 1: Proceso de obtención de energía en tres etapas que llevan a cabo los organismos aerobios (Avers, 1986).

1) Glucólisis.

Puesto que los carbohidratos son la principal fuente de energía de los organismos heterótrofos, la glucólisis es una vía metabólica muy bien estudiada que se define como: "la secuencia de reacciones que convierte a la glucosa en piruvato con la producción concomitante de ATP" (Stryer, 1988). Este proceso se da tanto en organismos aerobios, (preludio para el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa) como en organismos anaerobios, ya que no precisa de oxígeno para que se lleve a cabo.

La ecuación global es: glucosa + 2 Pi + 2 ADP + 2 NAD⁺ ---> 2 piruvato + 2 ATP + 2 NADH + 2 H⁺ + 2 H₂O.

La glucólisis es catalizada por 11 enzimas y se distinguen dos fases principalmente. En la primera, la glucosa así como las demás hexosas son fosforiladas mediante el consumo de ATP. Dicha fosforilación provee a cada intermediario de un grupo polar cargado negativamente, lo que le impide pasar por la membrana celular; actúa también como grupo de reconocimiento en la formación de complejos enzima-sustrato y es una forma de conservación de energía puesto que será utilizado en la producción de ATP. Finalmente la glucosa es convertida en gliceraldehído 3-fosfato utilizando la energía de dos moléculas de ATP. En la segunda fase, se llevan a cabo las etapas de óxido-reducción produciéndose cuatro moléculas de ATP a partir de ADP y generando piruvato, con un rendimiento neto de dos moléculas de ATP (Lehninger, 1985) (fig. 2).

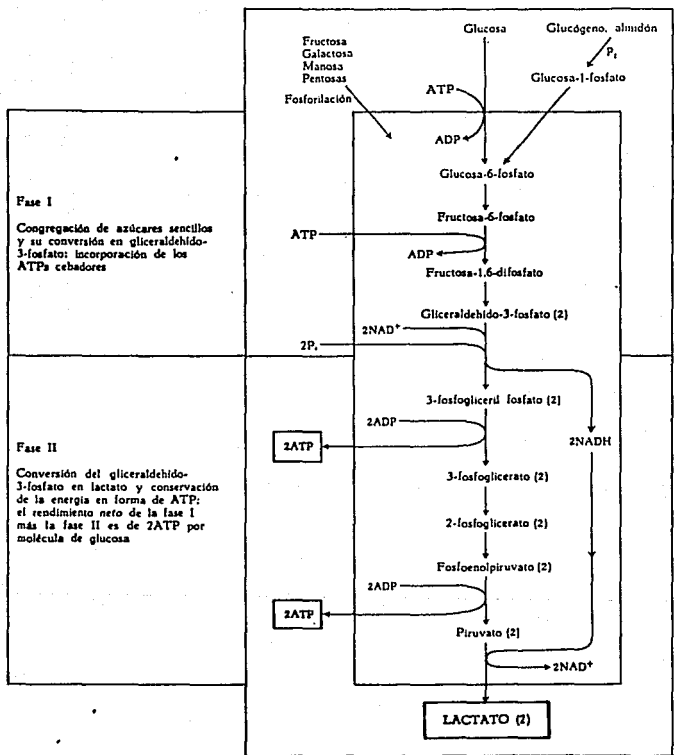


Fig. 2: Dos fases de la glucólisis: la degradación de hexosas hasta la producción de piruvato, conlleva la síntesis neta de dos moléculas de ATP (Lehninger, 1985).

Durante la glucólisis anaerobia, el piruvato es convertido en lactato o puede formar acetaldehído y etanol sucesivamente, como lo hacen las levaduras y otros microorganismos. Sin embargo, en eucariontes aerobios la glucosa puede llegar a liberar una mayor cantidad de energía, cuando el piruvato entra a la mitocondria (un organelo celular) y forma acetil CoA mediante la reacción catalizada por la piruvato deshidrogenasa: Piruvato + NAD⁺ + CoA --> acetil CoA + CO₂ + NADH. El Acetil CoA, pasa a la segunda etapa de obtención de energía, el ciclo de Krebs.

2) Ciclo de Krebs.

Este proceso, también llamado ciclo de los ácidos tricarbónicos, constituye una ruta común en la oxidación de todas las moléculas de combustible, siendo su inicio una molécula de acetil CoA que al condensarse con ácido oxalacético forma ácido cítrico, un compuesto tricarbónico de seis carbonos, el cual a través de una serie de reacciones genera dos moléculas de CO₂ y cuatro pares de átomos de hidrógeno (los cuales se incorporarán a la cadena respiratoria para generar ATP) reconstituyendo nuevamente al oxalacetato de cuatro carbonos, cerrando el ciclo y así volver a comenzar con una nueva molécula de acetato (Lehninger, 1985) (fig. 3). Puesto que una molécula de glucosa produce dos acetatos, se necesitan dos ciclos completos de Krebs para oxidarla, dando la siguiente reacción general: 2 acetatos + 6 NAD⁺ + 2 FAD + 2 GDP + 2 Pi ---> 6 NADH + 6 H⁺ + 2 FADH₂ + 4 CO₂ + 2 GTP + 2 H₂O (Avers, 1986).

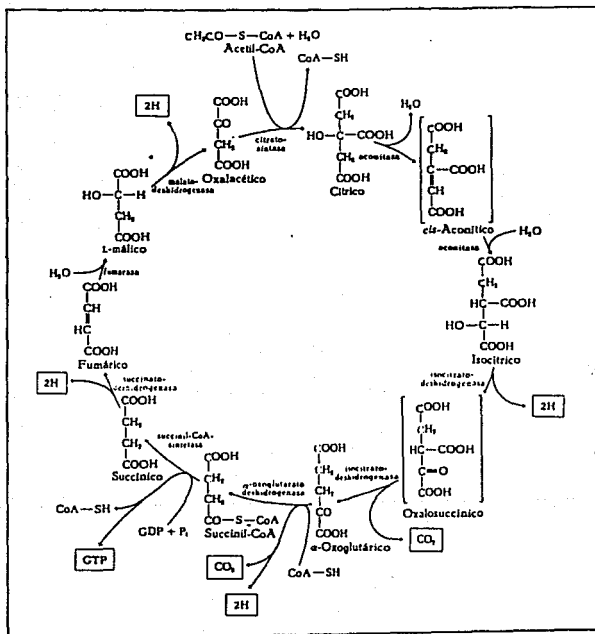


Fig. 3: El ciclo de Krebs: la oxidación de piruvato, (el cual entra al ciclo en forma de acetil-CoA) hasta CO_2 está asociada a la producción de NADH Y FADH_2 (Lehninger, 1985).

3) Fosforilación oxidativa y la cadena respiratoria.

3.1 La mitocondria: es un organelo celular de 0.7 a 1.0 micras de largo y de formas variadas (Nicholls, 1982), en donde se lleva a cabo la respiración de todos los organismos eucariontes. Presenta dos membranas: la externa, permeable a un gran número de moléculas pequeñas como iones y la membrana interna, que presenta una serie de invaginaciones llamadas crestas en donde se encuentran embebidas las proteínas de la cadena respiratoria. Esta membrana es impermeable a iones H^+ y OH^- y se compone de 0.33 a 0.44 mg de lípidos por mg de proteína distribuidos asimétricamente en la bicapa. Predominantemente existe fosfatidilcolina (40% aprox) hacia el lado periplásmico y fosfatidiletanolamina (35%) y cardiolipina (15%) hacia la matriz (Capaldi, 1982; Hatefi, 1985). Además, la mitocondria presenta dos compartimientos: la matriz, que contiene el ADN del organelo, ribosomas y una gran cantidad de enzimas, como las que llevan a cabo el ciclo de Krebs (ver sección anterior) y el espacio intermembranal, que mantiene características de pH y composición diferentes a la primera.

3.2 La cadena respiratoria: se compone de cinco complejos oligoméricos embebidos en la membrana interna mitocondrial que de acuerdo con su actividad enzimática se denominan: NADH- ubiquinona oxidorreductasa (complejo I), succinato-ubiquinona oxidorreductasa (complejo II), ubiquinol-citocromo c oxidorreductasa (complejo III), citocromo c oxidasa (complejo IV) y ATP sintetasa (complejo

V) (Hatefi, 1985), (fig. 4 y tabla I); además del citocromo c y de la ubiquinona encargados de la transferencia de electrones desde un compuesto con potencial redox alto, el NADH/NAD⁺ ($E_m = -320$ mV) proveniente del ciclo de Krebs de la matriz mitocondrial, hasta el oxígeno molecular ($E_m = +800$ mV), (fig. 5). En el caso del FADH₂/FAD con un potencial redox cercano a cero (-20 mV), sus electrones entran directamente a la cadena respiratoria mediante el complejo II (fig. 6), la única enzima del ciclo de Krebs que se encuentra parcialmente embebida en la membrana mitocondrial (Nicholls, 1982). Así mismo, existen tres estados a lo largo de la cadena respiratoria, representados por los complejos I, III y IV, donde la energía es conservada por la translocación de protones, creando un gradiente electroquímico a través de la membrana que es aprovechado por la ATP sintetasa para producir ATP (Hatefi, 1985).

Se sabe que la estequiometría entre los complejos es de: 1 complejo I : 2 complejos II : 3 complejos III : 6 citocromos c : 6 complejos IV : 1 complejo V, y que por lo menos el complejo III y el IV se encuentran en forma dimérica en la membrana (Capaldi, 1982; Capaldi y col, 1988). Se ha demostrado que los complejos respiratorios difunden libremente en forma lateral dentro de la membrana y que el citocromo c lo hace tridimensionalmente, provocando colisiones múltiples al azar que afectan directamente la velocidad del transporte de electrones (Hackenbrock, 1986), (ver Tabla I).

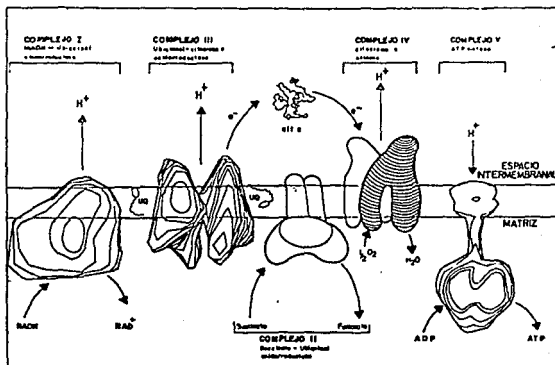


Fig. 4: Representación de los cinco complejos de la cadena respiratoria en la membrana interna mitocondrial (González-Halphen, 1990).

Tabla I: Datos significativos sobre los componentes que participan en la fosforilación oxidativa (González-Halphen, 1990).

COMPONENTE	PESO MOLECULAR DEL MONOMERO (Da) ^a	CONCENTRACION nmol/ug prot.	SUBUNIDADES nGél. mit.	GRUPOS PROSTETICOS
COMPLEJO I	700,000	0.06-0.13	25 7	FMN, Fe-S
COMPLEJO II	200,000	0.19	5 0	FAD, hemo b560 y centros Fe-S
COMPLEJO III	250,000	0.25-0.53	10 1	hemo c1, hemo b562, hemo b566 y centros Fe-S
COMPLEJO IV	208,000	0.6-1.00	10 3	hemo a3, Cu y Cu a3
ATP SINTASA	550,000	0.32-0.34	14 2	adenín nucleótidos Mg ²⁺
UBIQUINONA	860	6-8	- -	-
CITOCROMO c	17,000	0.8-1.02	1 -	hemo c
COEFICIENTE DE DIFUSION LATERAL (cm ² /seg)				FRECUENCIA DE COLISIONES (Colisiones/cm ²)
4 x 10 ⁻¹⁰		1,960		5.04 x 10 ¹³
4 x 10 ⁻¹⁰		3,781		2.07 x 10 ¹³
4.4 x 10 ⁻¹⁰		5,743		2.02 x 10 ¹³
3.7 x 10 ⁻¹⁰		17,089		-
-		-		-
3 x 10 ⁻⁹		119,763		1.19 x 10 ¹⁴
1.9 x 10 ⁻⁹		17,089		4.15 x 10 ¹⁴

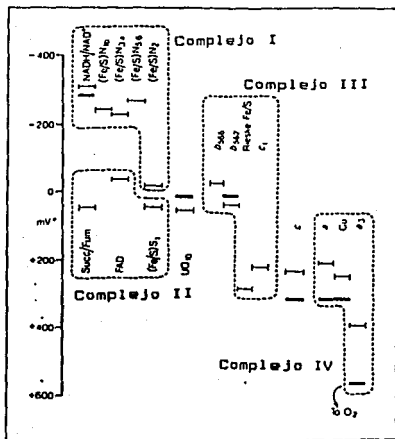


Fig. 5: Potenciales medios de óxido-reducción de los componentes involucrados en el transporte de electrones (Nicholls, 1982).

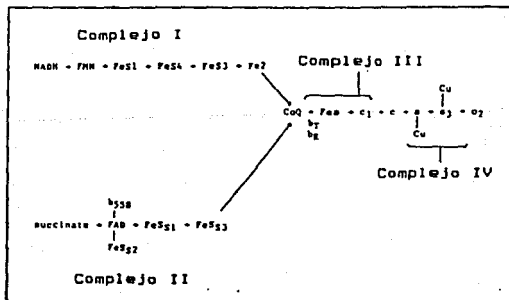


Fig. 6: Esquema del paso de electrones a través de los centros óxido-reductores de los complejos respiratorios (Capaldi, 1988).

cloroplasto o la membrana plasmática de bacterias aerobias, está acoplada a la síntesis de ATP por un potencial electroquímico dado por el bombeo de protones a través de la membrana transportadora de energía. Dicha reacción se mantiene desplazada hacia la síntesis de ATP ya que éste es continuamente removido para su consumo, así como el gradiente electroquímico es restituido por las enzimas bombeadoras de H⁺ conforme se transportan los electrones (Mitchell, 1979; Nicholls, 1982).

II.- Generalidades sobre el complejo III.

El complejo III mitocondrial (EC 1.10.2.2), también llamado complejo bc₁, cataliza la reacción de óxido-reducción entre el ubiquinol-10 y el citocromo c de la cadena respiratoria. El paso de electrones está acoplado además, al transporte de protones de la matriz al espacio intermembranal, por lo que se le ha denominado el sitio II de acoplamiento de la cadena respiratoria, ya que ahí se genera un cambio de energía suficiente para la producción de ATP. La ecuación general es:



donde p y n designan el lado positivo y negativo de la membrana, (o espacio intermembranal y matriz respectivamente) (Trumpower, 1990a).

1) Grupos oxidorreductores: el complejo III (bc₁) de todos los organismos estudiados hasta el presente, contienen los tres mismos

componentes redox, los cuales son: un citocromo b, que contiene dos grupos hemo tipo b unidos no covalentemente pero estabilizados por histidinas, denominados b-566 y b-562 según sus máximos de absorción; un citocromo c, con un hemo tipo c unido covalentemente a las cisteínas del polipéptido y la proteína hierro-azufre con un centro $2\text{Fe}:2\text{S}$ unido covalentemente por cisteínas e histidinas a la proteína.

Los citocromos se pueden seguir espectroscópicamente, ya que presentan un espectro reducido absoluto típico formado por varios picos denominados alfa, beta y gama (o Soret), tal como observó Keilin desde 1925, (fig. 7a). En espectros diferenciales (reducido menos oxidado), el citocromo b (reducido con ditionita), presenta una sola señal máxima a 562 nm, (aunque también se ha reportado el espectro del hemo b-566 utilizando menadiona; Berry, 1991). El citocromo c, puede ser reducido con ácido ascórbico dando un máximo de absorción a 553 nm (fig. 7b). El potencial medio de óxido-reducción del hemo b-566 es $E_m = -30$ a -60 mV, y del b-562 es $E_m = +30$ a $+100$ mV. Por otra parte, el citocromo c, presenta un $E_m = +225$ a $+245$ mV muy parecido al citocromo c soluble pero más negativo que la proteína hierro-azufre $E_m = +280$ mV. Este último centro es paramagnético cuando está reducido por lo que se le puede seguir por su espectro de resonancia paramagnética del electrón (EPR) con un g de 1.90 (Trumpower, 1981).

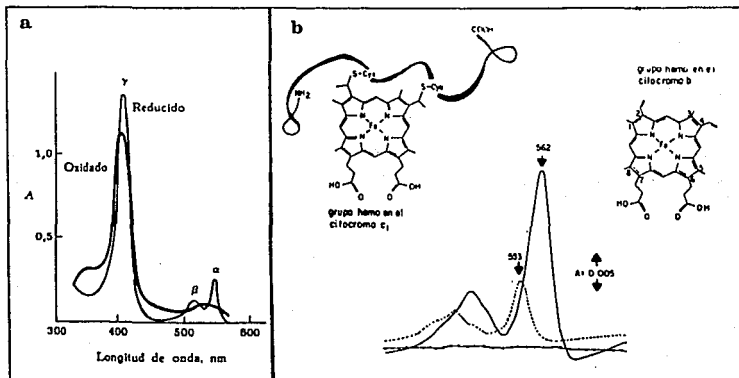


Fig. 7: a) Espectro absoluto del cit c donde se muestran los máximos de absorción al reducirse (Lehninger, 1985). b) Espectro diferencial del complejo bc₁, al cit b con un máximo de absorción a 562 nm y el cit c₁ a 553 nm. Además se esquematizan los grupos prostéticos de ambos citocromos (González-Halphen, 1990).

Se han propuesto varios modelos de cómo actúan los tres centros redox en la actividad del complejo, sin embargo, el que ha sido ampliamente aceptado por su demostración tanto *in vivo* como *in vitro* (incorporado en liposomas), (Papa y col, 1983; De Vries, 1988) es el llamado ciclo Q, postulado originalmente por Mitchell en 1975 y modificado por varios autores (entre otros Trumpower, 1990a). Según este modelo, una molécula de ubiquinol (ubiquinona reducida, con dos protones y dos electrones) es primeramente oxidada en forma parcial en el lado positivo de la membrana al transferir un electrón a la proteína hierro-azufre (FeS) que a su vez reduce al cit c₁, y que finalmente pasará su electrón al citocromo c soluble en el espacio intermembranal, transportando

además, dos protones en el lado positivo provenientes del ubiquinol. La semiquinona que fue formada, transfiere su otro electrón al hemo b-566 que se recicla al pasar al b-562, el cual reduce a la quinona para formar nuevamente semiquinona ahora en el lado negativo de la membrana. Una segunda molécula de ubiquinol es oxidada de la misma forma ya descrita, (transportando otros dos protones a través de la membrana), a diferencia de que el citocromo b-562 ahora reduce a la semiquinona anteriormente producida regenerando al ubiquinol y con el consumo de dos protones del lado negativo (es decir, tomando dos protones de la matriz), completándose así el ciclo.

En resumen, durante el ciclo Q se necesitan oxidar dos moléculas de ubiquinol y una es regenerada, se depositan dos protones en el lado positivo provenientes del ubiquinol y se translocan otros dos desde el lado negativo de la membrana y por último, se transfieren dos electrones que reducen a dos citocromos c (Trumpower, 1990a) (fig. 8).

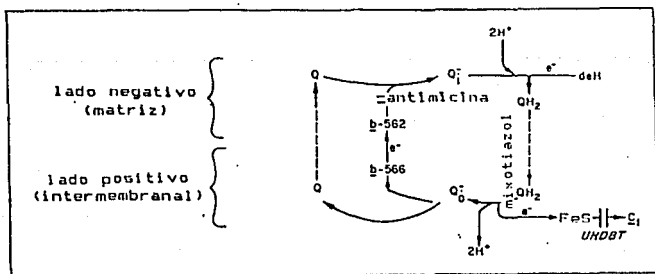


Fig. 8: El ciclo Q propuesto por Mitchell: se indican los sitios en los que actúan algunos inhibidores (Trumpower, 1990a).

Con objeto de comprobar experimentalmente el modelo propuesto, se han probado una gran variedad de inhibidores que actúan sobre diferentes puntos del ciclo; dos de los más utilizados, es la antimicina que inhibe la reducción de la ubiquinona a nivel del cit b-562 y el mixotiazol que inhibe la oxidación de ubiquinol actuando sobre la FeS y el hemo b-566 (von Jagow y Link, 1986). Así mismo, la distribución de los grupos redox dentro de la membrana ha sido confirmada mediante estudios de EPR. Los cálculos indican, que el hemo b-562 está en la parte media de la bicapa, mientras que el hemo b-566 y la proteína FeS están hacia el lado positivo, lo que los acerca al cit c, y cit c (Ohnishi y col, 1989).

2) Composición polipeptídica y topología del complejo: en la sección anterior se describió el funcionamiento del complejo bc₁, a continuación se mencionará lo que se conoce a cerca de su estructura.

El complejo bc₁, ha sido purificado por distintos métodos según la fuente de donde quiera ser extraído. En nuestro caso, el complejo III mitocondrial de mamífero, es aislado de corazón de bovino por el método reportado por Rieske en 1967, principalmente por su reproducibilidad y altos rendimientos, (ver materiales y métodos).

Al disociar el complejo utilizando detergentes y agentes caotrópicos, (clorhidrato de guanidina o urea) ya sea por cromatografía o por electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS) al 16%, se obtiene el mismo patrón de once polipéptidos (o subunidades) que lo constituyen tal como se

muestra en la en la fig. 9 (Schägger y col, 1986; Shimomura y col, 1986; González-Halphen y col, 1988).

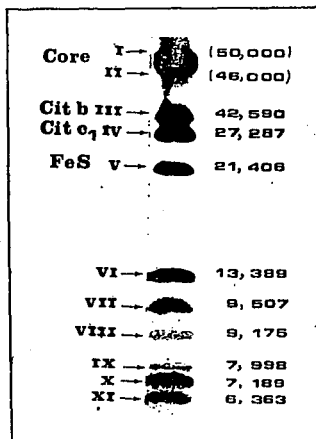


Fig. 9: Patrón electroforético de las 11 subunidades del complejo III. Del lado izquierdo se indican los tres polipéptidos con función redox y las denominadas proteínas estructurales (Core). En el lado derecho se muestran los pesos moleculares resultado de su secuenciación, a excepción de los marcados entre paréntesis que corresponden a su migración electroforética.

El arreglo topológico de las once subunidades en la membrana interna mitocondrial se ha estudiado desde distintos enfoques metodológicos:

a) Con base en la proteólisis limitada del complejo en mitoplastos (mitocondrias carentes de membrana externa) o

partículas submitocondriales (vesículas invertidas). Se utilizaron distintas proteasas como tripsina, termolisina, subtilisina, pronasa E, quimiotripsina, etc., que digieren a las subunidades según su accesibilidad dependiendo de la orientación que tengan, para ser analizados mediante el uso de anticuerpos específicos. De esta forma se sabe que las subunidades II y VI se encuentran del lado de la matriz mientras que las subunidades V y XI están en el lado intermembranal (González-Halphen, 1988).

b) Mediante el uso de marcajes específicos, ya sea con reactivos fotoactivables (que se unen covalentemente a su ligando al ser iluminados con luz ultravioleta) o con reactivos topológicos de tipo hidrofóbicos o hidrofílicos. Con los primeros, se conoce que la subunidad VII es la que une a la quinona y que el cit c_1 es el que se une al cit c. Con los segundos, se marcan ya sea las cadenas hidrocarbonadas o los grupos polares de los fosfolípidos demostrando que el cit b es la subunidad embebida en la membrana atravesándola de lado a lado. El cit c_1 y la proteína FeS están hacia el espacio intermembranal y las otras subunidades están en mayor o menor grado expuestas hacia alguna región hidrofílica (Gutweniger, 1981; González-Halphen, 1988).

c) El empleo de agentes entrecruzadores ha permitido establecer relaciones de vecindad entre las subunidades, ya que estos agentes (como las succinimidias y carbodiimidias) reaccionan covalentemente por ambos extremos con los aminoácidos de las subunidades aledañas. Así se demostró, que los siguientes pares se encontraban relacionados: I+II, II+VI, III+VI, IV+V, V+X, VI+VII y que el sitio

de unión del cit c con el complejo III incluye a las subunidades IV, VIII y X. Con base en todas las evidencias mencionadas, se ha propuesto un modelo topológico de la distribución de las once subunidades del complejo III en la membrana (González-Halphen, 1988; González-Halphen, 1990) (ver fig. 10).

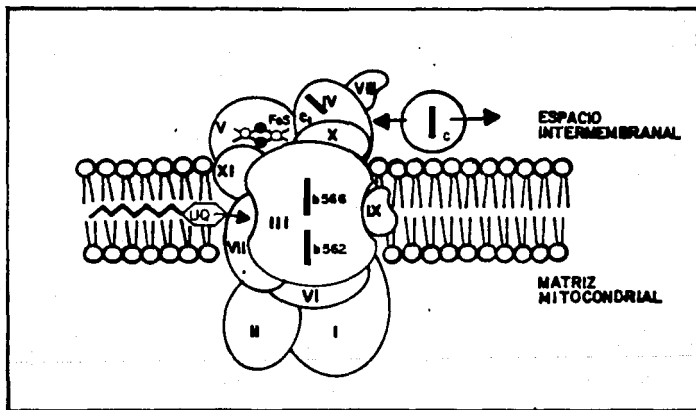


Fig. 10: Modelo del arreglo topológico de las subunidades del complejo III mitocondrial de corazón de bovino (González-Halphen, 1990).

3) **Cristalografía:** aunque se tienen muchas evidencias experimentales sobre la topología del complejo, todavía existe cierta controversia. El análisis de cristales bidimensionales del complejo III aislado con Tritón X-100 a partir de mitocondrias de Neurospora crassa, en monocapa y multicapa con una resolución de 2.5 y 1.8 nm respectivamente, muestra que un 30% de la masa del complejo está embebido en la bicapa, 50% en una sección periférica (7 nm) y un 20% en una sección periférica opuesta (3 nm) que constituyen dos pequeños lóbulos que representan al dímero.

Con base en los datos cristalográficos y las evidencias bioquímicas se sabe que el mayor porcentaje de la masa del complejo perteneciente a la matriz, corresponde a las subunidades I y II, mientras que las subunidades IV y V constituyen los dos pequeños lóbulos del compartimiento intermembranal y la subunidad III forma la parte central del complejo por ser tan hidrofóbica (Weiss y col, 1986) (fig. 11).

Recientemente diversos grupos (Kubota y col, 1991; Yue y col, 1991; Berry y col, 1992), lograron la producción de cristales tridimensionales del complejo III de corazón de bovino, pero todavía no se ha reportado el modelo estructural.

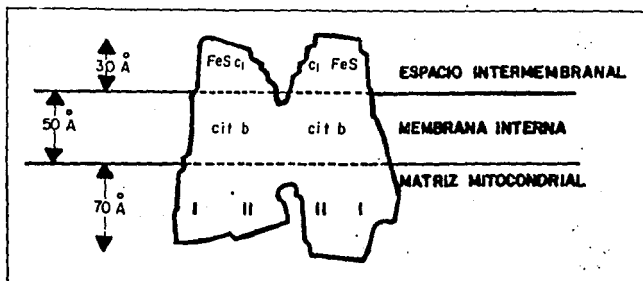
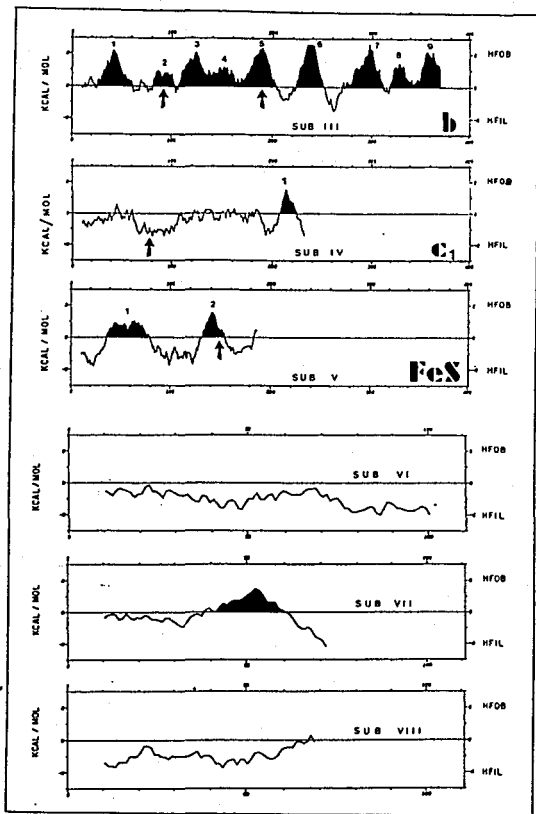


Fig. 11: Modelo estructural del complejo III dimérico de *Neurospora crassa* en la membrana a partir del análisis por difracción de electrones de cristales bidimensionales (Weiss y col, 1986; tomado de González-Halphen, 1990).

4) Biología molecular y filogenia: las once subunidades del complejo III de corazón de bovino han sido terminadas de secuenciar recientemente (Link y col, 1986; Gencic y col, 1991) y se les ha hecho un perfil de hidropatía según la escala de hidrofobicidad de los aminoácidos. De esta forma, el promedio de los valores de un segmento dado sirve para predecir los cruces transmembranales de una proteína cuando se aplica un algoritmo como el reportado por Kyte y Doolittle (1982). A partir de estos datos se propuso que el cit b tiene de 8-9 cruces, el cit c₁ solo presenta uno y la FeS dos, las subunidades VII, IX, X y XI también presentan regiones hidrofóbicas, pero las subunidades I, II, VI y VIII son casi en su totalidad hidrofílicas (González-Halphen, 1990) (fig. 12).



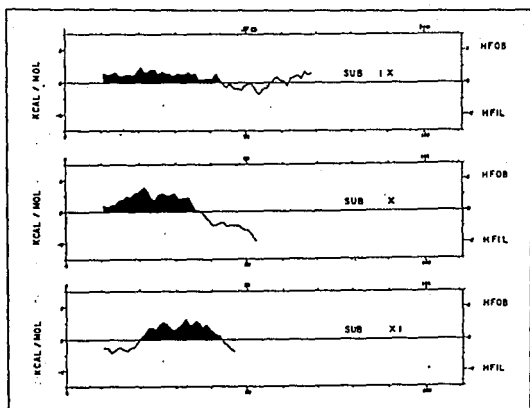


Fig. 12: Perfil de hidropatía de nueve de las once subunidades del complejo III, (no se incluye a las subunidades estructurales I y II). Las zonas sombreadas indican los posibles cruces transmembranales y las flechas, los sitios de unión de los grupos prostéticos (González-Halphen, 1990).

El citocromo b, de 390 residuos aproximadamente, es una de las subunidades mas estudiadas, ya que es el único polipéptido que se puede secuenciar a partir del ADN mitocondrial y por su importancia en cuanto a las implicaciones filogenéticas que conlleva según la teoría endosimbiótica. Además, se ha secuenciado a partir de fuentes como humano, bovino, ratón, *Saccharomyces*, *Aspergillus*, diferentes bacterias y cloroplastos de espinaca (cit b₆) los cuales son homólogos. Según los estudios de hidropatía, se ha propuesto que este citocromo cruza a la membrana en forma de alfa-hélices

nueve veces, (Saraste, 1983; Link, 1986) a excepción del de cloroplasto, donde se proponen cinco cruces (Widger, 1984). Sin embargo, pruebas recientes mediante la fusión de genes (entre otras), dan evidencia directa de que el cit b solo posee ocho cruces transmembranales y que el antes llamado segmento IV se ubica en el espacio periplásmico en Rhodobacter sphaeroides y posiblemente en otros organismos (Yun y col, 1991a). Por otra parte, existe consenso en proponer a cuatro histidinas, los residuos 82 y 96 del segmento II y los residuos 183 y 197 del segmento V en levadura (existiendo una separación de 13 aminoácidos entre los residuos de cada par) como los ligandos de los dos grupos hemo, ya que se encuentran conservadas en todas las secuencias. Link y col. en 1986, propusieron un modelo en el que los dos hemos se encuentran situados perpendicularmente a la membrana en medio de las hélices antiparalelas II y V, y que asociadas con los segmentos III y IV forman una estructura compacta, (aunque si tomáramos en cuenta que el segmento IV es en realidad hidrofílico, posiblemente estarían asociadas con las hélices I y III como menciona Trumpower, 1990b). Puesto que también se ha encontrado que la prolina 186 del cruce V está conservada en todas las secuencias, los autores proponen que ésta debe de conferir a la estructura cierta rotación con respecto al eje debido a un quiebre en la α -hélice.

La proteína FeS tiene 199 aminoácidos, la mayor parte corresponde al dominio del carboxilo terminal que es preferentemente hidrofílico y en donde se encuentra el sitio de unión del grupo redox. El precursor que es sintetizado en el

citoplasma tiene 32 residuos adicionales con lo que es acumulado en la mitocondria para después ser procesado e importado a su sitio final en el complejo bc₁ (Hartl y col, 1986; Fu y col, 1990; Fu y Beattie, 1991).

El cit c₁ está constituido por 241 aminoácidos, 43.6% de residuos hidrofóbicos y 41.1% polares dispuestos en gran parte en α -hélices (46%). La proteína se encuentra en el lado externo de la membrana anclada a ésta por una α -hélice hidrofóbica cercana al carboxilo terminal, mientras que las cisteínas que unen el grupo hemo (residuos 37 y 40 en bovino) pertenecen al dominio del amino terminal (Wakabayashi y col, 1982).

De los tres centros redox, el cit b es el más conservado tanto en los complejos bc₁ (bacterias púrpura y mitocondrias) como en los complejos b₆f (cianobacterias y cloroplastos) y puesto que se encuentra la misma estructura en gran variedad de organismos, esto apoya la hipótesis de que todas las líneas de procariontes tuvieron un origen monofilético (Gabellini, 1988; Hauska, 1988). El cit c₁ y el cit f aparecen por convergencia a partir de proteínas ancestrales diferentes y la FeS solo presenta un origen común en la parte del carboxilo terminal, aunque todas presentan la misma estructura y desarrollan la misma función. Tomando en cuenta que la velocidad de cambio de las proteínas está en íntima relación con la función que desarrollan, se explica que existan regiones conservadas en relación al sitio Qp del cit b, sin embargo no sucede lo mismo con el sitio Qn aun cuando ambos son fundamentales en el transporte de electrones (Howell, 1989).

En términos generales se puede decir que existe una mayor similitud entre los complejos de las bacterias fotosintéticas anaerobias y las mitocondrias, mientras que el de las cianobacterias tiene mayor parecido con el de cloroplastos lo que concuerda con la teoría endosimbiótica (Margulis, 1981; Gabellini, 1988).

Por otra parte, existe controversia acerca del resto de las subunidades no catalíticas del complejo. Se conoce que los procariontes presentan solamente las tres subunidades catalíticas como en Paracoccus denitrificans, o una subunidad más en Rhodobacter sphaeroides, los cloroplastos de plantas presentan cinco en total, los hongos Saccharomyces cerevisiae y Neurospora crassa tienen nueve y los mamíferos once. En algunos casos se les ha dado una posible función, como a la subunidad VII, relacionada con la unión de la ubiquinona (Yu y Yu, 1981), las subunidades VIII y X, que favorecen la unión del cit c₁ con el cit c (Kim y King, 1983), y las subunidades estructurales I y II que se ha visto su importancia en el ensamblaje del complejo en la membrana (Schulte y col, 1989). Posiblemente, el mayor número de subunidades esté relacionado con la compartimentalización de la cadena respiratoria en la mitocondria, lo que trajo consigo la necesidad de importar las proteínas codificadas por el núcleo y de un sistema de ensamblaje más complejo que el encontrado en procariontes. O también hay quienes proponen que las secuencias mas largas de los complejos bacterianos compensa el número extra de subunidades del complejo III en eucariontes (Gabellini, 1988; Trumpower, 1990b).

Hasta la fecha siguen realizándose experimentos con el fin de esclarecer estas polémicas.

5) Otras aportaciones: otro campo de investigación se refiere a la biogénesis del complejo, ya que resulta interesante como es que las 10 subunidades provenientes del citoplasma se ensamblan en la membrana interna mitocondrial coordinadas con el cit b que se inserta directamente después de ser sintetizado por los ribosomas mitocondriales. Mediante el estudio de mutantes de levaduras carentes de una subunidad específica, se ha tratado de establecer el orden de ensamblaje: la deficiencia de las subunidades estructurales I y II trae una reducción considerable de proteína en el cit b, la FeS y otras dos subunidades, mientras que el cit c₁ permanece intacto (Kennaway, 1988); la falta de la proteína FeS imposibilita el ensamblaje correcto de las subunidades de bajo peso molecular (6, 7 y 8 de levadura) así como un decremento en el cit b, pero no tiene efecto sobre las subunidades I y II (Japa, 1989). Posiblemente, se incorporen primero las subunidades de alto peso molecular y luego las más pequeñas, pero es necesaria la estructura completa incluyendo al apocitocromo b para que se incorpore finalmente el hemo b (Crivellone, 1988). El cit c₁ parece tener un mecanismo de ensamblaje independiente de las demás subunidades, ya que no se ve afectado en las diferentes mutantes (Kennaway, 1988; Japa, 1989). Dicho mecanismo ha sido bien estudiado por el grupo de Neupert (Teintze y col, 1982; Schleyer y Neupert, 1985).

El interés en el estudio de la estructura y la biogénesis del

complejo III, se ha incrementado por el descubrimiento de ciertas enfermedades relacionadas con la deficiencia de los complejos respiratorios en la mitocondria, y por la posible especificidad de tejido que pudiera darse desde el desarrollo embrionario, ya que esto último solo ha sido comprobado para algunas subunidades de la citocromo oxidasa (Capaldi y col, 1988; Kennaway, 1988).

III.- Antecedentes directos.

El tratar de separar a las subunidades de complejos integrales de membrana, generalmente lleva al uso de métodos largos y a la utilización de agentes desnaturalizantes.

Bordier en 1981, desarrolló una técnica para la obtención de proteínas hidrofóbicas que no pierden sus características espectroscópicas, mediante la separación de fases con el detergente no-iónico Tritón X-114.

Los detergentes pertenecientes a la familia del Tritón (polioxietilen p-t-octil fenol), tienen la capacidad de desplazar y reemplazar la mayor parte del ambiente lipídico que rodea a las proteínas, al formar pequeñas micelas en solución por arriba de su concentración micelar crítica (CMC TX-114 = 0.35 M) a 0°C. Sin embargo, al elevar la temperatura, el tamaño de la micelas se incrementa hasta un punto donde se enturbia la solución y se sale de fase. A la temperatura a la cual sucede esto se le llama punto de nube y depende directamente del número de grupos hidrofílicos oxietileno que posea el detergente. El Tritón X-100 por ejemplo,

con un número de 9-10 oxietilenos, tiene un punto de nube de 64°C, mientras que el TX-114 con $n = 7-8$ tiene un punto de nube de 20°C lo que le da la enorme ventaja de salirse de fase a temperaturas cercanas a la fisiológica (Pryde, 1986) (fig. 13).

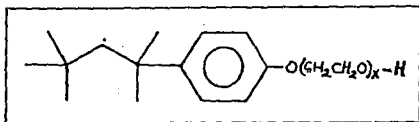


Fig. 13: Estructura del detergente Tritón X-114 en donde x representa el número de grupos oxietileno (TX-114 $x = 7-8$) (Neugebauer, 1987).

La separación de fases, se ha utilizado para la purificación de una gran variedad de proteínas, al recuperar una pastilla rica en detergente (después de centrifugar a baja velocidad), que contiene a las proteínas hidrofóbicas y un sobrenadante o fase acuosa en donde se encuentran las proteínas hidrofílicas que se unen muy poco al detergente.

Payne y Trumpower en 1987, utilizaron este método para separar las subunidades del complejo bc₁ de las bacterias Paracoccus denitrificans y Rhodobacter sphaeroides, que tienen tres y cuatro subunidades respectivamente. Sus resultados muestran que el cit b puro se localiza en la fase hidrofóbica (rica en detergente), mientras que el cit c₁, la proteína FeS y la subunidad IV, (según el caso) permanecen en el sobrenadante de acuerdo con su carácter hidrofílico. Los citocromos aún conservan sus propiedades espectroscópicas nativas, lo que indica que el método no solo es simple y rápido, sino que además permite purificar a las proteínas

con las características cercanas a las que poseían in vivo (fig.

14).

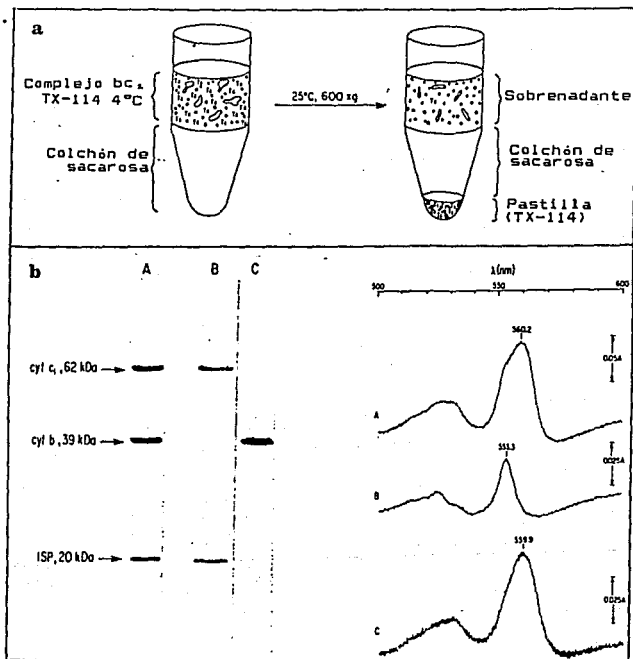


Fig. 14: Separación de fases del complejo bc₁ de Paracoccus denitrificans (Payne y Trumpower, 1987).

a) Representación de la separación de fases después de centrifugar a baja velocidad.

b) En el lado izquierdo se muestra el patrón electroforético del complejo y del lado derecho los respectivos espectros de absorción. (A) Corresponde al complejo antes de la separación por lo que se sobrepone los espectros de los citocromos, (B) es el sobrenadante en donde se localizan el cit c₁ y la FeS y (C) es la pastilla rica en detergente en donde se encuentra el cit b.

El cit b y el cit c, mitocondriales (el primero hidrofóbico y el segundo predominantemente hidrofílico), han sido purificados cada uno por diferentes métodos (T'Sai, 1982; Shimomura y col, 1985; Schägger y col, 1986), pero no se ha obtenido una preparación en la que ambos mantengan sus características espectroscópicas, es por esto que en el presente trabajo se probó la separación de fases del complejo III mitocondrial de bovino con el detergente TX-114 según el método de Payne y Trumpower (1987).

Por otra parte, el complejo III ha sido separado en diferentes subcomplejos mediante una cromatografía de hidrofobicidad en una columna de fenil-Sefarosa utilizando clorhidrato de guanidina como agente caotrópico (disociante), y detergentes como colato y desoxicolato de sodio. Esto ha permitido la purificación de casi todas las subunidades del complejo para su mejor estudio (Shimomura, 1986). Sin embargo, con este método el cit b se obtiene totalmente desnaturalizado por el detergente dodecil sulfato de sodio (SDS) (fig. 15a y b). Puesto que los citocromos son los que permanecen unidos a la columna durante la disociación, en el laboratorio probamos el efecto del TX-114, con el fin de obtener un subcomplejo que pudiera reconstituir actividad en forma parecida al complejo bc₁ de procariontes, y que después resultaría mas sencillo de disociar a gran escala, recuperando a los citocromos en forma pura.

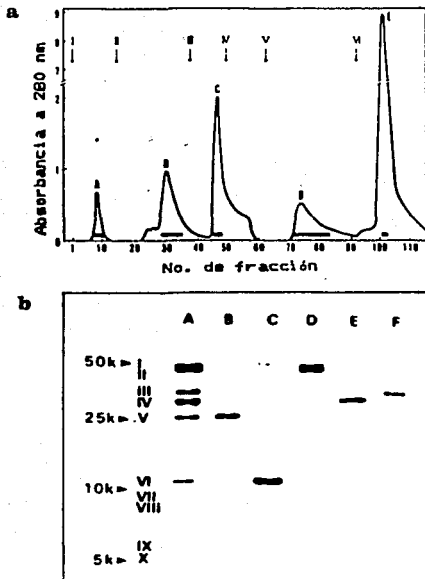


Fig. 15: Purificación de las subunidades del complejo III de corazón de bovino mediante una cromatografía de hidrofobicidad según el método reportado por Shimomura y col. (1986).

a) Perfil de elución de las subunidades, en donde los números romanos indican el amortiguador que se utilizó en presencia de: I.- desoxicolato de sodio 1%, II y III.- clorhidrato de guanidina 1.5 y 3 M respectivamente, IV.- colato 1%, V.- $C_{12}E_8$ 1%, y VI.- SDS 2% y las letras representan las fracciones enriquecidas en (A) FeS, (B) subunidad VI, (C) subunidades I y II, (D) cit c, y (E) cit b.

b) Patrón electroforético de las fracciones eluidas en un gel de poliacrilamida-SDS: (A) corresponde al complejo III (15 μ g de proteína), (B) FeS (2.5 μ g), (C) subunidad VI (2.5 μ g), (D) subunidades I y II (6 μ g), (E) cit c, (2.5 μ g) y (F) cit b (4 μ g).

OBJETIVOS

1.- Estudiar el fenómeno de separación de fases con el detergente no-iónico Tritón X-114 en el complejo III mitocondrial de corazón de bovino, con el fin de separar a las subunidades hidrofóbicas de las hidrofílicas.

2.- Purificar a los citocromos b y c_1 con el mismo detergente, utilizando cromatografías de hidrofobicidad e intercambio aniónico.

3.- Caracterizar electroforéticamente y espectroscópicamente a los citocromos purificados.

4.- Realizar el ensayo de reconstitución de la actividad de un subcomplejo constituido únicamente por los citocromos b y c_1 del complejo III mitocondrial con la proteína FeS, en un simil del complejo bc, de procariontes.

MATERIALES Y METODOS

1) Purificación del complejo III mitocondrial.

1.1 Obtención de mitocondrias (Löw y Vallin, 1963).

Se comenzó con corazones frescos de res que se limpiaron de tejido conectivo y grasa. El músculo se pasó por un molino de carne y se separó en fracciones de 400 g a las que se les agregó 1200 ml del amortiguador Tris-HCl 5 mM, sacarosa 250 mM y EDTA-K 2 mM (pH 7.4) para ser licuadas en pulsos de 6 seg por 5 de descanso durante un total de 30 seg, cuidando de mantener el pH del homogenizado a 7.5 con Tris saturado.

La mezcla resultante se centrifugó durante 10 min a 3,000 rpm en el rotor GS-3 (1,530 g) en una centrifuga Sorvall RC2-B. La pastilla obtenida se descartó y el sobrenadante se filtró a través de una capa de gasa doble para volver a ser centrifugado 10 min a 10,000 rpm con el rotor GSA (16,300 g). Las mitocondrias obtenidas en la pastilla fueron resuspendidas con un amortiguador que contenía únicamente Tris-HCl 5 mM y sacarosa 250 mM (pH 7.4) y se lavaron centrifugando 10 min a 10,000 rpm en el mismo rotor. La pastilla final se resuspendió en un volumen pequeño del segundo amortiguador, se homogenizó con un vástago de teflón y se guardó a -70°C.

Durante todo el procedimiento se trabajó a 4°C.

1.2 Preparación de la fracción S-1 (método modificado de Rieske, 1967).

Una vez que se midió el volumen de las mitocondrias, se obtuvo su concentración de proteína con el método de biuret (ver mas adelante). Se diluyeron con el amortiguador Tris-HCl 50 mM, sacarosa 670 mM e histidina 1 mM (pH 8.0) (Amortiguador TSH) para que quedasen a una concentración final de proteína de 23 mg/ml. A continuación se solubilizaron con desoxicolato de potasio (DOCK) al 10% (pH 9.0) gota a gota en agitación constante y en baño de hielo, a una concentración de 0.3 mg/mg de proteína y se precipitó con KCl sólido a 74.6 g/l. Se centrifugó por 16 min a 45,000 rpm con el rotor 60 Ti (145,000 g) en la ultracentrífuga (Beckman L8 55M). La pastilla que se obtiene es de color verde y corresponde mayoritariamente al complejo IV (cit oxidasa) por lo que se resuspendió en TSH y se guardó a -70°C para su posterior utilización. El sobrenadante rojo se filtró a través de fibra de vidrio y se midió su volumen, se le agregó 0.25 volúmenes de agua bidestilada fría y se centrifugó de la misma manera. El precipitado se descartó y el sobrenadante se dializó en una membrana con poro < PM 12,000-14,000 durante 3 horas contra 8 volúmenes de Tris-HCl 10 mM (pH 8.0). Finalmente, se centrifugó 45 min con el rotor 60 Ti a 45,000 rpm y el botón denominado fracción S-1 enriquecido en complejo III se resuspendió en TSH y se guardó a -70°C.

1.3 Preparación del complejo III crudo.

Se midió el volumen de la fracción S-1 y a continuación se obtuvo su concentración de proteína con el método de biuret. Se diluyó con el amortiguador TSH a una concentración final de 10 mg/ml y se solubilizó con DOCK (10%) a 0.5 mg/mg de proteína gota a gota. Posteriormente, se añadió acetato de amonio al 50% de saturación 16.5 ml/100 ml, se dejó reposar por 15 min (siempre a 4°C) y se centrifugó 16 min con el rotor 60 Ti a 45,000 rpm (145,000 g) en la ultracentrífuga. Este procedimiento se repitió dos veces agregando acetato de amonio al 50%, 6 ml/100 ml y 3.2 ml/100 ml respectivamente después de cada centrifugación. La pastilla llamada R₄B se puede guardar para la purificación del complejo I.

El sobrenadante se le midió el volumen y se le añadió acetato de amonio sólido (450 g/l), se dejó reposar 10 min y se centrifugó 25 min en el 60 Ti a 45,000 rpm. El botón obtenido corresponde al complejo III crudo que se resuspendió suavemente en TSH y se congeló a -70°C.

1.4 Preparación de complejo III puro.

Se midió el volumen del complejo III crudo y posteriormente se obtuvo la concentración de proteína con el método de biuret. Se diluyó a 10 mg/ml con el amortiguador TSH, se le añadió colato de potasio al 20% (pH 7.8) (0.25 mg/mg de proteína) y sulfato de amonio saturado a una concentración final de 0.35% de saturación (54 ml/ 100 ml) gota a gota en agitación continua. Se dejó reposar

10 min y se centrifugó con el rotor 60 Ti a 45 000 rpm (145,000 g) durante 10 min en la ultracentrifuga. El precipitado se descartó y al sobrenadante se le agregó sulfato de amonio a 0.40% de saturación (8.35 ml/ 100 ml), se dejó reposar y se centrifugó de la misma forma ya mencionada. El segundo sobrenadante se filtró a través de fibra de vidrio para eliminar el material aceitoso flotante, después se le agregó la mitad de la cantidad utilizada previamente de colato de potasio (20%) y sulfato de amonio 0.42% de saturación (3.45 ml/100 ml), se dejó reposar 10 min y se centrifugó bajo las mismas condiciones. Por último, se añadió sulfato de amonio a 0.48% de saturación (11.5 ml/100 ml) y se repitió la operación. El último botón corresponde al complejo III puro, se resuspendió en TSH, se le midió la concentración de proteína por el método de Lowry (ver mas adelante) y se guardó a -70°C hasta su uso.

Es de hacerse notar que las soluciones de desoxicolato y colato de potasio utilizadas en la metodología, se hicieron a partir de los ácidos desoxicólico y cólico recristalizados y KOH.

2) Separación de fases con el detergente Tritón X-114 (Bordier, 1981; Payne y Trumpower, 1987).

2.1 Precondensación del detergente Tritón X-114.

Para poder llevar a cabo la separación de fases, es necesario remover los grupos hidrofílicos del detergente comercial (Sigma), por lo que se sometió al pretratamiento descrito por Bordier

(1981). Se pesaron 20 g del TX-114 a los que se les agregó 16 mg de hidroxitolueno butilado (antioxidante), se disolvió en 980 ml de Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM (pH 7.4) a 0°C. La solución transparente se dejó incubando a 30°C durante toda la noche, al llegar a su punto de nube se enturbió y después se condensó, quedando una fase rica en detergente y una fase acuosa que se descartó. El procedimiento se repitió dos veces más y la última fase que se obtuvo enriquecida en detergente, se pasó a través del filtro Millipore (Millipore Corporation XX1004704) para eliminar impurezas. Se hicieron varias diluciones y se determinó su concentración por su espectro de absorción a 275 nm, utilizando el coeficiente de extinción $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 23.2$ (Payne y Trumpower, 1987).

2.2 Procedimiento para la separación de fases.

La proteína (2 mg/ml) en presencia de TX-114 1.5% precondensado, se sometió a diálisis durante 24 horas a 4°C contra Tris-HCl 25 mM (pH 8.0) con el objeto de eliminar el colato y sales provenientes de la purificación del complejo, (ya que comprobamos con anterioridad que su presencia inhibía la separación de fases desde muy bajas concentraciones) y se le determinó proteína por el método de Lowry. En un tubo cónico Eppendorf para microfuga se ajustó la muestra a una concentración final de 1.5 mg/ml en presencia de NaCl 150 mM, aforando a 0.5 ml con un amortiguador que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 7.5) y TX-114 1.5%. La mezcla se llevó a cabo a 0°C y se dejó agitando lentamente en frío en un agitador de plataforma rotatoria (Clay Adams Nutator 1105) durante una hora.

Posteriormente, las muestras aún translúcidas se envolvieron con hule espuma y se dejaron agitando a temperatura ambiente hasta que la solución se enturbiara, lo que indicaba que se había alcanzado el punto de nube. Después de 30 min los tubos fueron incubados a 30°C en un baño de agua con agitación (Cole-Palmer 1095-00) durante 5 min. A continuación las muestras se colocaron suavemente sobre 1 ml de una solución que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), sacarosa al 6% y TX-114 0.06% (solución "colchón") y se centrifugaron de 15-20 min a temperatura ambiente en una centrifuga clínica de columpio (Solbat) a 4,000 rpm. Al final del procedimiento, el Tritón se había salido de fase encontrándose en una pastilla densa. Se separó la pastilla del sobrenadante, se les midió a ambos la concentración de proteína y se corrió una electroforesis (ver adelante) para ver la distribución de proteínas. De ser necesario, la pastilla podía ser sometida nuevamente a separaciones de fases sucesivas para una mayor purificación.

El método descrito, es el sistema óptimo obtenido con base en una serie de pruebas hechas a partir de los rangos establecidos por el método de Payne y Trumpower (1987), que incluye: concentración de proteína de 1-1.5 mg/ml, cantidad de detergente 0.5-1.5% de TX-114, fuerza iónica determinada por la concentración de NaCl 50-150 mM, además de modificaciones propias como fueron, el dializar la proteína, variar el tiempo de incubación y la velocidad de centrifugación de la muestra. También se probó el uso de agentes caotrópicos (clorhidrato de guanidina y urea) a diferentes concentraciones, con el fin de obtener una mayor disociación del complejo III.

3) Purificación de los citocromos b y c₁.

3.1 Primera columna de DEAE-Biogel A (Ljungdahl, 1987; Silva-Cárdenas, 1991).

El complejo III purificado por el método de Rieske (descrito previamente), aún presenta cierta contaminación por subunidades de alto peso molecular pertenecientes al complejo II mitocondrial (succinato deshidrogenasa). Debido a los objetivos establecidos en este trabajo sobre la purificación de los citocromos b y c₁, se necesitaba partir de una muestra de complejo III lo más pura posible, por lo que en el laboratorio se ha implementado una técnica de aislamiento de estos dos complejos tratándolos con el detergente no-iónico lauril maltósido (dodecil β maltósido) y una cromatografía de intercambio aniónico. Para esto, el complejo III purificado por el método de Rieske (1967) (120-130 mg) se diluyó a 10 mg/ml (concentración final) con el amortiguador Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), sulfato de magnesio 1 mM (amort. 1) y se le agregó lauril maltósido 0.3 mg/mg de proteína gota a gota en agitación y en frío. Después de una hora de solubilización, se dializó contra el amort. 1 durante 4 horas, se diluyó 1:2 con Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), sulfato de magnesio 1 mM y lauril maltósido 0.1 mg/ml (amort. 2) y se centrifugó 10 min en el rotor 50 Ti a 30,000 rpm (60,000 g). El precipitado se descartó y el complejo III que se quedó en el sobrenadante se cargó a una columna de DEAE-Biogel A (BioRad) de 2.5 x 20 cm previamente equilibrada en frío con el amort. 2 y se lavó con 5 volúmenes de columna del mismo. Los complejos fueron

eluidos utilizando dos gradientes de cloruro de sodio en presencia del amort 2, el primero de 0-150 mM y un segundo de 150-400 mM de 2 volúmenes cada uno, dejando que en cada paso acabara de eluirse la proteína con un volumen adicional de amortiguador conteniendo NaCl 150 ó 400 mM respectivamente. Las fracciones se colectaron en volúmenes de 3 ml y se leyeron en el espectrofotómetro (Beckman UV/VIS DU50) a 280 nm. La fracción correspondiente al complejo II se concentró en una cámara de ultrafiltración Amicón de 10 ml con una membrana Diaflo YM 30 y se congeló a -70°C.

3.2 Columna de fenil-Sefarosa (método modificado de Shimomura y col, 1986).

La cromatografía de hidrofobicidad se utilizó con el fin de disociar al complejo III para la obtención de un subcomplejo constituido por las subunidades III (cit b) y IV (cit c₁).

Reactivos	Amortiguadores						
	1	2	3*	4	5	6*	7*
Tris-HCl							
25 mM (pH)	8.0	8.0	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
glicerol (%)	20	20	20	20	20	---	---
DTT (mM)	1.0	1.0	---	1.0	1.0	---	1.0
EDTA (mM)	1.0	---	---	---	---	---	---
NaCl (M)	0.2	---	---	---	---	---	---
DOCNa (%)	0.25	1.0	---	---	---	---	---
colato Na (%)	---	---	1.0	1.0	1.0	---	---
clorhidrato de guanidina (M)	---	---	---	1.5	3.0	---	---
TX-114 (%)	---	---	---	---	---	---	1.5

* amortiguadores adicionales al método original.

Al complejo III puro (que se eluyó de la primera columna de DEAE-Biogel A), se le adicionó glicerol al 20% y se cargó directamente (sin concentrar) a una columna de fenil-Sefarosa CL 4B (Pharmacia) de 2.5 x 20 cm equilibrada con 500 ml del amortiguador 1 y se lavó con 2.5 l del mismo. Posteriormente las diferentes

subunidades del complejo se eluyeron sucesivamente con 200 ml de cada uno de los amortiguadores 2, 3, 4, 5 y 7 (descritos anteriormente). Se colectaron en fracciones de 3 ml y se leyeron en el espectrofotómetro (Beckman UV/VIS DU50) a 280 nm, excepto las fracciones eluidas con el amort 7, ya que el máximo de absorción del TX-114 (275 nm) interfiere con la lectura de proteína, por lo que sólo se siguió la absorbancia de los hemos a 415 nm. El amortiguador 6 no eluye proteína, pero se utiliza para lavar el colato y el clorhidrato guanidina antes de eluir con el TX-114. Las muestras en presencia del agente caotrópico se dializaron contra Tris-HCl 25 mM (pH 7.5), colato 0.5% y todas las fracciones eluidas con cada amortiguador (excepto las de los amortiguadores 6 y 7) se concentraron por separado en una cámara de ultrafiltración Amicon de 20 ó 10 ml con una membrana Diaflo YM 10, se les midió la concentración de proteína por el método de Lowry y se analizaron por electroforesis, (ver adelante).

3.3 Segunda columna de DEAE-Biogel A.

El pico enriquecido en los citocromos b y c, en presencia del detergente TX-114 que se obtuvo del procedimiento anterior, se cromatografió directamente (sin concentrar) en una columna de 1 x 10 cm equilibrada previamente con Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), sulfato de magnesio 1 mM y octil glucósido 0.1 mg/ml y se lavó con dos volúmenes del mismo. A continuación se eluyó con Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), sulfato de magnesio 1 mM, Tween20 2%, NaCl 400 mM y DIT 1 mM. Las fracciones del lavado y de la elución que corresponden a cada

uno de los citocromos aislados, se colectaron en volúmenes de 2 ml y se leyeron en el espectrofotómetro a 415 nm. Se obtuvieron sus espectros de absorción y se realizó la electroforesis correspondiente de cada muestra.

4) Determinación de proteína.

4.1 Método de biuret (Gornall y col, 1949).

Este método consiste en una reacción colorimétrica que corresponde a la unión del cobre en solución alcalina con las uniones peptídicas y los residuos de tirosina.

Para preparar el reactivo de biuret, se necesitan 1.5 g de sulfato cúprico y 6 g de tartrato de sodio y potasio ($\text{NaKC}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) que se disuelven en agua tibia y se les agrega 300 ml de NaOH al 10% aforando posteriormente a 1 l.

La curva patrón se hizo a partir de seroalbúmina de bovino 10 mg/ml de 0 a 2 mg totales; cada tubo se aforó a 0.8 ml con agua bidestilada, se les agregó 0.2 ml de DOCK al 10% y 2 ml del reactivo de biuret agitando en cada paso. Las muestras a determinar se pusieron en cantidades de 10 y 20 μl por duplicado. Después de 30 min los tubos se leyeron en el espectrofotómetro (Shimadzu UV160U) a 540 nm y la concentración se obtuvo interpolando los datos en la curva patrón.

4.2 Método de Lowry modificado (Lowry, 1951; Markwell, 1978).

Este método es similar al de biuret pero es 10 veces más

sensible (Holme y Peck, 1983), además contiene SDS, lo que facilita la determinación de la concentración de proteínas membranales:

Solución A (1l): carbonato de sodio 2%
hidróxido de sodio 0.4%
tartrato de sodio 0.16%
SDS 1%

Solución B: sulfato de cobre 4%

Solución C: 100 vol A / 1 vol B

Solución D: 1 vol del reactivo de Folin / 1 vol de agua

La curva patrón se hizo con seroalbúmina 1 mg/ml de 0 a 0.1 mg y se aforó a 1 ml con agua, se le agregaron 3 ml de la sol. C y 0.3 ml de la sol. D agitando en cada paso. Después de 30 min se leyó en el espectrofotómetro a 540 nm.

5) Remoción del detergente Tritón X-114 asociado a las proteínas (Holloway, 1973).

5.1 Lavado de los Bio-Beads SM-2 (BioRad).

Los BioBeads son un copolímero (poliestirén-divinilbenceno) poroso de carácter neutro que adsorbe distintos detergentes, entre ellos al grupo del Tritón. Para su uso se recomienda un pretratamiento como se describe a continuación: a 30 g de BioBeads se les agregó 200 ml de metanol, se agitaron durante 15 min y se colectaron filtrando el líquido a través de un filtro Millipore, se les pasó 500 ml adicionales además de un litro de agua. Sin dejar que se secan, se lavaron lentamente en una columna para cromatografía con dos litros de agua y se mantuvieron en agua a temperatura ambiente hasta su uso.

5.2 Remoción del detergente.

El Tritón X-114 no traspasa la membrana Diaflo YM 10 (por su elevado número de agregación que en el caso del Tritón X-100 es de 100-155 dando un peso molecular aproximado de 62,500 para la micela), por lo que conforme se concentra la proteína también se incrementa la cantidad de detergente. Esto interfiere con la realización de los espectros, así como con la electroforesis, por lo que es necesario remover el exceso de detergente antes de llevarlos a cabo. El TX-114 no se puede dializar en un periodo menor a dos semanas debido a su bajo valor de CMC (lo que indica una rápida formación de micelas), (Furth, 1980); ni tampoco logramos que se intercambiara completamente por otro detergente en una cromatografía. Los BioBeads fueron efectivos al agregarse directamente a la muestra en una concentración de 0.6 g (peso húmedo) / 2 ml de proteína permaneciendo en agitación lenta sobre el agitador de tabla rotatoria durante 24 horas en frío. Dicho método permite disminuir la concentración del detergente lo suficiente para que no interfiera en la caracterización de las proteínas, aunque nunca alcanza a eliminarlo completamente.

6) Caracterización electroforética (Schägger y col, 1986).

6.1 El tipo de electroforesis de sistema discontinuo que se describe a continuación permite la resolución completa de las 11 subunidades del complejo III (Schägger y Von Jagow, 1987).

	gel separador (16%)	gel de muestra (4%)
Bis-acrilamida (0.938% / 30%)	16.0 ml	1.6 ml
Amortiguador electroforético	10.0 ml	3.0 ml
Glicerol (0.795% v/v)	4.0 ml	----
Agua	—	7.4 ml
Persulfato de amonio (10%)	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl

Amortiguadores utilizados

- electroforético: Tris 3 M, HCl 1 M, SDS 0.3%
- catódico (superior): Tris 0.1 M, Tricina 0.1 M, SDS 0.1%
- anódico (inferior): Tris-HCl 0.2 M (pH 8.9)

Solución digestora: Tris-HCl 100 mM (pH 6.8), SDS 10%, glicerol 30%, mercaptoetanol 4%, azul de bromofenol 0.03%

Las muestras se digirieron durante media hora con solución digestora y se cargaron a un gel de poliacrilamida-SDS. Se corrió en una cámara de electroforesis (BRL V16 vertical) a 30 Volts durante 1 hora y posteriormente a 80-100 V durante toda la noche. Al término se fijó con una solución de metanol 50% y ácido acético al 10%, se tiñó con azul de Coomassie G-25 0.1% y ácido acético al 10% y se destiñó con ácido acético al 10%.

Los geles de interés, se analizaron cuantitativamente mediante barridos densitométricos con el aparato Ultrascan XL (LKB) acoplado al programa de cómputo correspondiente.

6.2 Inmunorrélicas tipo Western (Towbin y col, 1979; Hawakes y col, 1982).

Un método adicional en la caracterización de los citocromos fue el uso de anticuerpos específicos contra la holoenzima, la

subunidad III (cit b) y la IV (cit c₁).

Amortiguadores

- transferencia: Tris 25 mM (pH 7.5), glicina 192 mM, metanol 20%, SDS 0.1%
- TBS: Tris-HCl 20 mM (pH 7.5), NaCl 500 mM
- TTBS: Tris-HCl 20 mM (pH 7.5), NaCl 500 mM, Tween 20 0.05%
- revelado: BCIP (fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolil) 30 mg / 4 ml dimetil formamida (DMF).
NBT (azul de nitrotetrazolio) 60 mg / 2.8 ml
DMF + 1.2 ml agua.

Primero se llevó a cabo la electroforesis con 5 µg de proteína en cada carril. Al gel (sin ser sometido a tinción), se le colocó encima el papel de nitrocelulosa y se puso entre papeles filtro y esponjas (previamente remojados en el amortiguador de transferencia) y la rejilla. Se usó la cámara de transferencia (Hoefer TE22) durante 4 horas a 250 mA (corriente constante) y al terminar, los segmentos de papel se lavaron dos veces por 5 min con TBS (Tris, amortiguador salino). Se les agregó gelatina al 3% disuelta en el mismo amortiguador, por un mínimo de 4 horas con el fin de bloquear sitios inespecíficos y se lavaron en TTBS (Tris, Tween, amortiguador salino) dos veces (5 min). Se dejaron incubando con el primer anticuerpo: anti-holoenzima, dilución 1:20,000; anti-cit b 1:2,000 o anti-cit c, 1:2,000 respectivamente, en presencia de 1% de gelatina, toda la noche. Después se adicionó el segundo anticuerpo (fosfatasa alcalina, que permite la reacción colorimétrica) 1:3,000 durante 4 horas, lavando antes y después con TTBS. Para revelar, se agregó a cada tira una solución de bicarbonato de sodio 100 mM, cloruro de magnesio 1 mM (pH 9.8), además de 200 µl de BCIP y NBT y se detuvo la reacción lavando con

agua bidestilada.

(En todos los pasos, las tiras de papel de nitrocelulosa se trataron con 20 ml de cada solución en agitación constante y a temperatura ambiente).

7) Caracterización espectroscópica.

Las muestras se leyeron en el aparato Shimadzu UV (160U) directamente o se diluyeron con el amortiguador fosfato de potasio 25 mM, EDTA de potasio 0.025 mM (pH 7.2) de ser necesario. Se realizaron tres tipos de espectros:

7.1 Absoluto: en una celda de cuarzo de 0.5 ml se pusieron 250 μ l de muestra y se leyó en el espectrofotómetro para obtener el espectro oxidado, a continuación se le agregó ditionita en polvo como reductor (Aldrich Chemical) y se siguió su absorbancia en un rango de 350 a 700 nm.

7.2 Piridín-hemocromógeno: en una celda de 3 ml se mezclaron 1 ml de hidróxido de sodio, 1 ml de piridina y 0.5 ml de agua y se agregó 0.5 ml de muestra con la que se obtuvo el espectro oxidado. Después, la solución se redujo con un exceso de ditionita y se leyó inmediatamente en el espectrofotómetro en el mismo rango anterior (Horie y Morrison, 1963).

7.3 Diferencial: en una celda de 0.5 ml se pusieron 300 μ l de muestra y se le agregó ferricianuro de potasio (Baker Analyzed) (1 M) a una concentración final de 0.5 mM, se realizó la línea base leyendo en el espectro de 500 a 600 nm, a continuación se adicionó ascorbato (Sigma) (1 M pH 7.0) 5 mM y se repitió la lectura, se ajustó una segunda línea base con la misma muestra y se terminó de reducir con ditionita en polvo para obtener el último espectro. El contenido hémico del cit b y del cit c, se determinó con los coeficientes de extinción 25 y 17.5 mM respectivamente (Degli Esposti, 1986).

8) Ensayo de reconstitución de la actividad ubiquinol-citocromo c óxido-reductasa con el subcomplejo bc₁ y la proteína FeS (González-Halphen y col, 1991).

Reactivos

- Amortiguador: fosfato de potasio 25 mM (pH 7.2), EDTA de potasio 0.025 mM.
- Fosfolípidos: asolectina 4 mg/ml, cardiolipina 1 mg/ml disueltos por sonicación en fosfato de potasio 25 mM (pH 7.2), EDTA 0.025 mM, Tween 20 0.1% y azida de sodio 1 mM.
- Tween 20: 20% v/v.
- Ubiquinona: el DBH se preparó según Trumpower y Edwards (1979) en etanol 72 mM, se redujo con ditionita y se extrajo con ciclohexano (0.6-0.8 ml) 3 veces, se resuspendió en dimetil sulfóxido y se obtuvo su concentración por su coeficiente de extinción 16 mM a 277 nm.
- Proteína FeS: se eluyó de la columna de fenil-Sefarosa con desoxicolato de sodio 1% por el método descrito anteriormente. Su pureza se determinó por el barrido densitométrico de la electroforesis y su concentración precisa por la cuantificación de fierro con el espectro de absorción atómica (Perkin-Elmer 372) a 248 nm.

- Sub bc, y
cit c:

la cantidad de proteína utilizada se dedujo de la concentración de cit b y cit c que se obtuvo por sus coeficientes de extinción $\epsilon = 25$ y 19 mM (Degli Esposti, 1986), al reducirse con ditionita y ascorbato respectivamente.

El subcomplejo bc, en presencia de $275 \mu\text{g}$ de fosfolípidos y la proteína FeS se dializaron por separado toda la noche previa a la reconstitución contra el amortiguador de fosfatos para eliminar el DTT presente en la preparación y se les midió proteína por el método de Lowry. La muestra que contenía 300 pmol de cit b se incubó con 900 pmol de proteína FeS a 30°C durante 30 min . La actividad de ubiquinol-citocromo c óxido-reductasa se siguió en un espectrofotómetro de doble rayo (SLM-Aminco DW-2c) en el modo DUAL ($550\text{-}540 \text{ nm}$) en una celda de cuarzo de 3 ml con agitación en presencia de: lípidos $25 \mu\text{g/ml}$, catalasa 25 unidades/ml , superóxido dismutasa 10 unidades/ml , Tween 20 ó Tritón X-100 0.2% , cit c $30 \mu\text{M}$ y DBH $15 \mu\text{M}$ para disparar la reacción, aforando a 2 ml con amortiguador de fosfatos.

RESULTADOS

Para poder llevar a cabo el primer objetivo planteado en este trabajo con respecto a la separación de fases del complejo III mitocondrial, fue necesario establecer una metodología donde se obtuvieran los resultados óptimos. Entre las modificaciones más importantes, cabe mencionar el someter la proteína a diálisis intensiva con lo que se eliminó el colato, cuya presencia inhibe que el Tritón X-114 se salga de fase (ver fig. 16). Dicha técnica se estandarizó al poder separar la mezcla de citocromo oxidasa, (de carácter hidrofóbico) y el citocromo c (una proteína totalmente hidrofílica) y recuperarlos en su respectiva fase después del tratamiento, tal como se muestra en el gel de poliacrilamida-SDS de la figura 17 a y b.

Así mismo, la metodología implementada fue de utilidad cuando se quiso comprobar el carácter hidrofílico del fragmento V" de la proteína FeS al someter el complejo III a proteólisis limitada con tripsina, como se observa en el artículo del apéndice anexo.

Al probarse con el complejo III, aún después de realizarse dos separaciones consecutivas, el cit b (subunidad III) permanece en la fase rica en TX-114 y la proteína FeS (subunidad V) en la fase hidrofílica según lo esperado siguiendo el modelo topológico descrito en la introducción, sin embargo, el cit c, (IV) y la subunidad VI entre otras, se distribuyen equitativamente en ambas partes por lo que no hay una completa resolución de los polipéptidos en forma aislada (ver fig. 18).

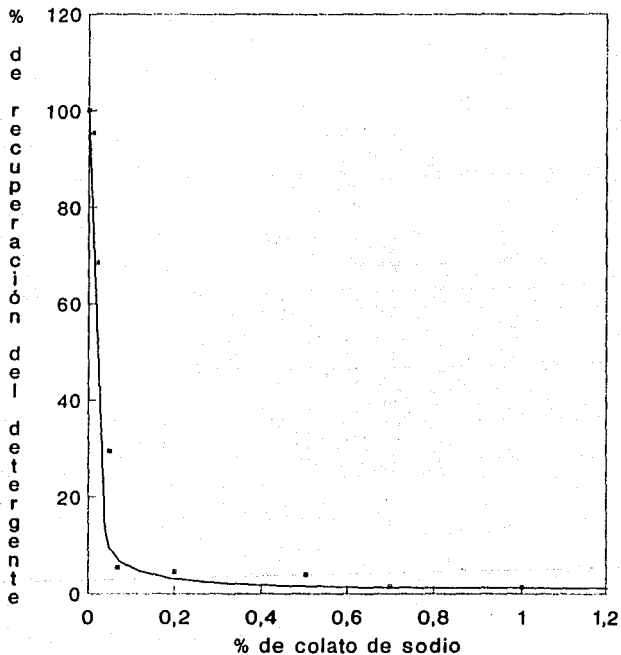
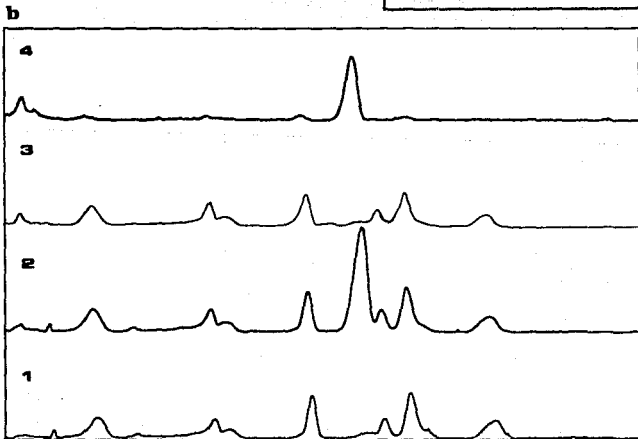
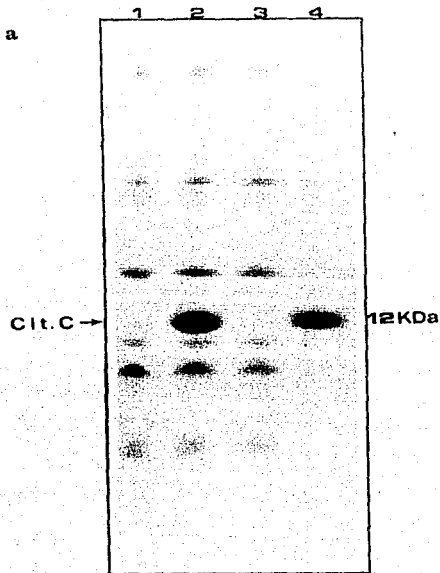


Fig. 16: Inhibición de la separación de fases del Tritón X-114 por concentraciones crecientes del detergente colato, en donde el 100% de recuperación de TX-114 en la pastilla corresponde a una absorbancia de 2.417 a 275 nm en ausencia de colato.

Fig. 17: a) Electroforesis de la separación de fases de la cit oxidasa y el cit c. 1) cit oxidasa purifica da 11.7 μg de proteína, 2) mezcla cit oxidasa 11.7 μg + cit c 3.3 μg = 15 μg totales antes de la separación, 3) Pastilla (fase hidrofóbica) 11.7 μg y 4) so brenadante (fase hidrofili ca) 3.3 μg . b) Barrido den sitométrico en donde 1,2,3 y 4 corresponden a los mig mos carriles que en a).



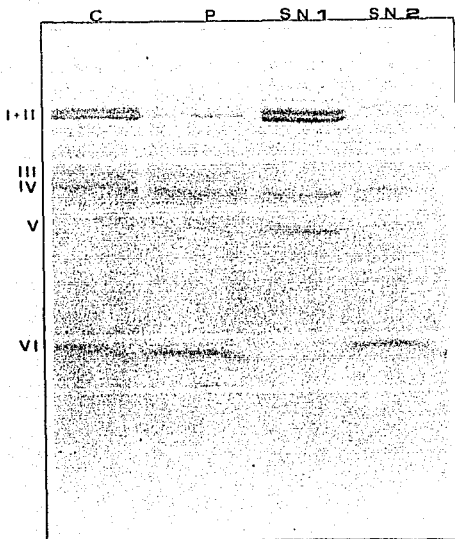


Fig. 18: Patrón electroforético de la separación de fases consecutiva del complejo III con el TX-114, en donde (C) corresponde al complejo III purificado (20 μg de proteína), (P) la pastilla que se obtuvo después de dos separaciones sucesivas (20 μg), (SN 1) primer sobrenadante (20 μg) y (SN 2) segundo sobrenadante (20 μg) recuperados. Del lado izquierdo se indica el número de la subunidad.

Para obtener una mejor resolución de la separación de fases se probó el uso de clorhidrato de guanidina. Sin embargo, se observó

que la adición de concentraciones crecientes de este agente caotrópico no condujo a mejores resultados, e incluso, inhibió la la separación de fases del detergente (fig. 19 y 20).

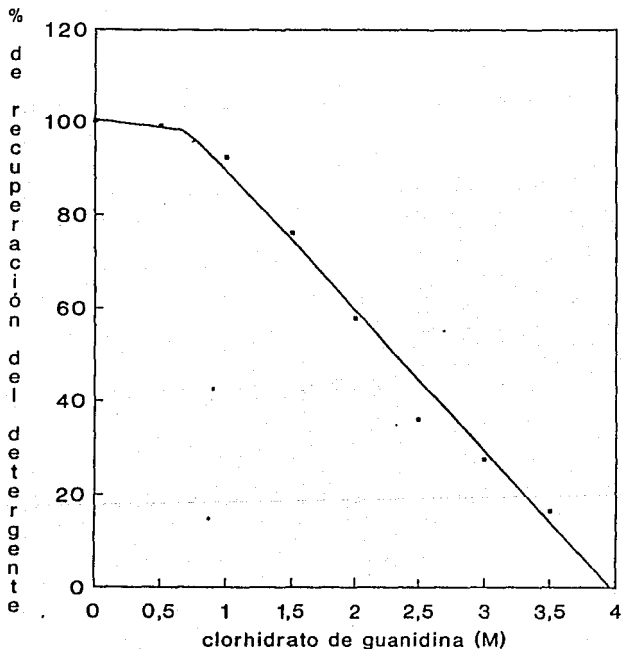


Fig. 19: Inhibición de la separación de fases del Tritón X-114 por concentraciones crecientes de clorhidrato de guanidina, en donde el 100% de recuperación del detergente en la pastilla corresponde a 1.92 de absorbancia a 275 nm en ausencia del agente caotrópico.

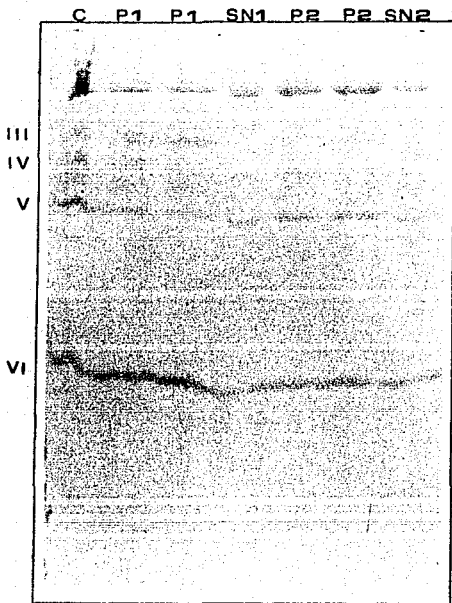


Fig. 20: Patrón electroforético de la separación de fases del complejo III con TX-114 en presencia de clorhidrato de guanidina. (C) Complejo III purificado (20 μ g de proteína), (P) pastilla (fase hidrofóbica con 20 μ g) y (SN) sobrenadante (fase hidrofílica con 10 μ g). Los números 1 y 2 indican la concentración del agente caotrópico 0.0 y 0.5 M respectivamente.

En presencia de urea (otro agente caotrópico), se obtuvieron buenos resultados en la separación de fases considerando que sólo se llevó a cabo una vez. Como se observa en la fig. 21, el cit b (subunidad III) permanece en las pastillas de detergente, mientras que las subunidades V y VI se enriquecen parcialmente en el sobrenadante alrededor de una concentración de 2.0 M de urea.

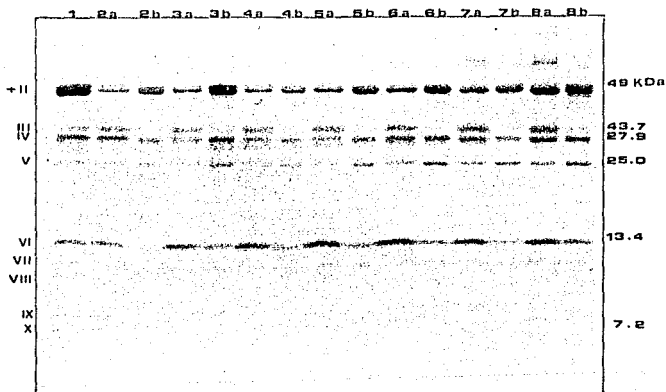


Fig. 21: Electroforesis de la separación de fases del complejo III con TX-114 a concentraciones crecientes de urea. (a) Pastilla con 20 μg y (b) sobrenadante con 20 μg de proteína. Los números superiores indican: 1.- complejo III antes de la separación de fases (20 μg de proteína), y a continuación las concentraciones de urea que se utilizaron: 2.- 0.0 Molar, 3.- 0.5 M, 4.- 1.0 M, 5.- 1.5 M, 6.- 2.0 M, 7.- 2.5 M y 8.- 3.0 M. Además del lado izquierdo se indica el número de subunidad y del lado derecho algunos de los pesos moleculares de las proteínas según su migración electroforética (Schägger y col, 1986).

Por último, se probó la separación de fases con el subcomplejo constituido por los citocromos b y c₁ (ver más adelante), bajo el supuesto que, con una estructura mas sencilla, se lograría la separación de los mismos. Sin embargo, tampoco se recuperaron en forma aislada, (datos no mostrados).

Dado que la separación de fases del complejo III intacto con el detergente TX-114 no separa eficientemente a las subunidades hidrofílicas de las hidrofóbicas, como sucede en el caso del complejo bc₁ de bacterias (Payne y Trumpower, 1987), se decidió disociar a las diferentes subunidades del complejo utilizando una cromatografía hidrofóbica de fenil-Sefarosa. Los resultados obtenidos se desglosarán según los tres pasos que se siguieron en la metodología.

a) Primera columna de DEAE-Biogel A: El complejo III obtenido por el método de Rieske en presencia de lauril maltósido cargado a esta columna, se sometió a un gradiente discontinuo de cloruro de sodio con el que se obtuvieron los complejos II y III a baja y alta fuerza iónica respectivamente (fig. 22). La succinato deshidrogenasa representa el 6-7% del total de proteína con el que se comenzó y el complejo III se recupera casi en su totalidad. En el gel de poli-acrilamida de la figura 24a, que se muestra más adelante, se puede comparar el complejo III en presencia (carril 8) y ausencia (carril 7) de las subunidades de alto peso molecular del complejo II.

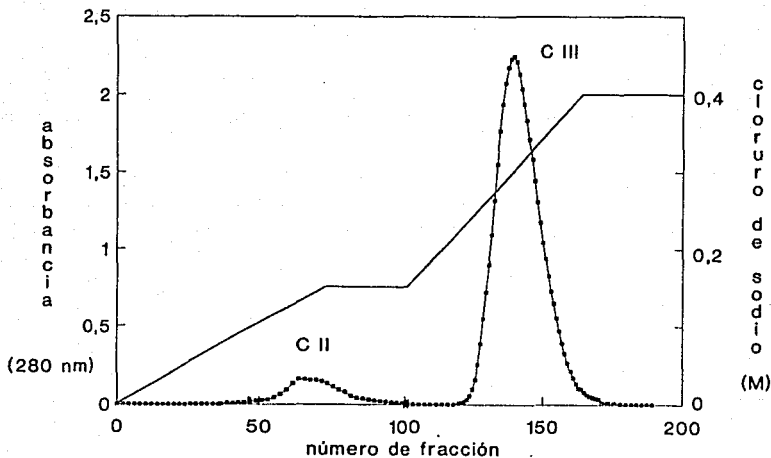


Fig. 22: Perfil de elución de la primera columna de DEAE-Biogel A que se siguió por la lectura de proteína a 280 nm, utilizando un gradiente discontinuo de cloruro de sodio (concentración molar). La doble marca sobre la línea del perfil indica que se interrumpió la lectura de las subsiguientes fracciones y se comenzó con el segundo gradiente.

b) Columna de fenil-Sefarosa: El complejo III puro que se cargó a esta columna, se lavó extensamente con 0.25% de desoxicolato de sodio y alta fuerza iónica con el fin de quitar los fosfolípidos asociados al complejo (Shimomura y col, 1986); dicho lavado es necesario para poder disociar posteriormente a la proteína fierro-azufre. Al aumentar la concentración del detergente a 1% y eliminar el cloruro de sodio, se obtiene una fracción enriquecida en la proteína FeS (60-70% de pureza) en presencia de las subunidades I y II, como se observa en su respectivo barrido densitométrico (que se muestra más adelante). Puesto que el desoxicolato precipita fácilmente en presencia del clorhidrato de guanidina, es necesario intercambiarlo por colato de sodio a la misma concentración, con el que se eluyen únicamente las subunidades I y II. Al adicionar el agente caotrópico (clorhidrato de guanidina) en una concentración de 1.5 M se obtiene esencialmente a la subunidad VI y al aumentar la concentración a 3.0 M se obtienen los polipéptidos VI y VIII todavía en presencia de las subunidades I y II. Después de lavar la columna, el subcomplejo constituido por las subunidades III (cit b) y IV (cit c,) es eluido con 1.5% de Tritón X-114.

El perfil de elución se presenta en la figura 23 y el patrón electroforético y el barrido densitométrico de las diferentes fracciones en las figuras 24 a, b y c. Como se observa, existen diferencias con respecto a los resultados obtenidos por el método original de Shimomura y col. (1986) que se discutirán mas adelante.

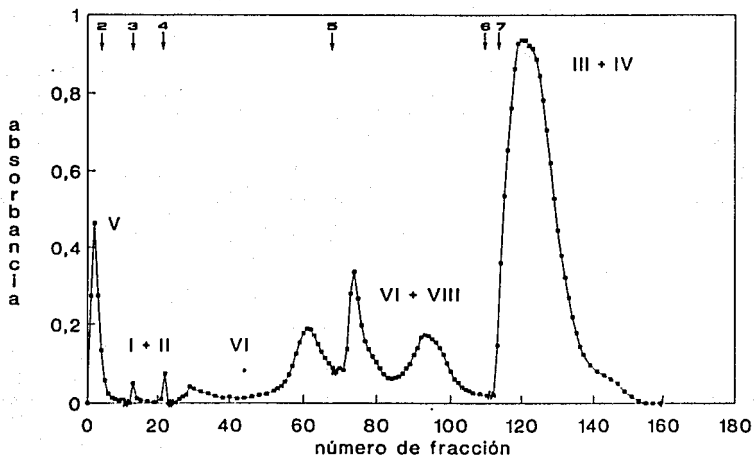
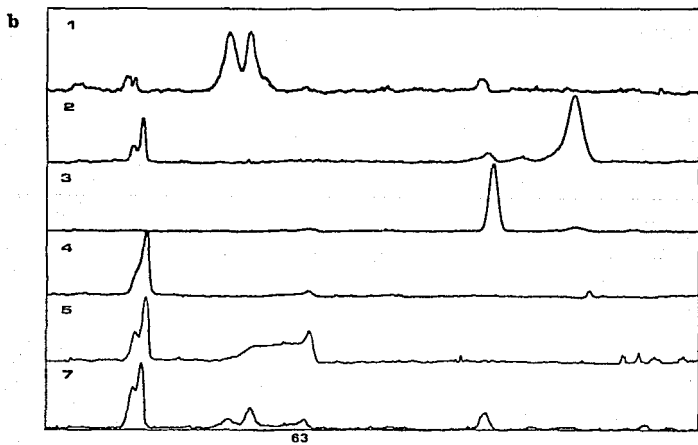
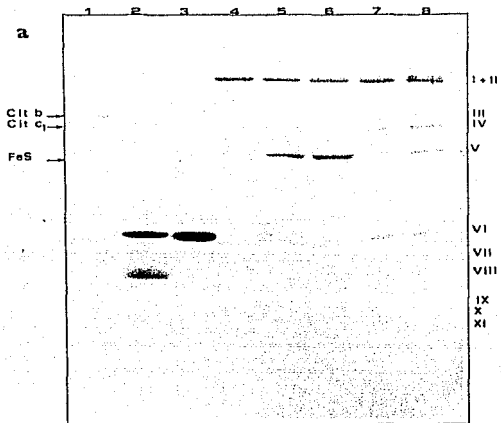


Fig. 23: Perfil de elución de la columna de fenil-Sefarosa CL 4B, que se siguió por la absorbancia a 280 nm excepto para el último pico que se leyó a 415 nm debido a la interferencia del detergente TX-114 con la lectura de proteína. Los números en la parte superior indican el amortiguador con el que se eluyó (ver métodos) y los números romanos las subunidades enriquecidas del complejo III. Las dobles marcas sobre la línea del perfil indican el principio y término de la lectura de las fracciones que contienen a las subunidades arriba señaladas, las cuales se colectaron por separado y se analizaron posteriormente.



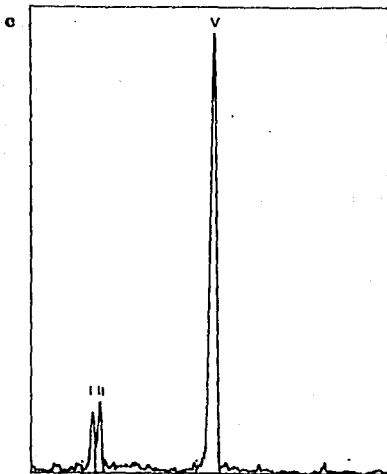


Fig. 24: a) Patrón electroforético de las subunidades eluidas de la columna de fenil-Sefarosa, en donde todos los pozos hay 10 μ g de proteína. De derecha a izquierda, el carril 8.- presenta el complejo III todavía en presencia de las subunidades de alto peso molecular de la succinato deshidrogenasa (por arriba de las subunidades I+II), 7.- el complejo III puro eluido de la columna de DEAE-Biogel A, y en los carriles subsecuentes se presentan las fracciones que se eluyeron con los amortiguadores en presencia de: 6 y 5.- DOCNa 1%, 4.- colato Na 1%, 3.- clorhidrato de guanidina 1.5 M, 2.- clorhidrato de guanidina 3.0 M y 1.- Tritón X-114 1.5% b) Barrido densitométrico de las subunidades presentes en cada fracción que se muestran en a). c) Barrido densitométrico de la misma fracción que se muestra en los carriles 5 y 6 enriquecida en la proteína FeS pero que se corrió nuevamente en otro gel por separado.

c) Segunda columna de DEAE-Biogel A: al cargar el subcomplejo bc_1 en esta columna, el citocromo b salió en el volumen de exclusión, mientras que el cit c_1 solo eluyó en presencia de Tween 2% y cloruro de sodio 400 mM (fig. 25). La electroforesis y el barrido densitométrico muestran la separación de los citocromos en las figuras 26 a y b. Además, la pureza de los citocromos tanto en el subcomplejo como en su forma aislada, se corroboró con las inmunorrélicas tipo western que se muestran en la figura 27.

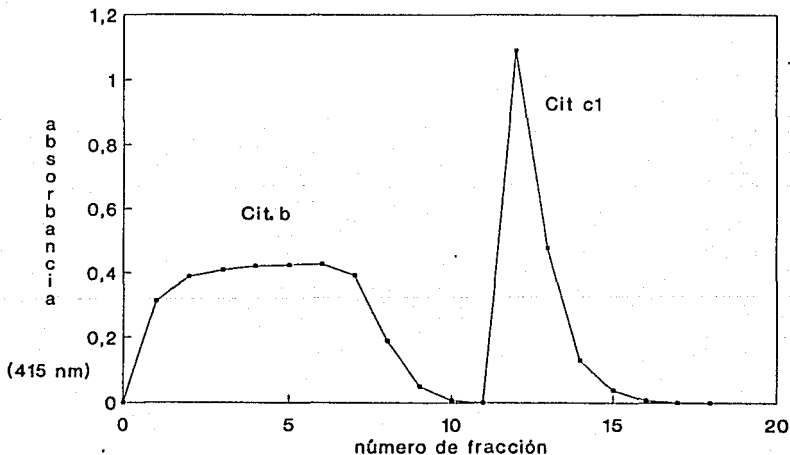
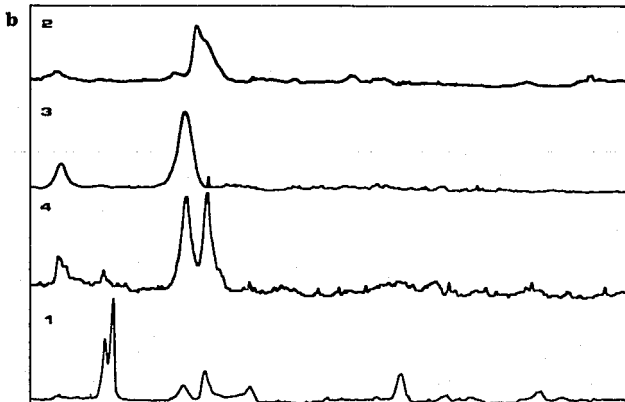
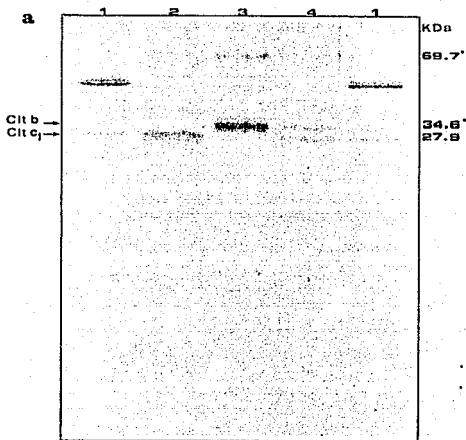


Fig. 25: Perfil de elución de la segunda columna de DEAE-Biogel A, cuya lectura se siguió por la absorción de los grupos hemo a 415 nm. Las fracciones que corresponden al cit b constituyen el volumen de exclusión, mientras que el pico del cit c_1 , se eluyó con Tween 2%, NaCl 0.4 M.

Fig. 26: a) Patrón electroforético y b) barrido densitométrico de los citocromos eluidos de la 2a columna de DEAE-Biodel A en donde cada carril contiene 10 μ g de proteína: 1.- complejo III puro, 2.- cit c_1 , 3.- cit b y 4.- subcomplejo bc_1 , en presencia de TX-114. Del lado derecho se muestran los pesos moleculares de los citocromos, aquellos marcados con una x son los datos obtenidos por el barrido densitométrico indicando que la banda de 69.7 KDa corresponde al dímero del citocromo b.



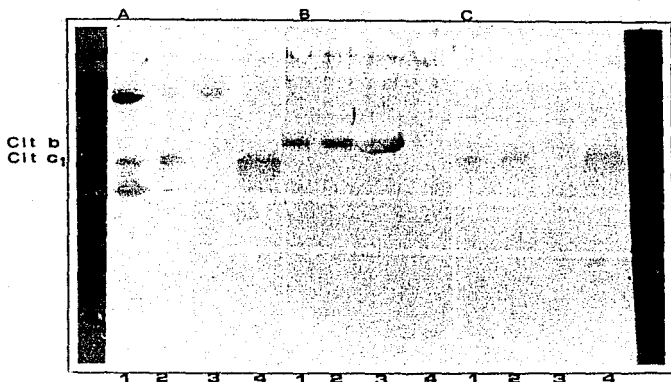


Fig. 27: Inmunorréplicas tipo Western de los citocromos b y c₁. Las letras en la parte superior indican el anticuerpo que se usó: (A) anti-holoenzima 1:20,000, (B) anti-citocromo b 1:2,000 y (C) anti-citocromo c₁ 1:2,000. En la parte inferior se señalan los carriles de la electroforesis los cuales contienen 5 µg de proteína cada uno y corresponden a: 1.- complejo III puro, 2.- subcomplejo bc₁, 3.- cit b purificado y 4.- cit c₁ purificado. Es de hacerse notar que el anticuerpo anti-holoenzima no reconoce al citocromo b.

Caracterización espectroscópica: el subcomplejo bc_1 y los citocromos purificados presentan un espectro absoluto oxidado con un solo pico λ (Soret) máximo entre 415.5 y 416.5 nm, mientras que tienen tres regiones de absorción típicas al ser reducidos con ditionita α , β y γ cuyos valores máximos varían ligeramente entre sí como se muestra en las figuras 28a, 29a y 30a, especialmente para el caso del cit c_1 .

El espectro de piridín-hemocromógeno, que determina la cantidad total de hemo independientemente de su unión con la proteína, no resolvió a los citocromos b y c_1 en el subcomplejo, ni mostró un incremento en absorbancia con respecto al espectro absoluto, pero se observa un desplazamiento de los picos máximos de absorción con respecto a los obtenidos solamente con ditionita (fig. 28b).

Los espectros diferenciales, para el caso del cit b , tanto en la proteína pura como en el subcomplejo bc_1 , no mostró una diferencia significativa en su máximo de absorción con respecto a lo reportado, siendo de 560-561 nm al ser reducido con ditionita (fig. 28c y 29b). El espectro del cit c_1 , tampoco se ve modificado dentro de los rangos reportados 552-553 nm, pero sí presenta diferencia en cuanto a su potencial redox puesto que el ascorbato resulta insuficiente para reducirlo y ahora requiere de la presencia de ditionita para reducirse completamente (fig 30b). Esto también se ve reflejado en el espectro diferencial del subcomplejo (fig. 28c), donde pareciera que la cantidad de hemo b con respecto al c_1 es considerablemente mayor al esperado, (para su comparación ver fig. 7b).

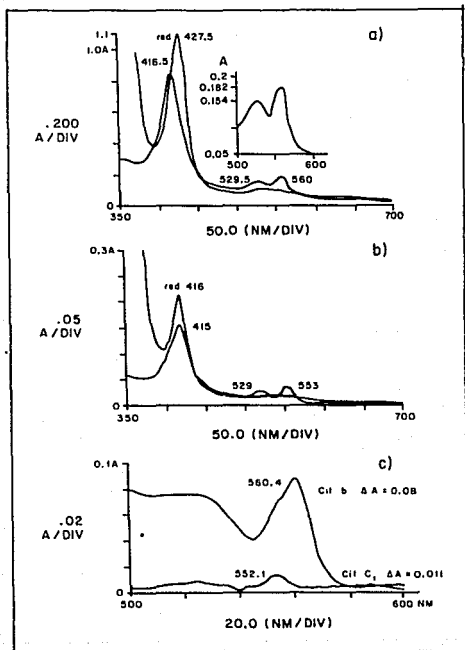


Fig. 28: Espectros de absorción del subcomplejo bc₁ obtenido de la columna de fenil-Sefarosa. a) Absoluto: el espectro oxidado presenta un solo pico Soret a 416.5 nm y el espectro reducido con ditionita muestra las tres regiones características α (560 nm), β (529.5 nm) y γ (427.5 nm). En el recuadro se amplifican los picos α y β . b) Piridin-hemocromógeno: el espectro oxidado presenta un solo pico Soret a 415 nm y el espectro reducido con ditionita muestra un corrimiento de los picos α (553 nm), β (529 nm) y γ (416 nm) con respecto al espectro reducido en (a). c) Diferencial (ditionita menos ascorbato) en el que se muestra solamente la región α y β : el pico a 560.4 nm producto de la reducción con ditionita corresponde al cit b mas un porcentaje del cit c, que se observa en un ligero hombro. La fracción del cit c, reducible por ascorbato corresponde al pico a 552.1 nm. Del lado derecho se indica el incremento en la absorbancia de ambos citocromos.

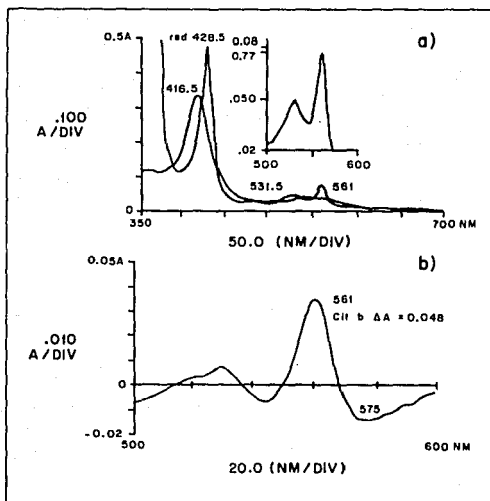


Fig. 29: Espectros de absorción del cit b. a) Absoluto: en el espectro oxidado sólo hay un pico de absorción máximo en la zona Soret a 416.5 nm, mientras que en el espectro reducido con ditionita se observa un pico α a 561 nm, uno β a 531.5 nm y el γ a 428.5 nm. Se inserta la amplificación de la zona α y β . b) Diferencial (reducido con ditionita menos oxidado con ferricianuro): se muestra únicamente la zona α y β con un máximo de absorción a 561 nm y cuyo incremento en la absorbancia es de 0.048.

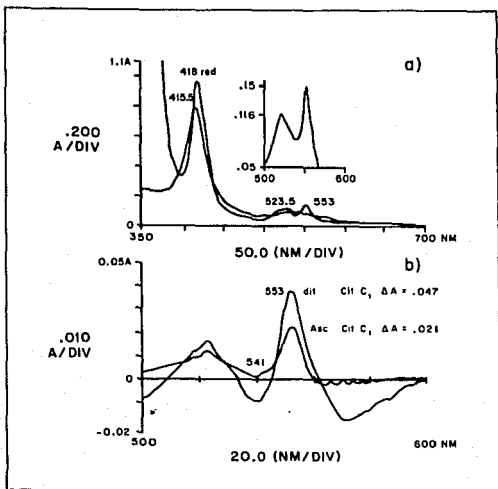


Fig. 30: Espectros de absorción del cit c. a) Absoluto: el espectro oxidado presenta un pico máximo de absorción a 415.5 nm y al ser reducido con ditionita tiene un pico α a 553 nm, uno β a 523.5 nm y uno γ a 418 nm, en el recuadro se amplifica la zona α y β . b) Diferencial (reducido con ascorbato o ditionita menos el oxidado con ferricianuro): se muestra únicamente la zona α y β del espectro, en donde se observa que el ascorbato resulta insuficiente para reducir al cit c, y es necesario utilizar ditionita que lo reduce completamente sin cambiar el máximo de absorción de 553 nm.

Debido a que el citocromo c₁ no se redujo con ascorbato completamente, resultó muy difícil poder conocer la relación cit b / cit c₁ en el subcomplejo bc₁ por lo que, con el objeto de tener una mejor aproximación de la cantidad de hemo por mg de proteína y la relación de hemos existente en el subcomplejo se siguió un enfoque diferente, que se describe a continuación:

a) Primero nos encontramos con el problema de la determinación de proteína, ya que el método de Lowry generalmente utilizado sobreestimaba la concentración real de las muestras debido a la elevada cantidad de detergente que contenían (aún después de ser tratados con BioBeads). Para demostrarlo, se realizó una electroforesis en la que se pusieron distintas cantidades de proteína de complejo III puro, subcomplejo bc₁ (que se obtuvo de la columna de fenil-Sefarosa), y los citocromos b y c₁ purificados (fig. 31); luego se analizó por el barrido densitométrico y como se muestra en la tabla II, el incremento del área de los citocromos no corresponde a la cantidad de proteína que se cargó en cada carril del gel según la determinación hecha por Lowry, tomando en cuenta que el cit b en el complejo III corresponde al 11.6% del total de subunidades, en el subcomplejo bc₁ al 49.9% y en forma pura al 100% y que el cit c₁ participa con el 15.7% en el complejo, 50.1% en el subcomplejo y corresponde al 100% después de haber sido purificado. Cabe señalar que dicho análisis puede hacerse gracias al hecho de contar con un complejo III nativo altamente purificado, donde se puede cuantificar espectroscópicamente el contenido de los citocromos b y c₁. Con esta preparación, es posible comparar las

otras muestras obtenidas: el subcomplejo bc, el cit b puro y el cit c₁ puro, con base en los barridos densitométricos de cada patrón electroforético.

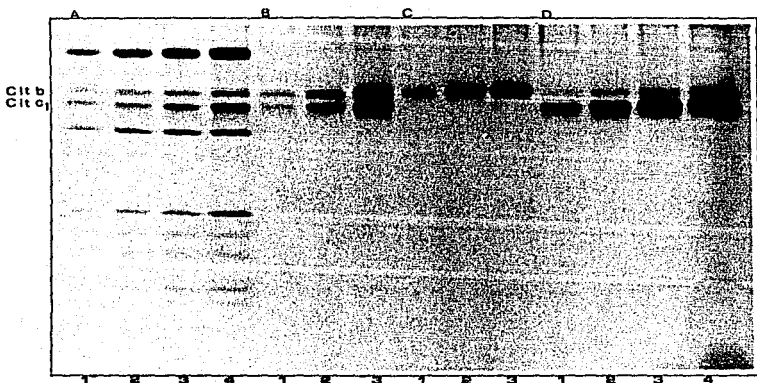


Fig. 31: Electroforesis de (A) complejo III puro, (B) subcomplejo bc, eluido de la columna de fenil-Sefarosa, (C) citocromo b puro y (D) citocromo c₁ puro, en donde los carriles presentan cantidades crecientes de proteína: 1.- 5 μ g totales, 2.- 10 μ g, 3.- 15 μ g y 4.- 20 μ g (cuya concentración se determinó por el método de Lowry).

Tabla II: Valores del barrido densitométrico de los citocromos de la figura 31.

Paso de purificación:	Concentración de proteína (Lowry)			
	5	10	15	20 µg
- la colum. DEAE-Biogel A				
cit b (11.6%)*	0.13828	0.53116	0.73642	1.23664
cit c ₁ (15.7%)*	0.23072	0.71456	1.00700	1.70336
- Columna fenil-Sefarosa				
cit b (49.9%)*	0.61184	0.77644	1.50860	
cit c ₁ (51.1%)*	0.55060	0.97860	1.49596	
- 2a colum. DEAE-Biogel A				
cit b (100%)*	0.82292	1.25364	1.79064	
cit c ₁ (100%)*	1.09216	2.03960	2.92956	3.43588

* Porcentaje al que corresponde cada citocromo en el complejo III, en el subcomplejo bc₁ y las proteínas puras respectivamente. (El valor de área = unidades arbitrarias abs/mm).

b) A continuación se graficaron las áreas obtenidas por el análisis densitométrico contra la cantidad de proteína cargada en el gel (según el método de Lowry) para verificar que se mantenía una relación lineal, lo que nos permitiría hacer los cálculos subsecuentes. Efectivamente, en la fig. 32 se demuestra que los citocromos tanto en forma pura como en en el complejo y el subcomplejo (éstos últimos no se muestran) mantienen una relación lineal en el incremento de área con respecto a la cantidad de proteína. Es de aclararse que el que no todas las gráficas partan del mismo punto posiblemente se deba a que el programa computacional al integrar las áreas de los diferentes picos no establece la misma línea base para los citocromos puros que para los que conforman al complejo III (fig. 26b).

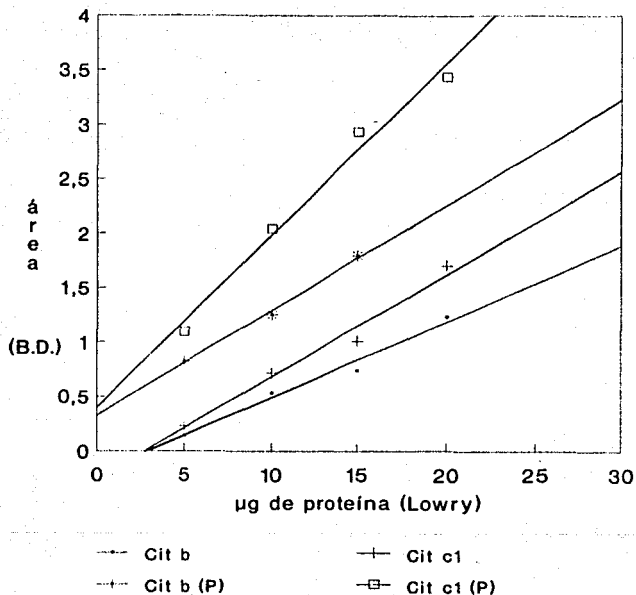


Fig. 32: Relación del área (determinada por el barrido densitométrico) de los citocromos en el complejo III puro y de los citocromos purificados (P), con respecto a la cantidad de proteína (determinada por el método de Lowry) cargada en el gel de la fig. 31, donde se muestra que se mantiene una relación lineal.

c) Se realizó una curva patrón para cada uno de los citocromos b y c₁ del complejo III puro al graficar el área del barrido densitométrico contra su concentración real, es decir, tomando en cuenta dos aspectos: 1) el espectro de absorción del cit c₁ en el complejo III intacto del cual no se cree que haya perdido su grupo hemo en la purificación con lauril maltósido (puesto que está unido covalentemente, presenta espectros de absorción correspondientes al citocromo nativo y es una preparación enzimáticamente activa, capaz de catalizar actividad de ubiquinol-citocromo c óxido-reductasa sensible a antimicina) dando una concentración de 36.65 nmolas/mg de proteína y 2) los pesos moleculares de ambos citocromos obtenidos por su secuenciación (tomados de González-Halphen, 1990). Para construir esta gráfica se consideró que cada polipéptido b y c₁ mantiene una relación con el complejo nativo y entre ellos de 1:1 y los diferentes puntos se obtuvieron al multiplicar la concentración real de proteína por la cantidad de μ l cargados en los carriles 1,2,3 y 4 del gel de poliacrilamida de la fig. 31. En esta segunda gráfica se extrapolaron los valores de los barridos densitométricos de los citocromos purificados y los del subcomplejo bc₁ para obtener su concentración real de proteína (fig. 33).

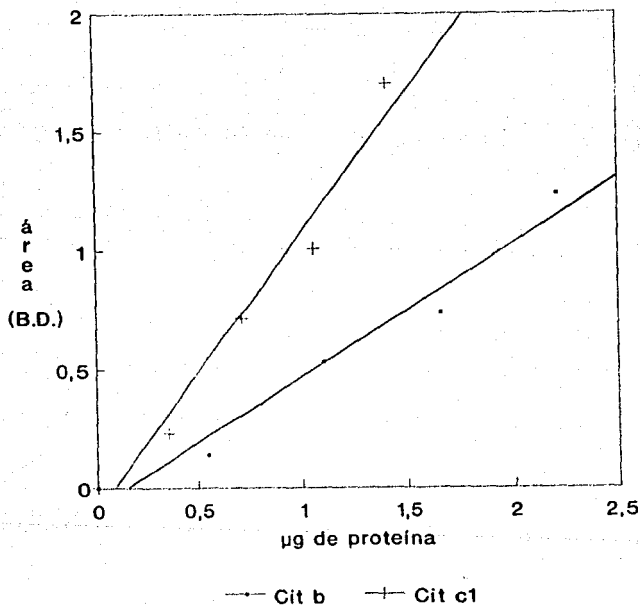


Fig. 33: Relación del área (determinada por el barrido densitométrico) de los citocromos b y c, pertenecientes al complejo III intacto con respecto a su cantidad de proteína real determinada por el espectro de absorción del cit c, guardando una relación entre los polipéptidos III y IV de 1:1, (por ejemplo, 1 µg de proteína corresponde a 0.037 nmolas de cit c, y a 0.023 nmolas de cit b respectivamente).

Con base en los datos espectroscópicos y la concentración de proteína real de los citocromos, determinamos que la reducción del cit c, por ascorbato corresponde al 52% de su reducción total con ditionita (fig. 30b) y que por lo tanto, la relación de los hemos b con respecto al hemo c, en el subcomplejo es de 1:1 por lo que uno de los hemos del cit b se perdió durante el proceso de purificación.

Los resultados del proceso de purificación de los citocromos se resumen en la tabla III.

Paso de purificación	proteína total mg	hemo nmolas/mg	recuperación de hemo %
- C III Rieske	123		
cit b		46.96	100.0
cit c ₁		36.65	100.0
- 1a columna DEAE-Biogel A	115		
cit b		35.79	76.22
cit c ₁		36.65	100.0
- Columna fenil-Sefarosa	4.00 (apr)		
cit b		25.83	55.00
cit c ₁		28.27	77.14
- 2a columna DEAE-Biogel A			
cit b	2.47 (apr)	25.02	53.27
cit c ₁	1.00 (apr)	28.27	77.14

apr = aproximadamente.

El conocimiento de los resultados antes mencionados como: la concentración de proteína del subcomplejo, la cantidad de hemos presentes en los citocromos y la pureza de las proteínas por electroforesis, permitieron llevar a cabo el último objetivo planteado en este trabajo correspondiente al ensayo de reconstitución de la actividad del subcomplejo bc, con la proteína FeS. Sin embargo, como esta proteína se encontraba en presencia de

las subunidades estructurales I y II (fig. 24), se cuantificó la cantidad de hierro presente en la muestra con el espectro de absorción atómica, extrapolando su absorbancia en una curva patrón de hierro de 0 a 5 ppm, (fig. 34) y se consideró que la FeS tiene dos átomos de hierro por polipéptido para obtener la concentración real, la cual corresponde al 61-65% de pureza, rango que se encuentra comprendido en el ya antes obtenido por el barrido densitométrico que se mostró en la fig. 24c. El resultado final es de 2.7-3.3 mg de proteína FeS pura con un contenido de hierro no-hémico de 41.73 nmolas / mg de proteína lo que corresponde al 89% de lo esperado teóricamente.

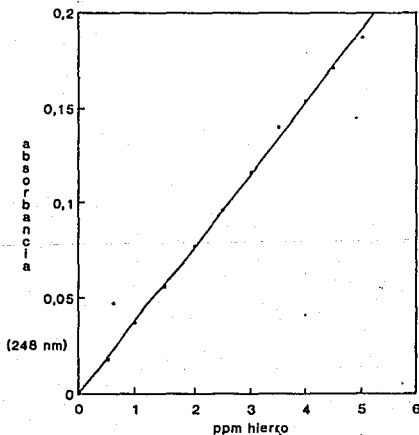


Fig. 34: Curva patrón de hierro a partir de su absorción atómica utilizando soluciones con diferentes concentraciones de hierro.

Los datos del ensayo de reconstitución de la actividad de ubiquinol-citocromo c reductasa se resumen en la tabla IV.

Tabla IV: Ensayo de actividad

En presencia de:	proteína μg totales	actividad μmol cit c red/min
- ubiquinol	---	0.0
- bc ₁	44.85	0.0011
- FeS	21.59	0.0051
- bc ₁ con FeS	66.44	0.0051
- bc ₁ con FeS y antimicina	66.44	0.0051

Como se observa en la tabla, los datos corresponden a la actividad inespecífica de las proteínas utilizadas en el ensayo, lo que nos permite compararlos. No se detecta reducción química del citocromo c por el ubiquinol (DBH) lo que sirve como control. La actividad medida corresponde al paso de electrones de la proteína FeS o el subcomplejo bc₁ al cit c sin la intervención del ciclo Q, las posibles razones se discutirán más adelante.

DISCUSION

Separación de fases con el detergente Tritón X-114.

La purificación de los centros redox de una proteína es fundamental para su estudio estructural y funcional. En el caso del complejo III mitocondrial, se han propuesto diferentes metodologías para el aislamiento del cit b o del cit c₁ (von Jagow y col, 1978; Shimomura y col, 1985) comprometiendo en cualquier caso la pérdida de alguno de ellos, además de ser procedimientos largos que en su mayoría llevan a la pérdida de proteína y desnaturalización de la misma. En el presente trabajo, se trató de encontrar una metodología en donde se recuperaran ambos citocromos sin pérdida de sus características espectroscópicas, para lo cual se implementó primeramente, un tipo de separación de fases en el que se utilizó el detergente no-iónico Tritón X-114, con el cual Payne y Trumpower (1987) habían obtenido buenos resultados en la purificación de los citocromos del complejo bc₁ homólogo en procariontes. De esta parte del trabajo, podemos decir que la técnica resulta de gran utilidad cuando en la muestra a disociar, se encuentran proteínas de caracter marcadamente hidrofóbico e hidrofílico respectivamente, como pueden ser todas las proteínas de membrana con respecto a las proteínas solubles (Bordier, 1981); así, la mezcla de cit oxidasa y cit c₁, resulta fácil de separar, o cuando la proteína a purificar tiene una estructura más sencilla como en el caso de los complejos respiratorios de bacterias. También, es una herramienta que nos

ayuda a demostrar el caracter hidrofóbico o hidrofílico de un péptido o de un fragmento de una proteína que se obtuvo por digestión con proteasas, como el segmento V" de la proteína FeS (ver apéndice). Sin embargo, la técnica presenta ciertas limitaciones, ya que primero hay que encontrar un sistema ideal de disociación y puesto que el coeficiente de reparto de las proteínas en estas condiciones se ve afectado por la concentración del polímero (detergente), la fuerza iónica, el tamaño de las proteínas y su concentración y el tipo de ligando al que estén asociadas, no siempre resulta ser un procedimiento rápido y sencillo.

En el presente trabajo se logró obtener una recuperación completa del citocromo b en la fase hidrofóbica después de realizar la separación de fases del complejo III con el Tritón X-114, tal como se muestra en las figuras 18, 20 y 21, sin embargo, la imposibilidad de disociar completamente a los citocromos del complejo con el método propuesto, nos da idea de la estrecha relación que guardan entre ellos y con el resto de las proteínas estructurales, no sólo por uniones de tipo Van der Waals, sino también interacciones electrostáticas (dipolo-dipolo, puentes iónicos y de hidrógeno), uniones covalentes como puentes disulfuro e interacciones hidrofóbicas (Link, 1986).

Cabe mencionar, que existen otros tipos de separaciones de fases que incluyen sistemas con diferentes polímeros como Dextran y óxido de polietileno (PEO), pero que en este trabajo no se probaron, ya que es difícil hallar una proporción ideal de separación, (para su revisión ver Baskir y col, 1989).

Disociación de las subunidades del complejo bc₁.

Puesto que la separación de fases del complejo III no nos llevó a resultados concluyentes, se probó un segundo tipo de enfoque metodológico, utilizando el mismo detergente Tritón X-114 en una cromatografía de hidrofobicidad y siguiendo el método reportado por Shimomura y col (1986) modificado por nosotros en el laboratorio. Con esta técnica se logró la obtención de un subcomplejo constituido únicamente por los dos citocromos b y c₁. Es de hacerse notar que en el método original de Shimomura y col (1986) se utiliza un detergente no iónico de la misma familia de los polioxietilenos, el C₁₂E₈ (dodecil octaetilén glicol monoéter) que presenta un grupo hidrofílico con 8 grupos oxietilenos. Sin embargo, la diferencia en la estructura de los detergentes es crítica en la separación de los citocromos, puesto que con el C₁₂E₈ se eluye únicamente al citocromo c₁, mientras que con el TX-114 se obtiene un subcomplejo formado por ambos citocromos.

La metodología que proponemos cuenta con otras variantes que también favorecen la obtención de diferentes resultados con respecto a la cromatografía del método original: a) el complejo III purificado por el método de Rieske (1967) siempre presenta como contaminantes subunidades de alto peso molecular pertenecientes al complejo II, es por esto que nosotros hicimos una resolubilización con lauril maltósido y lo cromatografiamos en una columna de DEAE-Biogel A para eliminar dichos contaminantes; b) se incluyeron 2 lavados adicionales de la columna de fenil-Sefarosa intercalados

antes y después del uso del clorhidrato de guanidina, lo que modifica el perfil de elución reportado (ver fig. 15a) y c) el primer cambio de detergente de desoxicolato a colato (amort 3) eluye parte de las subunidades I y II lo que tal vez permita que al usar el agente caotrópico a 3.0 M se disocie la subunidad VIII (una proteína que ha sido difícil de purificar), que no se observa en el patrón electroforético original (fig. 15b) y sí se presenta claramente en nuestra preparación (fig. 24).

El Tritón X-114 tuvo una tercera ventaja, ya que su carácter no-iónico permitió que se pudieran separar posteriormente a los citocromos en una columna de intercambio iónico en donde el cit c, se unió a la resina, mientras el cit b eluyó en el volumen de exclusión. Para eluir al cit c, fue necesario aumentar la fuerza iónica.

Resulta interesante el que sea necesario agregar DTT (ditiotreitól) en los amortiguadores con los que se eluyeron los citocromos en ambas cromatografías para obtener mejores resultados espectroscópicos, al parecer la forma reducida de las proteínas previene en cierta medida la desnaturalización durante el procedimiento.

Purificación de los citocromos tipo b y c.

En la literatura se encuentran reportados diferentes métodos de purificación del cit b de bovino, de Neurospora crassa y de levadura (Hatefi, 1985), sin embargo, en todos ellos se presenta

algún tipo de alteración en las propiedades de los productos finales, ya sea en los potenciales redox, en la sensibilidad a monóxido de carbono, en las propiedades espectroscópicas o en la facilidad con que se disocian los grupos hemo. Aún cuando se conoce que el apocitocromo b presenta una alta afinidad por su grupo hemo con una constante de disociación de 1.0 nM, hay que recordar que se encuentra unido no covalentemente (Granick, 1978), por lo que puede disociarse fácilmente al desnaturalizar parcialmente a la proteína. Se ha demostrado que el grupo hemo y la función de los citocromos b en la mitocondria no solo depende de la interacción proteína-proteína, sino que también son importantes las interacciones proteína-lípidos que parecen estabilizar a la proteína (Salerno, 1986). Sin embargo, para su extracción es necesario el uso de elevadas concentraciones de detergente que eliminan principalmente el medio lipídico, así como el requerimiento de incluir agentes caotrópicos, para poder disociarlo de las otras subunidades.

Cabe señalar que el más alto rendimiento en contenido hémico que se ha reportado fue para el caso de levadura con 36.7 nmol/mg de proteína (78% de lo esperado), solubilizando al complejo III con 0.5% de colato y el reactivo 3,4,5,6-tetra-anhidro hidrofáltico (lisina modificada) y cromatografiándolo en una columna de hidroxapatita (T'Sai y Palmer, 1982). Por otra parte, el único caso en el que se ha obtenido un cit b que al titularlo presenta aún un potencial redox bifásico (indicativo de la presencia de los dos hemos), es el reportado por von Jagow y col (1978) a partir de corazón de bovino, que incluye seis cromatografías, cuatro a través

de columnas de hidroxapatita (fosfato de calcio) y dos a través de Sephadex G-25 (filtración en gel), utilizando Tritón X-100 y clorhidrato de guanidina 1.5 M. Sus resultados muestran un componente de alto potencial medio de -85 mV y uno de bajo de -5 mV, sin embargo, ambos se encuentran 100 mV por debajo de los valores del cit b nativo, cuando se encuentra unido al resto del complejo.

La preparación de cit b que obtuvimos después de su purificación presenta un contenido hémico de 25 nmolas/mg de proteína, lo cual representa una disminución aproximada del 50% con respecto al complejo nativo. Este resultado, se puede interpretar desde dos puntos de vista: una posibilidad es que todos los citocromos b de la preparación pierdan uno de los hemos y mantengan el otro, lo que nos puede estar indicando una estequiometría de un hemo b por un hemo c₁ en el subcomplejo bc₁ después de la columna de fenil-Sefarosa; la segunda posibilidad es que la mitad de los citocromos b no presenten ninguno de los hemos y la otra mitad mantengan los dos. Yo considero que es más factible la primera propuesta, con base en que si la muestra tuviera los apocitocromos sin sus hemos, esto la haría muy inestable y se desnaturizaría rápidamente. Sin embargo, hemos observado que nuestra preparación se mantiene estable hasta varios meses después de su purificación. Por otra parte, se ha reportado que al hacer mutagénesis dirigida en el complejo bc₁ de Rhodobacter sphaeroides para intercambiar las cuatro histidinas que sirven de ligandos de ambos hemos por algún otro aminoácido como aspártico o asparagina, se pierde fácilmente

el hemo b-562 (lado Qn de la membrana) mientras que el hemo b-566 (lado Qp) permanece unido (Yun y col, 1991b). En nuestra preparación resulta difícil asumir que sucede lo mismo, ya que se trata de complejos bc₁ con distinta complejidad estructural. Aunque no se puede descartar esta última posibilidad, me inclino a suponer que el hemo que permanece es el b-562, porque se encuentra embebido en la parte hidrofóbica de la proteína y porque el máximo de absorción se encuentra más cercano a 562 nm. A futuro, se podrá demostrar si nuestra preparación de citocromo b mantiene ambos citocromos o si pierde alguno y cual de los dos, mediante su titulación potenciométrica. Cabe señalar, que se intentó restituir los hemos del cit b dentro del subcomplejo bc₁ utilizando hemina (Degli Esposti, 1989) y aunque no se logró, es otra vía factible de seguirse estudiando con el fin de recuperar una preparación con contenido hémico más elevado (datos no mostrados).

La purificación del cit c₁ conlleva menos problemas metodológicos puesto que presenta un sólo cruce transmembranal y el resto es una proteína periplásmica con un grupo hemo unido covalentemente, lo que posiblemente halla sido una respuesta evolutiva que evitara que se perdiera fácilmente en el entorno líquido del espacio periplásmico, ya que la disponibilidad de la unión de la apoproteína a otro grupo hemo durante la biogénesis implica mayor gasto de energía que la unión del hemo tipo b al apocitocromo b en un medio lipídico (Wood, 1991). El grupo de Shimomura (1985), aisló a la proteína del complejo III de corazón de bovino utilizando tres columnas: c-Sefarosa (columna de Sefarosa

preparada con CNBr-activado y citocromo c) y fenil-Sefarosa (ambas de hidrofobicidad) y DEAE-Sefarosa (intercambio iónico) en presencia de $C_{12}E_8$ y el mismo agente caotrópico clorhidrato de guanidina 1.5 y 3.0 M (Shimomura y col, 1986), obteniendo una preparación con 100% de pureza y contenido hémico de 39.1 nmolas/mg de proteína, además de no presentar alteraciones espectroscópicas importantes y que es capaz de reconstituir el paso de electrones desde el ubiquinol - proteína FeS - cit c_1 - cit c (sin incluir al cit b) en una reacción insensible a antimicina.

Por medio de la metodología propuesta en este trabajo, se utilizan únicamente tres cromatografías, lo que significa un ahorro de pasos con respecto a las técnicas reportadas, se recuperan ambos citocromos en forma pura, sin modificaciones notorias en sus patrones espectroscópicos y con un contenido hémico para el cit b del 53% y para el cit c_1 del 77% que es un rendimiento medio a lo reportado por otros. Lo que es más importante, es que se obtiene un subcomplejo constituido únicamente por estas dos subunidades redox en una relación estequiométrica de un hemo b por un hemo c_1 , lo que permite poder realizar análisis de tipo funcional, además de ser una preparación sin precedentes en la literatura del campo.

Ensayo de reconstitución de actividad con el subcomplejo bc_1 .

Los resultados de actividad del ensayo de reconstitución, muestran que la única medición obtenida, corresponde al paso de electrones de la proteína FeS al cit c mediante una reacción

insensible al inhibidor antimicina, probablemente mediada por radicales libres, lo que quiere decir que no hay una actividad real de ubiquinol-cit c oxidorreductasa en el subcomplejo bc₁. Resulta interesante que la combinación de las tres subunidades con grupos prostéticos no sea capaz de reconstituir actividad catalítica. Pensamos que esto puede deberse a dos causas principales: por una parte, los citocromos obtenidos pueden encontrarse parcialmente desnaturalizados, con modificaciones importantes en sus potenciales de óxido-reducción, lo cual es necesario de ser demostrado en un trabajo posterior mediante la titulación de los citocromos. De hecho, como se observa con el cit c₁, después de la purificación no es totalmente reducible por ascorbato y es necesario agregar un agente reductor más poderoso como es la ditionita. Por otra parte, no hay que descartar la idea de que la reconstitución de actividad de un subcomplejo constituido únicamente por los tres grupos redox que pertenecen a un complejo original de 11 subunidades no sea factible de llevarse a cabo. Existen diferentes evidencias a favor y en contra de la necesidad de las proteínas estructurales para que el complejo pueda llevar a cabo su función, por ejemplo, Linke y Weiss (1986) demostraron que las subunidades estructurales I y II son indispensables en la reconstitución de actividad del complejo en Neurospora y postularon que posiblemente el sitio de unión provisional del duroquinol se encuentre entre éstas y el cit b o que participan en la estabilización del sitio de unión de la semiquinona. Por otra parte, Schoppink y col (1989), trabajando con mutantes de levadura carentes de las mismas subunidades

estructurales o de la subunidad VI (VIII en bovino), obtuvieron una disminución de la presencia de otras subunidades, pero ajustando la fuerza iónica del medio lograron obtener recambios parecidos a las cepas silvestres. Por lo que permanece la interrogante de si las proteínas estructurales sólo participan durante la biogénesis, sirven en la estabilización de los centros redox o son indispensables en la función del complejo. Se necesita conocer mucho más acerca de ellas, pero hasta la fecha no existe reporte alguno en el que se haya logrado reconstituir la actividad de un complejo de eucarionte de forma similar a la de un procarionte. Los fosfolípidos juegan un papel importante en la reconstitución de la actividad de proteínas membranales, aunque no creemos que sea el factor determinante en el caso del subcomplejo bc, puesto que la mezcla utilizada se ha comprobado que funciona para el caso del complejo III intacto (González-Halphen y col, 1991). Sin embargo, (como ya se mencionó anteriormente), al intercambiar el ambiente lipídico de la proteína por detergente durante la purificación, ésta posiblemente se vea afectada (Salerno, 1986).

Por lo tanto, queda abierta la posibilidad de que, a partir de los tres componentes redox aislados en forma nativa, es decir, el citocromo b, el citocromo c, y la proteína hierro-azufre, sea posible integrar un complejo activo in vitro, que funcionase a manera de los complejos bacterianos, como el de Paracoccus denitrificans (Payne y Trumpower, 1987; Trumpower, 1990b).

Esta segunda parte del trabajo abre una posibilidad a futuro para el estudio de las relaciones que guardan las subunidades

estructurales con las subunidades catalíticas desde el punto de vista bioquímico y funcional, y establece un principio en la purificación de los centros redox, aún cuando hace falta depurar la técnica probando otros tipos de cromatografía y de agentes caotrópicos que permitan obtener mejores rendimientos.

CONCLUSIONES

1.- La separación de fases con dicho detergente, permite separar proteínas de membrana de proteínas hidrofílicas sin aparente pérdida de sus características espectroscópicas, pero no resuelve completamente la disociación de una estructura polipeptídica como es la del complejo III mitocondrial de corazón de bovino.

2.- La metodología propuesta permite la obtención de un subcomplejo constituido por los dos citocromos b y c₁ y la purificación de los mismos con pérdida parcial de sus hemos.

3.- Los componentes óxido-reductores del complejo III mitocondrial aislados bajo nuestras condiciones no reconstituyen actividad.

4.- El presente trabajo abre la posibilidad del estudio de las relaciones existentes entre las subunidades estructurales y los componentes redox y su función en el complejo III de corazón de bovino.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Avers, C. (1986). *Biología celular*. Grupo editorial Iberoamérica, México 532 p.
- 2.- Baskir, JN, A Hatton y UW Suter. (1989). *Biotechnology and Bioengineering*, 34: 541-558.
- 3.- Bell, RL y RA Capaldi. (1976). *Biochemistry*, 15: 996-1000.
- 4.- Berry, EA, L. Huang y VJ DeRose. (1991). *J Biol Chem*, 266: 9064-9077.
- 5.- Berry, EA, LS Huang, TN Earnest y BK Jap. (1992). *J Mol Biol*, 224: 1161.
- 6.- Bordier, C. (1981). *J Biol Chem*, 256: 1604-1607.
- 7.- Capaldi, RA. (1982). *Biochim Biophys Acta*, 694: 291-306.
- 8.- Capaldi, RA, D González-Halphen, YZ Zhang y W Yanamura. (1988). *J Bioenerg Biomem*, 20: 291-311.
- 9.- Capaldi, RA. (1991). *Current Opinion in Structural Biology*, 1: 562-568.
- 10.- Cooper, TG. (1977). *The Tools of Biochemistry*. John Wiley and sons, Nueva York 423 p.
- 11.- Crivellone, MD, M Wu y A Tzagoloff. (1988). *J Biol Chem*, 263: 14323-14333
- 12.- De Vries, S, AN Van Hoek y JA Berden. (1988). *Biochim Biophys Acta*, 935: 208-216.
- 13.- Degli Esposti, M, AL Tsai, G Palmer y G Lenaz. (1986). *Eur J Biochem*, 160: 547-555.
- 14.- Degli Esposti, M, G Palmer y G Lenaz. (1989). *Eur J Biochem*, 182: 27-36.
- 15.- Fu W, S Japa y DS Beattie. (1990). *J Biol Chem*, 265: 16541-16547.
- 16.- Fu, W y DS Beattie. (1991). *J Biol Chem*, 266: 16212-16218.
- 17.- Furth, A. (1980). *Anal Biochem*, 109: 207-215.
- 18.- Gabellini, N. (1988). *J Bioenerg Biomem*, 20: 59-83.

- 19.- Gencic, S, H Schägger y G von Jagow. (1991). Eur J Biochem, 199: 123-131.
- 20.- González-Halphen, D, MA Lindorfer y RA Capaldi. (1988). Biochemistry, 27: 7021-7031.
- 21.- González-Halphen, D. (1990). Ciencia, 41: 4133-152.
- 22.- González-Halphen, D, M Vázquez-Acevedo y B García-Ponce. (1991). J Biol Chem, 266: 3870-3876.
- 23.- Gornall, AG, CJ Bardawill y MM David (1949). J Biol Chem, 177: 751-766.
- 24.- Granick, S y SI Beale. (1978) Adv Enzymol, 46: 33-203.
- 25.- Gutweniger, H, R Bisson y C Montecucco. (1981). J Biol Chem, 256: 11132-11136.
- 26.- Hackenbrock, CR, B Chazotte y SS Gupte. (1986). J Bioenerg Biomem, 18: 331-368.
- 27.- Hartl, FU, B Schmidt, E Wachter, H Weiss y W Neupert. (1986). Cell, 47: 939-951.
- 28.- Hatefi, Y. (1985). Ann Rev Biochem, 54: 1015-69.
- 29.- Hauska, G, W Nitschke y RG Herrmann. (1988). J Bioenerg Biomem, 20: 211-228.
- 30.- Hawakes, R, E Niday y J Gordon. (1982). Anal Biochem, 119: 142-147.
- 31.- Holloway, PW. (1973). Anal Biochem, 53: 304-308.
- 32.- Holme, DJ y H Peck. (1983). Analytical Biochemistry. Ed. Longman. Londres, 460 p.
- 33.- Horie, S y M Morrison. (1963). J Biol Chem, 238: 1855-1860.
- 34.- Howell, N. (1989). J Mol Evol, 29: 157-169.
- 35.- Japa, S y DS Beattie. (1989). Arch Biochem Biophys, 268: 716-720.
- 36.- Keilin, D. (1925). Proc Royal Soc B London, 98: 312-324.
- 37.- Kennaway, NG. (1988). J Bioenerg Biomem, 20: 325-352.
- 38.- Kim, CH y TE King. (1983). J Biol Chem, 258: 13453-13551.

- 39.- Kubota, T, M Kawamoto, K Fukuyama, K Shinzawa-Itoh, S Yoshikawa y H Matsubara. (1991). *J Mol Biol*, 221: 379-382.
- 40.- Kyte, J. y RF Doolittle. (1982). *J Mol Biol*, 157: 105-132.
- 41.- Lehninger, A. (1985). *Bioquímica*. Ediciones Omega S.A. Barcelona, 1117 p.
- 42.- Ljungdahl, PO, JD Pennoyer, DE Robertson y BL Trumpower. (1987). *Biochim Biophys Acta*, 891: 227-241.
- 43.- Link, TA, H Schägger y G Von Jagow. (1986). *FEBS Lett*, 204: 9-15.
- 44.- Linke, P y H Weiss. (1986). *Methods Enzymol*, 126: 201-210.
- 45.- Löw, H e I Vallin (1963). *Biochim Biophys Acta*, 69: 361-374.
- 46.- Lowry, OH, NJ Rosenbrough, AL Farr y R Randall. (1951). *J Biol Chem*, 193: 265-275.
- 47.- MacMunn, CA. (1886). *Phil Trans*, 177: 267.
- 48.- Margulis, L y KV Schwartz. (1981). *Cinco reinos*, publicado por la Facultad de Ciencias UNAM, 335 p.
- 49.- Markwell, MAK, SM Haas, LL Bieber y NE Tolbert. (1978). *Anal Biochem*, 87: 206-210
- 50.- Mitchell, P. (1975). *FEBS Lett*, 56: 1-6.
- 51.- Mitchell, P. (1979). *Science*, 206: 1148-1159.
- 52.- Neugebauer, J. (1987). *A guide to the properties and uses of detergents in biology and biochemistry*. Calbiochem Brand Biochemicals, 58 p.
- 53.- Nicholls, DG. (1982). *Bioenergetics*. Academic Press. London, 2190 p.
- 54.- Ohnishi, T, H Schägger, SW Meinhardt, R LoBrutto, TA Links y G von Jagow. (1989). *J Biol Chem*, 264: 735-744.
- 55.- Papa, S, M Lorusso, D Boffoli y E Bellomo. (1983). *Eur J Biochem*, 137: 405-412.
- 56.- Payne, WE y BL Trumpower. (1987). *FEBS Lett*, 213: 107-112.
- 57.- Pfanner, N y W Neupert. (1990). *Annu Rev Biochem*, 59: 331-353.
- 58.- Pfanner, N, T Söllner y W Neupert. (1991). *TIBS* 16: 63-67.

- 59.- Pryde, JG. (1986). TIBS, 11: 160-163.
- 60.- Rieske, JS. (1967). Methods Enzymol, 10: 239-245.
- 61.- Salerno, JC, S Yoshida y TE King. (1986). J Biol Chem, 261: 5480-5486.
- 62.- Saraste, M. (1984). FEBS Lett, 166: 367-372.
- 63.- Schägger, H, TA Link, WD Engel y G Von Jagow. (1986). Methods Enzymol, 126: 224-237.
- 64.- Schägger, H y G Von Jagow. (1987). Anal Biochem, 166: 368-379.
- 65.- Schleyer, M y W Neupert. (1985). Cell, 43: 339-350.
- 66.- Schoppink, PJ, W Hemrika y JA Berden. (1989). Biochim Biophys Acta, 974: 192-201.
- 67.- Schulte, U, M Arretz, H Schneider, M Tropschug, E Wachter, W Neupert y H Weiss. (1989). Nature, 339: 147-149.
- 68.- Shimomura, Y, M Nishikimi y T Osawa. (1985). J Biol Chem, 260: 15075-15080.
- 69.- Shimomura, Y, M Nishikimi y T Osawa. (1986). Anal Biochem, 153: 126-131.
- 70.- Silva-Cárdenas, I. (1991). Tesis licenciatura. Facultad de Ciencias UNAM, 88 p.
- 71.- Skulachev, V. (1988]. Membrane Bioenergetics. Springer-Verlag, Berlín, 442 p.
- 72.- Slater, EC. (1953). Nature, 172: 975-978.
- 73.- Stryer, L. (1988). Biochemistry. W.H. Freeman and company, New York, 1089 p.
- 74.- Teintze, M, M Slaughter, H Weiss y W Neupert. (1982). J Biol Chem, 257: 10364-10371.
- 75.- Towbin, H, T Staehelin y J Gordon. (1979). Proc Natl Acad Sci USA, 76: 4350-4354.
- 76.- Trumpower, BL y CA Edwards. (1979). J Biol Chem, 254: 8697-8706.
- 77.- Trumpower, BL. (1981). Biochim Biophys Acta, 639: 129-155.
- 78.- Trumpower, BL. (1990a). J Biol Chem, 265: 11409-11412.

- 79.- Trumpower, BL. (1990b). Microbiological Reviews, 54: 101-129.
- 80.- T'Sai, AL y G Palmer. (1982). Biochim Biophys Acta, 681: 484-495.
- 81.- von Jagow, G, H Schägger, WD Engel, W Machleidt, I Machleidt y HJ Kolb. (1978). FEBS Lett, 91: 121-125.
- 82.- von Jagow, G y TA Link. (1986). Methods Enzymol, 126: 253-271.
- 83.- Wakabayashi, S, H Matsubara, CH Kim y TE King. (1982). J Biol Chem, 257: 9335-9344.
- 84.- Weiss, H, S Hovmöller y K Leonard. (1986). Methods Enzymol, 126:191-201.
- 85.- Widger, WR, WA Cramer, RG Herrmann y A Trebst. (1984). Proc Natl Acad Sci USA, 81: 674-678.
- 86.- Wood, PM. (1991). Biochem Biophys Acta, 1058: 5-7.
- 87.- Yu, C y L Yu. (1981). Biochim Biophys Acta, 639: 99-128.
- 88.- Yue, WH, YP Zou, L Yu y CA Yu. (1991). Biochemistry, 30: 2303-2306.
- 89.- Yun, CH, SR Van Doren, AR Crofts y RB Gennis. (1991a). J Biol Chem, 266: 10967-10973.
- 90.- Yun, CH, AR Crofts y RB Gennis. (1991b). Biochemistry, 30: 6747-6754.

A P E N D I C E

On the Interaction of Mitochondrial Complex III with the Rieske Iron-Sulfur Protein (Subunit V)*

(Received for publication, June 11, 1990)

Diego González-Halphen[†], Miriam Vázquez-Acevedo, and Berenice García-Ponce

From the Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-243, México D.F. 04510

Limited proteolysis of solubilized beef heart mitochondrial complex III with trypsin yields a product previously identified as fragment V[†] (González-Halphen, D., Linderfer, M. A., and Capaldi, R. A. (1988) *Biochemistry* 27, 7021-7031). In this work, fragment V[†] was generated by trypsin treatment of both the intact complex III and the purified Rieske iron-sulfur protein. Thus, in its bound or isolated form, the same sites of subunit V are sensitive to protease action. Fragment V[†] was a soluble protein that retained its iron-sulfur moiety. It was purified by exclusion from a hydrophobic phenyl-Sepharose CL-4B column followed by gel filtration. In contrast to the pure, intact subunit V, fragment V[†] did not reconstitute oxidoreductase activity when combined with complex III devoid of subunit V. However, a 20-amino acid synthetic peptide carrying the sequence between amino acids Lys²³ and Lys²⁴ of the Rieske iron-sulfur protein competed with intact subunit V in reconstitution assays. The results obtained suggest that the iron-sulfur protein binds to complex III by hydrophobic protein-protein interactions, and that a nontransmembrane 18-amino acid amphipathic stretch accounts for the association of this subunit to the rest of the complex.

Complex III, bc₁ complex or ubiquinol:cytochrome-c oxidoreductase (EC 1.10.2.2), is an oligomeric protein that participates in the electron transfer pathway of the inner mitochondrial membrane respiratory chain (Rieske, 1976). The complex has 11 different subunits (Schägger *et al.*, 1986), three of which contain redox prosthetic groups: subunit III (two b type heme groups), subunit IV (one c₁ type heme group), and subunit V (a Fe-S₂ iron-sulfur center). Recently a model has been proposed for the topological arrangement of the 11 polypeptides in the bovine heart complex III (González-Halphen *et al.*, 1988).

The iron-sulfur protein (subunit V) dissociates from intact complex III under a variety of conditions. Rieske *et al.* (1964) showed the existence of the Fe-S₂ cluster and isolated the iron-sulfur protein in an inactive state. Later, Trumpower and Edwards (1979) and Engel *et al.* (1983) obtained preparations of reconstitutively active iron-sulfur protein by dissociation of the complex with guanidine hydrochloride or urea. More recently, Shimomura *et al.* (1984) reported the purifi-

cation of the Rieske iron-sulfur protein in the absence of chaotropic agents after extensive depletion of phospholipids from complex III that had been bound to a hydrophobic matrix. A subunit V-depleted complex III was also obtained from the same chromatographic step after elution with a buffer containing Tween 20. In the latter preparation, phospholipids were required to restore ubiquinol-cytochrome c reductase activity from the purified subunit V and the iron-sulfur protein-depleted complex III.

The amino acid sequences of several mitochondrial iron-sulfur proteins (Rieske-type) are known (Harnisch *et al.*, 1985; Schägger *et al.*, 1987; Beckmann *et al.*, 1987; Nishikimi *et al.*, 1989). Models based on the hydrophobic plots predict two hydrophobic regions, one relatively near the amino-terminal region and another close to the conserved cysteines and histidines, which presumably bind the iron-sulfur moiety (Schägger *et al.*, 1987). The first hydrophobic region is sufficiently long to span the membrane with either one or two α -helices. Therefore, in these models, the iron-sulfur protein is shown as a monotopic or polytopic membrane protein (according to von Heijne's nomenclature, 1988).

The Rieske iron-sulfur protein is digested by trypsin (Baum *et al.*, 1967; Ball *et al.*, 1977) at two sites, i.e. one after Arg²⁷, which generates fragment V[†] and another at Lys²⁴, which gives rise to the supernatant of a sucrose gradient centrifugation in the presence of sodium cholate and Triton X-100 (González-Halphen *et al.*, 1988).

In order to ascertain the mechanism of the iron-sulfur protein in the catalytic activity of ubiquinol-cytochrome-c reductase, it is necessary to explore how the various subunits interact with each other. Thus, we purified the soluble trypsinized fragment of subunit V (fragment V[†]) by hydrophobic and gel-filtration chromatography and determined its capacity to reconstitute oxidoreductase activity. The properties of the reconstituted complex were compared to those of the intact iron-sulfur protein. It was found that trypsin liberates a soluble 18,000-Da fragment of the subunit which retains its iron-sulfur moiety but does not restore oxidoreductase activity in reconstitution measurements. In addition, a synthetic peptide carrying the sequence between residues Lys²³ and Lys²⁴ of the nonheme iron protein competed with intact subunit V in reconstitution assays. The results suggest that the nonheme iron protein interacts with complex III through an 18-amino acid amphipathic stretch.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials.—Trypsin (type XIII, L-1-toxylamido-2-phenylethyl chloromethyl ketone-treated), catalase (from bovine liver, crystalline suspension), horse heart cytochrome c (type III), and superoxide dismutase (from bovine erythrocytes) were obtained from Sigma. Phenyl-Sepharose CL-4B was purchased from Pharmacia LKB Biotechnology Inc. and Ultrogel ACA-44 was from LKB. Ubiquinone-1

* This work was partially supported by grants from the Third World Academy of Sciences (Grant TW-AS-IG-BC 89-31) and from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (Grant P228COX891541). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[†] To whom correspondence should be addressed.

was an appreciated gift from Drs. W. Schupp and H. E. Keller (cf. Hoffman-La Roche, Basel, Switzerland).

Beef heart mitochondrial complex III was obtained as described by Rieske (1967) and kept at -70°C until used. The preparations contained between 4.2 and 6.3 nmol of heme *c*/mg of protein, a *b/c* stoichiometry between 1.8 and 2.2 and a nonheme iron content of 14.3 ng-atoms of iron/mg of protein (measured in a preparation containing 6.3 nmol of heme *c*/mg of protein, giving a $\text{Fe}/\text{S}_2/\text{cytochrome } c_1$ stoichiometry of 1). The turnover rate was 50 s^{-1} at 25°C in a buffer containing 25 mM potassium phosphate (pH 7.2), 0.025 M potassium EDTA, 0.2% Tween 20, $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ of asolectin, 0.015 M ubiquinol-1, and 0.030 M horse heart cytochrome *c*.

Cytochrome *b*, cytochrome *c*, cytochrome *c*, and ubiquinone concentrations were determined spectrophotometrically using the same extinction coefficients of Engel Spiess *et al.* (1966). Spectra were obtained in 25 mM potassium phosphate (pH 7.2) containing 0.025 M potassium EDTA in a Beckman DU-50 spectrophotometer.

Activity and Reconstitution Measurements—Ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase activity was measured as described by Rieske (1967) using a SLM-Aminco DW-2C spectrophotometer in the dual-wavelength mode (550–540 nm). Assays were carried out in 2 ml of 25 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2), 0.025 M potassium EDTA, 0.2% Tween 20, $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ superoxide dismutase (equivalent to 10 units/ml), 25 units/ml catalase, and $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ phospholipids. The phospholipids were added from a stock solution containing 4 mg/ml purified asolectin and 1 mg/ml cardiolipin in 25 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2), 0.025 M potassium EDTA, 0.1% Tween 20, and 1 mM sodium ascorbate. The cytochrome *c* reduction (0.030 M final concentration) was recorded after the addition of 0.015 M ubiquinol-1. Ubiquinone-1 was reduced in an ethanolic solution with sodium dithionite and recovered by cyclohexane extraction according to Rieske (1967); after evaporation of the cyclohexane under a stream of nitrogen, the reduced quinone was resuspended in dimethyl sulfoxide at a concentration of 3–10 mM and kept at -70°C until used.

Reconstitution assays with the purified Rieske iron-sulfur protein and the subunit V-depleted complex III were carried out as described by Shimomura *et al.* (1984): 300 pmol of the depleted complex (based on its cytochrome *c* content) were incubated with varying amounts of the iron-sulfur protein and $275 \mu\text{g}$ of phospholipids (purified soybean asolectin containing 20% w/w cardiolipin). The volume mixture was brought to 150 μl at 4°C in 25 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2) containing 0.025 M potassium EDTA. Thereafter, the samples were incubated for 30 min at 30°C prior to the activity measurements.

Isolation of the Inactive Iron-Sulfur Protein (Subunit V)—The phenyl-Sepharose CL-4B hydrophobic column was prepared, equilibrated, and run as described by Shimomura *et al.* (1984): 70 mg of complex III were added to the column (0.5 \times 32 cm) and washed with 25 column volumes of 25 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 1 mM DTT¹, 1 mM sodium EDTA, 0.25% sodium deoxycholate, 200 mM NaCl, and 20% glycerol. A fraction enriched in the Rieske iron-sulfur protein (subunit V) was eluted in the presence of 25 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 1 mM DTT, 1% sodium deoxycholate, and 20% glycerol. Finally, a fraction containing the subunit V-depleted, but active, complex was eluted with a buffer containing 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 3% Tween 20, 1 mM DTT, and 20% glycerol. The nonheme iron protein was further purified by gel filtration on a Sephacryl S-200 column (1.6 \times 75 cm) equilibrated with 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5), 0.5% sodium cholate, 0.1 M NaCl, 1 mM DTT, and 20% glycerol as described by Shimomura *et al.* (1984).

Isolation of the Trypsinized Iron-Sulfur Protein—The trypsinized fragment of subunit V (fragment V*) was generated as described by González-Halphen *et al.* (1988) after limited proteolysis of complex III (5 mg of protein/ml) with trypsin (1:50 or 1:100 ratio, w/w) for 45–60 min at room temperature. Trypsin digestion was arrested with 1 mM pA-PMSF and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of TLCK (final concentrations). The fragment was separated from the rest of the complex by sucrose gradient centrifugation, essentially as described by Zhang *et al.* (1984), i.e. detergents were omitted. Fragment V* was recovered from the supernatant and concentrated by ultrafiltration on an Amicon PM-10 membrane. The rest of the complex formed a tight pellet in the bottom of the tubes. A faster and simpler procedure was developed to

separate fragment V* from the rest of the complex. After limited proteolysis, the trypsinized complex III was bound to a phenyl-Sepharose CL-4B column (0.5 ml of resin per milligram of protein) equilibrated with 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 200 mM NaCl, 0.25% sodium deoxycholate, 1 mM DTT, 1 mM sodium EDTA, and 20% glycerol. Under these conditions the trypsinized fragment V* did not bind to the hydrophobic matrix; it eluted in the exclusion volume of the column. After extensive washing with 40 column volumes of 25 mM Tris-HCl, small amounts of the remaining intact (nontypsinized) iron-sulfur protein could be eluted in the presence of 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1% sodium deoxycholate, 1 mM DTT, and 20% glycerol. If desired, the trypsinized *b*, subcomplex was released from the column with 25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM DTT, 3% Tween 20, and 20% glycerol.

After concentration by ultrafiltration in an Amicon cell using a PM10 membrane, fragment V* was further purified (from high molecular weight contaminants (mainly traces of a 70-kDa component) by gel filtration on an Ultracel AC-4 column (1.5 \times 46 cm) equilibrated in the presence of 25 mM Tris-HCl (pH 8.0).

Polyacrylamide Gel Electrophoresis—Polyacrylamide gel electrophoresis was performed as described by Schagger *et al.* (1986), using 4–20% Tris-glycine gels. Gels were fixed and stained as described in the same work.

Phase Separation with Triton X-114—Triton X-114 was purified from hydrophilic components by preadsorption as described by Bordier (1981). In order to remove all traces of sodium cholate, which strongly inhibits the phase separation of Triton, complex III (5 mg of protein/ml) was added with 1 mM Triton X-114 in a constant ratio and dialyzed overnight against 150 ml of Tris-HCl 50 mM (pH 7.5). Limited proteolysis of complex III (2 mg of protein/ml) was carried out in a buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) with trypsin (1:100 w/w). The reaction was stopped with the following inhibitors (final concentrations): 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of 3,4-dichlorocoumarin, 1 mM PMSF, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pA-PMSF, and 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TLCK. Phase separation of the trypsinized complex III in the presence of Triton X-114 was carried out as described by Payne and Trippmore (1987) in the presence of 150 mM NaCl.

Antibodies—Antibodies against the iron-sulfur protein were made with subunit V recovered from polyacrylamide gels after its transfer to polyvinylidene difluoride membranes, according to Szwedek and Szymanski (1983). Gels were run as described above with 30 μg of purified complex III per lane. The gels were blotted into polyvinylidene difluoride membranes (Immobilon, Millipore) for 12 h at 20°C in a buffer containing 25 mM Tris-HCl (pH 8.3) and 192 mM glycine. The membranes were stained with 0.2% (w/v) amido black 10 B (Sigma) and hand V was excised from the membranes with a scalpel. The protein was extracted from the polyvinylidene difluoride membranes by incubation with 500 μl of 50 mM Tris-HCl (pH 9.0), 1% Triton X-100, and 2% SDS. The extracts were dialyzed against 500 ml of 50% ethanol with three changes and finally against distilled water to remove the remaining ethanol. The precipitated protein was lyophilized and resuspended in 0.9% NaCl. Rabbits were immunized intramuscularly with 50 μg of protein mixed with one volume of Freund's complete adjuvant, followed by three more injections of 50 μg of protein in Freund's incomplete adjuvant every three weeks. Sera were collected and partially purified by ammonium sulphate precipitations. The presence of antibodies was detected by immunoblotting.

Western Blots—Immunoblotting was carried out as described by Towbin *et al.* (1979) with the modifications described by González-Halphen *et al.* (1988).

Peptide Synthesis—The 20-amino acid peptide comprising the nonheme iron protein amino acid sequence from Lys¹² to Lys³² was synthesized by Multiple Peptide Systems (San Diego, CA). The peptide was found to be 64% pure, as judged by analysis in a reversed-phase HPLC chromatogram. The sample was run in a Vydac C-18 column (4.6 \times 250 mm) at a flow rate of 1 ml/min. The solvents used for chromatography were 0.05% trifluoroacetic acid in water (solvent A) and 0.05% trifluoroacetic acid in acetonitrile (solvent B). A gradient was run from 5 to 65% solvent B in 30 min, and the peaks were recorded at 215 nm (as reported by the supplier).

Other Methods—Protein concentrations were determined according to Lowry *et al.* (1951) with the modifications of Markwell *et al.* (1978). Nonheme iron was determined with 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline by the method of Brumby and Massey (1967) using ferrioxin as nonheme iron standard. Ferrioxin was purified from the cyanobacterium *Spirulina maxima* following the procedure described by Hall *et al.* (1972), and it was an appreciated gift of Drs. A. Rayavar and C. Gómez-Luján from Centro de Investigación y Estudios

¹ The abbreviations used are: DTT, dithiothreitol; pA-PMSF, (4-aminodiphenyl)methanesulfonyl fluoride; SDS, sodium dodecyl sulfate; TLCK, N-(p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone); HPLC, high-performance liquid chromatography.

Arceizanos del I, P. N. Universidad Nacional Autonoma de Mexico (Mexico). The purified subunit was spectrophotometrically quantitated using an extinction coefficient of 9.7 mM^{-1} at 420 nm as reported by Eblston and Kragmann (1979). Chloric acid and deoxychloric acid were recrystallized from an ethanolic solution after activated charcoal treatment. Asolestin was purified as described by Kagawa and Becker (1971), and it was a kind gift from Dr. G. Garza-Ramos (UNAM, Mexico).

Secondary Structure Program—Calculations were carried out with the program SEQANAL, version 1.01 by Antony R. Cofts (copyright, 1987) University of Illinois (Urbana-Champaign). Structure predictions were made following the algorithm of Chou and Fasman (1978), modified for membrane proteins with the considerations of Rao and Azooz (1986). Sequence similarities were obtained using the procedure of Needleman and Wmsch (1979), with the parameters described by Capaldi *et al.* (1984). The terms similarity and homology are used as suggested by Ireeck *et al.* (1987).

RESULTS

Isolation of a Reconstitutively Active Iron-Sulfur Protein—Following the procedure of Shimomura *et al.* (1984), we obtained a preparation of the Rieske iron-sulfur protein with similar yield and purity. It contained 56 ng-atoms of Fe/ng of protein (see Fig. 1A, lane C, and Fig. 1B, lane C). Ubiquinol-cytochrome *c* reductase activity was reconstituted with this preparation when combined with a subunit V-depleted com-

plex III. However, the isolated iron-sulfur protein catalyzed (in the absence of the rest of complex III components) the reduction of cytochrome *c* by ubiquinol-1 in a concentration-dependent manner. This reaction was insensitive to antimycin and myxothiazol, but was completely abolished when the iron-sulfur protein was denatured by heating in boiling water for 4 min. This activity was also observed if the incubation step at 30°C with phospholipids was omitted. The reaction was inhibited 25% by 10 units/ml of superoxide dismutase plus 25 units/ml of catalase in the assay medium; further additions of these two enzymes, did not increase the extent of inhibition. In contrast, oxidoreductase activity measured with 0.2% Tween 20, was inhibited up to 95% when the detergent was added in the presence of superoxide dismutase and catalase. Therefore all the reconstitution activity measurements were carried out with 0.2% Tween 20 plus superoxide dismutase and catalase. With the latter additions, the activity of the isolated nonheme iron protein was almost identical to the chemical reduction rate of cytochrome *c* by ubiquinol-1 when assayed in the same conditions.

Isolation of the Iron-Sulfur Protein trypsinized Fragment—When detergent-solubilized complex III was incubated with trypsin, subunits II, V, VII, and XI were partially degraded. It is noteworthy that subunit V was digested to a stable fragment with an apparent molecular mass of 18,000 Da that was named fragment V'. This can be recovered by sucrose gradient centrifugation in the presence of Triton X-100 and sodium cholate (Gonzalez-Halphen *et al.*, 1988). Here it was found that a fraction enriched in V' was obtained when the sucrose gradient centrifugation step was run in the absence of detergents (Fig. 2).

Detergent-mediated phase separation has been used to differentiate between membrane-bound and soluble proteins (Bordier, 1981). To further ascertain if fragment V' was indeed soluble, trypsinized complex III was subjected to phase separation in the presence of Triton X-114, as described by

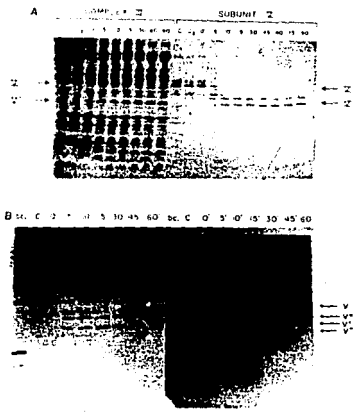


Fig. 1. A, time course of proteolytic digestion of beef heart complex III and of the purified iron-sulfur protein by trypsin. Complex III (5 mg/ml in 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0) and isolated iron-sulfur protein (2 mg/ml in the same buffer) were incubated with trypsin (1:100 w/w) at room temperature. Protease digestion was stopped at the indicated times (in minutes), with pA-PMSF and TLCK as described under "Experimental Procedures." Gels were loaded with 30 μg of complex III or 30 μg of the purified iron-sulfur protein per lane. The positions of the intact iron-sulfur protein (V) and the trypsin fragments V', V'', and V''' are indicated. B, SDS polyacrylamide gel electrophoresis of a time course of trypsinization of another preparation of the iron-sulfur protein (right) which was transferred into nitrocellulose membranes and immunodecorated with an anti-Rieske iron-sulfur protein antibody (left).

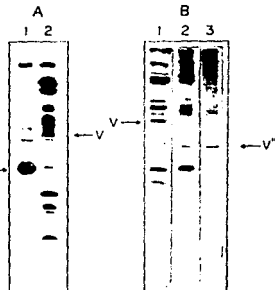


Fig. 2. A, SDS polyacrylamide gel electrophoresis of the isolated fragment V', obtained in the supernatant of the sucrose gradient centrifugation and concentrated on an Amicon PM10 ultrafilter (lane 1, 20 μg of protein) and the trypsinized complex III (lane 2, 30 μg of protein). B, SDS polyacrylamide gel electrophoresis of control complex III (lane 1, 20 μg of protein), trypsinized complex III (lane 2, 20 μg of protein), and the supernatant obtained after phase separation of the trypsinized complex in the presence of Triton X-114 (lane 3, 30 μg of protein).

Payne and Trumpower (1987). Fragment V* remained in the aqueous phase, whereas the rest of the complex partitioned as a pellet in the detergent phase (Fig. 2B). Therefore it was thought that fragment V* behaved as a soluble protein, which would not be retained in a hydrophobic gel matrix. In fact when trypsinized complex III was chromatographed through phenyl-Sepharose CL-4B, fragment V* eluted in the exclusion volume of the column. This fragment V*-enriched fraction was identical to that obtained by sucrose gradient centrifugation.

Fragment V* was further purified to a single homogenous polypeptide by gel-filtration chromatography on Ultragel ACA-44. In this step, complete separation of fragment V* from high molecular weight contaminants was achieved, i.e. a single polypeptide band with an apparent molecular mass of 18,000 Da in polyacrylamide gel electrophoresis was obtained. Its content of nonheme iron was 88 ng-atoms per milligram of protein.

Limited Proteolysis of Isolated Iron-Sulfur Protein Also Gives Rise to Fragment V*—An alternative approach to generate fragment V* is to subject the purified iron-sulfur protein to limited proteolysis with trypsin. The generated fragments were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis, and it was found that the cleavage products correspond to those obtained when intact complex III was trypsinized (Fig. 1A and B). Three major digestion fragments were distinguished, which were named V*, V', and V". Fragment V* has the amino-terminal sequence KGFSYL while fragment V" started NVVSQF (González-Halphen *et al.*, 1988). From its apparent molecular weight on polyacrylamide gel electrophoresis, fragment V* (a transient peptide which is rapidly degraded) should start with a SSKESK sequence. This indicates that both the isolated and the complex-bound iron-sulfur protein have similar accessibility to trypsin. Furthermore, all the trypsin-generated fragments reacted with an antibody raised against the intact iron-sulfur protein (Fig. 1B).

Reconstitution of Oxidoreductase Activity in a Subunit V-depleted Complex III—Subunit V restored ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase activity of iron-sulfur protein-depleted complex III. However, to obtain maximum reconstitution activity, incubation at 30 °C in the presence of lipids for 30 min was necessary (Shimomura *et al.*, 1984). We have performed reconstitution experiments with the intact iron-sulfur protein, and found that reconstituted oxidoreductase activity in the presence of ubiquinol-1 was 14.7 nmol of cytochrome *c* reduced (nanomoles of cytochrome *c*,¹⁺, s⁻¹). This value was 30% of the original complex III activity. It is pointed out that subunit V-depleted complex III obtained by phenyl-Sepharose chromatography had a lower *b/c* stoichiometry (1.1–1.4) than the original complex III (1.8–2.2). Probably a partial dissociation of the complex took place in the hydrophobic chromatography step. In fact, cytochrome *b* could be recovered from the phenyl-Sepharose CL-4B column by elution with 2% SDS at room temperature (Shimomura *et al.*, 1984). Thus, if the activity is calculated on the basis of the heme *b* content of the preparation, the nonheme iron protein reconstitutes 50% of the original complex III activity, i.e. the activity of the original preparation was 25 nmol of cytochrome *c* red (nanomoles of heme *b*,¹⁺, s⁻¹) whereas that of the reconstituted complex was 13 nmol of cytochrome *c* red (nanomoles of heme *b*,¹⁺, s⁻¹) (at a ratio of 3 mol of iron-sulfur protein per mol of subunit V-depleted complex III).

Up to a ratio of 8.7 mol/mol, the purified trypsinized fragment V* did not restore oxidoreductase activity in the subunit V-depleted complex (Fig. 3).

The reconstitution assay was carried out with a subunit V-

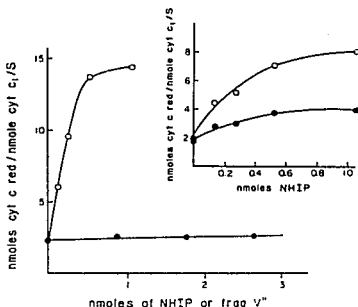


Fig. 3. Reconstitution of ubiquinol:cytochrome *c* oxidoreductase activity of a subunit V-depleted complex III by the intact nonheme iron protein (NHIP) (○) and the purified trypsinized fragment V* (●). The assay was carried out as described under "Experimental Procedures." The inset shows the same reconstitution experiments carried out in the presence of dimethyl formamide (5 μ l) in the incubation medium. ○ and the synthetic peptide (1.25 nmol comprising residues from Lys¹³ to Lys²¹ of the iron-sulfur protein (●)).

depleted complex III and a synthetic peptide carrying the iron-sulfur protein sequence between residues Lys¹³ and Lys²¹, in the presence of the intact Rieske iron-sulfur protein. The oxidoreductase activity obtained in these conditions was 50% of the control at a ratio of 3 moles of nonheme iron protein per mole of subunit V-depleted complex III (Fig. 3, inset). It should be noted that the catalytic activity of the control-reconstituted complex is only of the order of 8 nmol of cytochrome *c* red (nanomoles of cytochrome *c*,¹⁺, s⁻¹). This was due to the presence of dimethylformamide in the incubation media, which was the vehicle in which the peptide was added.

DISCUSSION

Fragment V* was generated by limited proteolysis, in a site of the iron-sulfur protein which is susceptible to a variety of proteolytic enzymes including papain (Lorusso *et al.*, 1989) and several serine proteases (González-Halphen *et al.*, 1988). It is noteworthy that proteolysis degrades this subunit to an 18-kDa fragment, which is not further cleaved by trypsin. This may be due to a highly compact tertiary structure that contains the iron-sulfur center, as has been recently predicted by Gatti *et al.* (1989) and by Beckmann *et al.* (1989) for the yeast nonheme iron protein.

Subunit V and Fragment V* Catalyze an Inhibitor-insensitive Ubiquinol-cytochrome *c* Reductase Activity—In the course of this work we found that preparations of iron-sulfur protein and its trypsinized fragment catalyzed an antimycin-insensitive oxidoreductase activity. This reaction is probably mediated by superoxide radicals (Shimomura *et al.*, 1985), even though superoxide dismutase and catalase induced only a partial inhibition of the reaction. Interestingly, the presence of the nonionic detergent Tween 20 in the assay media drastically abolished this inhibitor-insensitive activity. This could be due either to the aggregation state of the protein or to the

property of the polyoxyethylene detergents to act as powerful superoxide or semiquinone radical quenchers. In this respect, Bellester (1987) spectrophotometrically determined the decomposition of the ubisemiquinone radical of ubiquinol-2 by Tween 20. The isolated iron-sulfur protein may catalyze a partial reaction *in vitro*, generating a ubisemiquinone free radical, which is not reduced by cytochrome *b*. Within the framework of the protonmotive Q-cycle (Mitchell, 1976; Trumpower, 1981), two ubisemiquinones (Q_0 and Q_1) have been predicted and were identified by its EPR signals (Ohnishi and Trumpower, 1980; de Vries *et al.*, 1981). The unstable semiquinone radical Q_0 is proposed to be formed by the oxidation of ubiquinol by the nonheme iron protein (Trumpower, 1981). Therefore, we conclude that the inhibitor-insensitive ubiquinol-cytochrome-*c* reductase activity of the isolated iron-sulfur protein and its trypsinized fragment could be mediated by superoxide ions and ubisemiquinone radicals that are generated by the iron-sulfur center and which subsequently reduce soluble cytochrome *c*. The relevance of this catalytic activity of the isolated iron-sulfur protein has been discussed by Degli Esposti *et al.* (1990).

Subunit V Interacts with Complex III through an 18-Residue Amphipathic Stretch—We think that the failure of fragment V* to reconstitute oxidoreductase activity is due to the lack of the hydrophobic stretch of 18 residues flanked by Lys³³ and Lys⁵² of the original iron-sulfur protein. That is, this part of the molecule is central in the anchoring of the iron-sulfur

protein to the rest of the complex. Consistent with this suggestion is the observation that this fragment competitively prevents the reconstitution of the activity by subunit V and the rest of the complex. According to this argument, it would appear that the trypsin-induced inactivation of complex III (Baum *et al.*, 1967; Ball *et al.*, 1977) was due to the release of the iron-sulfur protein from the rest of the complex, and not to a complete digestion of this subunit. A similar situation has been observed with *Neurospora crassa* complex III, whose chymotrypsin-generated fragment is unable to reconstitute oxidoreductase activity (Li *et al.*, 1981; Harnisch *et al.*, 1986).

The region accessible to proteolytic cleavage in the beef heart Rieske iron-sulfur protein exhibits similarity with the amino acid sequences of the yeast and *N. crassa* counterparts. Fig. 4A shows the amino acid sequences of the first 90 residues of the iron-sulfur proteins. Although the similarity is less than in the prosthetic group-binding moiety of the protein, these amino-terminal regions of the mitochondrial iron-sulfur proteins are homologous. Interestingly, the predicted secondary structures derived from these sequences seem to be conserved (Fig. 4B). Therefore, these proteins seem to share the same sequence and structural features in the regions subject to proteolytic degradation, and which result in the release of the large hydrophilic sections which still bind their iron-sulfur moieties.

We have recently discussed (González-Halphen, 1990) that chemical labeling of complex III does not give any appreciable reaction of subunit V with the following hydrophobic and amphipathic agents: (a) two different azido derivatives of phosphatidylethanolamine, bearing the cross-linking photoreactive group at two different levels of the fatty acid chain (Gutweniger *et al.*, 1981); (b) the membrane intercalated probe 3-trifluoromethyl-3-(*m*-¹²⁵I)iodophenyl) diazine (González-Halphen *et al.*, 1988), a hydrophobic reagent with broad specificity; and (c) amphipathic arylazido derivatives of phosphatidylethanolamine, which act in the lipid head-groups of the membrane-water interface (González-Halphen *et al.*, 1988). On the other hand, it has been shown that the iron-sulfur protein faces only the intermembrane space of the mitochondrion by: (a) chemical labeling with hydrophilic extrinsic probes (Gellerens and Nelson, 1977; Bell *et al.*, 1979; D'Souza and Wilson, 1982); (b) protease sensitivity (Li *et al.*, 1981; González-Halphen *et al.*, 1988); and (c) functional studies, *i.e.* interaction with cytochrome *c* (Rich, 1984). Furthermore, Hartl *et al.* (1986) have reported that both the amino- and carboxyl-terminal portions of the iron-sulfur protein are exposed towards the mitochondrial intermembrane space in

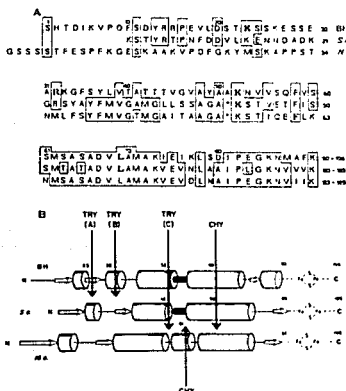


Fig. 4. Amino acid sequence and secondary structure similarities between mitochondrial Rieske iron-sulfur proteins. A, the amino-terminal part (the first 90 residues) of bovine heart (BH) (Schagger *et al.*, 1987), *S. cerevisiae* (*S.c.*) (Beckmann *et al.*, 1989), and *N. crassa* (*N.c.*) (Harnisch *et al.*, 1985) mature Rieske iron-sulfur proteins are compared. The residues which are subject to proteolytic cleavage are shown in bold characters. B, secondary structure predictions based on the amino acid sequences. The trypsin (TRY) and chymotrypsin (CHY) cleavage sites are shown in the three structures: beef heart (González-Halphen *et al.*, 1988), yeast (Trumpower, 1990), and *N. crassa* (Harnisch *et al.*, 1985). White cylinders, α -helices; arrows, β sheets; black cylinders, β turns.

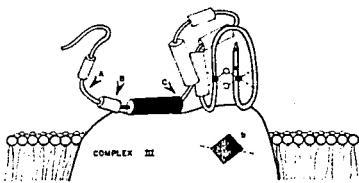


Fig. 5. Schematic representation of subunit V arrangement in complex III. Arrows A, B, and C indicate the tryptic cleavage sites, which give rise to fragments V*, V¹, and V², respectively. The dark zone in the sequence indicates residues Lys³³ to Lys⁵². One of the heme groups of cytochrome *b* is also depicted. For clarity, the disposition of adjacent subunits was omitted.

N. crassa, and that this subunit is readily removed by relatively mild procedures, i.e. washing with sodium carbonate in the absence of detergents. Finally, it is also worthwhile to mention that during its biogenesis in the yeast complex, the iron-sulfur protein is the last subunit with a redox group that is integrated into complex III (Crivellone *et al.*, 1988). In addition, the presence of cytochrome *b* is a prerequisite for its insertion in the nascent complex (Japa and Beattie, 1989). Therefore the overall data indicate that the Rieske iron-sulfur protein is not in direct contact with the phospholipids of the bilayer, but rather that it is associated to a subunit (most likely cytochrome *b*) that is embedded in the lipid milieu of the membrane. This possibility is in accordance with the work of Ohnishi *et al.* (1989), who showed that the iron sulfur moiety of subunit V is in close proximity to one of the hemes of cytochrome *b*. On the other hand, Degli Esposti *et al.* (1989) observed changes in the circular dichroic spectra of cytochrome *b* when complex III was delipidated and depleted of the iron-sulfur protein. In addition, Shimomura *et al.* (1984) have shown that phospholipids are required in order to reconstitute subunit V to complex III. We therefore conclude that the presence of phospholipids in the reconstitution assays is necessary to maintain a stable conformation of cytochrome *b*, therefore facilitating the formation of a functional electron transport complex with the iron-sulfur protein. Interestingly, the inhibitor myxothiazol, upon binding to cytochrome *b*, displaces a ubiquinone binding site which must also be close to the iron-sulfur protein (Von Jagow *et al.*, 1984).

Different calculation methods have been used to predict the presence of membrane-associated helices (Eisenberg *et al.*, 1984; Klein *et al.*, 1985; Rao and Argos, 1986). When these are applied to subunit V, only one highly hydrophobic sector was found (residues Trp¹²⁹ to Ala¹⁴⁴). This region has 2 of the 4 conserved cysteine residues which are thought to bind the iron-sulfur moiety in a hydrophobic pocket (Schägger *et al.*, 1987; Gatti *et al.*, 1989; Beckmann *et al.*, 1989). On the other hand, no transmembrane helix is predicted for the region between Lys³³ and Lys⁵² which, as shown here, serves to anchor subunit V to the rest of the complex. Therefore this segment is not a classical transmembrane stretch but rather an exposed amphiphilic region which binds to the complex by hydrophobic protein-protein interactions (Fig. 5). Recently, Ljungdahl *et al.* (1989), established a methodology for the mutation analysis of the Rieske iron-sulfur protein in yeast. The present results predict that substitution by site-directed mutagenesis of lysine 42 from the yeast amino acid sequence by a nonpositively charged residue should prevent the release by trypsin of the iron-sulfur protein from the bc₁ complex (even if other lysines and arginines are cleaved by the protease).

Acknowledgments—We thank Dr. M. Degli Esposti for helpful discussions and for making available unpublished data. We are grateful to G. Ramirez for skillfully typing the manuscript and to D. González, J. Ramirez, and R. Paredes for their help in the elaboration of the figures. We also gratefully acknowledge the careful review of the manuscript by Profs. W. Yanamura and H. Wilson and the critical comments and encouragement of Drs. G. Dreyfus and A. Gómez-Puyou.

REFERENCES

Hall, M. B., Bell, R. L., and Capaldi, R. A. (1977) *FEBS Lett.* **83**, 99-102
 Ballester, F. (1987) *Structural and Functional Characterization of the Rieske-type Protein of Beef Heart Mitochondria*. Ph. D. thesis, University of Bologna, Italy
 Baum, H., Sillman, H. L., Rieske, J. S., and Lipton, S. H. (1967) *J. Biol. Chem.* **242**, 4876-4887
 Heckmann, J. D., Ljungdahl, P. O., Lopez, J. L., and Trumppower, B.

L. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 8901-8909
 Beckmann, J. D., Ljungdahl, P. O., and Trumppower, B. L. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 3716-3722
 Bell, R. L., Sweetland, J., Ludwig, B., and Capaldi, R. A. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 741-745
 Bordier, C. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 1604-1607
 Brumby, P. E., and Massey, V. (1967) *Methods Enzymol.* **10**, 463-474
 Capaldi, R. A., González-Halphen, D., and Takamiya, S. (1986) *FEBS Lett.* **207**, 11-17
 Chou, P. Y., and Fasman, G. D. (1978) *Adv. Enzymol.* **47**, 45-148
 Crivellone, D., Wu, M., and Tzagoloff, A. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 14323-14333
 Degli Esposti, M., Tsai, A., Palmer, G., and Lenaz, G. (1986) *Eur. J. Biochem.* **160**, 547-555
 Degli Esposti, M., Palmer, G., and Lenaz, G. (1989) *Eur. J. Biochem.* **182**, 27-36
 Degli Esposti, M., Ballester, F., Timoneda, J., Crimi, M., and Lenaz, G. (1990) *Arch. Biochem. Biophys.* **283**, in press
 D'Souza, M. P., and Wilson, D. F. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 11760-11766
 de Vries, S., Albracht, S. P. J., Berden, J. A., and Slater, F. C. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 11996-11998
 Eisenberg, D., Schwarz, E., Komarow, M., and Wall, R. (1984) *J. Mol. Biol.* **179**, 125-142
 Ellefson, W., and Krogmann, D. W. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* **184**, 593-599
 Engel, W. D., Michalicki, C., and Von Jagow, G. (1983) *Eur. J. Biochem.* **132**, 395-402
 Gatti, D. L., Meinhardt, S. W., Ohnishi, T., and Tzagoloff, A. (1989) *J. Mol. Biol.* **205**, 421-435
 Gelferovs, P., and Nelson, B. D. (1977) *Eur. J. Biochem.* **80**, 275-282
 González-Halphen, D., Lindorfer, M. A., and Capaldi, R. A. (1988) *Biochemistry* **27**, 7021-7031
 González-Halphen, D. (1990) in *Highlights in Ubiquinone Research* (Lenaz, G., Barabasi, O., Rabbi, A., and Battino, M., eds) pp. 158-161. Taylor and Francis, London
 Gutwenger, H., Bisson, R., and Montecucco, C. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 11132-11136
 Hall, D. O., Rao, K. K., and Cammack, R. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **47**, 798-802
 Harnisch, U., Weiss, H., and Sebald, W. (1985) *Eur. J. Biochem.* **149**, 95-99
 Harnisch, U., Linke, P., and Weiss, H. (1986) *5th EBEL Reports*, College of Wales, Aberystwyth, Wales, p. 184
 Hartl, F., Schmidt, B., Wachter, E., Weiss, H., and Neupert, W. (1986) *Cell* **47**, 939-951
 Japa, S., and Beattie, D. S. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* **268**, 716-720
 Kagawa, Y., and Hackler, E. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 5477-5487
 Klein, P., Kanehisa, M., and DeLisi, C. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* **815**, 468-476
 Li, Y., De Vries, S., Leonard, K., and Weiss, H. (1981) *FEBS Lett.* **135**, 277-280
 Lorusso, M., Cecco, T., Boffoli, D., Gatti, D., Meinhardt, S., Ohnishi, T., and Papa, S. (1989) *Eur. J. Biochem.* **170**, 535-540
 Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275
 Ljungdahl, P. O., Beckmann, J. D., and Trumppower, B. L. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 3723-3731
 Markwell, M. A. K., Haas, S. M., Bieber, L. L., and Tolbert, N. E. (1978) *Anal. Biochem.* **87**, 206-210
 Mitchell, P. (1976) *J. Theor. Biol.* **62**, 327-337
 Needleman, S. B., and Wunisch, C. D. (1970) *J. Mol. Biol.* **48**, 441-453
 Nishikimi, M., Hosokawa, Y., Toda, H., Suzuki, H., and Ozawa, T. (1989) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **169**, 19-25
 Ohnishi, T., and Trumppower, B. L. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 3278-3284
 Ohnishi, T., Schägger, H., Meinhardt, S. W., LoBrutto, R., Link, T., and Von Jagow, G. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 735-744
 Payne, W. E., and Trumppower, B. L. (1987) *FEBS Lett.* **213**, 107-112
 Rao, M. J. K., and Argos, P. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **880**, 197-214
 Rees, G. R., de Haen, C., Teller, D. C., Doolittle, R. F., Fitch, W. M., Dickerson, R. E., Chambon, P., McLachlan, A. D., Margoliash,

- E., Jukes, T. H., and Zuckerkandl, E. (1987) *Cell* 50, 667
- Rich, P. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 788, 53-79
- Rieske, J. S. (1967) *Methods Enzymol.* 10, 233-245
- Rieske, J. S. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 456, 195-247
- Rieske, J. S., MacLennan, D. H., and Coleman, R. (1964) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 15, 338-344
- Schagger, H., Link, Th. A., Engel, W. D., and Von Jagow, G. (1986) *Methods Enzymol.* 126, 224-237
- Schagger, H., Borchart, U., Machleidt, W., Link, T. A., and Von Jagow, G. (1987) *FEBS Lett.* 219, 161-168
- Shimomura, Y., Nishikimi, M., and Ozawa, T. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 14053-14063
- Shimomura, Y., Nishikimi, M., and Ozawa, T. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 15075-15080
- Szewczyk, B., and Summers, D. F. (1988) *Anal. Biochem.* 168, 48-53
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 4350-4354
- Trumpower, B. L. (1981) *J. Bioenerg. Biomembr.* 13, 1-24
- Trumpower, B. L. (1990) *Microbiol. Rev.* 54, 101-129
- Trumpower, B. L., and Edwards, C. A. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 8697-8706
- Von Heijne, G. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 947, 307-333
- Von Jagow, G., Ljungdahl, P. O., Graf, P., Ohnishi, T., and Trumpower, B. L. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 6318-6326
- Zhang, Y. Z., Georgevich, G., and Capaldi, R. A. (1984) *Biochemistry* 23, 5616-5621