

03081 9



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

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

ESTUDIO FÍSICOQUÍMICO DE LA NADH:Q₆
OXIDORREDUCTASA INTERNA DE LA MITOCONDRIA DE
Saccharomyces cerevisiae.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

PRESENTA:

M. en IBB MA. ISABEL VELAZQUEZ LOPEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. JUAN PABLO PARDO VAZQUEZ

MEXICO, D. F.

2002

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta 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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DRA. MARIETA TUENA SANGRI
SECRETARIO: DR. JUAN PABLO PARDO VÁZQUEZ
VOCAL: DR. EDMUNDO CHÁVEZ COSSÍO
VOCAL: DRA. MARINA GAVILANES RUÍZ
VOCAL: DR. GUILLERMO MENDOZA HERNÁNDEZ
SUPLENTE: DR. MARIO CALCAGNO MONTÁNS
SUPLENTE: DR. JOSÉ DE JESÚS GARCÍA TREJO

SUSTENTANTE

MA. ISABEL VELÁZQUEZ LÓPEZ

TUTOR:

DR. JUAN PABLO PARDO.

COMITÉ TUTORAL

DR. MARIO CALCAGNO M
DR. ALEJANDRO FERNÁNDEZ VELASCO
DR. JUAN PABLO PARDO VAZQUEZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA BÁSICA.

El trabajo experimental fue realizado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM, con la asesoría del Dr. Juan Pablo Pardo.

Este proyecto recibió los siguientes apoyos:

Beca para estudios de doctorado por la Dirección General del Personal Académico (UNAM).

Programa de Apoyo a los Estudios de Postgrado, PAEP (UNAM) 030368 y 201436.

LA CIUDAD DE LOS POETAS

Shahen Haeyan

Había una vez una ciudad muy hermosa situada a orillas de un lago, cerca de un bosque frondoso. El gobierno de la ciudad estaba en manos de un alcalde que moraba en un gran castillo, rodeado de un séquito de ayudantes encargados de administrar la vida de los ciudadanos. La principal característica de esa ciudad era su población: la habitaban un gran número de poetas que había elegido ese lugar como residencia por su belleza y, sobre todo, por el apoyo que el alcalde del lugar les brindaba. En efecto, cada poeta recibía mensualmente una pequeña moneda de oro que le permitía vivir sin más preocupaciones que componer buenos poemas.

Por supuesto había poetas buenos, malos y regulares. Incluso algunos viciales se hacía pasar por bardos para recibir regularmente las monedas de oro, sin que nadie les conociera un solo verso.

Pero muchos poetas se esforzaban por realizar sus labores tan bien como sus talentos naturales se los permitieran. Y se daba el caso frecuente de viciales cuya fama rebasaba los límites de su ciudad de residencia.

Pero un día la situación económica del reino empezó a deteriorarse; el clima cambió, la cosechas se perdieron y las minas se agotaron. La pobreza invadió la otrora próspera ciudad. El alcalde se vio en la necesidad de recortar los gastos públicos, y los primeros en resentir la escasez fueron los poetas que tanta fama le daban a la ciudad. Al principio la moneda de oro que recibían mensualmente se transformó en una moneda de plata; poco después, la plata se volvió cobre, y cada vez la moneda era más y más pequeña. Los poetas padecieron de hambre. Unos emigraron a reinos vecinos; otros se dedicaron a labores muy alejadas de su arte para redondear sus ingresos; y entre los jóvenes sólo aquellos con un gran espíritu de sacrificio se entregaron a la poesía.

Los poetas que aún quedaban fueron a lamentarse con el alcalde. Este les prometió que buscaría recursos adicionales para sostener a sus súbditos en desgracia. Finalmente, después de arduas discusiones con las autoridades más altas del reino, el alcalde anunció un buen día por medio de sus trovadores, que pagaría algunas monedas adicionales a los poetas, pero sólo aquellos que demostraran fehacientemente su dedicación al arte de rimar.

Fue así como se impuso un estricto control sobre la actividad literaria para evitar que los embusteros cobraran las pocas monedas adicionales que el alcalde había prometido. Al principio se le asignó a cada poeta un lugar específico donde instalarse a esperar la inspiración: debajo de un árbol, a orillas del lago o en la mesa de un café. Ahí debía de firmar cada día laborable para dejar constancia por escrito de su presencia y del tiempo pasado en compañía de su musa.

Además se convino en que cada poeta rindiera un informe anual de sus odas, ya que, mientras más compusiera, más monedas recibiría. Hubo profundas discusiones en el

castillo del alcalde sobre la manera más conveniente de evaluar la actividad artística de los bardos. ¿Debía contar más un poema escrito en latín que uno en el dialecto local? ¿Valía más un alejandrino que un hexámetro? ¿Se aceptaría el verso libre o sólo las rimas rigurosas? ¿Equivalía una copia de veinte estrofas a dos de diez?

Finalmente los administradores del castillo se pusieron de acuerdo sobre la manera más eficiente y objetiva de juzgar la creación poética. Elaboraron una tabla en que se asignaba con rigor matemático una cantidad definida de puntos por cada yambo, espóndeo o dáctilo; se ponderaba cada estrofa de acuerdo con su rima; dábese mas valor a los poemas que trataban de grandes problemas nacionales, y menos a los soliloquios y cantos de amores frustrados; se reconocía un mérito mayor al soneto que al poema en prosa; y muchas más reglas para valorar con precisión la labor poética.

Con el fin de realizar la enorme labor de evaluación, el alcalde tuvo que contratar a un gran número de ayudantes. Estos, a su vez, se asesoraron de grandes vates que habían alcanzado ya el olimpo poético. El número de admiradores de la ciudad aumento rápidamente, incluso muchos poetas abandonaron su arte para dedicarse a la labor mejor remunerada de ayudar al alcalde en la justa evaluación de sus súbditos.

Ante tal situación, los trabajadores de la pluma adaptaron su obra a las normas establecidas por sus benefactores. Por ejemplo, muy pronto se abandonó el género épico y se popularizó el *haiku*, poema japonés de sólo diecisiete sílabas; los grandes poemas se dividieron en varios sonetos; y se favorecieron los temas señalados como prioritarios por el alcalde y sus ayudantes. Lo importante era producir el mayor número posible de poemas en el menor tiempo posible para merecer el estímulo de las monedas adicionales.

Los primeros años, los poetas dedicaron una parte importante de su labor literaria a preparar sus reportes de actividades. Pero pronto ese trabajo se volvió tan agobiante que los poetas incluyeron en sus informes anuales la redacción de los informes de año anterior. El resultado fue que, al cabo del tiempo, los nuevos informes ya sólo incluían la preparación de los informes anteriores.

Cuenta la leyenda que en las noches de luna llena, algunos viejos poetas se reúnen en un claro del bosque para componer versos como en los tiempos antiguos. Pero escriben sus poemas en las hojas de los árboles y el viento los dispersa a la mañana siguiente.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Pablo Pardo por su dirección y sus observaciones durante la realización del trabajo.

A los miembros del comité tutoral: Dr. Mario Calcagno, Dr. Alejandro Fernández y Dr. Juan Pablo Pardo por la ayuda durante este periplo en el doctorado.

Agradezco a los miembros del jurado por la revisión crítica de la tesis y del artículo de investigación.

Agradezco a todos los compañeros del departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina por haberme brindado su cariño, confianza y apoyo en este trabajo, en especial a la Dra. Patricia del Arenal la que también me brindo una muy buena asesoría de las relaciones interpersonales además de compartir una buena experiencia en el Colegio de Profesores.

Agradezco a la Dra. Ariane Atteia y a Roberto Van Lis por su ayuda técnica y su consejos en la electroforesis en condiciones nativas con los geles azules.

Dedico esta tesis

*A Jorge, con quien he caracterizado y sobreexpresado... nuestro amor.
Por su soporte... técnico y moral.*

*A mi madre, Carmen López, que es la persona más noble que conozco y me
alegra mucho el ser su hija.*

A mi familia.

A mis amigos porque la amistad aún sigue siendo el mejor de los negocios.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	6
RESUMEN	7
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	11
Clasificación de las NADH deshidrogenasas	12
La cadena respiratoria de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
Características de la NADH-DH interna	19
Estudios Cinéticos	20
Características de las NADH-DHs externas	21
Estudios con levaduras mutantes $\Delta ndi1$	21
Expresión heteróloga del gen <i>ndi1</i>	21
Estudios con levaduras mutantes $\Delta nde1$ y $\Delta nde2$	22
Las NADH deshidrogenasas de plantas	23
Papel fisiológico de las NADH deshidrogenasas de clase 2	23
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	27
MATERIALES Y MÉTODOS	30
Purificación de la enzima	30
Determinación de la actividad enzimática	31
Actividad enzimática en presencia de inhibidores	31
Determinación de proteína	31
Análisis cinético	32
Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes	32

Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas	32
Ensayo de actividad en geles nativos	32
Estructura secundaria de la proteína	33
Modelaje de la estructura terciaria	33
RESULTADOS	34
Purificación de la NADH-DH interna	34
Patrones de la velocidad inicial	38
Efectos cinéticos de los inhibidores sin salida e inhibición por productos	41
Inhibición por flavona	44
Efecto del pH en la estabilidad de la NADH-DH interna	50
Efecto del pH sobre los parámetros cinéticos de la NADH-DH interna	52
Determinación de la estructura secundaria y un modelo de estructura terciaria	55
Determinación del estado de agregación	61
Efecto de la flavona sobre el consumo de oxígeno en las mitocondrias de <i>S. cerevisiae</i>	64
DISCUSIÓN	66
PERSPECTIVAS	72
CONCLUSIONES	73
ANEXOS	75
REFERENCIAS	78

Abreviaturas:

AMP	Adenosina 5' monofosfato
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
<i>ndi1</i>	Gen de la NADH deshidrogenasa interna
NDI1	Proteína NADH-DH interna
<i>nde1</i>	Gen de la deshidrogenasa externa 1
NDE1	Proteína NADH-DH externa 1
<i>nde2</i>	Gen de la deshidrogenasa externa 2
NDE2	Proteína NADH-DH externa 2
NADH-DH1	NADH deshidrogenasa clase 1
NADH-DH2	NADH deshidrogenasa clase 2
NADH-DHs	NADH deshidrogenasas
DCPIP	Diclorofenolindofenol
DOC	Desoxicolato de sodio
HEPES	2-N-hidroxiethylpiperazina-N'-2 ácido etanosulfónico
Flavona	2-fenil-4H-1-benzopiran-4-ona
MES	2-N-morfolino- ácido etanosulfónico
MOPS	3-N-morfolinopropano ácido sulfónico
MQ ₆	Menaquinona-6
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difenil-bromuro de tetrazolium
PMSF	Fluoro fenil metil sulfonilo
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TRIS	Tris- hidroximetilaminometano
UQ ₁	Ubiquinona 1

RESUMEN

La NADH:Q₆ oxidorreductasa interna de *Saccharomyces cerevisiae* (NDI1), insensible a rotenona, lleva a cabo la transferencia de electrones del NADH a la quinona en la cadena respiratoria. A diferencia del complejo I, esta enzima no bombea protones, por lo que las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae* no tienen el sitio I de acoplamiento de energía. Esta enzima está constituida por una subunidad de 53 kDa, tiene como grupo prostético al FAD y no presenta centros hierro azufre. Es insensible a los inhibidores clásicos de sitio I, como la rotenona y la piericidina, y se inhibe por concentraciones micromolares de flavona. El gen de esta proteína, el *ndi1*, es de origen nuclear y codifica para una proteína con un péptido señal de 26 aminoácidos para su importación a la mitocondria. La enzima fue purificada siguiendo la metodología descrita por de Vries y Grivell (1988), la cual consiste en el uso de bajas concentraciones de Triton X-100 y alta fuerza iónica para solubilizar a la proteína y dos cromatografías, una de intercambio iónico y otra de afinidad.

En este trabajo se estudió la cinética de la enzima, la cual sigue un comportamiento clásico de Michaelis-Menten con inhibición por sustrato. Se obtuvieron las siguientes constantes cinéticas: $K_{mNADH} = 9.4 \pm 1.0 \mu\text{M}$, la $K_{mDCPIP} = 6.2 \pm 0.8 \mu\text{M}$, $V_{max} = 83.6 \pm 4.6 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$, $K_{iNADH} = 52.5 \pm 28.8 \mu\text{M}$ y $K_{iDCPIP} = 115.2 \pm 70.34 \mu\text{M}$. La NADH-DH interna sigue un mecanismo de tipo ping-pong, en el cual el primer producto se libera antes de la adición del segundo sustrato. Uno de los productos de la reacción, el NAD⁺, no inhibe a la enzima aún a concentraciones milimolares, mientras que el otro sustrato, el DCPIP reducido, inhibe a la enzima con una $K_i = 14.1 \pm 1.3 \mu\text{M}$. Este mecanismo se comprobó mediante el uso de inhibidores como el AMP y la flavona. El AMP presentó una inhibición competitiva con respecto al NADH ($K_i = 5.5 \text{ mM}$) y una inhibición acompetitiva para el DCPIP ($K_i = 11.5 \text{ mM}$). La flavona fue un inhibidor parcial, el cual muestra inhibición hiperbólica acompetitiva con respecto al NADH e inhibición hiperbólica no competitiva para el DCPIP. La constante de inhibición aparente en el intercepto ($K_{ii} = 5.4 \mu\text{M}$) y la constante de inhibición de la pendiente ($K_{is} = 7.1$

μM) fueron obtenidas por análisis de regresión no lineal. Los resultados indican que el complejo ternario F-DCPIP_{ox}-flavona cataliza la reducción del DCPIP, aunque con una baja eficiencia. El efecto del pH sobre la V_{max} y la V_{max}/K_m fueron estudiados. El perfil de la V_{max} mostró dos grupos con valores de pK_a de 5.3 y 7.2 involucrados en el proceso catalítico. En el caso de la V_{max}/K_m también existen dos grupos involucrados en la unión de los sustratos, con valores de pK_a semejantes a los anteriores.

El estado de agregación de la proteína se determinó mediante el uso de electroforesis en condiciones nativas y las bandas se identificaron por medio de actividad. Se encontró una banda con un peso molecular de 130 kDa, que corresponde a un dímero. En contraste, una deshidrogenasa externa dependiente de NADPH migró con un peso molecular de 60 Kda

El uso de varios programas de predicción de estructura secundaria nos permitió obtener una estructura consenso de la proteína. La enzima tiene en la parte central una estructura $\beta\alpha\beta$, probablemente involucrada en la unión del NADH o del FAD. Se encontraron cuatro regiones muy conservadas, tres de ellas hidrofóbicas. Sin embargo, no hay una clara indicación de un segmento transmembranal que ancle a la proteína en la membrana. Por tanto, suponemos que la NADH deshidrogenasa esta unida a la membrana por interacciones hidrofóbicas, no del tipo α -hélice transmembranal, e interacciones electrostáticas. Recientemente se publicó que las deshidrogenasas mitocondriales de levadura están asociadas en la membrana interna formando complejos supramoleculares (Grandier-Vazeille y col., 2001).

Al comparar la secuencia de la proteína con las secuencias depositadas en el banco dentro del Swiss Prot se encontró una mayor semejanza con las NADH-DHs de plantas que con las de bacterias.

La estructura tridimensional de una tripanotiol reductasa del protozoario parásito (*Trypanosoma cruzi*) y una lipoamida deshidrogenasa de la bacteria (*Pseudomonas putida*) fueron usadas para obtener un modelo tridimensional de la NADH-DH interna.

ABSTRACT

The internal NADH:Q6 oxidoreductase rotenone-insensitive (NDI1) in *Saccharomyces cerevisiae* carries out the transfer of electrons from NADH to quinone in the respiratory chain. Contrary to the complex I, this enzyme does not pump protons, and therefore mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* lack energy coupling site I. This enzyme is constituted by a 53 kDa subunit, that contains a prosthetic group FAD and no iron-sulphur clusters are found in the protein. It is insensitive to the classic inhibitors of complex I, such as rotenone and piericidin, but it is inhibited by micromolar concentrations of flavone. The gene of this protein, *ndi1*, is of nuclear origin and it codes for a protein with a pre sequence of 26 amino acids for its import into mitochondria. The enzyme was purified essentially as described by de Vries and Grivell (1988). The method consists basically in using low concentrations of Triton X-100 and relatively high ionic strength to solubilize the protein followed by two chromatographic steps, a DEAE-Biogel and a blue Sepharose CL-6B.

In this work, the kinetics of the enzyme was studied. It follows a classic Michaelis-Menten behavior with substrate inhibition. The following kinetic constants were obtained: $K_{mNADH} = 9.4 \pm 1.0 \mu\text{M}$, the $K_{mDCPIP} = 6.2 \pm 0.8 \mu\text{M}$, $V_{max} = 83.6 \pm 4.6 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$, $K_{iNADH} = 52.5 \pm 28.8 \mu\text{M}$ and $K_{iDCPIP} = 115.2 \pm 70.34 \mu\text{M}$. The internal NDH-DH follows a ping-pong mechanism, in which the first product is released before the addition of the second substrate. One of the products of the reaction, NAD^+ , does not inhibit the enzyme even at millimolar concentrations, while the other one, the reduced DCPIP, inhibits the enzyme with a $K_i = 14.1 \pm 1.3 \mu\text{M}$. This mechanism was proven by means of the use of inhibitors like AMP and flavone. AMP showed a competitive inhibition with regard to NADH ($K_i = 5.5 \text{ mM}$) and uncompetitive inhibition for DCPIP ($K_i = 11.5 \text{ mM}$). Flavone was a partial inhibitor, exhibiting an uncompetitive hyperbolic inhibition with regard to NADH and a noncompetitive hyperbolic inhibition for DCPIP.

The intercept inhibition constant ($K_{ii} = 5.4 \mu\text{M}$) and the slope inhibition constant ($K_{is} = 7.1 \mu\text{M}$) were obtained by non linear regression analysis. The results indicate that the ternary complex F-DCPIP_{ox}-flavone catalyzes the reduction

of DCPIP, although with a lower efficiency. The effect of pH on V_{max} and V_{max}/K_m were studied. The V_{max} profile showed two groups with pK_a of 5.3 and 7.2 involved in the catalytic process. In the case of the V_{max}/K_m profile there are two groups involved in the binding of substrates with similar to the previous values of pK_a .

The aggregation state of the protein was determined by electrophoresis on native conditions and the bands were identified through activity. A band with a molecular weight of 130 kDa was found, which corresponds to a dimer. In contrast, one of the external NADPH-DH migrate with a molecular weight of 60 kDa.

The use of several programs for secondary structure prediction allowed us to propose a consensus structure of the protein. The enzyme has in the central part a $\beta\alpha\beta$ structure, probably involved in the binding of NADH or FAD. Four highly conserved regions were found in the alignment. There is no a clear indication of a transmembrane segment to anchor the protein to the membrane. Therefore, the NADH dehydrogenase might be bound to the membrane by hydrophobic interactions (but not a transmembrane α -helical segment) and electrostatic interactions. Recently, it was published that yeast mitochondrial dehydrogenases are associated in a supramolecular complex (Grandier-Vazeille, *et al.*, 2001)

The sequence of the protein was compared with the data bank to obtain related sequences and the analysis predicted that there is higher homology with the NADH-DH of plants than to those of bacteria.

The three-dimensional structure of a trypanothione reductase from parasitic protozoa (*Trypanosoma cruzi*) and of a dihydrolipoamide dehydrogenase from bacteria (*Pseudomonas putida*) crystallized were used to obtain a three-dimensional model of the inner NADH-DH

INTRODUCCIÓN

En los animales, la transferencia de los electrones del NADH al oxígeno molecular proviene vía los complejos respiratorios en una cadena respiratoria lineal. La respiración y la síntesis de ATP en las células animales participan cinco grandes complejos mitocondriales proteicos: la NADH:ubiquinona oxidorreductasa (complejo I), la succinato:ubiquinona oxidorreductasa (complejo II), la ubiquinol:citocromo c oxidorreductasa (complejo III), la citocromo c oxidasa (complejo IV) y la ATP sintasa (complejo V). Además, la cadena cuenta con dos elementos móviles que conectan estos complejos: la ubiquinona (molécula hidrofóbica de unidades de isopreno) entre el complejo I y el complejo III y el citocromo c (proteína de bajo peso molecular) entre el complejo III y el complejo IV. En los complejos I, III y IV el transporte de electrones está acoplado a la translocación de protones, dando como resultando una fuerza protomotriz que es usada para la síntesis de ATP y el transporte de metabolitos.

En contraste, las plantas presentan una cadena ramificada con otras cuatro diferentes NADH deshidrogenasas insensibles a rotenona y una ubiquinol oxidasa alterna, ninguna de las cuales transloca protones. Dos NADH deshidrogenasas, una que oxida al NADH y otra que oxida al NADPH (y posiblemente también al NADH), se encuentran en la membrana interna mitocondrial orientadas hacia el espacio intermembranal. Las otras dos NADH deshidrogenasas se encuentran con su sitio activo hacia la matriz mitocondrial y pueden competir con el complejo I por el NADH formado durante el ciclo del ácido cítrico (Rasmusson y col., 1998). Éstas forman caminos alternos y son capaces de mantener la respiración de manera continua en presencia de los inhibidores específicos para cada complejo. Estas proteínas alternas también están presentes en las bacterias y en los hongos. La expresión y la regulación de la actividad de estos componentes alternos parecen responder a factores de estrés oxidativo, al estado de desarrollo, o ambos (Rasmusson y col., 1998, y Horne, y col., 2001).

Clasificación de las NADH deshidrogenasas

Desde el punto de vista de la relación estructura-función, las NADH-DHs se clasifican en tres clases:

a) Las NADH-DH de clase 1 son enzimas que presentan un sitio de acoplamiento de energía y están constituidas por un complejo multiproteico que contiene como grupo prostético al FMN (unido no covalentemente) y varios centros hierro y azufre. Pueden usar como sustrato al NADH y al desamino-NADH. Se inhiben por concentraciones micromolares de rotenona o de piericidina. Dentro de esta clase se encuentra el complejo I, el cual cataliza la oxidación del NADH y la reducción de la ubiquinona. Esta actividad combina la transferencia de dos electrones con la salida de cuatro protones (Dutton y col., 1998). Es el complejo más grande, con 43 subunidades en la mitocondria de bovino. Siete subunidades son codificadas por el DNA mitocondrial y el resto son de origen nuclear. Tiene un mononucleótido de flavina (FMN), seis centros hierro y azufre: dos binucleares N1a y N1b, y cuatro tetranucleares N2 a N5 (Ohnishi, 1973) y tiene al menos tres sitios de unión a la quinona. El complejo tiene una masa molecular de 900 kDa. En el hongo *Neurospora crassa* la enzima tiene al menos 35 subunidades diferentes y una masa molecular de 770 kDa (Weiss y col., 1991); algunas de sus subunidades son homólogas a las subunidades del complejo I de bovino. Solo muy pocas subunidades del complejo I de *N. crassa* no se conoce su homólogo en bovino (21.3a, 21.3b, 20.9 y 17.8 Videira, 1998). El complejo I en *Escherichia coli* tiene una masa molecular aproximada de 530 kDa y está constituida por 13 subunidades diferentes (Weidner y col. 1993). Siete son homólogas a las subunidades codificadas por el DNA mitocondrial. Las restantes son homólogas a las subunidades de codificación nuclear. Las 13-14 subunidades de las bacterias forman la unidad funcional mínima del complejo. Los valores de la K_{map} para el NADH con UQ₁ o K₃Fe(CN)₆ como aceptores de electrones es de alrededor de 10 μM, en varias bacterias (Yagi, 1991). En contraste, el NADPH no es un sustrato para estas enzimas, con una actividad menor al 2% de la actividad con NADH. Sin embargo, presentan una especificidad baja relativamente para el sitio de unión de la quinona y pueden usar UQ₁, UQ₆, rodoquinona, UQ₁₀ y duroquinona como

sustratos. El complejo I de las mitocondrias de plantas ha sido aislado de varias especies como betabel, haba y papa, (Rasmusson y col., 1998). El complejo I de betabel (*Beta vulgaris*) tiene una masa molecular de 700 kDa, con 30 subunidades diferentes, algunas de las cuales fueron identificadas por anticuerpos contra los polipéptidos del complejo I de *N. crassa*, lo cual indicó que algunos epítopes de las subunidades están conservados en las de plantas. Existe una gran cantidad de inhibidores que interactúan con el complejo I, algunos de origen natural, como los rotenoides y las piericidinas, y otros de origen sintético, como el amital y ciertos pesticidas (Degli-Esposti, 1998).

El complejo I se encuentra prácticamente en todos los organismos estudiados. Sin embargo, está ausente en *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* (de Vries y Grivell, 1988), *Saccharomyces carlsbergii* y *Kluyveromyces lactis* (Horne y col., 2001).

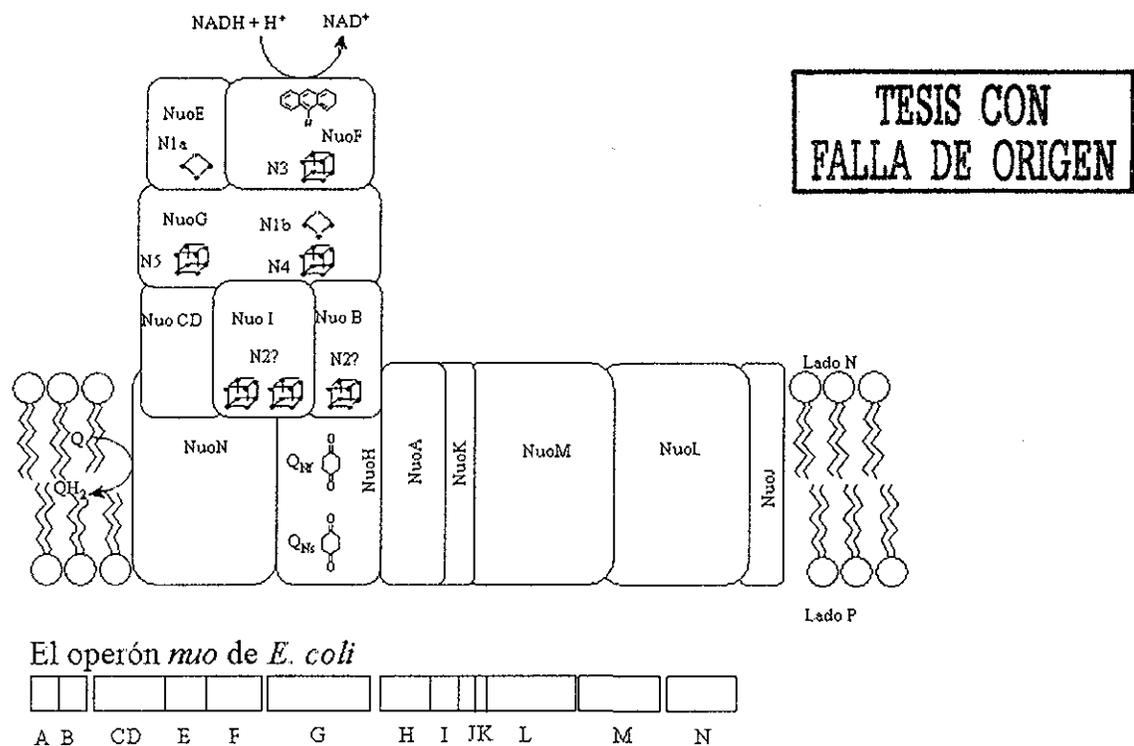


Figura 1. Componentes del complejo I de *Escherichia coli*. El complejo I está formado por 13 subunidades diferentes, seis de ellas son proteínas periféricas y siete son proteínas transmembranales. El sitio de unión del NADH, el FMN y el centro hierro-azufre N3 se encuentran en la subunidad NuoF y el centro N1a en la subunidad NuoE. La subunidad NuoG contiene tres centros hierro-azufre: el N1b, el N4 y el N5. El centro N2 se localiza muy cerca de la membrana, probablemente en la subunidad NuoB o en la NuoL. N y P significan los lados negativo y positivo de la membrana, respectivamente. En la parte inferior se muestra el operón *nuo* con los genes que codifican para las subunidades del complejo I en *E. coli*.

Por medio de microscopía electrónica se obtuvo la estructura tridimensional de estos tres complejos, con una resolución de 22 Å (bovino) (Grigorieff, 1998), 28 Å (*N. crassa*) (Guénbaut y col., 1997) y 34 Å (*E. coli*) (Guénbaut y col., 1998).

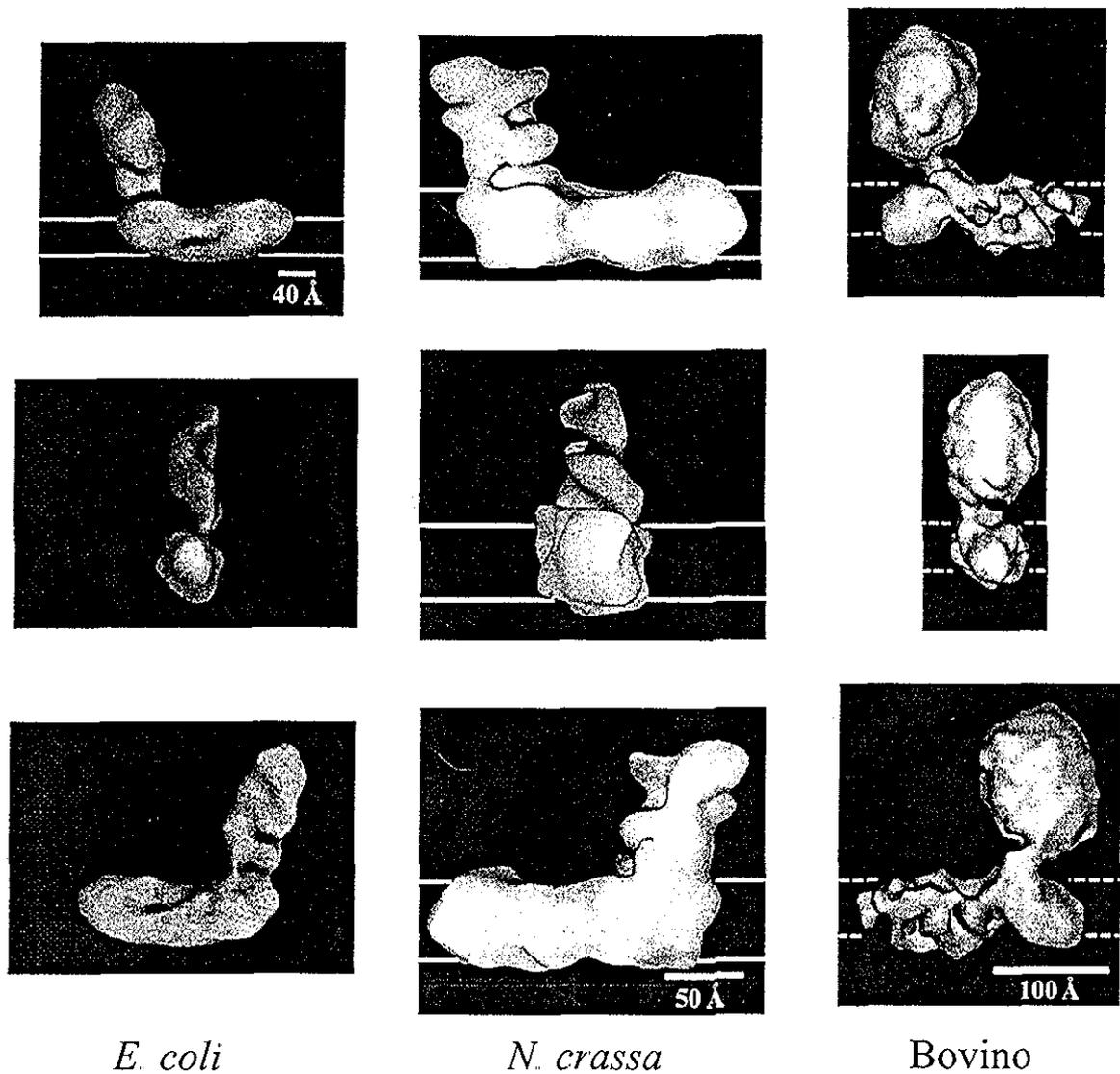


Figura 2. Estructura tridimensional del complejo I de *E. coli*, *N. crassa* y de corazón de bovino. Sucesivas observaciones con rotación de 90° sobre el eje vertical. La posición de la bicapa de lípidos, se determinó por cristales bidimensionales y cristales tubulares en la enzima de *N. crassa*. Las estructuras de *E. coli* y de bovino muestran una zona estrecha entre el dominio de la membrana y la matriz (el tallo) que no es visible en el complejo de *N. crassa*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El complejo I presenta una forma característica de L en donde uno de los brazos se proyecta hacia la matriz mitocondrial (el dominio hidrofílico) y el otro brazo está embebido en la membrana interna mitocondrial (el dominio hidrofóbico) y los dos brazos están conectados por un cuello. Hay evidencias en *N. crassa* de un ensamblaje separado del dominio periférico y del hidrofóbico, previo a la formación *in situ* del complejo completo (Friedrich y col., 1993 y Friedrich y Weiss, 1997).

b) Las NADH-DH de clase 2 se han aislado de un gran número de bacterias y de las mitocondrias de las levaduras y de las plantas (de Vries y Grivell, 1988., Roberts y col., 1995 y Melo y col., 1996). No acoplan la transferencia de electrones con el bombeo de protones, contienen como grupo prostético al FAD, unido en forma no covalente, y carecen de centros hierro azufre. Presentan alta especificidad por su sustrato, el NADH o el NADPH. Son activadas por cationes monovalentes como el sodio y el potasio, y por cationes divalentes como el magnesio. Son insensibles a los inhibidores de las NADH-DH de clase 1 (Yagi, 1991).

Las enzimas de *S. cerevisiae* están formadas por un solo tipo de subunidad y las secuencias de esta familia de proteínas presentan tres regiones conservadas (Young y col., 1981). Dos de éstas tienen el plegamiento de Rossmann, el cual tiene el motivo $\beta\alpha\beta$ con propiedades de unir ADP (Wierenga, 1986). Es posible que una de estas regiones represente el sitio de unión del FAD y la otra de unión del NADH.

También se ha supuesto que el sitio de unión a la quinona podría caer en una secuencia conservada, debido a que la UQ_1 actúa como sustrato para todas las NADH-DH de clase 2. Se ha visto en la enzima de *E. coli* que al remover los primeros 60 residuos de la región amino-terminal se pierde completamente la actividad y la habilidad para unirse a los liposomas, lo que sugiere una posible función de anclaje a la membrana (Xu y col., 1985). En otros organismos, como *Thermus*, se encontró una secuencia que sugiere un sitio de unión a nucleótidos (GXGXXG) y que la relaciona más con la NADH-DH de clase 2 de *E. coli*. Estas enzimas pueden usar como sustrato al NADH o al NADPH, pero son incapaces de

emplear al desamino-NADH. La enzima de *Thermus* y la NADH-DH interna de *S. cerevisiae* utilizan como sustrato al NADH pero no al NADPH. En las plantas, éstas pueden usar específicamente al NADH o al NADPH (Roberts y col., 1995). Sólo se ha reportado a la flavona como un inhibidor de las NADH-DH de clase 2 en las mitocondrias de *Arum maculatum* y *S. cerevisiae* (Cook, 1984., y de Vries, 1988).

En la enzima purificada de *E. coli* se determinó el valor de la $K_{m_{app}}$ para el NADH usando diferentes aceptores de electrones. Las K_m fueron de 5.9 μM con Q_1 , 2.3 μM con Q_2 , 18.7 μM con la DQ, 1.8 μM con la idebenona y 20 μM con el DCPIP (Björklöf y col., 2000).

El estado de agregación funcional no se ha reportado para la mayoría de estas proteínas. Ningún miembro de esta clase ha sido cristalizado, por lo que aún no se conoce la topología de la proteína.

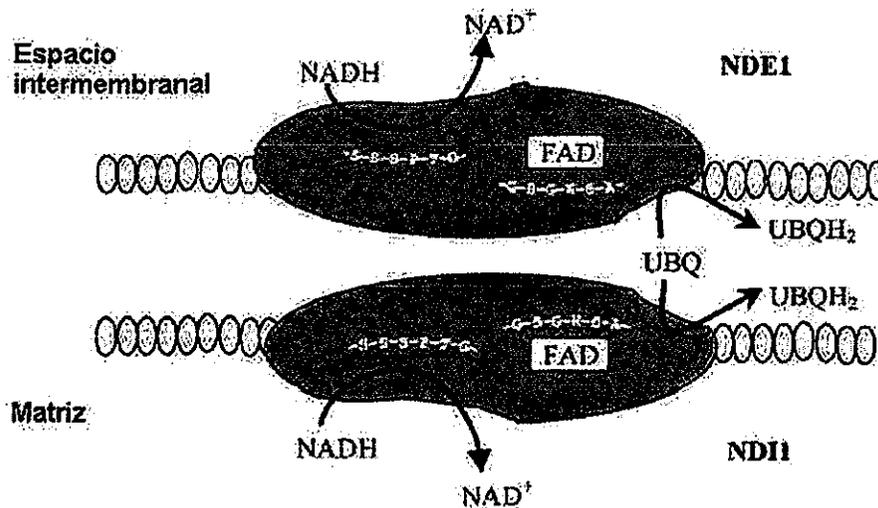


Figura 3. Modelo de la posible organización de las NADH-DHs interna y externa en *S. cerevisiae*. Las NADH-DHs interna y externa de la levadura (NDI1 y NDE1 respectivamente) están representadas como proteínas similares con opuestas topologías en la membrana interna mitocondrial (figura tomada de la referencia de Joseph-Horne, y col. 2001)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

c) Finalmente, las NADH-DH clase 3 fueron descritas en la bacteria marina *Vibrio alginolyticus*, y agrupa a las enzimas que generan un gradiente electroquímico de iones de sodio durante la respiración aerobia. Las enzimas son inducidas a pH alcalino y acoplan la reacción redox con la translocación de sodio. Estas enzimas son distintas de las NADH-DH clase 1 y las NADH-DH clase 2 en varios aspectos: la dependencia de sodio (necesario para la actividad de quinona reductasa), los inhibidores (sensibles a concentraciones micromolares del ion plata y por la 2-n-heptil-4-hidroxiquinolina N-óxido), el tipo de sustrato (puede usar el análogo desamino-NADH), la composición peptídica y el tipo de cofactor (Rich y col., 1995). Este complejo presenta seis subunidades, α , β , γ , y otras 3 subunidades hidrofóbicas (Tabla1), y contiene FAD y FMN, y centros hierro azufre como cofactores redox.

Los genes en la bacteria *V. alginolyticus* están organizados en el operón *nqr*, con seis genes estructurales llamados *nqra-nqrf*. Las proteínas NqrA y NqrC son las subunidades α y γ , mientras que la proteína NqrF equivale a la subunidad β , que es el sitio de oxidación del NADH. Las proteínas NqrB, NqrD y NqrE son las subunidades hidrofóbicas.

Tabla1

Resumen de las propiedades de las proteínas codificadas por el operón de la NADH:ubiquinona oxidorreductasa de *V. alginolyticus*.

Proteína	M _r (Da)	No. residuos	PI	N-terminal	Probable número de hélices transmembranales	Comentario
NqrA	48	446	5.58	MITIKKGLDL-	0	Subunidad α
NqrB	48	426	9.12	MPRYYYREGRV -	6-12	Hidrofóbica
NqrC	27	256	4.82	MASNNDSIKK-	1 (N-terminal)	Subunidad γ
NqrD	22	210	9.28	MSSAQNVKKS -	4-7	Hidrofóbica
NqrE	21	198	7.18	MEHYISLLVK-	6	Hidrofóbica
NqrF	45	407	4.54	MDIILGVVMF-	2 (N-terminal)	Subunidad β

La NADH:ubiquinona oxidorreductasa dependiente de Na^+ está ampliamente distribuida entre las bacterias marinas y también se encontró en *Klebsiella pneumoniae* crecida aeróbicamente en citrato.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

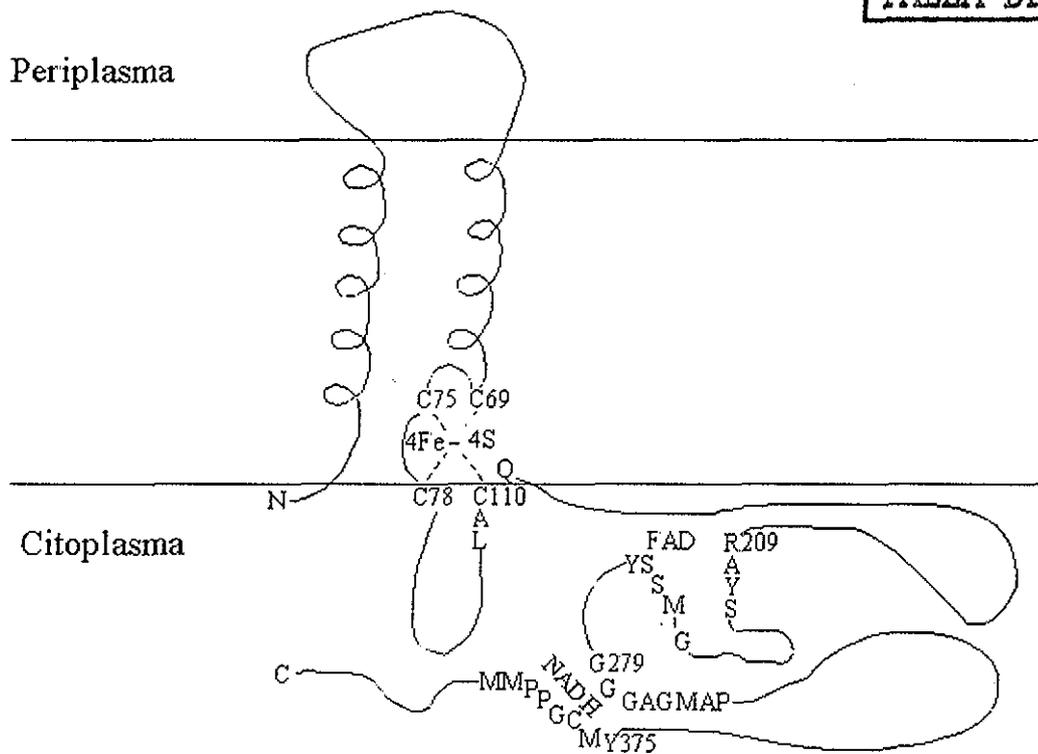


Figura 4. Modelo topológico de la subunidad NqrF y la posición de los centros redox de *Vibrio alginolyticus*. La subunidad está anclada por un par de horquillas α -hélices en la región amino terminal. Los residuos del centro hierro azufre están muy cerca de la interfase entre esta región hidrofóbica y la gran región globular, la cual se proyecta hacia el citoplasma. La parte globular tiene dos dominios estructurales, uno que da el sitio de unión para el FAD y otro el sitio de unión del cofactor NADH. En este modelo, la región amino y carboxilo terminal están en la cara citoplásmica.

La cadena respiratoria de *Saccharomyces cerevisiae*

En contraste con muchas células eucariotes, incluyendo a otros hongos, *S. cerevisiae* carece del complejo I mitocondrial. En vez de éste, contiene una NADH:

quinona oxidorreductasa con un solo tipo de subunidad, la cual cataliza la transferencia de dos electrones del NADH que se produce en la matriz a la ubiquinona. Además, como las mitocondrias de plantas, *S. cerevisiae* tienen dos NADH-DH externas, las cuales tampoco bombean protones y tienen su sitio activo en el espacio intermembranal, por lo que su función es la oxidación del NADH citosólico (figura 5).

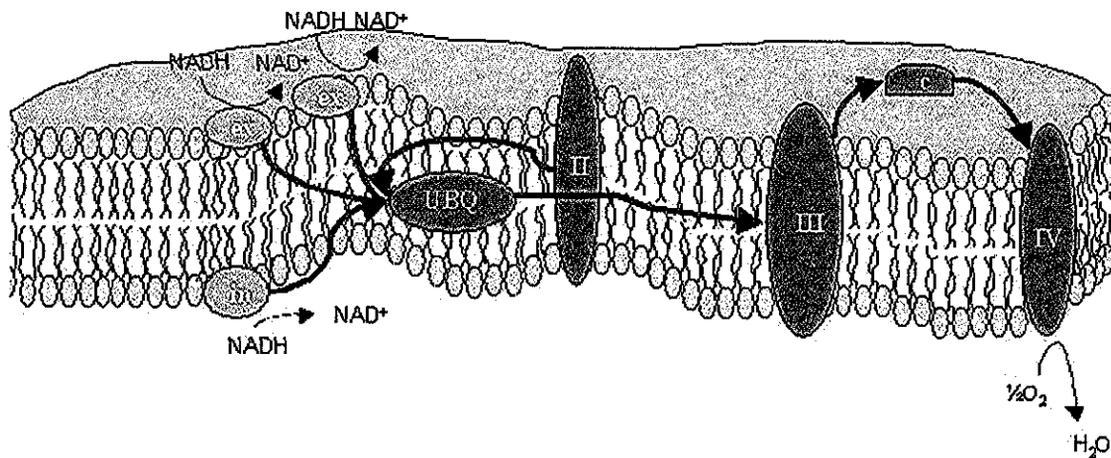


Figura 5. Esquema de la membrana interna mitocondrial de *S. cerevisiae*, con los componentes del sistema de transporte de electrones. ex, NADH:ubiquinona oxidorreductasas externas; in, NADH: ubiquinona oxidorreductasa interna; UBQ, poza ubiquinona: ubiquinol; c, citocromo c periférico. Las flechas indican la dirección del flujo de electrones (figura tomada parcialmente de la referencia de Joseph-Horne, y col., 2001).

Características de la NADH-DH interna

Está codificada por el gen nuclear *ndi1*, que da lugar a un precursor de 57.2 kDa. La proteína contiene un 44% de residuos no polares y carece de cisteínas (de Vries y col., 1991). La determinación de la secuencia N-terminal indicó que la NADH-DH interna inicia en la Ser27, de tal manera que la masa molecular de la proteína madura es de 54.2 kDa. La NADH-DH interna se sintetiza con una secuencia señal de 26 aminoácidos, la cual dirige la proteína a la mitocondria. La presecuencia contiene residuos sin carga y es relativamente rica en serina, treonina y leucina (de Vries y col., 1992). Ni por el algoritmo de Chou-

Fasman ni por el de Garnier se predice un plegamiento α hélice para la secuencia señal. Algunas mutaciones en los residuos de la presecuencia no afectan el proceso de importación y translocación de esta enzima. Se sabe que se necesita la fuerza protomotriz para la entrada del precursor a la mitocondria (de Vries y col., 1992). Los resultados sobre la importación de la NADH-DH interna sugieren que es muy similar a la de la subunidad β de la ATP sintasa, en donde usa un receptor para introducirse a la mitocondria (Böhni, 1983), pero aún queda por establecerse cómo y cuándo se inserta el grupo FAD.

Como miembro de la familia NADH-DH de clase 2, tiene como grupo prostético al FAD unido no covalentemente y no presenta centros hierro azufre (de Vries y col., 1992). La NADH-DH interna no bombea protones, por lo que la transferencia de electrones del NADH a la poza de quinonas no contribuye a la generación de la fuerza protomotriz a través de la membrana interna mitocondrial. Esto tiene interesantes consecuencias energéticas para la célula. Por ejemplo, el cociente P/O de las mitocondrias de *S. cerevisiae* es de uno (Venduyn, 1992).

Estudios cinéticos

La enzima es específica para el NADH, ya que la actividad con otros sustratos como el NADPH o el desamino-NADH es 250 veces menor que con NADH. La K_m para el NADH es de 31 μM (de Vries y Grivell, 1988). *In vitro*, la NADH-DH interna puede usar varios aceptores de electrones, como la UQ₁, la UQ₂, la UQ₆, el DCPIP, el ferricianuro y la decilquinona entre otros. La enzima es inhibida por flavona ($K_{50} = 95\mu\text{M}$), pero es insensible a los típicos inhibidores del complejo I, como la rotenona y la piericidina. En partículas submitocondriales, la actividad de la NADH-DH interna con UQ₂ es cinco veces más alta que con su aceptor endógeno de electrones, la UQ₆. Con esta última como sustrato, la enzima tiene un amplio intervalo de pH óptimo, donde se observa una meseta en el intervalo de 4.5-9.5 (de Vries y Grivell, 1988).

Características de las NADH-DHs externas

S. cerevisiae tiene dos genes que codifican para las NADH-DHs externas, *nde1* y *nde2* (Luttik y col.,1998 y Curtis y McAlister-Henn, 1998). Ambos genes fueron identificados por su homología con el gen *ndi1*. La secuencia de aminoácidos de NDE1 tiene un 48% de identidad con NDI1 y la secuencia de NDE2 tiene un 46% de identidad con NDI1. La identidad entre NDE1 y NDE2 es de 62%. El alineamiento de las secuencias de estas tres proteínas reveló que NDE1 y NDE2 poseen una extensión en la región amino terminal que está ausente en NDI1. Estas extensiones probablemente son responsables del anclaje a la mitocondria. Las propiedades cinéticas de las NADH-DHs externas no han sido estudiadas. En las mitocondrias sonicadas se determinó una K_m para el NADH de 30 μ M, semejante al valor de la K_m para la Ndi1 purificada.

Estudios con levaduras mutantes $\Delta ndi1$

Las mitocondrias aisladas de las levaduras de *S. cerevisiae* sin el gen *ndi1* ($\Delta ndi1$) no oxidan el NADH de la matriz mitocondrial. Esto confirmó que la Ndi1 es una deshidrogenasa de localización interna (Marres y col.,1991). El gen *ndi1* está sujeto a represión por glucosa. Cuando la levadura se cultiva con fuentes de carbono no fermentables, como el lactato o el acetato, la levadura induce una mayor cantidad de la NADH-DH interna que cuando la fuente de carbono es glucosa. Con glucosa, galactosa o etanol como única fuente de carbono, las mutantes $\Delta ndi1$ presentan un crecimiento similar al de la cepa silvestre, a diferencia de las cepas cultivadas en acetato o en piruvato, cuyo crecimiento está completamente ausente, por lo que la deshidrogenasa es esencial cuando se cultiva con sustratos respiratorios.

Expresión heteróloga del gen *ndi1*

Se ha propuesto que el gen *ndi1* de *S. cerevisiae* es un buen candidato en la terapia génica de pacientes con deficiencia del complejo I. Esta propuesta está basada en dos consideraciones. La primera y más importante, es que la NDI1 es

mucho más simple que el complejo I. La segunda es que NDI1 cataliza la transferencia simultánea de dos electrones, a diferencia del complejo I, el cual cataliza la reacción de un solo electrón. Esto reduce el riesgo de la producción de radicales libres.

El gen *ndi1* de *S. cerevisiae* se expresó en *E. coli* (Kitajima-Ithara y Yagi 1998). En las células transformadas, NDI1 actúa como una parte integral de la cadena respiratoria y fue evidenciada su localización en la membrana e inhibida la actividad de NADH oxidasa por flavona (inhibición parcial). Por otra parte, la expresión heteróloga del gen *ndi1* de *S. cerevisiae* en los fibroblastos de hamster deficientes en el complejo I restablece la oxidación del NADH en la matriz mitocondrial. Esta actividad no fue inhibida por rotenona, pero sí por flavona, inhibidor específico de la NADH-DH interna (Seo y col., 1998). La expresión de *ndi1* también restableció la capacidad de las células de hamster deficientes en el complejo I para crecer en galactosa, para lo cual se requiere la cadena respiratoria. Recientemente, *ndi1* se expresó en células de riñón humano (Seo y col., 1999). Las células transfectadas crecieron en un medio en presencia de rotenona y de glucosa 0.6 mM, o de rotenona, glucosa 0.6 mM y galactosa 5 mM, lo que indica que también en estas células la proteína fue funcional. Estos estudios de expresión heteróloga demuestran que NDI1 puede funcionar en varios tipos de células, desde las bacterias hasta las células de mamífero. Esto apoya que el gen *ndi1* de *S. cerevisiae* es un buen candidato para la terapia génica de pacientes con deficiencia en el complejo I.

Estudios con levaduras mutantes $\Delta nde1$ y $\Delta nde2$

Se encontró que las mitocondrias aisladas de las levaduras que carecen de los genes *nde1* y *nde2* no oxidan el NADH exógeno. En condiciones de cultivo con sustrato respiratorio, con una concentración de glucosa limitante, la supresión del gen *nde2* no produce un decremento importante en la velocidad de oxidación del NADH exógeno. En contraste, la supresión del gen *nde1* causa una disminución importante de la velocidad de oxidación del NADH en las mitocondrias. Esto sugirió que el papel fisiológico de *nde1* es mucho más importante que el de *nde2*,

al menos durante el crecimiento respiratorio con glucosa o etanol (Luttik y col., 1998 y Small y col., 1998).

Las NADH deshidrogenasas de plantas

Las mitocondrias de la mayoría de las plantas poseen la capacidad de oxidar al NADH y al NADPH por deshidrogenasas localizadas en la superficie externa de la membrana interna mitocondrial (Cook-Johnson y col., 1999 y Kromer y col., 1992). La NADH deshidrogenasa externa dona los electrones del NADH al complejo III vía la poza de quinona. La respiración en presencia de NADH externo es insensible a la rotenona (y a otros inhibidores del complejo I), es sensible a la antimicina y al mixotiazol (inhibidores del complejo III), y las mitocondrias tienen una relación ADP/O comparable al observado con el succinato (Horne y col., 2001). Aunque algunos flavonoides inhiben la oxidación del NADH externo, ninguno es específico para estas deshidrogenasas; adicionalmente, en algunos casos desacoplan la fosforilación oxidativa.

En las mitocondrias de plantas la oxidación del NADH exógeno es estimulada por diferentes cationes y tiene un requerimiento específico de concentraciones micromolares de calcio. La oxidación del NADH puede ser inhibida por quelantes como el EDTA, EGTA y el citrato.

Las mitocondrias de plantas también oxidan al NADPH, mostrando un comportamiento frente a los inhibidores y una relación ADP/O similar al del NADH externo. Sin embargo, la oxidación del NADH y del NADPH difieren con respecto a la sensibilidad a los quelantes y al mersalyl, lo cual sugiere la presencia de dos separadas deshidrogenasas, ambas localizadas en la superficie externa de la membrana interna.

Papel fisiológico de las NADH deshidrogenasas de la clase 2

En los organismos que tienen complejo I y que además presentan otra NADH-DH interna, como *E. coli* o *Paracoccus denitrificans*, el posible papel de la deshidrogenasa alterna sería importante en situaciones de baja fuente de carbono o bien cuando hay una cantidad muy baja de hierro en el medio, ya que en estas

condiciones no hay síntesis del complejo I y la función la realizaría la NADH-DH interna. En otros hongos semejantes a *N. crassa*, en la levadura *Candida utilis* y en las plantas, hay evidencias de que las mitocondrias oxidan el NADH en la matriz y en el citoplasma y esta oxidación es insensible a rotenona, lo que sugiere la presencia de las NADH-DHs externas e internas de la clase 2. Otro dato interesante es que estos hongos, dependiendo del estado de crecimiento, presentan al complejo I o a la NADH-DH de la clase 2. En la fase logarítmica de crecimiento tienen actividad de NADH-DH insensible a rotenona y la formación parcial de los centros hierro y azufre del complejo I, y cuando está en la fase estacionaria presentan una actividad de NADH deshidrogenasa que se inhibe con rotenona (Cobley y col., 1975). Además, la secuencia de *N. crassa* predice un dominio de unión a calcio, que es también identificado en una NADH-DH externa de papa, sugiriendo que el calcio puede tener un papel regulador en ambas proteínas. Cuando se cultivó a *N. crassa* en medios con concentraciones limitantes de hierro, se observó un decremento en la concentración de los citocromos mitocondriales, con la pérdida del sitio I de fosforilación e insensibilidad a la rotenona y a la piericidina (Cobley y col., 1975). Estos efectos fueron revertidos al incubar las células con FeSO_4 en ausencia de una fuente adicional de carbono (Cobley y col., 1975).

En el caso de algunas bacterias y de las levaduras que carecen del complejo I, como *Bacillus subtilis* y *S. cerevisiae*, la actividad de la deshidrogenasa interna es esencial cuando se cultivan en sustratos respiratorios (Marres y col., 1981).

En las NADH-DH externas, el papel fisiológico ha sido poco caracterizado. En *S. cerevisiae* participan, junto con otros sistemas (la lanzadera del glicerol 3 fosfato, la lanzadera de etanol-acetaldehído y la lanzadera de piruvato-malato), en la oxidación del NADH citosólico. Mediante el uso de mutantes se evaluó que la NDE1 tiene un papel importante en la oxidación del NADH citosólico, mientras que no es evidente la participación de la proteína NDE2 (Luttik y col., 1998 y Small y col., 1998). Es posible que una de las NADH-DH externa emplee NADPH en vez de NADH como sustrato. Esto se apoya en reportes sobre la oxidación del NADPH en partículas submitocondriales de *S. cerevisiae* (Djavadi, 1980). Además, se ha

encontrado que las mitocondrias de otras levaduras, como *S. carlsbergensis* y *Torulopsis utilis*, oxidan al NADPH (Djavadi, 1980).

Es muy poco lo que se conoce acerca del papel fisiológico de las NADH deshidrogenasas internas de las mitocondrias de plantas. Éstas tampoco contribuyen en la fuerza protonmotriz y pueden liberar energía en forma de calor. Las plantas termogénicas utilizan esta liberación de calor para propósitos reproductivos (Cook-Johnson y col., 1999). Se ha sugerido también que estas enzimas participan en la respuesta al estrés. En los tejidos dañados por el frío o en condiciones limitantes de nutrientes hay un incremento en la actividad de las NADH deshidrogenasas alternas (Rychter, 1992). También se encontró inducción de las NADH-DHs durante el envejecimiento de las plantas (Day y col., 1986). La razón de la respuesta de esta proteína a varios tratamientos no es clara; sin embargo, esto podría incrementar la oxidación del NADH y actuar como un mecanismo compensatorio para una cadena de transporte que está muy comprometida.

En la tabla 2 se listan las NADH-DHs de la clase 2 que han sido aisladas de diferentes fuentes y algunas de sus propiedades estructurales y cinéticas.

Tabla 2
Características de las NADH-DH aisladas de varios organismos

Organismo	P.M. (kDa)	Grupo Prostético	Estado de Agregación	Parámetros Cinéticos $K_{mapp}^1 V_{max}^2$	Mec. cinético	Referencia
<i>Bacillus subtilis</i>	63	FAD	-	Difeniltretazolio =60 23.5		(Bergsma, 1982)
<i>Bacillus caldotenax</i>	44	FAD	-	DCPIP= 8 50 Mena=60 600 Ferricianuro=420 3 4	Ping- Pong	(Kawada, 1981)
<i>Bacillus YN1</i>	65	FAD	Dímero	$K_{NADH}=42$ 182 $K_{DCIP}=61$ $K_{NADH}=78$ NAD $K_{DCIF}=127$ NAD		(Xu, 1985)
<i>Escherichia coli</i>	47	FAD	-	$Q_1=5.9$ 106 $Q_2=2.3$ 190 DB=18.7 191 DCPIP=20 19.5		(Björöf, 2000)
<i>Bacillus stearothermoph ilus</i>	43	-	Monómero	-		(Mains, 1980)
<i>Thermus thermophilus</i>	50	FAD	Monómero	$K_{NADH}=12$		(Yagi, 1988)
<i>Thermus aquaticus</i>	50	FMN	-	-		(Walsh, 1983)
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	50	-	-	-		(Wakao, 1987)
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	-	FAD	-	$K_{NADH}=47$ 30	Ping- pong	(Imagawa, 1978)
<i>Halobacterium cutirubrum</i>	-	FAD	-	$K_{NADH}=25.4$ $K_{DCPIP}=30.0$ $K_{NADH}=9.8$	Ordenado bi-bi	(Hochstein 1975)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

<i>Sacharomyces cerevisiae</i> (mitocondrias)	53	FAD	-	$K_{NADH}=31$	Ping-Pong	(De Vries 1988) (Velázquez 2001)
<i>Arum maculatum</i> (mitocondrias externas coliflor)	78 65	FAD	-	mitocondrias $UQ_1=44$ 11.1 DCPIP=100 3.3 Enzima pura $UQ_1=18$ DCPIP= 150		(Cottingham 1984)
<i>Beta vulgaris</i> (mitocondrias betabel)	32 40-55 43*	FAD	-	-	*Ping-Pong	(Menz, 1996)
<i>Yarrowia lipolytica</i> (mitocondrias)	65.8 ext.	FAD	-	$K_{NADH}=15$ 79		(Kerscher 1999)
<i>Solanum tuberosum</i> (mitocondrias papa)	55 int. 65 ext.	FAD	-	-		(Rasmusson 1999)
<i>Zymomonas mobilis</i>			-	$K_{NADH}=66$		(Kim, 1995)
<i>Synechocystis</i>	23 kDa	FAD	Homodímero	$K_{NADH}=48$ 1200 $K_{NADPH}=12$ 940		(Matsuo, 1998)

¹(μM) ²($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)

JUSTIFICACIÓN

La NADH-DH interna tiene varias características que la hacen atractiva. En primer lugar, desde un punto de vista fisiológico, oxida al NADH que se produce en el ciclo de Krebs y cede los electrones a la coenzima Q. Con esto, la oxidación del NADH en la mitocondria de la levadura *S. cerevisiae* se acopla a la síntesis de ATP. La importancia de esta enzima radica en que las mitocondrias de esta levadura carecen de complejo I, por lo que dependiendo de la fuente de carbono,

<i>Sacharomyces cerevisiae</i> (mitocondrias)	53	FAD	-	$K_{NADH}=31$	Ping-Pong	(De Vries 1988) (Velázquez 2001)
<i>Arum maculatum</i> (mitocondrias externas coliflor)	78 65	FAD	-	mitocondrias $UQ_1=44$ 11.1 DCPIP=100 3.3 Enzima pura $UQ_1=18$ DCPIP= 150		(Cottingham 1984)
<i>Beta vulgaris</i> (mitocondrias betabel)	32 40-55 43*	FAD	-	-	*Ping-Pong	(Menz, 1996)
<i>Yarrowia lipolytica</i> (mitocondrias)	65.8 ext.	FAD	-	$K_{NADH}=15$ 79		(Kerscher 1999)
<i>Solanum tuberosum</i> (mitocondrias papa)	55 int. 65 ext.	FAD	-	-		(Rasmusson 1999)
<i>Zymomonas mobilis</i>			-	$K_{NADH}=66$		(Kim, 1995)
<i>Synechocystis</i>	23 kDa	FAD	Homodímero	$K_{NADH}=48$ 1200 $K_{NADPH}=12$ 940		(Matsuo, 1998)

¹(μ M) ²(μ mol min⁻¹ mg⁻¹)

JUSTIFICACIÓN

La NADH-DH interna tiene varias características que la hacen atractiva. En primer lugar, desde un punto de vista fisiológico, oxida al NADH que se produce en el ciclo de Krebs y cede los electrones a la coenzima Q. Con esto, la oxidación del NADH en la mitocondria de la levadura *S. cerevisiae* se acopla a la síntesis de ATP. La importancia de esta enzima radica en que las mitocondrias de esta levadura carecen de complejo I, por lo que dependiendo de la fuente de carbono,

la enzima resulta esencial para el crecimiento. En segundo lugar, desde un punto de vista estructural, la enzima tiene varias propiedades interesantes: a) es una proteína asociada a la membrana que aparentemente no presenta cruces transmembranales; b) carece de cisteínas y tiene solamente 4 triptofanos, uno de ellos localizado en la porción amino terminal y los tres restantes en el carboxilo terminal; c) tiene homología con dos deshidrogenasas de bacteria.

La caracterización se inició con el estudio cinético ya que este conocimiento es fundamental para posteriores estudios estructurales.

OBJETIVO GENERAL

Determinar las propiedades cinéticas de la NADH deshidrogenasa interna de la mitocondria de *Saccharomyces cerevisiae*, caracterizar el estado de agregación funcional y obtener su posible estructura secundaria y terciaria mediante programas de predicción.

OBJETIVOS PARTICULARES

La purificación de la NADH-DH interna de las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*, siguiendo la metodología reportada por de Vries y Grivell (1988).

La obtención del mecanismo cinético y de las constantes cinéticas mediante los patrones de velocidad inicial y el empleo de inhibidores sin salida

La obtención de curvas de estabilidad a los diferentes valores de pH.

Estudio de la actividad de la NADH deshidrogenasa a diferentes valores de pH para obtener los valores de pK_a de los grupos implicados en la unión del sustrato y en la catálisis.

La construcción de un modelo de la estructura secundaria y terciaria de la proteína utilizando programas de predicción de estructura secundaria y de modelaje por homología.

La obtención de la masa molecular mediante electroforesis nativa, para conocer el estado de agregación de la proteína.

MATERIALES

La resina de intercambio aniónico DEAE Bio-gel fue adquirida de Bio-Rad. La sefarosa azul CL-6B fue comprada en Pharmacia. La nicotinamida adenín dinucleótido reducido (NADH), el 2,6 diclorofenol indofenol (DCPIP), la adenosina 5' monofosfato (AMP), la 2-fenil-4H-1-benzopiran-4-ona (flavona), el 2-*N*-hidroxietilpiperazina-*N'*-2 ácido etanosulfónico (HEPES), 2-*N*-morfolino-ácido etanosulfónico (MES), 3-*N*- morfolino propanosulfónico (MOPS) y el tris-hidroximetil- aminometano (TRIS-base) fueron de Sigma Chemical Co. El Triton X-100 reducido fue de Aldrich Chemical Co., y el Triton X-100 grado proteínas fue adquirido en Calbiochem. Las otras sustancias químicas utilizadas fueron de grado analítico.

MÉTODOS

Purificación de la enzima. La levadura *S. cerevisiae* que se usó en este trabajo fue aislada de una cepa de la levadura comercial Azteca. Las levaduras fueron sembradas en placas de medio sólido y cultivadas en el medio líquido descrito por de Kloet y col. (1961), con glucosa y lactato como fuente de carbono. Las mitocondrias se obtuvieron siguiendo la metodología reportada por Guérin y col. (1979). Éstas se almacenaron a -70°C . Las mitocondrias se resuspendieron en el amortiguador A (Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, pH 7.6) a una concentración final de 15 mg/ml, se sonicaron a baja potencia (4 pulsos de 10 seg) y se centrifugaron a 5000g por 20 minutos. El paquete mitocondrial se llevó a una concentración de 15 mg/ml en el amortiguador A añadiendo PMSF 1 mM y NaCl 200 mM. Las proteínas se solubilizaron con 0.18% de Triton X-100 por 15 minutos, en agitación. La suspensión se centrifugó a 5000g por 40 minutos y el sobrenadante se dializó toda la noche contra 20 volúmenes del amortiguador A con 0.02% de Triton X-100. El dializado se colocó en una columna de DEAE-Biogel y se lavó con 5 volúmenes de la columna con el amortiguador A más 0.05% de Triton X-100. La proteína se eluyó con un gradiente de NaCl de 0 a 250 mM. Las fracciones con actividad se dializaron contra 20 volúmenes del amortiguador A para disminuir la concentración de sal. El dializado se mezcló con la sefarosa azul CL-6B previamente equilibrada

con MOPS-KOH 20 mM, EDTA 1 mM, 0.05% de Triton X-100 de tal manera que la actividad del sobrenadante disminuye al 90% y la resina se cargó a una columna y la enzima se desprendió con un gradiente lineal de NaCl de 0.1-1 M. Las fracciones con actividad se colectaron y se almacenaron a -70°C . En estas condiciones la actividad enzimática se mantiene por varios meses. La pureza de la fracción con actividad se verificó por electroforesis en condiciones desnaturalizantes (ver en resultados).

Determinación de la actividad enzimática. La actividad de la NADH deshidrogenasa se determinó espectrofotométricamente, con un aparato de arreglo de diodos Hewlett Packard modelo 8453, midiendo la oxidación del NADH a 340 nm o la reducción del DCPIP a 600 nm. La actividad específica se calculó con las siguientes absorptividades molares: $6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el NADH y $21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el DCPIP. La mezcla de reacción contenía MOPS-KOH 20 mM, EDTA 1 mM y KCl 200 mM en un volumen final de 2 ml. La reacción se inició con la adición de la enzima y las velocidades iniciales se obtuvieron a partir de la pendiente de los primeros 10-20 segundos del cambio de absorbencia contra el tiempo.

Actividad enzimática en presencia de inhibidores. En un medio con el amortiguador MOPS-KOH 20 mM, pH 7.0, se colocaron ambos sustratos, uno a concentración fija y otro variable, y concentraciones variables del inhibidor (el NAD^{+} , el AMP o la flavona). La reacción se inició añadiendo la enzima. La solución concentrada de flavona se hizo con DMSO. Hasta una concentración de 0.1% no hay un efecto del DMSO en la reacción.

Determinación de proteína. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry, 1951 o de Bradford, 1976. En los experimentos con diferentes detergentes, la concentración de proteína se determinó mediante la absorbencia a 280 nm en un medio que contenía 0.1% de SDS.

Análisis cinético. Las velocidades iniciales se obtuvieron a partir del cambio de absorbancia contra tiempo, utilizando el programa Excel. Los resultados se graficaron con el programa Sigma Plot y el ajuste global se realizó con el programa Origin versión 4.1. Las ecuaciones empleadas para el ajuste de los datos se obtuvieron de Segel, 1993.

Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Durante el proceso de purificación, en cada uno de los pasos se determinó la proteína, la actividad de la enzima y la composición polipeptídica mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes, de acuerdo con lo reportado por Laemmli, 1970.

Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas. Se empleó el sistema amortiguador de MOPS-histidina, que mantiene el pH cercano a 7.0 durante la corrida a 4° C. Se hicieron dos tipos de geles: con una concentración constante de acrilamida y con un gradiente de acrilamida de (3-15%), ambos con una concentración de Tritón X-100 de 0.18% (McLellan, 1982).

Electroforesis nativa en geles azules. Se ha usado para aislar complejos proteicos en membranas (Schägger, 1991). Este sistema trabaja a pH cercano a 7.5. La preparación mitocondrial fue solubilizada con n-dodecil β -D-maltósido al 1% y 0.75 M de ácido aminocapróico. Después de 30 minutos se centrifugó a 100,000g y al sobrenadante se le añadió el azul Serva G. El colorante sirve para darle a la proteína carga y el ácido caprónico para solubilizar a las proteínas de membrana. La electroforesis fue corrida en frío a 100 V hasta el inicio del gel separador se aumentó a 200 V. La corrida fue de aproximadamente de 6 h. Las bandas de proteína fueron teñidas durante la corrida.

Ensayo de la actividad en geles nativos. Los geles se lavaron con 50 ml de TRIS-HCl 0.05 M a pH 7.0 durante 1 h. a temperatura ambiente, se reemplazó el amortiguador y se añadió nuevo con 1 mM de NADH y 0.24 mM de MTT. La

reacción se lleva a cabo en la oscuridad y la aparición de las bandas ocurre en los primeros 15 minutos (Venugopal y Adiga 1980).

Estructura secundaria de la proteína. Mediante varios programas de predicción de estructura secundaria: Predator (Frishman y Argos, 1997), Phd.seq (Rost y Sander, 1994), Pssp.seq, Sspredic.seq, Nnsp.seq, Método de Gibrat (Gibrat y col.,1987), Método de Levin (Levin y col., 1986), Método de DPM (Deléage y Roux, 1987) SOPMA predict (Geourjon y Deleage, 1995) se determinó la estructura secundaria consenso de la enzima (ver resultados).

Modelaje de la estructura terciaria. La tripanotiol reductasa de *Trypanosoma cruzi* (1BZL A) y la dihidrolipoamida deshidrogenasa de *Pseudomonas putida* (1LVL) se escogieron para predecir la estructura terciaria de la NADH-DH interna. Primero se utilizó el programa Blast (Altschul y col., 1997) para el alineamiento de las secuencias y luego el Swiss-Model para realizar el modelaje por homología (Peitsch,1995 y Guex, 1999). El resultado del modelaje fue visualizado con el programa Rasmol.

RESULTADOS

Purificación de la NADH-deshidrogenasa. No obstante contar con una metodología que describe la purificación de la NADH-DH interna, en nuestras manos se logró sólo una purificación parcial de la enzima. Una de las principales dificultades fue la baja abundancia de la NADH-DH interna en la mitocondria, fue menos del 0.1% del total de las proteínas. Por otro lado, la cepa de *S. cerevisiae* con la que se trabajó rinde un promedio de 3 mg de mitocondrias por gramo de levadura, mientras que el grupo que reportó la purificación (de Vries y Grivell, 1988) usando una cepa comercial de *S. cerevisiae*, obtuvo un rendimiento de 27 mg por gramo de levadura. Este último valor es nueve veces más grande que el nuestro y que el rendimiento reportado para otras especies de levaduras (Guérin y col., 1979).

La presencia de por lo menos dos NADH-DHs externas, con propiedades similares a las de la NADH-DH interna, añaden complicaciones al momento de seguir a la proteína por actividad. La sonicación a baja potencia elimina a las proteínas solubles y libera parcialmente a las NADH-DHs externas. La solubilización con el detergente Tritón X-100 a bajas concentraciones (0.18%) y con alta fuerza iónica (200 mM de NaCl) liberó sólo un 30% de la actividad y en el precipitado quedó una fracción de enzimas unidas a la membrana. Este patrón persistió al incrementar la concentración de detergente o la fuerza iónica. Se intentó sustituir al Tritón X-100 por otro detergente, ya que debido a su baja CMC, éste no puede ser dializado y cuando se concentró la muestra se incrementó su concentración, la cual no se redujo usando extractil-Gel o perlas de Bio-Rad (Holloway, 1973, y Lévy y col., 1990). Otros detergentes como el CHAPS, el Zwittergen 3-14 y el DOC solubilizaron a la proteína a concentraciones de 0.5% (p/p). Un 70% de la proteína se liberó al sobrenadante con los dos primeros detergentes, mientras que el DOC fue menos efectivo. Sin embargo, esta mayor solubilización de la NADH-DH interna se acompañó de una mayor contaminación por otras proteínas, entre las cuales están las NADH-DHs externas, que co-purifican con la NADH-DH interna.

La NADH-DH interna solubilizada con Tritón X-100 se dializó para eliminar el exceso de sal y se incorporó a una columna de intercambio aniónico. La enzima

se eluyó con un gradiente de NaCl, a una concentración de 100-150 mM. A pesar de que el punto isoeléctrico teórico para esta enzima es de 9.67, se retuvo en la columna de intercambio aniónico (a pH de 7.6 la proteína debería tener carga positiva y salir en el lavado). Cuando se usó un intercambiador catiónico, la proteína también se retuvo en la columna. Estos resultados sugieren que el Tritón X-100 pudiera estar formando micelas ($M_r = 90,000$) que incorporan a otras proteínas junto con la enzima, y la mezcla de estas proteínas es la que finalmente determinan la unión a la resina. Esta interpretación puede apoyarse en el reporte reciente de Grandier-Vazeille y col., (2001), en donde se demostró la presencia de complejos supramoleculares formados por varias deshidrogenasas en la membrana interna mitocondrial de *S. cerevisiae*, lo cual sugiere que la proteína con baja concentración de detergente es capaz de liberarse de la membrana junto con otras proteínas de ese gran complejo.

Las fracciones con actividad fueron aplicadas en "batch" a la sefarosa azul. Se determinó en cada caso la cantidad de resina que une al 90% de la actividad. La proteína se unió bien a la resina y se logró una buena separación de otras proteínas; sin embargo, se recuperó solamente el 10% de la actividad con un gradiente de NaCl. Un gradiente de NADH no liberó a la proteína de la resina. Esta pérdida en la actividad también se presentó en la purificación reportada; sin embargo la recuperación fue del 45% al salir de la resina (de Vries y Grivell, 1988). Esta pérdida de la actividad se pudo deber a alguna de las siguientes posibilidades: a) a la inactivación de la enzima por la pérdida de su cofactor, el FAD; b) a que la sefarosa azul ocasione un cambio conformacional irreversible de la enzima que deterioró su actividad catalítica o c) a que se haya quedado retenida en la columna, ya que no hubo recuperación completa de la proteína. El empleo de otras resinas de afinidad como la adenosina 5' monofosfato-agarosa y la nicotinamida adenina dinucleótido-agarosa, no dieron resultados positivos, ya que la enzima se unió débilmente.

En la figura 6 A y 6 B se muestran los perfiles de actividad y concentración de proteína en la cromatografía con DEAE-Biogel y con sefarosa azul CL-40, respectivamente. En la cromatografía de intercambio iónico se observan dos picos de actividad, el primero y de mayor tamaño sale con una baja concentración de sal y con poca proteína contaminante, mientras que el segundo pico sale con gran cantidad de proteína asociada (Fig. 6A). Las fracciones con actividad del primer pico se utilizaron para la cromatografía de afinidad, y la proteína se liberó con un gradiente de NaCl (Fig. 6 B). La proteína salió en un pico ancho a todo lo largo del gradiente de NaCl y se colectaron las fracciones con actividad. Los resultados de la purificación se encuentran resumidos en la tabla 3.

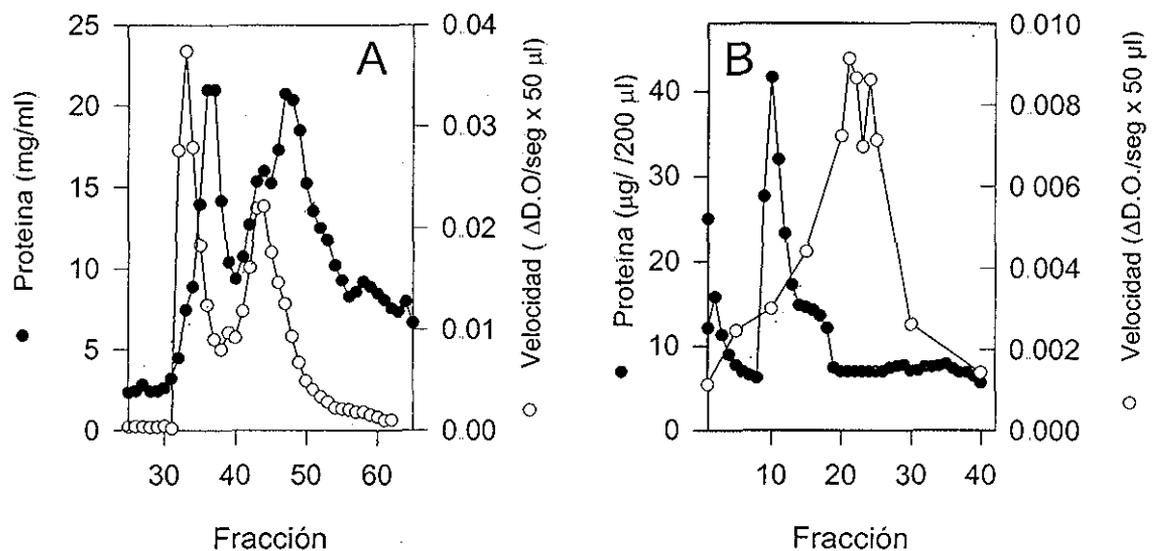


Figura 6. A Cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-Biogel). B Cromatografía de afinidad (sefarosa azul CL-6B) Las fracciones colectadas se les determinó proteína (●) y actividad (○). El gradiente de NaCl en la cromatografía de intercambio aniónico fue de 0-250 mM y con la resina de afinidad de 100 mM a 1M (----)

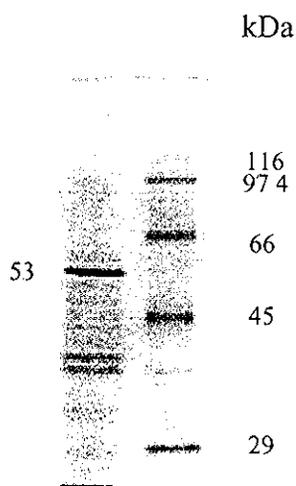
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 3. Purificación de la NADH:Q₆ oxidorreductasa de *S. cerevisiae*

Fracción	Proteína (mg)	Actividad total	Actividad específica	Purificación	Rendimiento
Mitocondrias	765.0	412.5	0.54	1.0	100
SN ₁	205.7	132.0	0.64	1.1	
P ₁	435.0	367.1	0.84	1.5	89
P ₁ tratado	434.2	559.0	1.28	2.4	135
SN ₂	83.8	132.0	1.57	2.9	32
DEAE-Biogel	12.2	119.0	9.75	18.1	29
Sefarosa azul	0.66	14.9	22.60	41.9	3.6

* $\mu\text{mol NADH mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ SN₁=sobrenadante 1, P₁=precipitado 1, P₁ tratado= solubilizado con detergente, SN₂= sobrenadante 2.

En la figura 7 se muestra un gel de poliacrilamida, tipo Laemmli, en condiciones desnaturalizantes y con tinción con plata, de la fracción que sale de la resina azul.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 7. Gel de poliacrilamida tipo Laemmli en condiciones desnaturalizantes y teñido con plata. Composición polipeptídica de la preparación parcialmente purificada de la NADH-DH interna. En el carril, 1 está la preparación que salió de la columna sefarosa azul (1 μg de proteína) la cual consiste en una banda mayoritaria de 53 kDa y algunas bandas de proteínas de bajo peso molecular. En el carril 2, están los marcadores de peso molecular.

Patrones de la velocidad inicial. La obtención de la mayoría de los parámetros cinéticos se realizó con la enzima que salió de la resina azul, mientras que en los experimentos de pH se usó la preparación menos pura que salió de la columna de DEAE-biogel, ya que no se logró disminuir la pérdida de la actividad en la resina azul.

La enzima (1.5 µg/ml) fue incubada a pH 7.0 y a 25°C con diferentes concentraciones de NADH y de DCPIP. Las ventajas de usar DCPIP son: su solubilidad, una elevada absorptividad molar y la desaparición de color en la forma reducida. En la figura 8 A y 8 B se muestra la dependencia del inverso de la velocidad con respecto al recíproco de la concentración de sustrato.

En la gráfica directa se encontró que la enzima sigue una cinética Michaeliana con respecto a la concentración de sustratos y en la gráfica de la doble recíproca se observaron líneas paralelas a bajas concentraciones de sustrato. Con altas concentraciones, los puntos se desplazan hacia arriba, indicando que existe una inhibición por sustrato. Cuando la concentración del sustrato fijo se incrementó, la inhibición por el sustrato desaparece y la enzima sigue una cinética de Michaelis-Menten. La gráfica del recíproco de la V_{max} en contra del recíproco de la concentración del sustrato sigue una relación lineal. Para el ajuste de los puntos se trabajó con la siguiente ecuación y se obtuvo el valor de las constantes cinéticas por medio de un análisis de regresión no lineal,

$$v = V_{max} * A * B / [K_{NADH} * B (1 + B / K_{i(DCPIP)}) + K_{DCPIP} * A (1 + A / K_{i(NADH)}) + A * B] \quad [1]$$

La expresión matemática describe un mecanismo de tipo ping-pong bi-bi con inhibición por sustrato, en donde A es el NADH, B es el DCPIP, K_{NADH} y K_{DCPIP} son las constantes de Michaelis para el NADH y el DCPIP respectivamente, V_{max} la velocidad máxima, y la $K_{i(NADH)}$ y la $K_{i(DCPIP)}$ las constantes de inhibición para el NADH y el DCPIP respectivamente. Como se muestra en las figuras 8 A y 8 B, el modelo ajusta los datos razonablemente bien, de tal manera que hay una gran concordancia de los datos experimentales con la curva teórica, lo cual se refleja en una pequeña desviación estándar asociada a los valores de las K_m y V_{max} (tabla

4). La enzima presenta una baja K_m para ambos sustratos ($K_{NADH} = 9.4 \pm 1.0 \mu M$ y $K_{DCPIP} = 6.2 \pm 0.8 \mu M$). Debido a las altas afinidades por los sustratos, la ventana para variar el sustrato en el intervalo de bajas concentraciones fue pequeño; además, a muy bajas concentraciones del sustrato fijo el efecto de la inhibición por sustrato fue más evidente. A pesar de estos factores, el error asociado a la determinación de la K_m fue pequeño. En contraste, las constantes de inhibición para ambos sustratos presentan desviaciones estándar altas (tabla 4), debido a que no se utilizaron en el estudio concentraciones por arriba de $50 \mu M$.

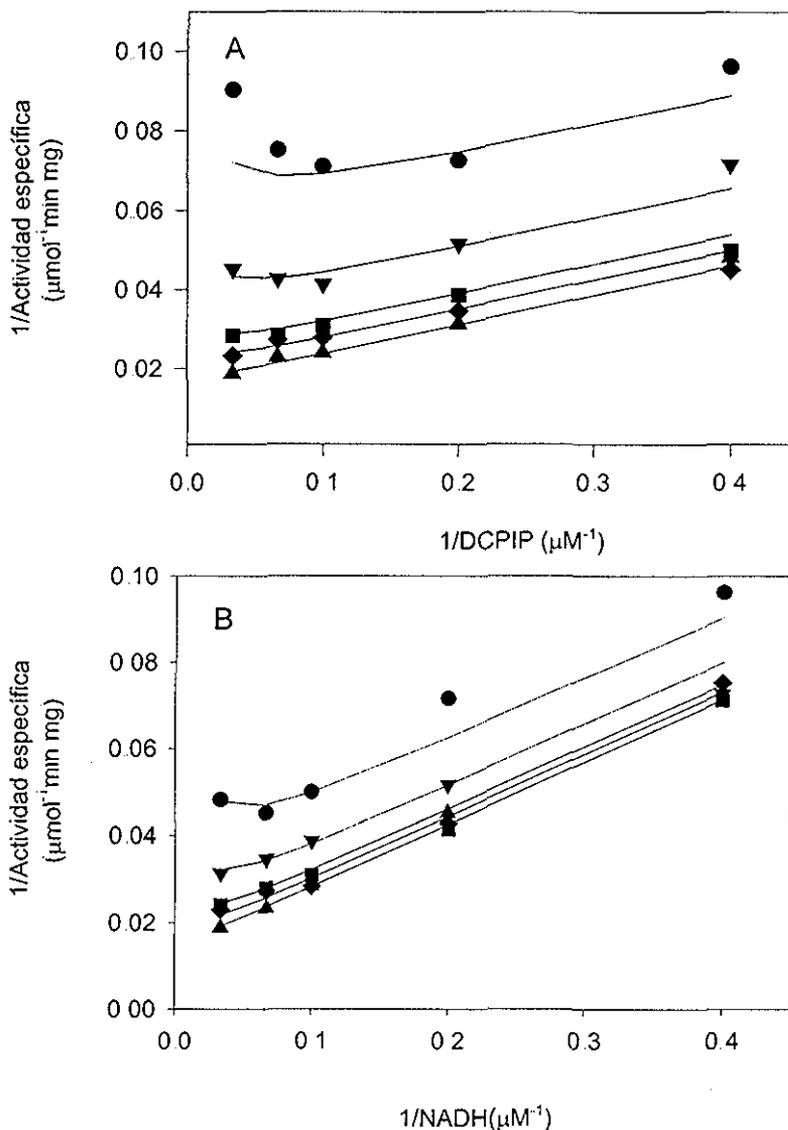


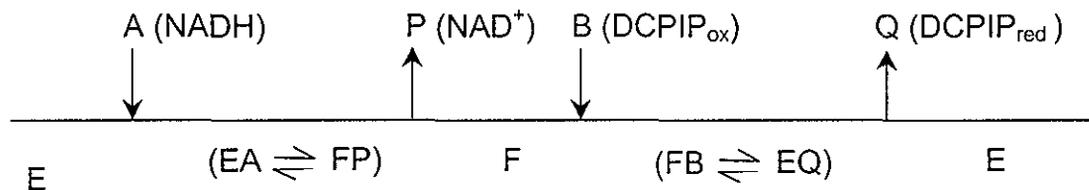
Figura 8. Efecto del NADH y del DCPIP sobre la velocidad inicial de la NADH-DH interna de la mitocondria de *S. cerevisiae*. La preparación enzimática ($1.5 \mu\text{g/ml}$) fue incubada en 20 mM de amortiguador MOPS-KOH, pH 7.0 como se describió en la sección anterior. A) Gráfica de doble recíprocos de la velocidad inicial contra diferentes concentraciones de NADH como sustrato variable. Las concentraciones fijas de DCPIP fueron las siguientes: ●2.5, ▼5, ■10, ◆15, ▲30 mM. B) Gráfica de doble recíprocos de la velocidad inicial con DCPIP como sustrato variable. Las concentraciones fijas de NADH fueron ●2.5, ▼5, ■10, ◆15 y ▲30 mM.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 4. Constantes cinéticas aparentes para la NADH-DH interna

Parámetros	Constantes cinéticas
V_{\max}	$83.6 \pm 4.6 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$
K_{NADH}	$9.4 \pm 1.0 \mu\text{M}$
K_{DCPIP}	$6.2 \pm 0.8 \mu\text{M}$
$K_{i(\text{NADH})}$	$52.5 \pm 28.8 \mu\text{M}$
$K_{i(\text{DCPIP-ox})}$	$115.2 \pm 70.3 \mu\text{M}$
$K_{i(\text{DCPIP-red})}$	$14.1 \pm 1.3 \mu\text{M}$

Efectos cinéticos de los inhibidores sin salida y de los productos. Aunque en la gráfica de dobles recíprocas se hayan obtenido líneas paralelas, lo que sugiere como muy posible que se trata de un mecanismo tipo ping-pong, el cual se muestra en el siguiente esquema:



deben tomarse en cuenta otros posibles mecanismos. Por ejemplo, en un mecanismo ordenado bi-bi, si la constante de disociación del primer sustrato es más pequeña que la constante de Michaelis (un primer sustrato "pegajoso"), se producirán líneas paralelas en los dobles recíprocos (Segel, 1993). Para discriminar entre estos dos mecanismos, se decidió estudiar la inhibición de la actividad enzimática por los productos o por inhibidores reversibles sin salida (anexo A). Estos análisis dan información adicional para la determinación del mecanismo cinético. Se inició con el uso de los productos de la reacción, el NAD^+ y el DCPIP reducido. El NAD^+ no inhibió la actividad de la enzima, incluso a concentraciones de 10 mM, mientras que fue difícil trabajar con el DCPIP reducido (datos que no se muestran). Por esto, se decidió estudiar la inhibición por AMP, el cual es un inhibidor reversible sin salida. A diferencia del NAD^+ y del DCPIP

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

reducido, el AMP se comportó como un inhibidor lineal competitivo respecto al NADH, ($K_i = 5.5 \pm 0.6$ mM, figura 9 A y tabla 5) y lineal acompetitivo con respecto al DCPIP oxidado ($K_i = 11.5 \pm 0.7$ mM, figura 9 B y tabla 5). Las gráficas del inverso de la V_{max} y de la V_{max}/K_m contra la concentración de AMP dan una línea recta, indicando una inhibición lineal. Estos patrones de inhibición ratifican que el mecanismo cinético de esta NADH-DH es de tipo ping-pong.

Para obtener la constante de inhibición del DCPIP reducido se analizó el curso temporal de la formación de producto y se analizaron los datos con la ecuación integrada del mecanismo de ping-pong (Boeker, 1984). Puesto que el NAD^+ no afectó la actividad de la enzima, la inhibición observada se asoció con el segundo producto, el DCPIP reducido. La enzima se incubó en presencia de diferentes concentraciones de NADH y de DCPIP oxidado y la reacción se siguió durante 56 segundos (Fig. 10). Por análisis de regresión no lineal, los datos se ajustaron a la ecuación integrada del mecanismo ping-pong, usando los programas de computación DNRP53 y AGIRE (Duggleby, 1984 y Duggleby y Wood, 1989). Para el análisis global de las velocidades iniciales se usó la ecuación del mecanismo ping-pong bi-bi sin inhibición por sustrato,

$$v = V_{max} * A * B / [K_{DCPIP} * A + K_{NADH} * B + A * B] \quad [2]$$

y se obtuvieron los siguientes valores: una K_{NADH} de 14.5 ± 1.7 μ M, una K_{DCPIP} de 9.6 ± 1.1 μ M y una V_{max} de 9.0 ± 0.7 μ M $mg^{-1} min^{-1}$. El análisis del curso temporal de la formación de producto dió esencialmente los mismos resultados: una K_{NADH} de 14.2 ± 0.4 μ M, una K_{DCPIP} de 9.1 ± 0.3 μ M, una V_{max} de 9.3 ± 0.3 μ M $min^{-1} mg^{-1}$, y una constante de inhibición del DCPIP reducido de 14.1 ± 1.3 μ M (tabla 4). Como se muestra en la figura 10, hay un buen ajuste entre los datos experimentales y las curvas teóricas. Esta aproximación nos permitió obtener la constante de inhibición por el segundo producto, el DCPIP reducido.

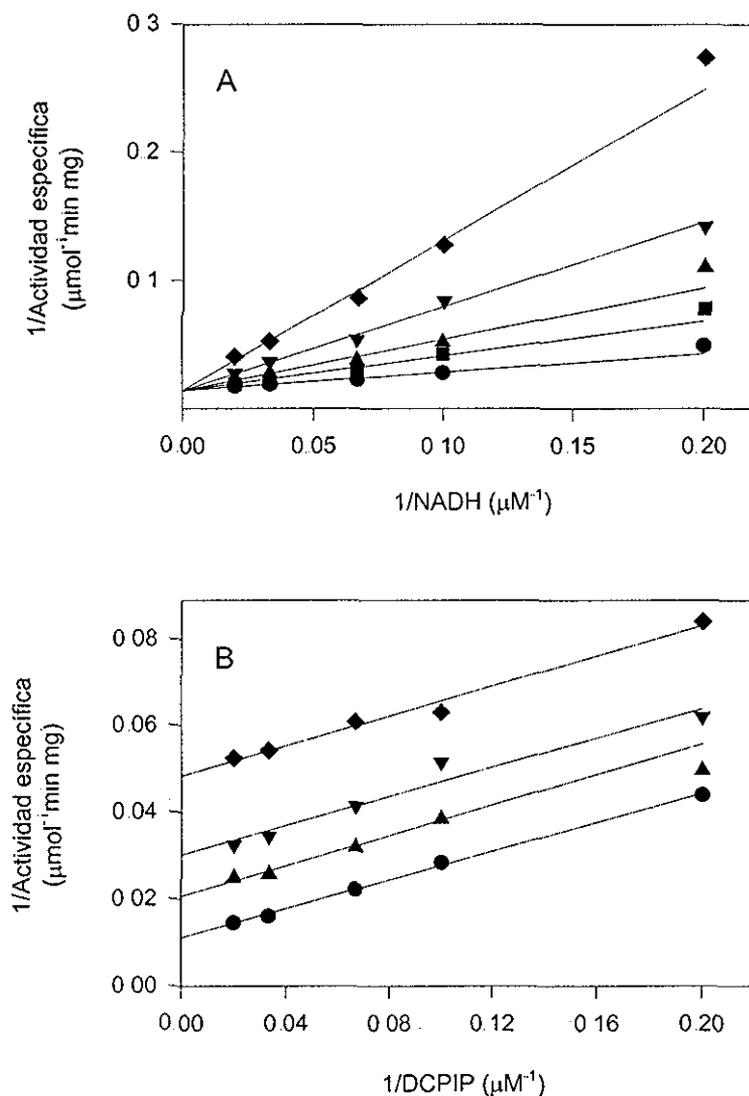


Figura 9. Inhibición de la NADH-DH por AMP a concentraciones variables de NADH o DCPIP. La preparación enzimática (1.5 $\mu\text{g/ml}$) fue incubada en 20 mM de amortiguador MOPS-KOH, pH 7.0, en presencia de concentraciones variables de AMP y NADH en una concentración fija de DCPIP (30 μM) o en presencia de concentraciones variables de AMP y DCPIP a una concentración fija de NADH (30 μM). Las concentraciones de NADH y DCPIP fueron 5, 10, 15, 30 y 50 μM y las concentraciones para el AMP fueron de \bullet 0, \blacksquare 5, \blacktriangle 10, \blacktriangledown 20; y \blacklozenge 40 mM. A) La gráfica de las dobles recíprocas de la velocidad inicial con el NADH como sustrato variable. B) La gráfica de las dobles recíprocas de la velocidad inicial con el DCPIP como sustrato variable.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

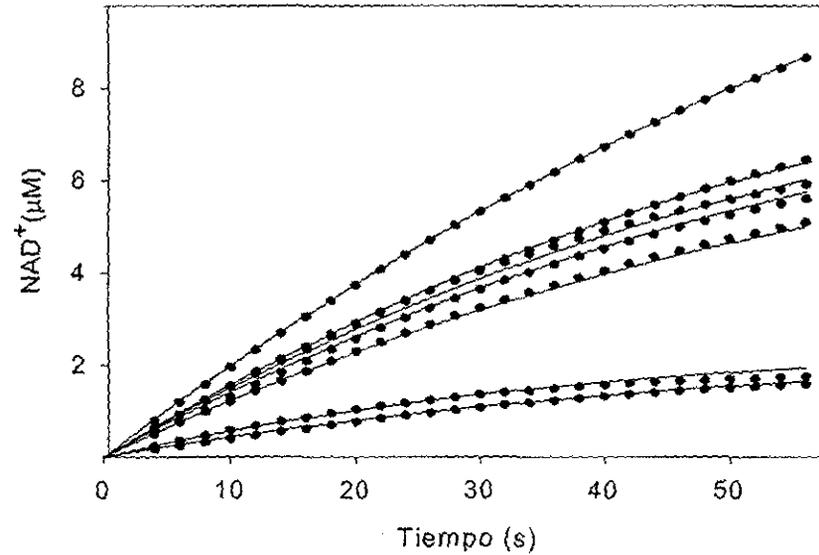
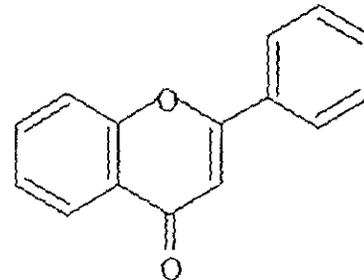


Figura 10. Curso temporal de la formación de producto por la NADH-DH interna. La preparación enzimática (3µg/ml) fue incubada en presencia de diferentes concentraciones de NADH (2.5, 5, 10, 15 y 30 µM) y DCPIP (3, 6, 11, 16 y 21 µM) en 20 mM de amortiguador MOPS-KOH, pH 7.0, a 25°C, y la reacción se continuó por 56 segundos. La reacción se inició con la adición de la enzima y se registró el decremento en absorbencia a 600 nm.

Inhibición por flavona. Se ha reportado que la flavona es un inhibidor específico de la NADH-DH interna insensible a rotenona de la mitocondria de *S. cerevisiae* (de Vries y Grivell, 1988). La mayoría de los estudios de inhibición por flavona fueron hechos en mitocondrias completas y esta inhibición no estaba completamente caracterizada.

Figura 11. Estructura química de flavona.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Por esto, se obtuvieron los patrones de inhibición variando tanto los sustratos como el inhibidor. Primero, la enzima se incubó en presencia de concentraciones saturantes de NADH o DCPIP y diferentes concentraciones de flavona. Como se puede ver en la figura 12, la flavona es un potente inhibidor de la NADH-DH interna que, a concentraciones micromolares, disminuye la actividad de la enzima. Además, se observa que la enzima presenta una actividad remanente a concentraciones saturantes del inhibidor, indicando una inhibición parcial. Los datos fueron ajustados con la siguiente ecuación,

$$v = \frac{V_{\max}*(1 + \beta*[I]/K_{ii})}{1 + [I]/K_{ii}} \quad [3]$$

derivada de la ecuación 5 (Pág. 49). Esta ecuación describe la inhibición parcial por flavona a concentraciones saturantes de ambos sustratos. K_{ii} corresponde a la constante de inhibición aparente en el intercepto y $\beta*V_{\max}$ la velocidad máxima a concentraciones saturantes del inhibidor. La doble recíproca de la ecuación 3,

$$\frac{1}{(V_{\max} - v)} = \frac{1}{V_{\max}*(1-\beta)} + \frac{K_{ii}}{V_{\max}*(1-\beta)*[I]} \quad [4]$$

muestra que hay una relación lineal entre el recíproco de la $(V_{\max}-v)$ y el recíproco de la concentración del inhibidor (inserto en la figura 12). La K_{ii} puede obtenerse del intercepto en el eje de las X y β en la pendiente. La figura 11 muestra que la flavona inhibe a la enzima con una K_{ii} de $3.7 \pm 0.5 \mu\text{M}$, dejando una actividad parcial del 20% a concentraciones saturantes del inhibidor ($\beta= 0.23 \pm 0.03$).

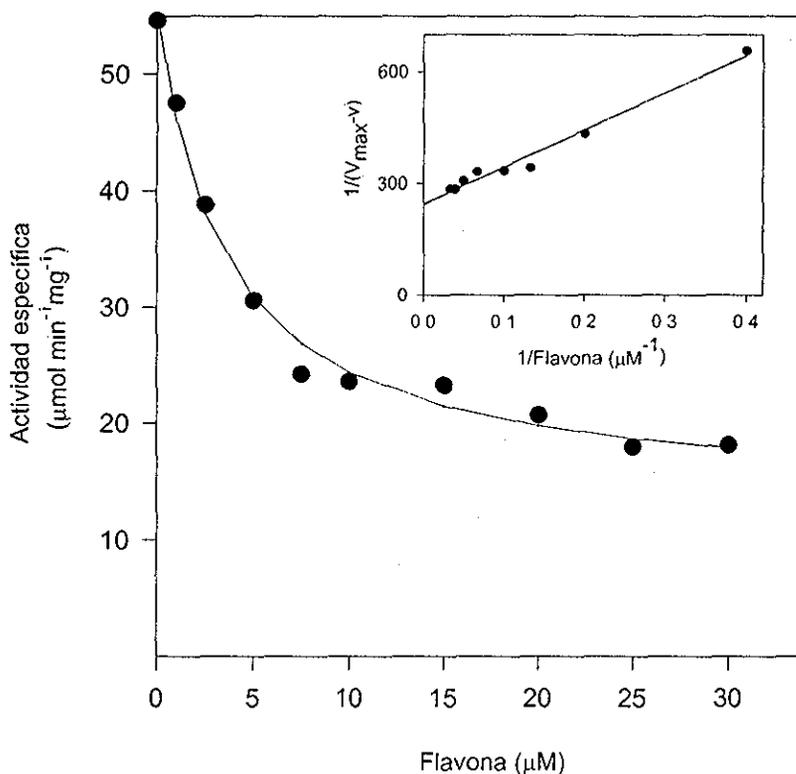


Figura 12. Efecto de la flavona sobre la actividad de la NADH-DH interna en la mitocondria de *S. cerevisiae*. La preparación enzimática (1.5 µg/ml) fue incubada en 20 mM de amortiguador MOPS-KOH, pH 7.0, 30 µM de NADH, 30 µM de DCPIP, a las concentraciones indicadas de flavona. En el inserto se grafica $1/(V_{\max}-v)$ contra el inverso de la concentración de flavona

Para conocer el mecanismo cinético de la inhibición por flavona, la enzima se incubó con diferentes concentraciones de flavona, a diferentes concentraciones fijas de NADH o DCPIP y concentraciones constantes del otro sustrato. Las figuras 13 A y 14 A muestran los patrones de inhibición producidos por flavona. Como se puede ver, en las gráficas de los dobles recíprocos se obtienen líneas rectas para ambos sustratos, pero las gráficas del intercepto y la pendiente fueron hiperbólicas, indicando una inhibición parcial (Fig. 13 B y 14B). Los patrones de inhibición con NADH como sustrato variable muestran una familia de líneas paralelas, que está de acuerdo con una inhibición acompetitiva hiperbólica.

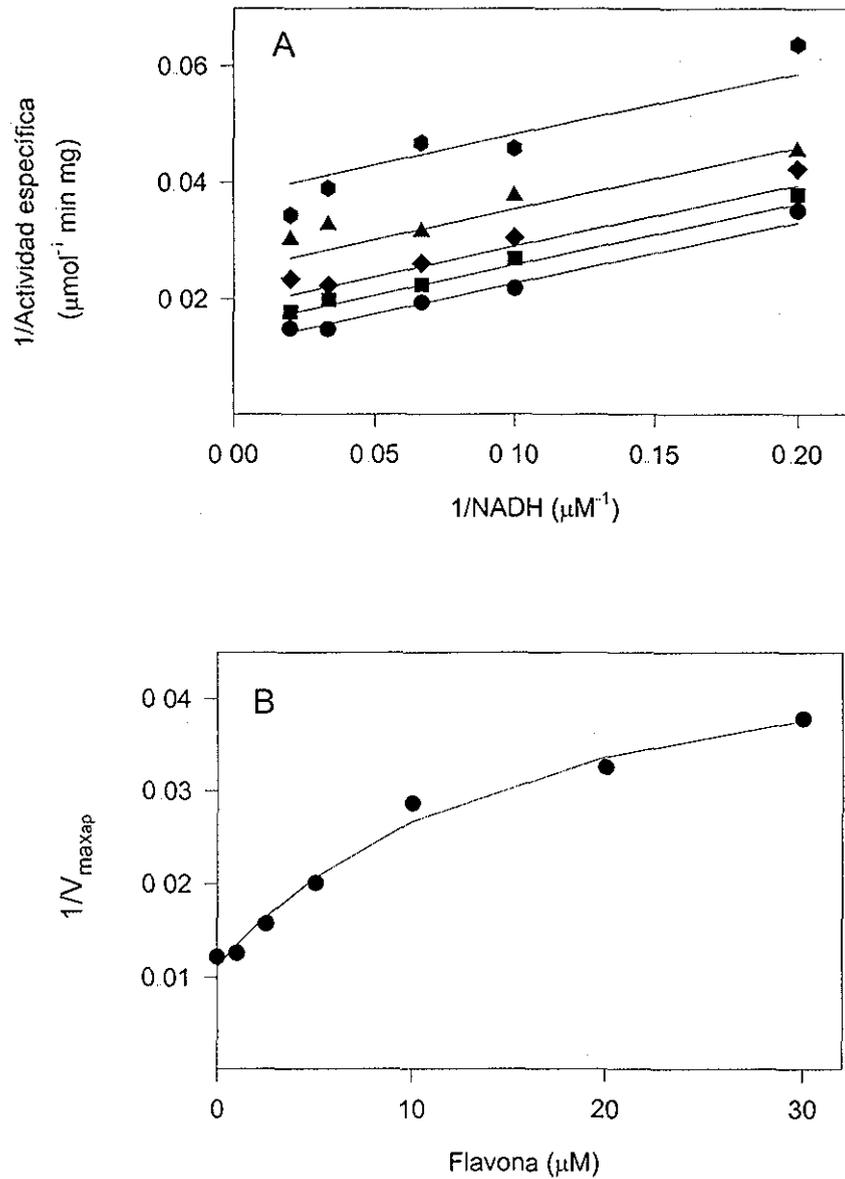


Figura 13. Inhibición de la NADH-DH interna por flavona a diferentes concentraciones de NADH. La preparación enzimática (1.5 $\mu\text{g/ml}$) fue incubada en 20 mM de amortiguador MOPS-KOH, pH 7.0, en presencia de variables concentraciones de NADH (5, 10, 15, 30 y 50 μM) y flavona (\bullet 0, \blacksquare 5, \blacklozenge 10, \blacktriangle 15, y \blacklozenge 30 μM). La concentración fija de DCPIP fue de 30 μM . A) La gráfica de las dobles recíprocas de la velocidad inicial con NADH como sustrato variable. B) La gráfica de $1/V_{\text{maxapp}}$ contra la concentración de flavona.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

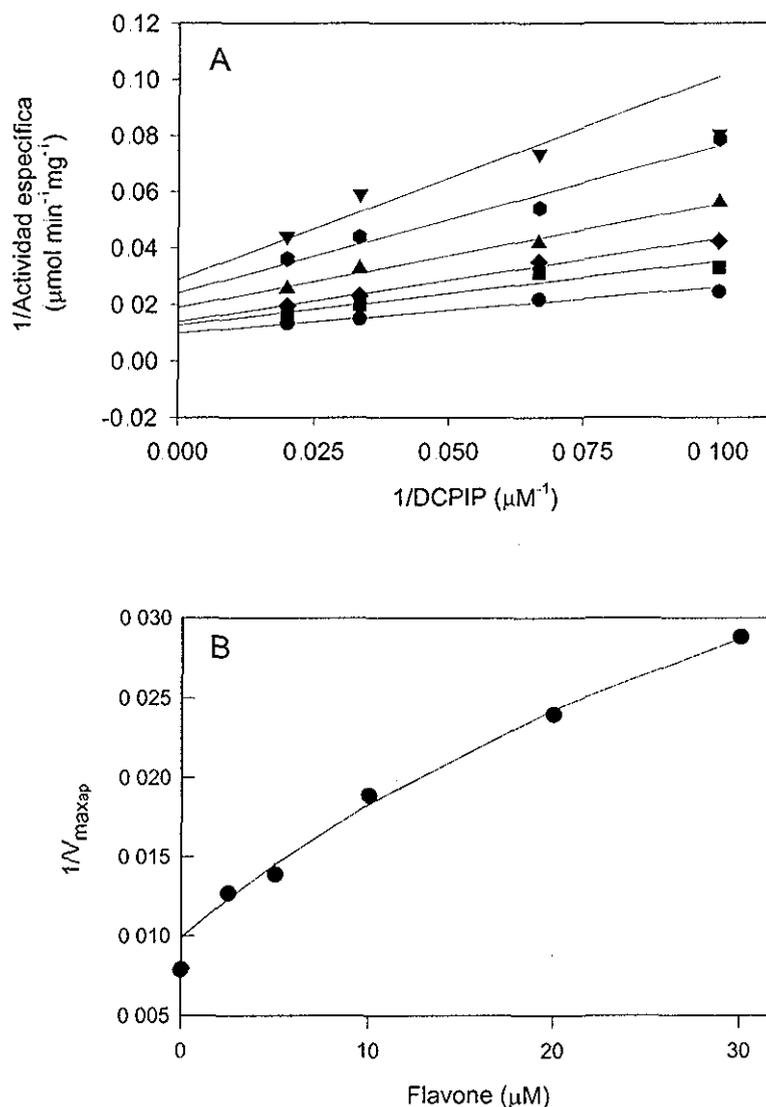


Figura 14. Inhibición de la NADH-DH interna por flavona a diferentes concentraciones de DCPIP. La preparación enzimática (1.5 $\mu\text{g/ml}$) fue incubada en 20 mM de amortiguador MOPS-KOH, pH 7.0, en presencia de variables concentraciones de DCPIP (5, 10, 15, 30 y 50 μM) y flavona (● 0, ■ 2.5, ◆ 5, ▲ 10, ● 15, y ▼ 30 μM). La concentración fija de NADH fue de 30 μM . A) La gráfica de las dobles recíprocas de la velocidad inicial con DCPIP como sustrato variable. B) La gráfica de $1/V_{\text{maxap}}$ contra la concentración de flavona.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Por otro lado, se encuentra una familia de líneas intersectantes cuando el DCPIP oxidado fue el sustrato variable, indicando una inhibición no competitiva hiperbólica. Los resultados sugieren que la flavona puede interactuar con dos formas de la enzima, F y F-DCPIP, resultando en la producción de un complejo binario F-flavona y un complejo ternario F-DCPIP-flavona. Además, los resultados sugieren que el complejo ternario F-DCPIP-flavona cataliza la reducción del DCPIP, aunque con baja eficiencia. Los valores de K_{ii} ($5.4 \pm 0.6 \mu\text{M}$), K_{is} ($7.1 \pm 1.1 \mu\text{M}$), y β (0.11 ± 0.02) se obtuvieron por medio de un ajuste global de los datos en las figuras 12 y 13 A a la siguiente ecuación,

$$v = \frac{V_{\max} \cdot (1 + \beta \cdot [I] / K_{ii}) \cdot [A] \cdot [B]}{K_b \cdot [A] + K_{\text{NADH}} \cdot [B] + [A] \cdot [B] + K_{\text{DCPIP}} \cdot [A] \cdot [I] / K_{is} + K_{\text{NADH}} \cdot \beta \cdot [B] \cdot [I] / K_{ii} + [A] \cdot [B] \cdot [I] / K_{ii}} \quad [5]$$

en donde V_{\max} , K_{NADH} , y K_{DCPIP} fueron previamente definidas, βV_{\max} representa la velocidad máxima a concentraciones saturantes del inhibidor, y K_{ii} y K_{is} corresponden a la constante de inhibición aparente del intercepto y la pendiente respectivamente. La tabla 5 resume el tipo de inhibición y los valores de las constantes de inhibición por AMP y flavona.

Tabla 5. Tipos de inhibición y constantes cinética de inhibición aparente de la NADH-DH interna por AMP y flavona

Inhibidor	Sustrato variable	Sustrato fijo	Tipo de inhibición	$K_i (\pm \delta)$
AMP	NADH	DCPIP	Lineal, IC	$5.5 \pm 0.6 \text{ mM}$
AMP	DCPIP	NADH	Lineal, IA	$11.5 \pm 0.7 \text{ mM}$
Flavona	NADH	DCPIP	Hiperbólico, IA	$5.4 \pm 0.6 \mu\text{M}$
Flavona	DCPIP	NADH	Hiperbólico, IN	$7.1 \pm 1.1 \mu\text{M}$

Nota: IC inhibición competitiva, IA inhibición acompetitiva, IN inhibición no competitiva.

Efecto del pH en la estabilidad de la NADH-DH interna. Un importante paso en el análisis del comportamiento de los parámetros cinéticos con el pH es determinar la estabilidad de la enzima a diferentes valores de pH. En este sentido, algunos cambios en la actividad podrían ser debidos a la inactivación irreversible de la enzima dependiente de pH. La estabilidad de la enzima se examinó por dos diferentes procedimientos. En el primero, la enzima (3 $\mu\text{g/ml}$) se preincubó al pH deseado en ausencia o presencia de NADH, a 25 $^{\circ}\text{C}$, en 20 mM de amortiguador. A los tiempos indicados se tomó una alícuota de 80 μl y se diluyó en 1 ml del amortiguador estándar (20 mM MOPS-KOH, pH 7.0, 200 mM KCl). Para medir la actividad se añadieron concentraciones saturantes de NADH y DCPIP (Fig. 15).

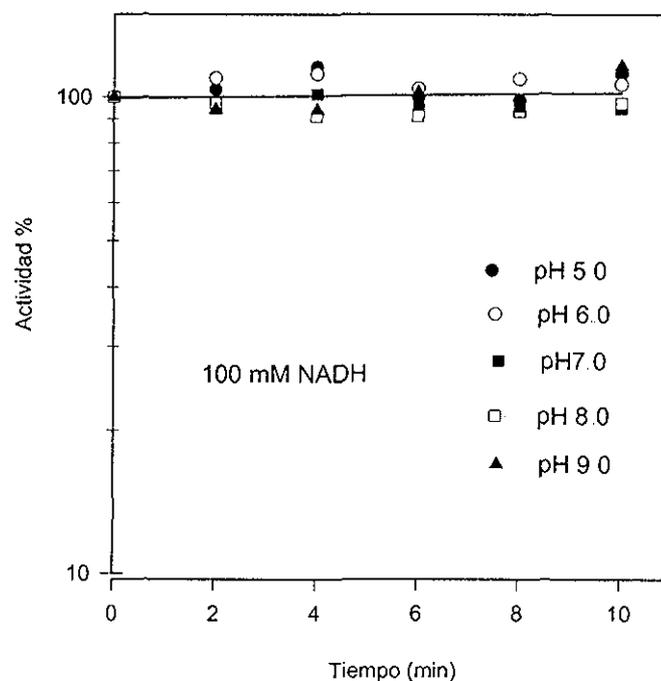


Figura 15. Efecto del pH en la estabilidad de la NADH-DH interna en presencia de NADH. La preparación enzimática (3 $\mu\text{g/ml}$) fue incubada en 20 mM en alguno de los diferentes amortiguadores MES-KOH, pH 5.0 y 6.0, MOPS-KOH, pH 7.0, o HEPES-KOH, pH 8.0 y 9.0 en presencia de 100 μM de NADH. A los tiempos indicados se tomó una alícuota de 80 μl y se diluyó en 1 ml del amortiguador estándar (20 mM MOPS-KOH, pH 7.0, 200 mM KCl) y se añadieron concentraciones saturantes de NADH y DCPIP para medir la actividad.

El segundo procedimiento se basó en el método descrito por Selwyn, 1965. La enzima (1.5-3.75 $\mu\text{g/ml}$) se añadió a una solución con 50 μM de NADH, 40 μM de DCPIP, 20 mM de amortiguador ajustado al pH deseado y 200 mM de KCl. El curso temporal de la formación de producto se midió y los datos se graficaron como se muestra en la figura 16. Este método tiene la ventaja de que mide la estabilidad de la enzima en condiciones catalíticas, en presencia de los sustratos y a baja concentración de proteína. Los resultados muestran que la enzima libre y el complejo binario E-NADH son muy estables en el intervalo de pH de 5.5 a 8.0, manteniendo la actividad inicial después de 10 minutos de incubación. En la figura 16 se muestra que la enzima es estable a bajas concentraciones de proteína y en presencia de ambos sustratos. La estabilidad máxima se observó a pH de 5.0 y 6.5, en donde ambas curvas (20 y 50 μl de enzima) son perfectamente superponibles, indican que no hay pérdida de actividad. Por otro lado, se encontró una inactivación marginal a pH de 8.5. Estos resultados indican que la enzima es estable en el tiempo que se usó para la determinación de la velocidad inicial.

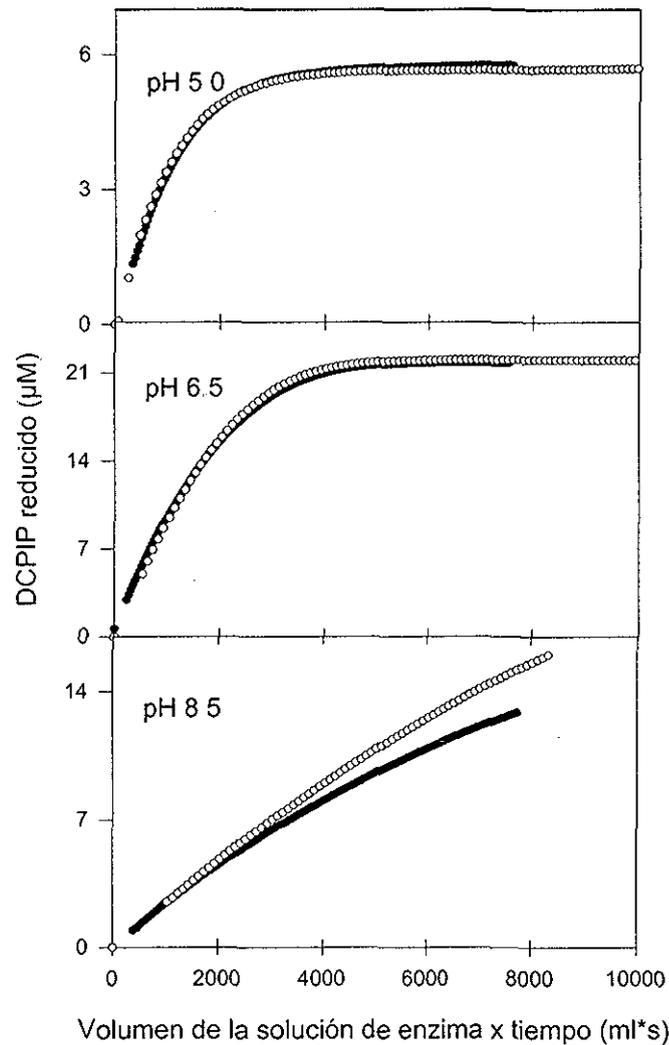


Figura 16. Efecto del pH en la estabilidad de la NADH-DH interna. La preparación enzimática a dos concentraciones diferentes (● 1.5 ; ○ 3 mg/ml) fue incubada en 20 mM en alguno de los diferentes amortiguadores MES-KOH, pH 5.5, MOPS-KOH, pH 6.5, o HEPES-KOH, pH 8.5 en presencia de 50 mM de NADH y 40 mM de DCPIP. La reacción fue iniciada con la adición de la enzima y se midió el decremento en absorbencia a 600 nm por 5 minutos

Efecto del pH sobre los parámetros cinéticos de la NADH-DH interna. Para obtener el perfil de los parámetros cinéticos y adquirir información acerca de los

grupos catalíticos importantes, la enzima (1.5-3.0 µg) se incubó en 20 mM de amortiguador, en presencia de concentraciones variables de NADH y de DCPIP, a los valores de pH indicados. Para la caracterización se trabajó en un intervalo de pH de 5.5 a 8.0, ya que la enzima es estable en este intervalo. Por medio de análisis de regresión no lineal, utilizando la ecuación [2], se obtuvieron los valores de V_{max} , K_{NADH} , K_{DCPIP} . Para obtener los valores de pK_a de los grupos involucrados en los procesos de catálisis y de unión de los sustratos, se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$V_{max\ ap} = \frac{V_{max}}{1 + 10^{-pH + pK_{es1}} + 10^{-pK_{es2} + pH}} \quad [6]$$

donde:

pK_{es1} y pK_{es2} son los logaritmos negativos de las constantes de disociación de los grupos involucrados en la catálisis.

$$V_{max}/K_{m\ ap} = \frac{V_{max}/K_m}{1 + 10^{-pH + pK_{e1}} + 10^{-pK_{e2} + pH}} \quad [7]$$

donde:

pK_{e1} y pK_{e2} son los logaritmos negativos de las constantes de disociación de los grupos involucrados en la unión de los sustratos.

El perfil del pH en la V_{max} muestra dos grupos con un pK_a de 5.3 ± 0.2 en la rama ácida y un pK_a de 7.2 ± 0.1 en la rama alcalina (Fig. 17). Por otro lado, los perfiles V_{max}/K_{NADH} y de V_{max}/K_{DCPIP} muestran un pK_a de 5.4 ± 0.2 en la rama ácida y un pK_a de 8.1 ± 0.1 2 en la rama alcalina.

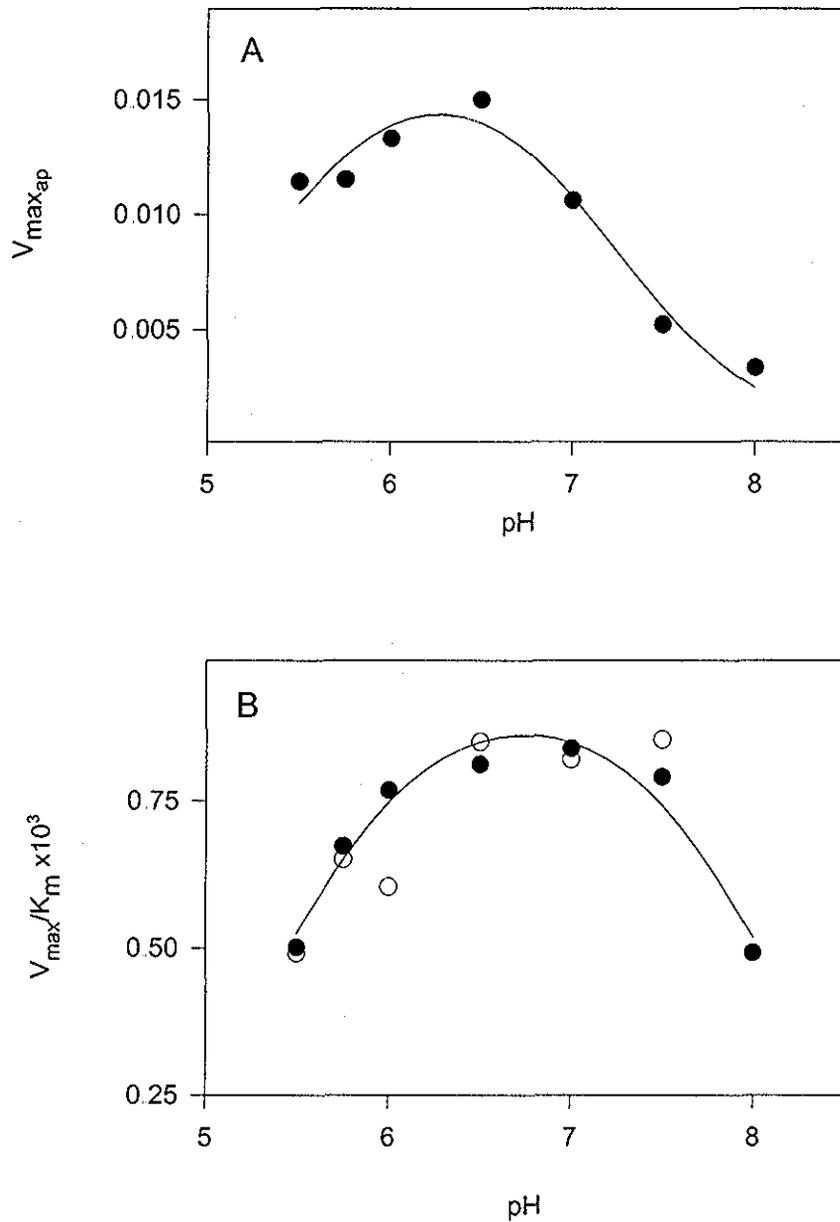


Figura 17. Efecto del pH sobre la actividad de la NADH-DH interna. La preparación enzimática (1.5 –3 $\mu\text{g/ml}$) fue incubada a diferentes valores de pH en 20 mM de los siguientes amortiguadores: MES-KOH, pH 5.0-6.5, MOPS-KOH, pH 6.5-7.5, o HEPES-KOH, pH 7.5-8.5 en presencia de concentraciones variables de \circ NADH y \bullet DCPIP. Los valores de V_{max} y V_{max}/K_m fueron obtenidos por análisis no lineal de los datos usando la ecuación [1].

Determinación de la estructura secundaria y un modelo de la estructura terciaria. Al inicio del trabajo con la NADH-DH interna únicamente se contaba con dos secuencias homólogas de origen bacteriano: la de *Escherichia coli* y la de *Haemophilus influenzae*. Estas secuencias tienen una identidad baja (22.2%) con la de la NADH-DH interna, pero la identidad es mayor entre ellas (40%). Se tenía una comparación estructural de la NADH-DH interna con la de *E. coli* (de Vries y col., 1992). Estas dos NADH-DH tienen en común que catalizan el mismo tipo de reacción de oxidorreducción, contienen el mismo grupo prostético (FAD) y ambas se encuentran en la membrana. La similitud entre estas dos NADH-DH es mayor en los primeros 400 residuos, mientras que en la región carboxilo terminal no se logró un alineamiento único. Presentan una estructura $\beta\alpha\beta$ involucrada en la unión de nucleótidos. La enzima de *E. coli* podría haber presentado un evento de duplicación génica, ya que hay una alta identidad entre los residuos 1-165 y los residuos 166-331. Este evento no es evidente en la secuencia de la enzima de la levadura. Por otro lado, ninguna proteína de este grupo se ha cristalizado y la similitud con alguna proteína relacionada no era mayor del 15 %.

Usando varios de los programas de predicción de estructura secundaria se determinó que la NADH-DH interna pertenece a la familia α/β con porcentajes probables de estructura α de 41.5%, de estructura β de 17% y de giros de 41.5%. Dos regiones con los sitios que une a nucleótidos (tríada de aminoácidos), son predichas como regiones hidrofóbicas (Fig. 18). Los residuos de la parte carboxilo no se encontró una buena identidad con la lipoamida cristalizada. Los residuos 52-76 están interrumpidos por la Arg 59, además de tener un gran contenido de prolinas que hacen improbable que se plieguen como una α -hélice transmembranal. La primera región (26-47) también es relativamente hidrofóbica, es un segmento corto que presenta varios aminoácidos cargados y que se predice como el sitio que fija el FAD.

Se reportó la comparación de siete NADH:ubiquinol oxidorreductasas (*Yarrowia lipolytica*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Arabidopsis thaliana*, *E. coli* y las tres NADH-DHs de *S. cerevisiae*) (Kerscher, y col., 1999). En este trabajo se obtuvieron cuatro motivos muy conservados (Fig. 19).

Pliegue dinucleótidos 1: Estructura $\beta\alpha\beta$ para los sitio de unión a dinucleótidos (Wierenga y col., 1986). Incluye 3 glicinas espaciadas, GXGXXG, que inician con residuos hidrofóbicos en la parte amino terminal y residuos ácidos conservados en la parte carboxilo terminal.

Pliegue dinucleótidos 2: Esta secuencia también posee estructura $\beta\alpha\beta$, pero incluye una región inusual de asa. Se sugiere como sitio de unión para el sustrato NADH.

Apolar / aromática: Se caracterizaron dos regiones bien conservadas de residuos apolares y aromáticos. La primera inmediatamente después del sitio de dinucleótidos 1. La segunda presenta varios residuos cargados conservados delimitados por residuos apolares y aromáticos. Ambas regiones podrían formar una bolsa hidrofóbica para la interacción de la ubiquinona con el FAD.

El avance en la cristalización no ha sido tan afortunado como la parte de biología molecular, ya que hasta el momento no se ha cristalizado ningún miembro de la familia de las NADH-DH de la clase 2. No obstante, se trató de modelar la NADH-DH de *S. cerevisiae* usando a una tripanotiol reductasa de *Trypanosoma cruzi* y una lipoamida deshidrogenasa de *Pseudomonas putida* cristalizadas (Björklöf y col., 2000). Como se muestra en la figura 20, la región amino terminal está mucho más conservada que la región carboxilo terminal. Se logró un buen modelaje de los sitios de unión al NADH y al FAD, con diferencias en el tamaño de los giros. La parte del carboxilo terminal, con poca conservación entre las proteínas, no se pudo modelar.

Sitio de unión de dinucleótidos

<i>S. cerevisiae</i> (NDE1)	108	NGSKRRI	LVILGSGWGSVSLKMLDTI	LYNVVVVS	PR	144
<i>S. cerevisiae</i> (NDE2)	93	NGIKKKEI	VILGIGWGAI	SLLKKLDIS	LYNVTIVVS	PR 129
<i>S. cerevisiae</i> (NDI1)	51	QHSDEPNV	LILGSGWGAI	SFLKHIDIKKYNVSIIS	PR	85

Aminoácidos sin carga / aromáticos

<i>S. c.</i> (NDE1)	146	YFLFIPLLP	S	156	212	DLKYDYLVVGVGAQPNIFGIPGVYESSFLKEIS	244
<i>S. c.</i> (NDE2)	131	FFLFIPLLP	S	141	197	SLSYDYLVVSVGAKITIFNIPGVYGNANFLKEIE	229
<i>S. c.</i> (NDI1)	87	YFLFIPLIP	S	97	166	EIKYDYIISAVGAEPNIFGIPGVIDYGHFLKEIP	198

Sitio de unión de dinucleótidos

<i>S. cerevisiae</i> (NDE1)	276	SFVVVGGGPIGV	FAAELRDYVDQDIRKUMPEISKEIKVTIVEALPN	321
<i>S. cerevisiae</i> (NDE2)	261	IFVVVGGGPIGV	FAAELQDYINQDLRKWMPDLSKEMKVIIEALPN	306
<i>S. cerevisiae</i> (NDI1)	230	SIVVVGGGPIGV	EAAAGELQDYVHQDLRKF LPALAEVQIHLVEALPI	275

Figura 19. Secuencias de los motivos conservados en la NADH-DH interna y en las NADH-DHs externas. Estos sitios también están presentes en otras proteínas homólogas de levaduras, de plantas y de bacterias (Kerscher, 1999). Los sitios de unión a nucleótidos con las glicinas conservadas y además aminoácidos básicos. Las regiones con gran contenido de residuos hidrofóbicos nos pueden sugerir uniones a la membrana o bien sitio de unión de la quinona.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

		10	20	30	40	50	60	
	******	
consenso	1	VIIGAGPAGLAAAIRLAR	---IG---	LKVALVEKE	-----	GCIPRKP	36	
NDH-DH int.	31	LILGSGWGAISFLKHIDI	---KK---	YNVSIISPR	-----	SYLETFE	66	
<u>1BZL A</u>	8	VVIGAGSGGLEAAWNAAI	lykKRvav	IDVQMVHG	Ppffsalg	----gtcvnv	GCVPKKI	62
<u>1LVL</u>	9	LIIGGGPGGYVAAIRAQ	---IG---	IPTVIVEG	qalgg	-----tclni	GCIPSKA	53
<u>1EBD A</u>	7	LVVAGPGGYVAAIRAAQ	---IG---	QKVTIVEK	gnlgg	-----vclnw	GCIPSKA	51
<u>1FL2 A</u>	5	LIVGSGPAGAAAAYSAR	---KG---	IRTGLM	Ger	-----fg	QOILDTV	42
<u>1NPX</u>	4	IVLGSSHGGYEAVELIN1	-hFD---	AEIQWYEK	-----	DFISFLS	41	

		70	80	90	100	110	120		
	******		
consenso	37	LLKAYLVGEEAKI	-----	GPELDRLR	PLEQY	---KKEG	VEVLIGTEVT	75	
NDH-DH int.	67	LLPSAPVGTVDEK	-----	SIIEPIVNF	ALK	---KKNV	TYEAEAT	104	
<u>1BZL A</u>	63	MVTGAQYMEHIREsagfgw	-----	efdrtil	RAEWK	NLI	AVKDEAVLN	NINKSYDEM	113
<u>1LVL</u>	54	LIHVAEQHFQASRftepsp	-----	lgiswas	ERLDIG	QSV	AWKDGIV	DRLIIGVAA	104
<u>1EBD A</u>	52	LISASHRYEQAKHseemg	-----	ikaenV	IIDE	FAKV	QEWKASV	VKKLTGGVE	98
<u>1FL2 A</u>	43	DIENYISVPKIE	-----	GQKLAG	ALKV	HVDEY	DVDVID	SQSAS	80
<u>1NPX</u>	42	CGMQLYLEGKVKD	-----	VNSVRY	MTGE	KM	ESRGV	NVFNTEIT	80

		130	140	150	160	170	180		
	******		
consenso	76	ALDKKGVVI	-----	DIVLG	-----	DGETL	95		
NDH-DH int.	105	SINPDRNIVI	-----	IKSISav	sqlyq	penh	lglhga	EFAEI	141
<u>1BZL A</u>	114	FRDTGIEFFlgwgslesk	-----	nvnv	resad	FASA	-----	VKERL	151
<u>1LVL</u>	105	LLKKHGVKVVhgwak	-----	vldg	KQ	VEV	-----	DGQRI	133
<u>1EBD A</u>	99	GLLKGNKVEIvkgeayf	-----	vdant	wrV	VNGD	-----	SAQTY	132
<u>1FL2 A</u>	81	KLIPAAVEGGL	-----	hQIEIA	-----	SGAVL	102		
<u>1NPX</u>	81	AIQPKHQVI	-----	kDLV	SG	-----	EERVE	102	

		190	200	210	220	230	240			
	******			
consenso	96	TYDKLIATGARPRIPPI	-----	DIEG	VEGL	RSD	DALAL	REVPK	136	
NDH-DH int.	142	KYDY LISAVGAEPNTFGIP	-----	GVIDY	GHEL	LKEI	PN	SLEIR	RIFA	183
<u>1BZL A</u>	152	EIEHILLASGSWPHMPN	-----	IPGIE	HCISS	NEA	FYL	PEPF	188	
<u>1LVL</u>	134	QCEHLLLATGSSVELPm	-----	LP	IGG	PVISS	IEAL	APKAL	171	
<u>1EBD A</u>	133	TEKNAIATGSRPIELPn	-----	fKFS	SNR	ILDS	IGAL	NLGE	VP	170
<u>1FL2 A</u>	103	KARSIIVATGAKWRNMNvp	-----	gED	QYRI	KGVI	YCP	HOD	GLEk	143
<u>1NPX</u>	103	NYDKLIISPGAVPFELDipg	-----	kd	LDNI	YLMR	GRQ	WAI	KLKQ	146

		250	260	270	280	290	300			
	******			
consenso	137	-----	-----	GK	-----	RVVV	GGGYIGLE	151		
NDH-DH int.	184	-----	AN	lekan	llpk	gdper	rllSIV	VGGG	P	216
<u>1BZL A</u>	189	-----	R	-----	RVLT	VGGG	FISVE	202		
<u>1LVL</u>	172	-----	Q	-----	HLVV	GGGYIGLE	185			
<u>1EBD A</u>	171	-----	K	-----	SLVV	GGGYIGIE	184			
<u>1FL2 A</u>	144	-----	gK	-----	RVAV	IGGG	NSGVE	158		
<u>1NPX</u>	147	p	-----	ev	N	-----	NVVV	IGSGYIGIE	163	

		310	320	330	340	350	360																								
	******																								
consenso	152	LAAALARLG	-----	AEVT	V	VERRD	RIL	PRF	DDEE	AAAL	LEK	LIE	EGGI	194																	
NDH-DH int.	217	AAGELQDYVhqdlrkf	-lpal	aeV	QIHL	VEAL	P	IVLN	ME	EKKL	SSYA	QSH	LEN	ISI	272																
<u>1BZL A</u>	203	FAGIFNAYKpk	-----	d	QVTL	CY	RGE	MIL	RGE	DHIL	REEL	TQ	LI	ANG	I	247															
<u>1LVL</u>	186	LGIAYRKL	-----	AQVS	V	VEARE	RIL	P	TY	D	SELI	AP	V	ESL	KKL	G	I	227													
<u>1EBD A</u>	185	LGATAYANFG	-----	IKVT	I	LEGAG	EIL	SGF	EK	QMAA	I	IK	R	L	KK	G	V	226													
<u>1FL2 A</u>	159	AAIDL	AGIV	-----	EHVT	L	EFAP	EMK	ADQ	VI	QDK	L	R	S	L	K	N	-----	V	195											
<u>1NPX</u>	164	AAEAFKAG	-----	KKVT	V	I	D	I	L	D	R	P	L	G	V	I	D	K	E	F	D	V	L	T	E	M	E	A	N	I	206



		370	380	390	400	410	420	
	******	
consenso	195	EILLGIK---	VEAIEGDG-DGG---	VRVKVVEIDG-KELEADLVLVAIG--	RRPN---	T	240	
NDH-DH int.	273	KVHLRIA---	VAKVEEKQILAK---	IKHEDGKIIE-EIIPYGILIWATG--	NKARpviT	322		
<u>1BZL A</u>	248	QILTKEN---	PAKVELNA-DG-----	SKSVIFESG--KKMDFDLVMMMAIG--	RSPR---	I	291	
<u>1LVL</u>	228	ALHLGHS---	VEGYENGc-----	LIANDGKGGq-IRLEADRVLVAVG--	RRPR---	T	270	
<u>1EBD A</u>	227	EVVTNAI---	AKGAEERE-DGvtvtvYEAN--	GEIK---IIDADYVLVTVG--	RRPN---	T	272	
<u>1FL2 A</u>	196	DIILNAQ---	TEVKGDGskw---	vgLEYRDRVSGdiHNIELAGIFVQIG--	LIPN---	T	244	
<u>1NPX</u>	207	TIAIGET---	VERYEGCG-----	RVQKVVICK-NAYDADLVVVAVG--	VREN---	T	248	
		430	440	450	460	470	480	
	******	
consenso	241	ELLGLAG---	IEIDRR-----	GGIVVDEYIRI-----	SVPGIYAAGDvAGgRI--	280		
NDH-DH int.	323	DLEKKIF---	EQNSSK-----	RGIAVNDELQvk-----	GSNNIFAIGDnafaglpp	365		
<u>1BZL A</u>	292	KDLQLQNa-g	MIKN-----	GGVQVDEYSRt-----	NvSNIYAIGDVIN-RV--	331		
<u>1LVL</u>	271	KGFNLECl-d	LKMNG-----	AAIAIDERCQt-----	SMHNVWAIGDVAG-EP--	310		
<u>1EBD A</u>	273	DELGLEQi-g	IKMINr-----	GLIEVDQOCrt-----	SVPNIFAIGDIVPg-P--	313		
<u>1FL2 A</u>	245	NWLEG-A---	VERNRM-----	gEIIIDAKCe-----	tNvKGVFAAGDCIIvPY--	283		
<u>1NPX</u>	249	AWLKI---	LEIHFn-----	GLIKIDEYMRt-----	sePDVFAVGDAIliKY--	287		
consenso	281	RLAGV	285					
NDH-DH int.	366	taqva	370					
<u>1BZL A</u>	332	MITPV	336					
<u>1LVL</u>	311	MLAHR	315					
<u>1EBD A</u>	314	ALAHK	318					
<u>1FL2 A</u>	284	KQIII	288					
<u>1NPX</u>	288	NPADt	292					

Figura 20. Secuencias relacionadas con la NADH-DH interna obtenidas con el programa BLAST (Altschul y col., 1997). La secuencia consenso es obtenida con un número mayor de 100 secuencias analizadas. La NADH-DH interna (*Saccharomyces cerevisiae*), la tripanotiol reductasa 1BZL A (*Trypanosoma cruzi*), la lipoamida deshidrogenasa 1LVL (*Pseudomonas putida*), la dihidrolipoamida deshidrogenasa 1EBD A (*Bacillus stearothermophilus*), la alquilhidroperoxido reductasa 1FL2 A (*Escherichia coli*) y la NADH peroxidasa 1NPX (*Enterococcus faecalis*). En rojo se marcan los residuos conservados en todas las secuencias, los asteriscos marcan los aminoácidos en la posición 5.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

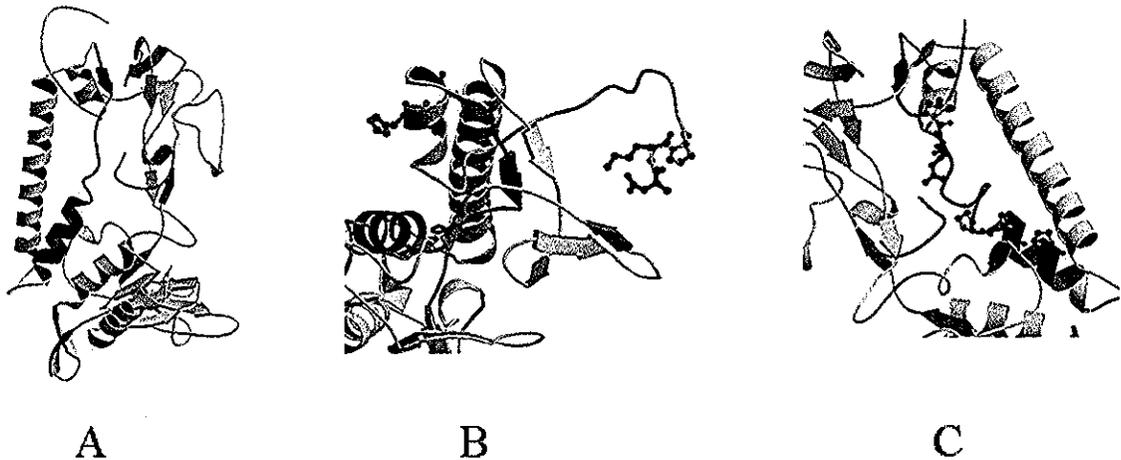


Figura 21. Estructuras terciarias de la NADH-DH interna mediante modelaje por homología. A La región de unión al grupo prostético FAD (color amarillo), región de unión al NADH (color café), región carboxilo terminal (color azul). B. Algunos de los aminoácidos en el sitio de unión al FAD, azul (aminoácidos con carga positiva), rojo (aminoácidos con carga negativa), rosa (prolinas), verde (histidinas). C. Algunos aminoácidos de sitio de unión del NADH.

Determinación del estado de agregación

No fue sencillo conocer el estado de agregación funcional de la enzima. Se realizaron diferentes intentos en geles nativos, variando la concentración del detergente y de la acrilamida, pero no se lograba introducir a la proteína parcialmente purificada. En algunas condiciones, la proteína migró asociada con bandas de muy alto peso molecular (mayores de 400 kDa). Una posible explicación mencionada al inicio de los resultados era la formación de micelas mixtas muy grandes de la enzima con el Tritón X-100 y con proteínas contaminantes. En experimentos recientes se utilizó el sistema de los geles azules en condiciones nativas (Schägger, 1991). Las mitocondrias de *S. cerevisiae* se obtuvieron a partir de una cepa control y otra con un plásmido que sobreexpresa a la NADH-DH interna. Posteriormente, las enzimas se solubilizaron con 1% de dodecil maltósido o 1% de Tritón X-100 y se llevó a cabo la electroforesis en geles azules. Las bandas que corresponden a la NADH o NADPH deshidrogenasa se detectaron por actividad. En la figura 22 se muestra el patrón de bandas con actividad de la NADH deshidrogenasa interna. Como marcadores se utilizaron los

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

complejos mitocondriales de bovino en los cuales se conoce su masa molecular (el complejo I, 750 kDa, la ATPasa, 600 Kda, el complejo III, 500 kDa, el complejo IV, 200 kDa y el complejo II, 130 kDa, determinada en geles de segunda dimensión Schägger, 1991).

En los carriles 1 al 4 son las muestras que fueron corridas en presencia de azul de Coomassie durante la corrida y son las bandas presentes en el gel antes de medir actividad. El carril 1 están las mitocondrias de bovino; en el carril 2 están las mitocondrias de la cepa control de *S. cerevisiae*; en el carril 3 están las mitocondrias de la cepa que sobreexpresa a la NADH-DH interna; y en el carril 4 está la preparación que sale de la columna de DEAE con actividad de NADH deshidrogenasa.

En los carriles del 5 al 8 se determinó actividad de NADH-DH. En el carril 5 están las mitocondrias de bovino en las cuales se observo un incremento en la banda que corresponde al complejo I y un poco de marca inespecifica; en el carril 6 tanto las mitocondrias de la cepa control como las mitocondrias que sobreexpresan a la NADH-DH interna en el carril 7 presentaron un barrido a todo lo largo del gel (mucho más intensa en esta última), lo que sugiere que la proteína no fue completamente solubilizada a concentraciones de detergente del 1% y presenta diversos estados de agregación; mientras que la preparación parcialmente purificada en el carril 8 presentó una banda de actividad aproximada de 120 kDa (marcada con el asterisco).

La actividad de NADPH deshidrogenasa se determinó en los carriles 10 y 11. En el carril 9 se encuentran las mitocondrias de bovino como marcadores. Las mitocondrias de la cepa control de *S. cerevisiae* y de la cepa que sobreexpresa a la NADH-DH interna presentaron ambas una banda de menor peso molecular alrededor de 60 kDa (marcadas con asterisco).

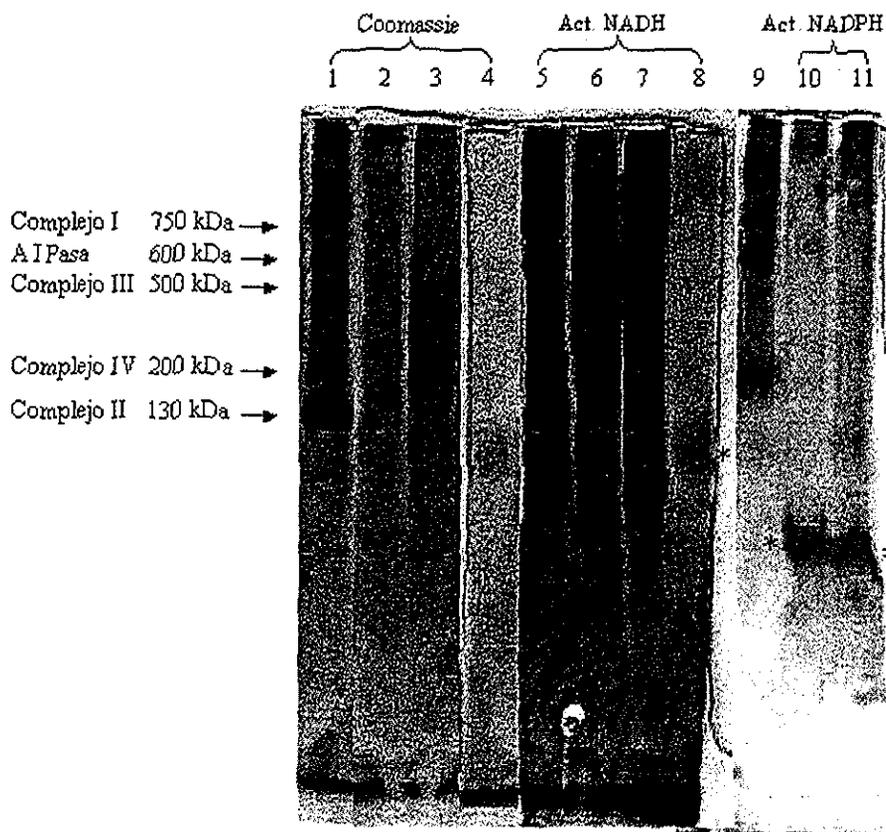


Figura 22. Gel azul en condiciones nativas para determinar el estado de agregación de la NADH-DH interna de las mitocondrias de *S. cerevisiae*. En el carril 1-4 se encuentra los geles teñidos durante la corrida con Coomassie, del carril 5-8 se determinó actividad de NADH deshidrogenasa y del carril 10-11 se determinó actividad de NADPH deshidrogenasa. En los carriles 1, 5 y 9 se muestran las mitocondrias control de bovino, en los carriles 2, 6 y 10 las mitocondrias de *S. cerevisiae* control, en los carriles 3, 7 y 11 las mitocondrias de *S. cerevisiae* de la cepa que sobreexpresa a la NADH-DH interna, y en los carriles 4 y 8 preparación que sale de la columna DEAE con actividad de NADH-DH.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Efecto de la flavona sobre el consumo de oxígeno en las mitocondrias de S. cerevisiae. El efecto de la flavona sobre la NADH-DH interna se caracterizó en este trabajo; sin embargo, no se conoce si también inhibe a las NADH-DHs externas. Debido a la alta similitud que presentan estas tres enzimas, se esperaba una inhibición semejante.

Para poder evidenciar a las diferentes deshidrogenasas (dos externas dependientes de NADH, una externa dependiente de NADPH y la interna) se obtuvieron mitocondrias acopladas para realizar experimentos de oximetría (Fig. 23). Se midió el consumo de oxígeno con diferentes sustratos respiratorios: el NADH o el NADPH para analizar a las NADH-DH externas y el etanol para identificar la actividad de la NADH-DH interna. En el trazo A se muestra el consumo de oxígeno de las mitocondrias con NADH y se determinó un control respiratorio de 1.75. En el trazo B se muestra el consumo de oxígeno con NADH el cual fue de $185 \text{ ng O}_2 \text{ min}^{-1}$, y se inhibió a $81 \text{ ng O}_2 \text{ min}^{-1}$ al añadir $200 \mu\text{M}$ de flavona, lo que representa una inhibición del 56%. Esta inhibición fue parcial, ya que existe un consumo de oxígeno residual, el cual desapareció completamente al añadir la antimicina.

El consumo de oxígeno, con el NADPH como sustrato fue menor ($42 \text{ ng O}_2 \text{ min}^{-1}$), y no se inhibió con flavona pero sí con antimicina, lo que indica que este sustrato también transfiere sus electrones a la ubiquinona (trazo C).

Finalmente, en el trazo D se observa que el consumo de oxígeno de las mitocondrias, usando como sustrato al etanol, fue de $62 \text{ ng O}_2 \text{ min}^{-1}$. Este consumo se vio ligeramente inhibido con flavona a $58 \text{ ng O}_2 \text{ min}^{-1}$, con un 7% de inhibición, esta inhibición se encontró mayor al 30% en dos experimentos anteriores (datos que no se muestran), sin embargo las mitocondrias no estaban acopladas. Esta actividad fue inhibida completamente con la antimicina.

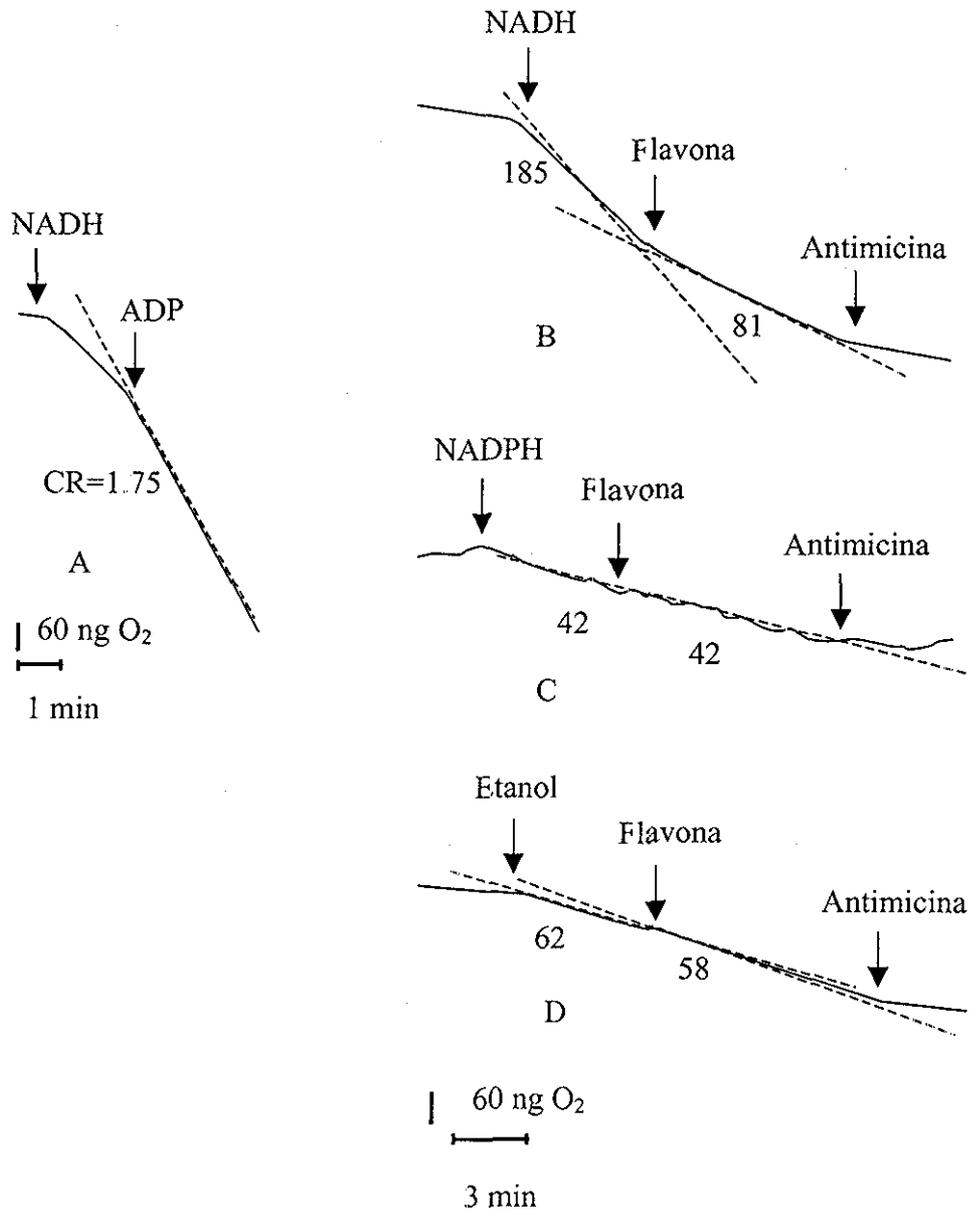


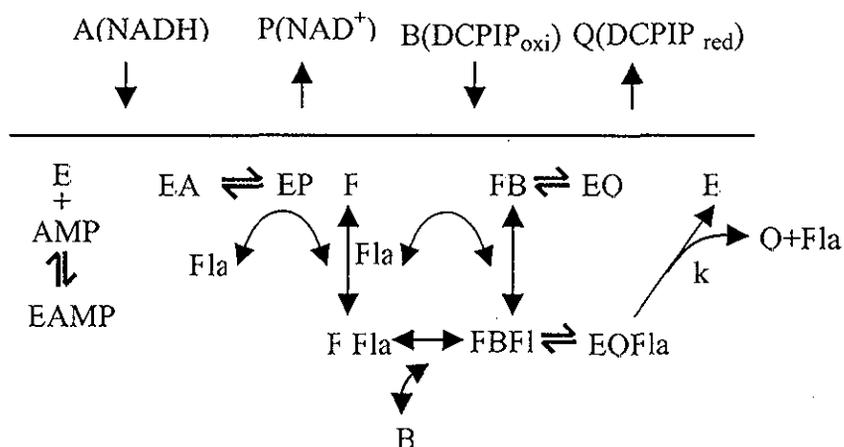
Figura 23. Efecto de la flavona en el consumo de oxígeno en las mitocondrias de *S. cerevisiae* con diferentes sustratos respiratorios. La concentración de proteína fue de (0.15 $\mu\text{g/ml}$) El medio que se usa para determinar el consumo de oxígeno fue el siguiente: (manitol 0.6 M, MES 5mM, H_3PO_4 4 mM, KCl 40 mM, MgCl_2 1 mM, y ADP 100 μM). La concentración de los sustratos respiratorios fue para el NADH y el NADPH de 1 mM, y para el etanol 138 μM . La concentración de los inhibidores: flavona 200 μM y antimicina 6 μM . La reacción se inició por la adición del sustrato. Los inhibidores se añadieron como se indica en los diferentes trazos. A. Control respiratorio. B. Consumo de oxígeno de las mitocondrias con NADH. C. Consumo de oxígeno de las mitocondrias con NADPH. D. Consumo de oxígeno de las mitocondrias con etanol.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

Las mitocondrias de la levadura *S. cerevisiae* carecen de complejo I, pero tienen una NADH-DH interna que cataliza la oxidación del NADH en la matriz mitocondrial. Los electrones del NADH son transferidos a la ubiquinona de la membrana. En contraste con el complejo I, esta enzima es mucho más simple desde el punto de vista estructural y no bombea protones a través de la membrana. Dependiendo de las condiciones de cultivo, esta enzima podría o no ser esencial para el crecimiento. Las mutantes que carecen de la NADH-DH interna no pueden crecer con fuentes de carbono como el acetato y el piruvato, pero sí con fuentes de carbono fermentativas como la glucosa (Marres y col., 1991). Bajo "condiciones fisiológicas", esta enzima se expresa cuando la célula cambia de condiciones fermentativas a respiratorias. Esta enzima es codificada por el gene *ndi1* (de Vries y col., 1992) y pertenece a una familia creciente de NADH deshidrogenasas. Los miembros de esta familia están en la membrana plasmática de bacterias y en la membrana interna de las mitocondrias de hongos y plantas. Se ha sugerido que la NADH-DH interna de la mitocondria de *S. cerevisiae* tiene entre uno a dos segmentos transmembranales (Melo, 1999). Esta suposición se apoya en la solubilización de algunas de las enzimas de esta familia de deshidrogenasas mediante detergentes. Sin embargo, para otros miembros de la familia, la enzima es liberada al sobrenadante con tratamientos suaves, en ausencia de detergente (Rasmusson y col., 1993). En el caso de la NADH-DH interna de *S. cerevisiae*, suponemos que está asociada a la membrana a través de interacciones hidrofóbicas e interacciones electrostáticas. Un análisis de estas regiones hidrofóbicas descubre la presencia de un residuo de arginina a la mitad del segmento o diversos residuos de prolina. Estas regiones hidrofóbicas predichas probablemente interactúan con la fase no polar de la membrana, facilitando la transferencia de electrones a la ubiquinona embebida en la fase lipídica. Apoyando esta hipótesis, se observó la solubilización de la enzima por 0.18% de Triton X-100 y alta concentración de sal.

La cinética de la NADH-DH interna es consistente con el siguiente esquema,



El NADH se une primero al sitio activo de la enzima libre (E) y se transfieren dos electrones del NADH al grupo prostético de la enzima (FAD), de tal manera que se produce la forma reducida de la enzima (F). La enzima muestra una alta especificidad por el NADH (ni el NADPH ni el desamino NADH se oxidaron), pero acepta diferentes quinonas como Q₀, Q₁, Q₂, o Q₆ (esta última es la quinona natural de *S. cerevisiae*) o aceptores de electrones artificiales como el DCPIP. Cabe resaltar que el NAD⁺, no interactúa ni con la enzima libre (E) ni con la forma reducida de la enzima (F), aún a concentraciones de 10 mM no afecta la actividad, lo que indica que la liberación del primer producto es un paso irreversible en el ciclo de reacción. Estos resultados sugieren que las interacciones electrostáticas entre la enzima y el anillo de nicotinamida del NADH son importantes en el proceso de unión. En este sentido, la repulsión del NAD⁺ por un grupo cargado positivamente en o cerca del sitio activo puede explicar la ausencia de inhibición por NAD⁺. La unión del segundo sustrato, el DCPIP o la quinona, induce la transferencia de electrones desde FAD al sustrato. En contraste con el complejo I, esta enzima no genera radicales libres durante el ciclo catalítico, ya que la reducción de la ubiquinona ocurre con la transferencia simultánea de los dos electrones (de Vries y Grivell, 1988). El análisis del curso temporal de la reacción muestra que el segundo producto, el DCPIP reducido, inhibe a la enzima con una K_i de 14.1 μM. De acuerdo con el mecanismo propuesto de ping-pong, el AMP (un

análogo del NADH) fue un inhibidor competitivo lineal para el NADH y un inhibidor acompetitivo lineal con respecto al DCPIP. En contraste, la flavona (un inhibidor específico para la NADH-DH) fue un inhibidor parcial. Una caracterización cuidadosa de este inhibidor mostró que la flavona (Fla) es un inhibidor acompetitivo hiperbólico con respecto al NADH y un inhibidor no competitivo hiperbólico con respecto al DCPIP. La inhibición parcial que ejerce la flavona se observó también en presencia de quinonas más hidrofóbicas (Q_1 , Q_2) como segundo sustrato (datos que no se muestran). Por otra parte, la inhibición parcial no es un artefacto de la purificación, ya que este fenómeno se observa en mitocondrias intactas. Esto se demostró en las células HEK 293 transfectadas con el gen de la NADH-DH interna (Seo y col., 1999). La adición de un exceso de flavona (500 μ M) a las células HEK 293 transfectadas y permeabilizadas con la digitonina e incubadas en presencia de glutamato-malato, inhibió un 80% el consumo de oxígeno, dejando una actividad remanente del 20%. En contraste, la adición de 5 μ M de antimicina A inhibió la respiración completamente. Resultados similares se obtuvieron en las mitocondria aisladas de células de *S. cerevisiae*. La adición de flavona a concentración de 200 μ M en la mitocondria de la levadura en presencia de etanol (que reduce el NAD^+ en la matriz mitocondrial) resultó en una inhibición parcial del consumo de oxígeno. De manera semejante, en presencia de NADH (sustrato para las NADH externas) la flavona inhibe también parcialmente el consumo de oxígeno. A diferencia de una de las NADH-DH externas, dependiente de NADPH que no se inhibe con flavona.

Finalmente, para conseguir información de los residuos involucrados en el proceso catalítico se estudió la dependencia de los parámetros cinéticos V_{max} y K_m/V_{max} con respecto al pH. La gráfica de la V_{max} contra pH mostró la contribución de dos grupos, el primero con pK_{aes1} de 5.3 y un segundo grupo con pK_{aes2} de 7.2. Experimentos independientes mostraron que la desprotonación del DCPIP presenta un pK_a de 5.8, sugiriendo que el grupo asociado con la rama ácida en el perfil de V_{max} contra pH podría pertenecer al DCPIP. Así, la desprotonación de este grupo en el sitio activo de la enzima podría inhibir la transferencia de electrones del FAD al DCPIP_{ox}. Si esto es correcto, la unión del DCPIP_{ox} a la

forma reducida de la enzima no modifica el pK_a de este grupo ionizable. El pK_{aes2} de 7.2 sugiere la participación de un residuo de histidina en la catálisis. Resultados preliminares muestran una inactivación de la enzima con dietilpirocarbonato (modificador químico específico para histidinas). Se requerirá la identificación de los residuos involucrados en este perfil de pH. Los pK_{ae1} y pK_{ae2} de los grupos involucrados en la unión de los sustratos fueron de 5.5 y 7.8; sin embargo, hubo dificultad en la determinación de la K_m debido a la alta afinidad de la enzima por los sustratos.

Una característica notable entre estas NADH-DH es su bajo contenido en residuos de cisteína. Las NADH-DH externas presentan uno y dos residuos, mientras que la NADH-DH interna carece de cisteínas. Se reportó que las proteínas de *S. cerevisiae* tienen un 35% menos contenido de cisteínas (Scheibel y col., 1997). La posible causa de esta reducción en la cantidad de cisteínas se atribuye a un problema en el mecanismo de transporte de sulfato, lo que limita la cantidad de residuos de cisteína en las proteínas de esta levadura y conserva únicamente aquellos residuos que tienen una importancia funcional. Sin embargo, en experimentos preliminares, incubando a las NADH-DHs externas con N-ethylmaleimida, no hubo pérdida de la actividad, lo que sugiere que no son esenciales para la actividad de la enzima o que no hubo accesibilidad al reactivo. El estado funcional de agregación de este grupo de enzimas se conoce poco. Se ha reportado que la NADH-DH de *Bacillus* YN1 (alcalófilo), funciona como dímero (Xu y col., 1985). Por otra parte, las lipoamidas solubles, que tienen una similitud alta con las NADH-DHs, son dímeros.

Nuestros experimentos con geles nativos sugieren que la NADH-DH interna podría trabajar como un dímero y la NADPH-DH externa como monómero.

En los últimos dos años, debido a la gran explosión de la biología molecular con los grandes proyectos de secuenciación completa del genoma de diferentes organismos (incluyendo el de *S. cerevisiae*), se aporta una lista grande de secuencias relacionadas con la de la NADH-DH interna, incluyendo varios marcos de lectura abiertos. Un análisis de las estas secuencias muestra que, desde un

punto de vista evolutivo, *S. cerevisiae* está más cercana de las otras levaduras y de las de plantas que de las de bacterias (Fig. 22), anexo b.

En un trabajo reciente, en donde se realizó el mismo tipo de análisis (Kerscher y col., 1999), se especula acerca del posible ancestro común de las NADH-DHs de hongos. Este ancestro pudo tener una orientación externa, por lo que la NADH-DH interna se produce como una divergencia evolutiva que siguió a un evento temprano de duplicación génica. Este desarrollo involucró la adquisición de una señal para su localización en la matriz mitocondrial. Por otra parte, la similitud entre las dos NADH-DHs externas es sorprendentemente alto, por lo que podría ser un evento más reciente de duplicación génica.

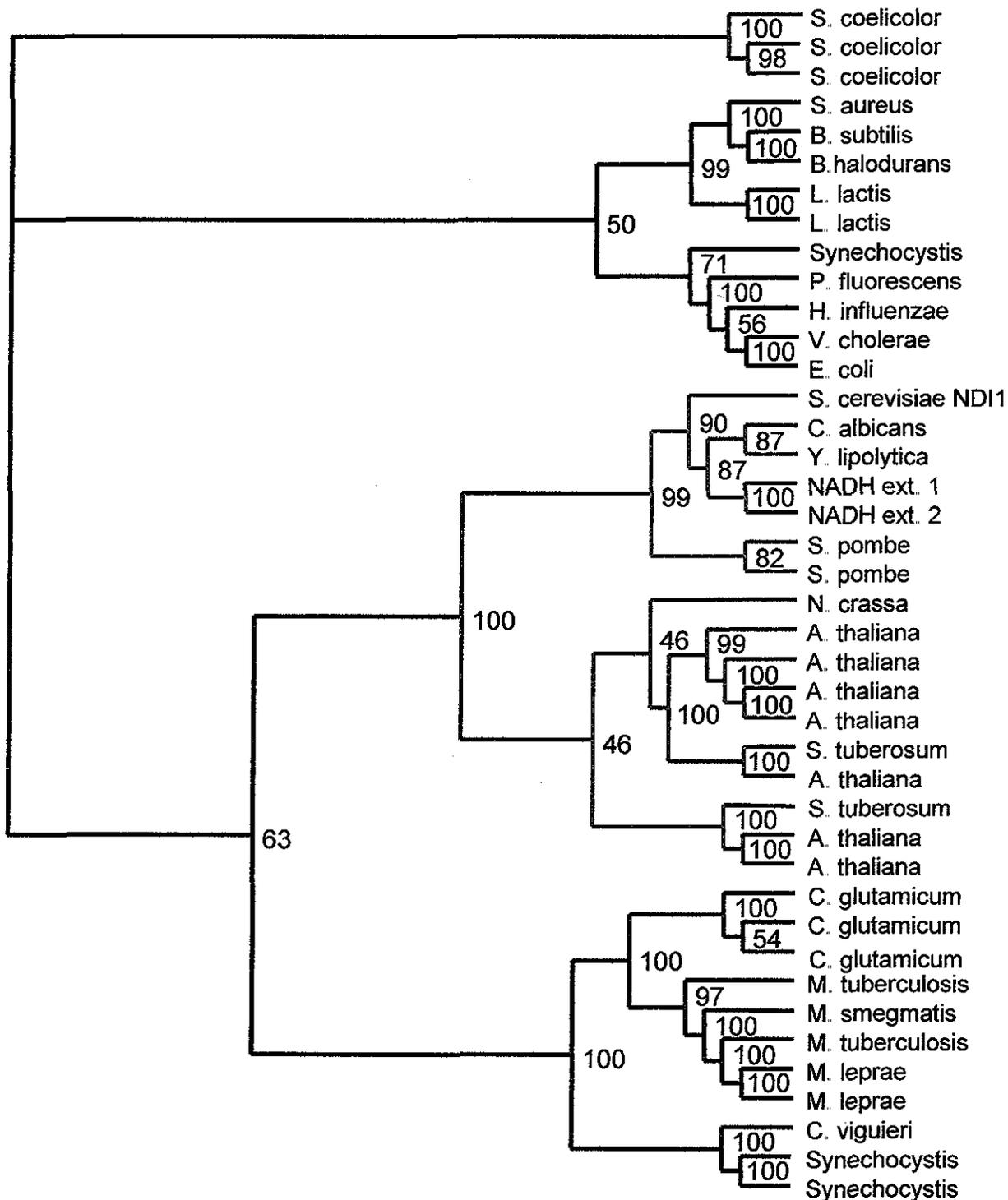


Figura 24. Relaciones filogenéticas de la NADH-DH interna de *S. cerevisiae* con 70 secuencias relacionadas. Se alinearon con el uso del programa CLUSTAL, DKFZ Heidelberg, Alemania. El árbol no tiene raíz. Los valores del Bootstrap (están en las ramas) indicando el porcentaje de árboles que fueron agrupados en 1000 repeticiones, el largo de las ramas es proporcional al número de sustituciones y la secuencia del hipotético ancestro común en el punto de la rama.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PERSPECTIVAS

El campo de posibilidades que abre este grupo de enzimas de la levadura es muy amplio. Por una parte, cabe mencionar algunas de las características que hacen de estas enzimas sistemas interesantes para continuar su estudio: a) son proteínas altamente conservadas en las levaduras, los hongos y las plantas, b) no se conoce el mecanismo de anclaje a la membrana mitocondrial, c) no existe hasta el momento ninguna proteína de esta familia cristalizada y d) desde el punto de vista funcional, no se conoce qué factores regulan su actividad en la levadura.

Después de la caracterización realizada, estamos interesados en continuar con estudios estructurales, para lo cual será necesario resolver dos problemas sustanciales: aumentar la cantidad de proteína y evitar la posible contaminación por las otras NADH-DHs presentes en la levadura.

Para resolver el primer problema se inició mediante técnicas de biología molecular, la clonación y la sobreexpresión de la NADH-DH interna, con lo cual podremos tener una mayor cantidad de proteína. Un abordaje sería colocar una extensión de histidinas en la NADH-DH interna, que facilitaría su purificación.

En relación al segundo problema, existen cepas a las cuales se les eliminaron los genes de las NADH-DHs externas. De esta manera, se tiene solamente a la NADH-DH interna y se podría, inclusive, intentar sobreexpresarla. Esta levadura, a la cual se le eliminaron los genes para ambas NADH-DHs externas, ya fue construída en el laboratorio del Dr. Peter Kötter.

El trabajo con las NADH-DHs externas recién inicia. En un primer paso, se intentará purificarlas y caracterizarlas cinéticamente en las levaduras que sólo contengan una de estas enzimas.

CONCLUSIONES

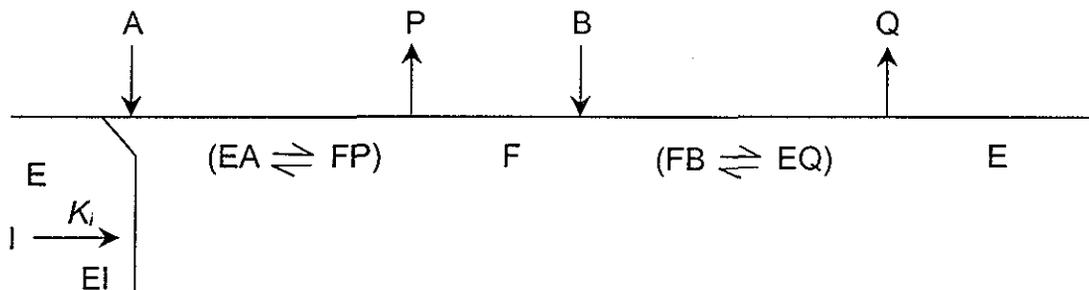
1. *Saccharomyces cerevisiae* presenta en su membrana interna mitocondrial al menos cuatro NADH deshidrogenasas insensibles a rotenona cuando se cultiva en medios con sustratos respiratorios. Tres de ellas se encuentran con su sitio activo orientado hacia el espacio intermembranal, dos catalizan la oxidación del NADH externo y una la oxidación del NADPH externo. La cuarta deshidrogenasa presenta su sitio activo en la matriz y oxida el NADH intramitocondrial.
2. Al menos tres de las NADH-DHs son enzimas sencillas con una subunidad de alrededor de 50 kDa, con el FAD como grupo prostético unido no covalentemente y carecen de centros hierro azufre.
3. La NADH-DH interna es específica para su primer sustrato, el NADH, pero no para su segundo sustrato, ya que puede utilizar una gran variedad de quinonas así como aceptores artificiales con diferente eficiencia.
4. La NADH-DH interna presenta una cinética Michaeliana con inhibición por sustrato; sigue un mecanismo cinético tipo ping-pong, el cual se confirmó mediante el uso de los productos y de los inhibidores reversibles sin salida.
5. El NAD^+ no inhibe a la enzima a concentraciones milimolares, lo que indica que la reacción de liberación del producto es prácticamente irreversible. Por el contrario, el $\text{DCPIP}_{\text{red}}$ inhibe a la enzima con una constante de inhibición de $14.1 \mu\text{M}$.
6. El AMP fue un inhibidor de tipo competitivo para el NADH con una $K_i \approx 5.5 \text{ mM}$ y un inhibidor de tipo acompetitivo para el DCPIP con una $K_i = 11.5 \text{ mM}$.
7. La flavona es un inhibidor parcial de la NADH-DH interna con una inhibición hiperbólica acompetitiva con respecto al NADH y una inhibición hiperbólica no competitiva para el DCPIP. La constante de inhibición aparente en el intercepto ($K_{ii} = 5.4 \mu\text{M}$) y la constante de inhibición de la pendiente ($K_{is} = 7.1 \mu\text{M}$). Los resultados indican que el complejo ternario F- DCPIP_{ox} -flavona cataliza la reducción del DCPIP, aunque con una baja eficiencia.

8. El efecto del pH sobre la V_{max} y la V_{max}/K_m fueron estudiados. El perfil de la V_{max} mostró dos grupos con valores de pK_{es1} de 5.3 y pK_{es2} de 7.2 involucrados en el proceso catalítico. En el caso de la V_{max}/K_m también existen dos grupos involucrados en la unión de los sustratos, con valores de pK_a semejantes a los anteriores.
9. El uso de varios programas de predicción de estructura secundaria nos permitió obtener una estructura consenso de la proteína. Es una proteína α/β , con una parte inicial de estructura $\beta\alpha\beta$ probablemente involucrada en la unión del NADH o del FAD. Con dos regiones muy conservadas y que son sitios de unión a nucleótidos y dos regiones hidrofóbicas que probablemente interactúan con la membrana.
10. El estado de agregación de la NADH-DH interna se determinó mediante el uso de electroforesis en condiciones nativas y las bandas se identificaron por medio de actividad. Se encontró una banda con un peso molecular de 130 kDa, que corresponde a un dímero. En contraste, una deshidrogenasa externa dependiente de NADPH migró con un peso molecular de 60 Kda.

ANEXOS

Anexo A

Los inhibidores reversibles sin salida (dead-end inhibitors) son aquellas moléculas que reaccionan con una o más formas de la enzima y producen un complejo que no participa en la reacción. Como ejemplo se muestra una enzima con un mecanismo tipo ping-pong bi-bi en presencia de un inhibidor (sin salida), I, que se combina con la forma libre de la enzima para dar el complejo EI:



La ecuación de velocidad para la siguiente reacción en ausencia de inhibidor es:

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[A][B]}{K_{mB}[A] + K_{mA}[B] + [A][B]} \quad (1)$$

Si el inhibidor se combina con la enzima libre E. La ecuación en presencia de inhibidor, afecta el término $K_{mA}[B]$ que se multiplica por $(1 + [I]/K_i)$:

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[A][B]}{K_{mB}[A] + K_{mA}[B](1 + [I]/K_i) + [A][B]} \quad (2)$$

Cuando [A] es variable, la ecuación es:

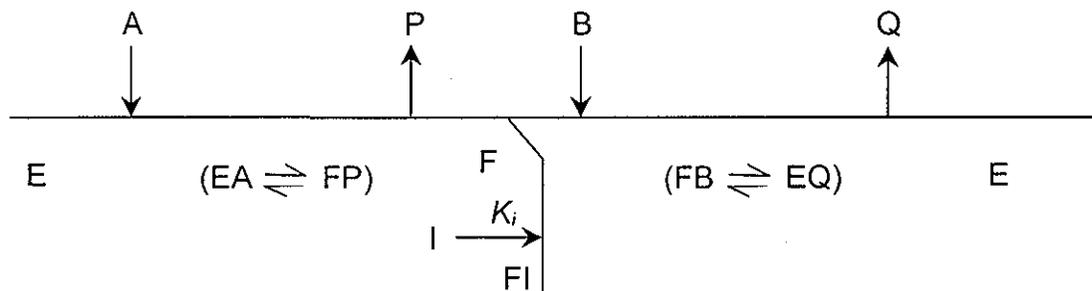
$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[A]}{K_{mA}(1 + [I]/K_i) + [A](1 + K_{mB}/[B])} \quad (3)$$

Cuando [B] es variable:

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[B]}{K_{mB} + [B](1 + K_{mA}/[A] + K_{mA}[I]/K_i[A])} \quad (4)$$

Así el inhibidor sin salida sería competitivo con respecto a A, y $K_{is} = K_i$ y sería acompetitivo con respecto a B a concentraciones saturantes de [A]. La K_i puede ser evaluada regraficando (la pendiente $1/A$ contra $[I]$).

Si suponemos que el inhibidor se une a la forma reducida de la enzima F. La secuencia de reacciones son:



Por lo que la $K_{mB}[A]$ se multiplica por $(1 + [I]/K_i)$. Las ecuaciones resultantes son simétricas con las ecuaciones 2, 3 y 4. El inhibidor sería competitivo con respecto a B y no competitivo con respecto a A.

Anexo B:

El "bootstrap" es un método estadístico que requiere cálculos masivos por computadora para evaluar la precisión (desviación estándar) de algunas estimaciones o la distribución muestral de estas estimaciones. En particular se usa en problemas no paramétricos (que son aquellos en los que no se conoce la distribución de los datos o no se supone una distribución de los mismos) o donde los métodos paramétricos son imprácticos. El bootstrap, consiste en remuestrear (tomar una submuestra de la muestra) los datos para construir una serie de datos artificiales a los cuales se les puede determinar la distribución y la desviación estándar, a través de su histograma, su media y su varianza. (Diaconis, P y Efron, B., 1983).

REFERENCIAS

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J. Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D.J. (1997). Gapped Blast and PSI-BLAST: a New Generation of Protein Database Search Programs. *Nucleic. Acid. Res.* 25:3389:3402.
- Bakker, B.M., Bro, C, Kötter, P, Luttk, M, Van Dijken, J.P. y Pronk, J.T. 2000. The Mitochondrial Alcohol Dehydrogenase Adh3p Is Involved in a Redox Shuttle in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 182:4730-4737.
- Bergsma, J., Van Dongen, M.B.M. y Konings, W.N. 1982. Purification and Characterization of NADH Dehydrogenase from *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.* 128:151-157.
- Björklöf, K., Zichermann, V. y Finel, M. 2000. Purification of the 45 kDa, Membrane Bound NADH Dehydrogenase of *Escherichia coli* (NDH-2) and Analysis of its Interaction with Ubiquinone Analogues. *FEBS Lett.* 467:105-110.
- Boeker, E.A. 1984. Integrated Rate Equations for Enzyme-Catalysed First-Order and Second-Order Reactions. *Biochem. J.* 223:15-22.
- Böhni, P.C., Daum, G. y Schatz, G. 1983. Import of Proteins into Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 258:4937-4943.
- Bradford, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding Academic Press, New York, 1976.
- Cobley, J.G., Grossman, S. y Singer, T.P. 1975. Piericidin A Sensitivity, Site 1 Phosphorylation, and Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Dehydrogenase during Iron-limited Growth of *Candida utilis*. *J. Biol. Chem.* 250:211-217.
- Cook, N.D. y Cammack, R. 1984. Purification and Characterization of Rotenone-Insensitive NADH Dehydrogenase of Mitochondria from *Arum maculatum*. *Eur. J. Biochem.* 141: 573-577.
- Cook-Johnson, R.J., Zhang, Q., Wiskich, J.T. y Soole, K.L. 1999. The Nuclear Origin of the Non-Phosphorylating NADH Dehydrogenases of Plant Mitochondria. *FEBS Lett.* 454:37-41.
- Cottingham, I.R. y Moore, A.L. 1984. Partial Purification and Properties of the External NADH Dehydrogenase from Cuckoo-pint (*Arum maculatum*) Mitochondria. *Biochem. J.* 224:171-179.

- Cottingham, I.R., Cleeter, M.W.J., Ragan, C.I. y Moore, A.L. 1986. Immunological Analysis of Plant Mitochondrial NADH Dehydrogenases. *Biochem. J.* 236:201-207.
- Curtis, W. y McAlister-Henn, L. 1998. Identification of a Cytosolically Directed NADH Dehydrogenase in Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 180: 4051-4055.
- Day, D.A. Price, G.D. y Gresshoff, P.M. 1986. Isolation and Oxidative Properties of Mitochondria and Bacteroids from Soybean Root Nodules. *Protoplasma.* 134:121-129.
- Degli-Esposti, M. 1998. Inhibitors of NADH-Ubiquinone Reductase: an Overview. *Biochim. Biophys. Acta.* 1364: 222-235.
- Djavadi, F.H.S., Moradi, M. y Djavadi-Ohanian, L. 1980. Direct Oxidation of NADPH by Submitochondrial Particles from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 107:501-504.
- De Kloet, S.R., Van Wermeskerken, R.K.A y Konigsberger, V.V. 1961. Studies on Protein Synthesis by Protoplasts of *Saccharomyces carlsbergensis*. I. The Effect of Ribonuclease on Protein Synthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 47:138-143.
- Deléage, G. y Roux, 1987. An Algorithm for Protein Secondary Structure Prediction Based on Class Prediction. *Protein. Eng.* 1:289-294.
- De Vries, S. y Grivell, A. 1988. Purification and Characterization of a Rotenone-Insensitive NADH:Q₆ Oxidoreductase from Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 176:377-384.
- De Vries, S., Van Witzenburg, R., Grivell, L.A. y Marres, C.A.M. 1992. Primary structure and import pathway of the rotenone-insensitive NADH-ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J Biochem.* 203:587-592.
- Diaconis, P y Efron, B. 1983. Computer-Intensive Methods in Statistics. *Sci. Amer.* 248:116-130.
- Djavadi, F.H.S., Moradi, M y Djavadi-Ohanian, L. 1980. Direct Oxidation of NADPH by Submitochondrial Particles from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 107:501-504.
- Duggleby, R.G. 1984. Regression Analysis of Nonlinear Arrhenius Plots: an Empirical Model and a Computer Program. *Comput. Biol. Med.* 14:447-455.

- Duggleby, R.G. y Wood, C. 1989. Analysis of Progress Curves for Enzyme-Catalysed Reactions. *Biochem. J.* 258:397-402.
- Dutton, P.L., Moser, C.C., Sled, V.D., Daldal, F. y Ohnishi, T. 1998. A Reductant-Induced Oxidation Mechanism for Complex I. *Biochim. Biophys. Acta.* 1364:245-257.
- Friedrich, T., Weidner, U., Nehls, U., Fecke, W., Schneider, R y Weiss, H. 1993. Attempts to Define Distinct Parts of NADH:Ubiquinone Oxidoreductase (Complejo I). *J. Bioenerg. Biomembr.* 25:331-337.
- Friedrich, T. y Weiss, H. 1997. Modular Evolution of the Respiratory NADH:Ubiquinone Oxidoreductase and the Origin of its Modules. *J. Theor. Biol.* 187:529-540.
- Frishman, D. y Argos, P. (1997). 75% Accuracy in Proteins Secondary Structure Predictions. *Proteins.* 27:329-335.
- Geourjon, C. y Deleage, G. 1995. SOPMA: Significant Improvements in Protein Secondary Structure Prediction by Consensus Prediction from Multiple Alignments. *Comput. Appl. Biosci.* 11:681-684.
- Gibrat, J.F., Garnier, J. y Robson, B. 1987. Further Developments of Protein Secondary Structure Prediction Using Information Theory. New Parameters and Consideration of Residue Pairs. *J. Mol. Biol.* 198:425-443.
- Grandier-Vazeille, X., Bathany, K., Chaignepain, S., Cammougrand, N., Manon, S. y Schmitter, J.M. 2001. Yeast Mitochondrial Dehydrogenases Are Associated in a Supramolecular Complex. *Biochemistry.* 40:9758-9769.
- Grigorieff, N. 1998. Three-Dimensional Structure of Bovine NADH:Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I) at 22 Å in Ice. *J. Mol. Biol.* 277:1033-1046.
- Guénebaut, V., Vicentelli, R., Mills, D., Weiss, H. y Leonard, K.R. 1997. Three Dimensional Structure of NADH-Dehydrogenase from *Neurospora crassa* by Electron Microscopy and Conical Tilt Reconstruction. *J. Mol. Biol.* 265:409-418.
- Guénbaut, V., Schitt, A., Weiss, H., Leonard, K. y Friedrich, T. 1998. Consistent Structure between Bacterial and Mitochondrial NADH:Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I). *J. Mol. Biol.* 276:105-112.
- Guérin, B., Labbe, P y Somlo, M. Preparation of Yeast Mitochondria (*Saccharomyces cerevisiae*) with Good P/O and Respiratory Control Ratios. *Methods Enzymol.* Vol. LV. Academic Press, New York, 1979.

- Guex, 1999. Protein Modeling for All. TIBS. 24:364-367.
- Hisae, N., Aizawa, K., Koyama, N., Sekiguchi, T. y Nosoh, Y. 1983. Purification and Properties of NADH Dehydrogenase from an alkalophilic *Bacillus*. Biochim. Biophys. Acta. 743:232-238.
- Hochstein, L.I. 1975. Studies of a Halophilic NADH Dehydrogenase. II: Kinetic Properties of the Enzyme in Relation to Salt Activation. Biochim. Biophys. Acta. 403:58-66.
- Holloway, P.W. 1973. A Simple Procedure for Removal of Triton X-100 from Protein Samples. Anal. Biochem. 53: 304-308.
- Horne, T.J., Hollomon, D.W. y Wood, P.M. 2001. Fungal Respiration: a Fusion of Standard and Alternative Components. Biochim. Biophys. Acta. 1504: 179-195.
- Imagawa, T y Nakamura, T. 1978. Properties and Kinetics of Salt Activation of a Membrane-Bound NADH Dehydrogenase from a Marine Bacterium *Photobacterium phosphoreum*. J. Biochem. 84:547-557.
- Kawada, N., Takeda, K. y Nosoh, Y. 1981. Effect of Lipids on a Membrane-Bound NADH Dehydrogenase from *Bacillus caldotenax*. J. Biochem. 89: 1017-1027.
- Kerscher, S.J., Okun, J.G. y Brandt, U. 1999. A Single External Enzyme Confers Alternative NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Activity in *Yarrowia lipolytica*. J. Cell. Science. 112: 2347-2354.
- Kim, Y.J., Song, K. y Rhee, S. 1995. A Novel Aerobic Respiratory Chain-Linked NADH Oxidase System in *Zymomonas mobilis*. J. Bacteriol. 177: 5176-5178.
- Kitajima-Ihara, T. y Yagi, T. 1998. Rotenone-Insensitive Internal NADH-Quinone Oxidoreductase of *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondria: The Enzyme Expressed in *Escherichia coli* Acts as a Member of the Respiratory Chain in the Host Cells. FEBS Lett. 421:37-40.
- Kromer, S., Hianning, I., y Heldt, H, W. 1992. In Molecular Biochemical and Physiological aspects of Plant Respiration. (Lambers, H. y Van Der Plas, L.H.W., eds.), SPB Academic Publishing, The Hague, pp. 167-176.
- Kuonen, D.R., Roberts, P.J. y Cottingham, I.R. 1986. Purification and Analysis of Mitochondrial Membrane Proteins on Nondesaturating Gradient Polyacrilamide Gels. Anal. Biochem. 153:221-226.

- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Levin, J.M., Robson, B. y Garnier, J. 1986. An Algorithm for Secondary Structure Determination in Proteins Based on Sequence Similarity. *FEBS Lett*. 205:303-308.
- Lévy, D., Bluzat, A., Seigneuret, M. y Rigaud, J.L. 1990. A Systematic Study of Liposome and Proteoliposome Reconstitution Involving Bio-Bed-mediated Triton X-100 Removal. *Biochim. Biophys. Acta*. 1025:179-190.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem*. 193:265-275.
- Luttik, M.A.H., Overkamp, K.M., Kötter, P., de Vries, S., van Dijken, J.P. y Pronk, J.T. 1998. The *Saccharomyces cerevisiae* NDE1 y NDE2 Genes Encode Separate Mitochondrial NADH Dehydrogenases Catalyzing the Oxidation of Cytosolic NADH. *J. Biol. Chem*. 273:24529-24534.
- MaLellan, T. 1982. Electrophoresis Buffers for Polyacrylamide Gels at Various pH. *Anal. Biochem*. 126: 94-99.
- Mains, I., Power, D.M. y Thomas, E.W. 1980. Purification of an NADH-(Dichlorophenol-Indophenol) Oxidoreductase from *Bacillus stearothermophilus*. *Biochem. J*. 191: 457-465.
- Marres, C.A.M., de Vries, S. y Grivell, L.A. 1991. Isolation and Inactivation of the Nuclear Gene Encoding the Rotenone-Insensitive Internal NADH:Ubiquinone Oxidoreductase of Mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem*. 195: 857-862.
- Matsuo, M., Endo, T. y Asada, K. 1998. Isolation of a Novel NAD(P)H-Quinone Oxidoreductase from the Cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *Plant Cell Physiol*. 39: 751-755.
- Melo, A.M., Roberts, T.H. y Møller, I.M. 1996. Evidence for the Presence of Two Rotenone-Insensitive NAD(P)H Dehydrogenases on the Inner Surface of the Inner Membrane of Potato Tuber Mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*. 1276:133-139.
- Menz, R.I. y Day, D. 1996. Purification and Characterization of a 43-kDa Rotenone-Insensitive NADH Dehydrogenase from Plant Mitochondria. *J. Biol. Chem*. 271:23117-23120.

- Moore, A.L. y Siedow, J.N. 1991. The Regulation and Nature of the Cyanide-Resistant Alternative Oxidase of Plant Mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1059:121-140.
- Ohnishi, T. 1973. Mechanism of Electron Transport and Energy Conservation in the Site I Region of the Respiratory Chain. *Biochim. Biophys. Acta.* 301:105-128.
- Peitsch, M.C. 1995. ProMod: Automated Knowledge-Based Protein Modeling Tool. *PDB Quarterly Newsletter* 72:4.
- Rasmusson, A.G., Fredlund, K.M. y Møller, I.M. 1993. Purification of a Rotenone-Insensitive NAD(P)H Dehydrogenase from the Inner Surface of the Inner Membrane of Red Beet Root Mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1141:107-110.
- Rasmusson, A.G., Heiser, V., Zabaleta, E. y Brennicke, A. 1998. Physiological, Biochemical and Molecular Aspects of Mitochondrial Complex I in Plants. *Biochim. Biophys. Acta.* 364:101-111.
- Rasmusson, A.G., Svensson, A.S., Knoop, V., Grohmann, L. Y Brennicke, A. 1999. Homologues of Yeast and Bacterial Rotenone-Insensitive NADH Dehydrogenase in Higher Eukaryotes: Two Enzymes are Present in Potato Mitochondria. *Plant. J.* 20:79-87.
- Rich, P.R., Meunier, B. y Bruce Ward, F. 1995. Predicted Structure and Possible Ionmotive Mechanism of the Sodium-Linked NADH-Ubiquinone Oxidoreductase of *Vibrio alginolyticus*. *FEBS Lett.* 375:5-10.
- Roberts, T.H., Fredlund, K.M. y Møller, I.M. 1995. Direct Evidence for the Presence of Two External NAD(P)H Dehydrogenases Coupled to the Electron Transport Chain in Plant Mitochondria. *FEBS, Lett.* 373:307-309.
- Rost, B. y Sander, C. 1994. Combining Evolutionary Information and Network Predict Protein Secondary Structure. *Proteins.* 19: 55-72.
- Rychter, A.M., Chauveau, M., Bomsel, J.-L., y Lance, C. 1992. The Effect of Phosphate Deficiency on Mitochondrial Activity and Adenylate Levels in Bean Roots. *Physiol. Plant.* 84:80-86.
- Schägger, H. 1991. Blue Native Electrophoresis for Isolation of Membrane Protein Complexes in Enzymatically Active Form. *Anal. Biochem.* 199: 223-231.
- Scheibel, T., Bell, S. y Walke, S. 1997. *Saccharomyces cerevisiae* and Sulfur: a Unique Way to Deal with the Environment. *FASEB. J.* 11:917-921.

- Segel, I.H. 1993. "Enzyme Kinetics". pp. 623-625. Wiley Interscience, New York.
- Selwyn, M.J. 1965. A Simple Test for Inactivation of an Enzyme during Assay. *Biochim. Biophys. Acta.* 105: 193-195.
- Seo, B.B. y col. 1998. Molecular Remedy of Complex I Defects: Rotenone-Insensitive Internal NADH-Quinone Oxidoreductase of *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondria Restores the NADH oxidase Activity of Complex I-Deficient Mammalian Cells. *Biochemistry.* 95:9167-9171.
- Seo, B.B., Matsuno-Yagi, A y Yagi, T. 1999. Modulation of Oxidative Phosphorylation of Human Kidney 293 Cells by Transfection with the Internal Rotenone-Insensitive NADH-Quinone Oxidoreductase (ND11) Gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1412:56-65.
- Soole, K., Dry, I.B. James, A.T. y Wiskich, J.T. 1990. The Kinetics of NADH Oxidation by Complex I of Isolated Plant Mitochondria. *Physiol. Plant.* 80:75-82.
- Small, W.C. y McAlister-Henn, L. 1998. Identification of a Cytosolically Directed NADH Dehydrogenase in Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 180:4051-4055.
- Trost, P., Bonora, P., Scagliari, S. Y Pupillo, P. 1995. Purification and Properties of NAD(P)H: (Quinone-Acceptor) Oxidoreductase at Sugarbeet Cells. *Eur. J. Biochem.* 234:452-458.
- Venduyn, C., Postman, E., Scheffers, W.A. y Van Dijken, J.P. 1992. Effects of Benzoic Acid on Metabolic Fluxes in Yeasts: a Continuous Culture Study on the Regulation of Respiration and Alcoholic Fermentation. *Yeast.* 8:501-517.
- Venugopal, K.S. y Adiga, P.R. 1980. Artfactual Staining of Proteins on Polyacrilamide Geles by Nitrobluetetrazolium Chloride and Phenazine Methosulfate. *Anal. Biochem.* 101:215-220.
- Videira, A. 1998. Complex I from the Fungus *Neurospora crassa*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1364:89-100.
- Wakao, H., Wakagi, T. y Oshima, T. 1987. Purification and Properties of NADH Dehydrogenase from a Thermoacidophilic Archaeobacterium, *Sulfolobus acidocaldarius*. *J. Biochem.* 102:255-262.
- Walsh, K.A.J., Daniel, R.M. y Morgan, H.W. 1983. A Soluble NADH Dehydrogenase (NADH: Ferricyanide Oxidoreductase) from *Thermus aquaticus* strain T351. *Biochem. J.* 209:427-433.

- Weidner, U., Geier, S., Ptock, A., Friedrich, T., Leif, H. y Weiss, H. 1993. The Gene Locus of the Proton-Translocating NADH:Ubiquinone Oxidoreductase in *Escherichia coli*: Organization of the 14 Genes and Relationship between the Derived Proteins and Subunits of mitochondrial Complex I. *J. Mol. Biol.* 233:109-122.
- Weiss, H., Friedrich, T., Hofhaus, G. y Preis, D. 1991. The Respiratory-Chain NADH Dehydrogenase (Complex I) of Mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 197:563-576.
- Wierenga, R.K., Terpstra, P y Hol, W.G.J. 1986. Prediction of the Occurrence of the ADP-Binding $\beta\alpha\beta$ -Fold in Proteins, Using an Amino Acid Sequence Fingerprint. *J. Mol. Biol.* 187:101-107.
- Xu, X., Kanaya, S., Koyama, N., Sekiguchi, T., Nosoh, Y., Ohashi, S. y Tsuda, K. 1985. Tryptic Digestión of NADH Dehydrogenase from Alkalophilic *Bacillus*. *J. Biochem.* 105: 626-632.
- Yagi, T. 1988. Purification and Characterization of Two Types of NADH-Quinone Reductase from *Thermus thermophilus* HB-8. *Biochem.* 22:2008-13.
- Yagi, T. 1991. Bacterial NADH-Quinone Oxidoreductases. *J. Bioenerg. Biomembr.* 23: 211-225.
- Young, I.G., Rogers, B.L., Campbell, H.D., Jaworowski, A. y Shaw, D.C. 1981. Nucleotide Sequence Coding for the Respiratory NADH Dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 116:165-170.



Kinetic Characterization of the Rotenone-Insensitive Internal NADH: Ubiquinone Oxidoreductase of Mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Isabel Velázquez¹ and Juan Pablo Pardo²

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-159, 04510 México, DF, México

Received October 16, 2000, and in revised form January 4, 2001; published online April 5, 2001

Saccharomyces cerevisiae mitochondria contain an NADH:Q₆ oxidoreductase (internal NADH dehydrogenase) encoded by NDI1 gene in chromosome XIII. This enzyme catalyzes the transfer of electrons from NADH to ubiquinone without the translocation of protons across the membrane. From a structural point of view, the mature enzyme has a single subunit of 53 kDa with FAD as the only prosthetic group. Due to the fact that *S. cerevisiae* cells lack complex I, the expression of this protein is essential for cell growth under respiratory conditions. The results reported in this work show that the internal NADH dehydrogenase follows a ping-pong mechanism, with a K_m for NADH of 9.4 μ M and a K_m for oxidized 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP) of 6.2 μ M. NAD⁺, one of the products of the reaction, did not inhibit the enzyme while the other product, reduced DCPIP, inhibited the enzyme with a K_i of 11.5 μ M. Two dead-end inhibitors, AMP and flavone, were used to further characterize the kinetic mechanism of the enzyme. AMP was a linear competitive inhibitor of NADH ($K_i = 5.5$ mM) and a linear uncompetitive inhibitor of oxidized DCPIP ($K_i = 11.5$ mM), in agreement with the ping-pong mechanism. On the other hand, flavone was a partial inhibitor displaying a hyperbolic uncompetitive inhibition regarding NADH, and a hyperbolic noncompetitive inhibition with respect to oxidized DCPIP. The apparent intercept inhibition constant ($K_{ii} = 5.4$ μ M) and the slope inhibition constant ($K_{is} = 7.1$ μ M) were obtained by non linear regression analysis. The results indicate that the ternary complex F-DCPIP_{ox}-flavone catalyzes the reduction of DCPIP, although with lower efficiency. The effect of pH on V_{max} was studied. The V_{max}

profile shows two groups with pK_a values of 5.3 and 7.2 involved in the catalytic process. © 2001 Academic Press

Key Words: mitochondria; inner membrane; NADH dehydrogenase; *Saccharomyces cerevisiae*; flavone; kinetic mechanism.

During mitochondrial respiration the electrons of NADH are transferred to ubiquinone in the respiratory chain. In most mitochondria this process is catalyzed by complex I, a multimeric enzyme composed of at least 43 different subunits, 7 encoded by the mitochondrial DNA and the others by the nuclear genome (1). Complex I contains noncovalent bound FMN and several iron-sulfur clusters as prosthetic groups. More important, this enzyme couples the transfer of electrons from NADH to ubiquinone with the translocation of protons across the membrane, generating a proton electrochemical gradient that is used in the synthesis of ATP (2). In contrast, *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria lack complex I (3). Instead, they contain both external and internal NADH dehydrogenases in their inner membrane that catalyze the transfer of electrons from NADH to ubiquinone without any translocation of protons across the membrane (4).

From a structural point of view, these enzymes are much simpler than complex I. For example, the internal NADH dehydrogenase contains a single subunit of 53,000 Da encoded by the nuclear DNA (5). The subunit is synthesized in cytosolic ribosomes and imported by mitochondria. Translocation of the protein across the inner mitochondrial membrane is associated with the removal of a segment containing the first 26 amino acid residues in the N-terminus end (5). The mature enzyme contains FAD as prosthetic group but no iron-sulfur clusters (5). In contrast with complex I, the

¹ Recipient of a scholarship from Dirección General de Asuntos del Personal Académico

² To whom correspondence should be addressed

internal NADH dehydrogenase is inhibited by flavone but not by rotenone, and the yeast enzyme is a two-electron reaction enzyme, whereas complex I is a one-electron reaction enzyme (6).

Interestingly, a recent work shows that the internal NADH dehydrogenase from *S. cerevisiae* can restore the activity of NADH oxidation in mammal cells containing mitochondria deficient in complex I, opening the possibility of gene therapy (7, 8). Therefore, we considered that it was important to gather structural and kinetic information of this enzyme before it can be used in gene therapy.

In this paper we report the kinetic characterization of the internal NADH dehydrogenase. The enzyme follows a ping-pong mechanism in which NADH first reduces the prosthetic group of the enzyme, FAD, which in turn reduces the second substrate, either a quinone or an artificial acceptor of electrons as DCPIP.³ As expected, AMP was a competitive inhibitor of NADH and uncompetitive inhibitor of DCPIP. Interestingly, flavone behaved as a partial inhibitor.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials

DEAE Bio-gel was obtained from Bio-Rad Blue Sepharose CL-6B was purchased from Pharmacia. The reduced form of β -nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP), adenosine 5'-monophosphate (AMP), 2-phenyl-4*H*-1-benzopyran-4-one (flavone), *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (Hepes), 2-*N*-morpholino-ethanesulfonic acid (Mes), (3-*N*-morpholinopropanesulfonic acid) (Mops) and tris-hydroxymethylaminomethane (Tris-base) were from Sigma Chemical Co. Reduced Triton X-100 was from Aldrich Chemical Co., and Triton X-100, protein grade, was from Calbiochem. All other chemicals were analytical grade. The chemical structure of flavone and other compounds can be obtained at <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>.

Methods

Enzyme purification. The internal NADH dehydrogenase was purified from a wild-type azteca yeast. Cells were grown in the medium described by Kloet and Lots (9) with 2% glucose and 2% lactate as carbon sources. Mitochondria were prepared according to Guérin *et al.* (10). The NADH dehydrogenase was purified as described by Grivell *et al.* (6). Briefly, mitochondria were suspended in buffer A (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.6) to a final protein concentration of 15 mg/ml. The suspension was sonicated and centrifuged at 5000g for 20 min. The mitochondrial pellet was resuspended to a final protein concentration of 15 mg/ml in buffer A containing 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 200 mM of NaCl. The enzyme was solubilized with 0.18% Triton X-100 for 15 min at 4°C under agitation. The suspension was centrifuged at 5000g for 40 min, and the supernatant was dialyzed overnight against 20 vol of 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.002% Triton X-100, pH 7.6 (buffer B). The dialyzed was loaded onto a DEAE Bio-gel column, washed with

elution buffer (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.05% Triton X-100, pH 7.6), and the protein eluted with a linear 0–250 mM NaCl gradient. The fractions containing the activity were dialyzed against 20 vol of buffer B to decrease the concentration of NaCl. The dialyzed was loaded onto the blue Sepharose CL-6B column previously equilibrated in 20 mM Mops-KOH, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.05% Triton X-100, pH 7.6, and the enzyme eluted with a linear 0–1 M NaCl gradient. The peak of enzyme activity was collected and stored at -70°C. In these conditions the enzyme activity was stable for at least 1 year. However, we found some problems with the purification of the enzyme. More than 90% of the activity was lost during the blue Sepharose CL-6B chromatography step, and the preparation still contained several protein contaminants, as detected by polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing conditions. We calculated a 40–50% purity for this preparation (data not shown). Therefore, for some experiments (those described in Figs. 3 and 7) we decided to work with the enzyme eluted from the DEAE Bio-gel column, in spite of its lower purity (3–4%). Control experiments showed that the two preparations displayed the same kinetic constants (K_{NADH} and K_{DCPIP}) and the same general behavior against AMP and flavone (partial inhibition).

pH studies. Initial rates for the reduction of DCPIP by NADH were determined as a function of pH at 25°C. The buffers used were Mes-KOH for the pH range of 5.5 to 6.5, Mops-KOH for pH 6.5 to 7.5 and Hepes-KOH for the pH range of 7.5 to 8.5. The reaction mixture contained 20 mM of the buffer, 1 mM EDTA, and 200 mM KCl in a final volume of 2 ml. The reaction was initiated by the addition of 3–6 μg of the enzyme and the change in absorbance was measured as described below.

Enzyme activity. NADH dehydrogenase activity was measured spectrophotometrically in a 1.0-cm-pathlength cuvette, following either the oxidation of NADH at 340 nm when the second substrate was a quinone or the reduction of DCPIP at 600 nm when DCPIP was used as the second substrate. The reaction mixture contained 20 mM Mops-KOH, 1 mM EDTA, and 200 mM KCl in a final volume of 2 ml. The reaction was started with the enzyme and the initial rate of the reaction was obtained from the slope of the absorbance versus time traces. The first 10–20 s of the reaction were used to calculate the initial rate.

RESULTS

Initial velocity studies. The determination of the kinetic mechanism was the initial step in the structural and kinetic characterization of the internal NADH dehydrogenase of *S. cerevisiae* mitochondria. The enzyme (1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was incubated at pH 7.0 and 25°C with several concentrations of both NADH and DCPIP, and the initial velocities were obtained from the time course of the reduction of DCPIP. This artificial acceptor of electrons was initially selected because of its favorable chemical properties, such as the high solubility in aqueous solution, the high molar extinction coefficient of the reduced form and the strong change in color upon reduction. Figures 1A and 1B show the dependence of the rate on substrate concentrations. The double reciprocal plots appeared to be parallel at low concentration of the varying substrate, but as the concentration of substrate increased, the lines curved upward, displaying inhibition by substrate. As the concentration of the fixed substrate was increased, the inhibition by the varying substrate vanished and the enzyme followed simple Michaelis-Men-

³ Abbreviations used: DCPIP, 2,6-dichlorophenolindophenol; Mes, 2-*N*-morpholinoethanesulfonic acid; Mops, 3-*N*-morpholinopropanesulfonic acid.

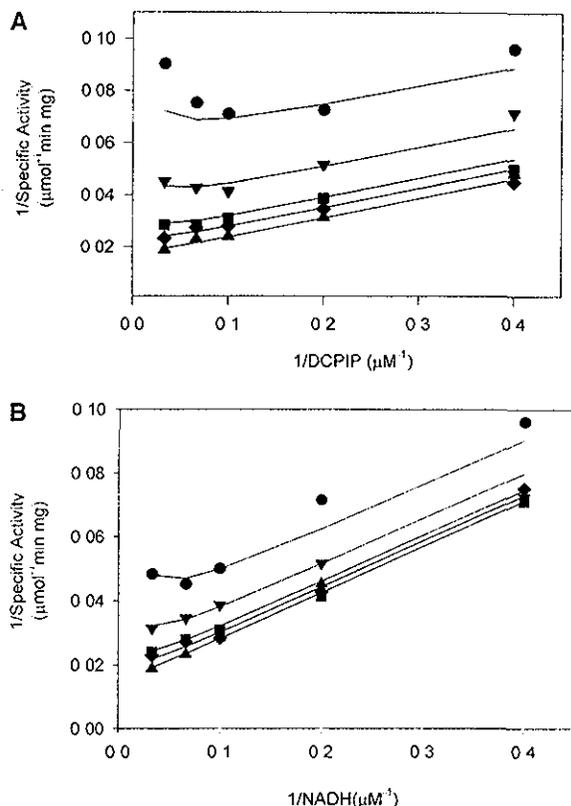


FIG. 1. Effect of NADH and DCPIP on the initial velocity of the internal NADH dehydrogenase of *S. cerevisiae* mitochondria. The enzyme (1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was incubated in 20 mM Mops-KOH buffer, pH 7.0, as described under Experimental Procedures. (A) Double-reciprocal plot of the initial velocity with NADH as the variable substrate. The fixed concentrations of DCPIP were as follows: \bullet 2.5; \blacktriangledown 5; \blacksquare 10; \blacklozenge 15; and \blacktriangle 30 μM . (B) Double-reciprocal plot of the initial velocity with DCPIP as the variable substrate. The fixed concentrations of NADH were \bullet 2.5; \blacktriangledown 5; \blacksquare 10; \blacklozenge 15; and \blacktriangle 30 μM .

ten kinetics. Replots of the reciprocal of V_{\max} against the reciprocal of the fixed substrate displayed a linear relationship (data not shown). We used the following equation to analyze the data by nonlinear regression analysis:

$$v = V_{\max} * A * B / [K_{\text{NADH}} * B(1 + B/K_{\text{iDCPIP}}) + K_{\text{DCPIP}} * A(1 + A/K_{\text{iNADH}}) + A * B]. \quad [1]$$

The mathematical expression describes a bi-bi ping-pong mechanism with substrate inhibition, where A is NADH, B is DCPIP, K_{NADH} and K_{DCPIP} are the Michaelis constants for NADH and DCPIP, respectively, V_{\max} the maximal velocity, and K_{iNADH} and K_{iDCPIP} the inhibition constants for NADH and oxidized DCPIP, respectively. As shown in Figs. 1A and 1B, the model explains the data quite well, as indicated by the good agreement

between the data points and the theoretical curve, as well as the small standard deviation associated with some of the parameters (Table I). The enzyme exhibited a low K_m for both substrates ($K_{\text{NADH}} = 9.4 \pm 1.0 \mu\text{M}$ and $K_{\text{DCPIP}} = 6.2 \pm 0.8 \mu\text{M}$), resulting in a kinetic pattern with a small separation between the lines in the double-reciprocal plot (Figs. 1A and 1B). Although the high standard deviation associated with both inhibition constants ($K_{\text{iNADH}} = 52.5 \pm 28.8 \mu\text{M}$ and $K_{\text{iDCPIP}} = 115.2 \pm 70.3 \mu\text{M}$), may suggest that the model is inadequate, the limited range of substrate concentrations used in the experiment explains well the dispersion.

Dead end and product inhibition studies Although parallel double-reciprocal plots strongly suggested a ping-pong mechanism, the presence of substrate inhibition increased the complexity of the kinetics and raised some doubts about the order of addition of substrates. Therefore, alternative mechanisms were taken into consideration. For example, an ordered bi-bi mechanism with the first substrate having a much smaller dissociation constant than its Michaelis constant (a sticky first substrate) will produce parallel double-reciprocal plots (11). To discriminate between these two mechanisms, we decided to study the inhibition of the enzyme activity by-products and dead-end reversible inhibitors. It is well known that this kind of analysis provides useful information for the determination of the kinetic mechanism of an enzyme catalyzed reaction. First, we tested the products of the reaction, NAD^+ and reduced DCPIP. Surprisingly, NAD^+ did not inhibit the activity of the enzyme, even at concentrations as high as 10 mM, and reduced DCPIP was difficult to work with (data not shown). Consequently, we used AMP as a dead end reversible inhibitor. In contrast with the results obtained with NAD^+ and reduced DCPIP, AMP turned out to be a linear competitive inhibitor of NADH, with a $K_i = 5.5 \pm 0.6 \text{ mM}$ (Fig. 2A and Table II), and a linear uncompetitive inhibitor of the oxidized DCPIP, with a $K_i = 11.5 \pm 0.7 \text{ mM}$ (Fig. 2B and Table II). Replots of the reciprocal of V_{\max} and V_{\max}/K_m against the concentration of AMP displayed a linear relationship (data not shown), indicating a lin-

TABLE I
Apparent Kinetic Constants for the Internal NADH Dehydrogenase

Parameter	Kinetic constants
V_{\max}	$83.6 \pm 4.6 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$
K_{NADH}	$9.4 \pm 1.0 \mu\text{M}$
K_{DCPIP}	$6.2 \pm 0.8 \mu\text{M}$
K_{iNADH}	$52.5 \pm 28.8 \mu\text{M}$
$K_{\text{i(DCIP}^{\text{ox}})}}$	$115.2 \pm 70.3 \mu\text{M}$
$K_{\text{i(DCIP}^{\text{red}})}}$	$14.1 \pm 1.3 \mu\text{M}$

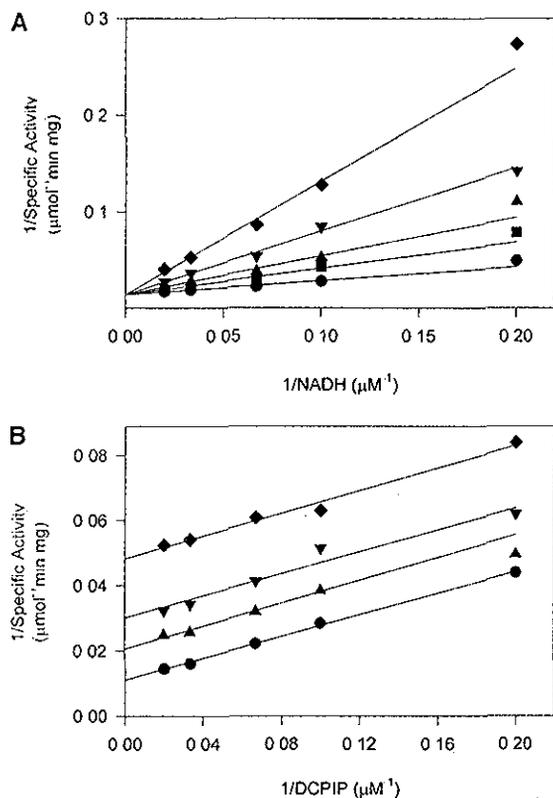


FIG. 2. Inhibition of NADH dehydrogenase by AMP at varying concentrations of NADH or DCPIP. The enzyme (15 $\mu\text{g/ml}$) was incubated in 20 mM Mops-KOH buffer, pH 7.0, in the presence of varying concentrations of AMP and NADH at a fixed concentration of DCPIP (30 μM) or in the presence of varying concentrations of AMP and DCPIP at the fixed concentration of NADH (30 μM). The concentrations of NADH were 5, 10, 15, 30, and 50 μM ; the concentrations of DCPIP were 5, 10, 15, 30, and 50 μM and for AMP the concentrations were \bullet : 0; \blacksquare : 5; \blacktriangle : 10; \blacktriangledown : 20; and \blacklozenge : 40 μM . (A) Double-reciprocal plot of the initial velocity with NADH as the variable substrate (B) Double-reciprocal plot of the initial velocity with DCPIP as the variable substrate.

ear inhibition. In addition, this inhibition pattern allows the identification of the internal NADH dehydrogenase as a ping-pong flavoenzyme mechanism.

In order to get the inhibition constant for the reduced form of DCPIP, we analyzed the time course of product formation and fitted the data to the integrated rate equation of the bi-bi ping-pong mechanism (12). Since NAD^+ had no effect on the activity of the enzyme, any inhibition observed in the curves was associated with the second product, the reduced DCPIP. The enzyme was incubated in the presence of different concentrations of NADH and oxidized DCPIP and the reaction was allowed to proceed for 56 s (Fig. 3). Nonlinear regression analysis of the data was performed as described by Duggleby *et al.*, using the computer programs DNRP53 and AGIRE (13, 14). Global fitting of

TABLE II

Inhibition Patterns and Kinetic Constants for the Inhibition of the Internal NADH Dehydrogenase by AMP and Flavone

Inhibitor	Varied substrate	Fixed substrate	Inhibition type	K_i (\pm SD)
AMP	NADH	DCPIP	Linear, C	5.5 ± 0.6 mM
AMP	DCPIP	NADH	Linear, UC	11.5 ± 0.7 mM
Flavone	NADH	DCPIP	Hyperbolic, UC	5.4 ± 0.6 μM
Flavone	DCPIP	NADH	Hyperbolic, NC	7.1 ± 1.1 μM

Note: C, competitive inhibition; UC, uncompetitive inhibition; NC, noncompetitive inhibition.

the initial rates to the bi-bi ping-pong equation without substrate inhibition,

$$v = V_{\max} * A * B / [K_{\text{DCPIP}} * A + K_{\text{NADH}} * B + A * B], \quad [2]$$

resulted in a K_{NADH} of 14.5 ± 1.7 μM , a K_{DCPIP} of 9.6 ± 1.1 μM , and a V_{\max} of 9.0 ± 0.7 $\mu\text{M mg}^{-1} \text{min}^{-1}$. On the other hand, fitting the time course of product formation to the integrated rate equation of the bi-bi ping-pong mechanism gave essentially the same results: a K_{NADH} of 14.2 ± 0.4 μM , a K_{DCPIP} of 9.1 ± 0.3 μM , a V_{\max} of 9.3 ± 0.3 $\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, and an inhibition constant for reduced DCPIP of 14.1 ± 1.3 μM (Table I). As shown in Fig. 3, there is a good agreement between the experimental points and the theoretical curves. Thus, with this approach it was possible to obtain the inhibition constant associated with the second product, the reduced DCPIP.

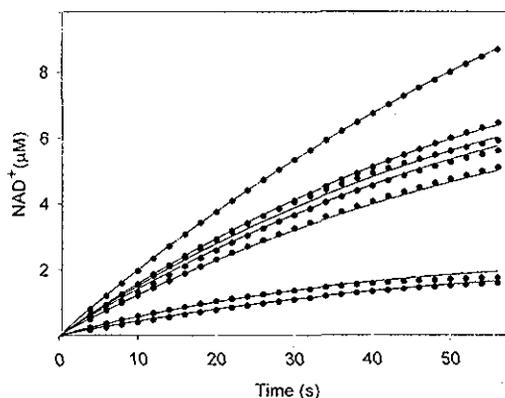


FIG. 3. Time course of product formation by the internal NADH dehydrogenase. The enzyme (3 $\mu\text{g/ml}$) was incubated in the presence of different concentrations of NADH and oxidized DCPIP in 20 mM Mops-KOH buffer, pH 7.0, at 25°C, and the reaction was allowed to proceed for 56 s. The reaction was initiated with the addition of the enzyme and the decrease in absorbance at 600 nm was recorded.

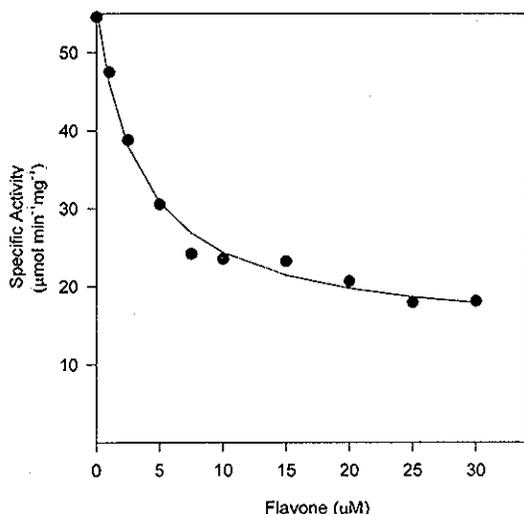


FIG. 4. Effect of flavone on the activity of the internal NADH dehydrogenase of *S. cerevisiae* mitochondria. The enzyme (1.5 µg/ml) was incubated in 20 mM Mops-KOH buffer, 10 mM, pH 7.0, 30 µM NADH, 30 µM DCPIP, and the indicated concentrations of flavone.

Inhibition by flavone. It has been reported that flavone inhibits specifically the activity of the internal NADH dehydrogenase of *S. cerevisiae* mitochondria (6), but it has no effect on complex I. Most of these studies were done on whole mitochondria and the inhibition of the enzyme activity by this compound was not fully characterized. Thus, to learn more about the mechanism of inhibition we decided to study further the inhibition pattern, such that different concentrations of both substrates and the inhibitor were used in the experiments. First, the enzyme was incubated in the presence of saturating concentrations of NADH and DCPIP and different concentrations of flavone. It was found that flavone is a powerful inhibitor of the NADH dehydrogenase decreasing the activity of the enzyme in the micromolar range. Furthermore, a remaining activity was present at saturating concentrations of the inhibitor, pointing to a partial inhibition (Fig. 4).

To get a deeper understanding of the kinetic mechanism of the inhibition by flavone, the enzyme was incubated with different concentrations of flavone, at several fixed concentrations of either NADH or DCPIP, and a constant concentration of the other substrate. Figures 5A and 5B show the inhibition patterns produced by flavone. It was evident that the reciprocal plots were linear for both substrates, but the intercept and slope replots were hyperbolic, indicating partial inhibition (data not show). The inhibition pattern with NADH as the variable substrate showed a family of parallel lines, in agreement with a hyperbolic uncompetitive inhibition. On the other hand, we found a family of intersecting lines when oxidized DCPIP was

the variable substrate, indicating a hyperbolic noncompetitive inhibition. The results suggest that flavone can interact with two forms of the enzyme, F and F-DCPIP, resulting in the production of the binary complex F-flavone or the ternary complex F-DCPIP-flavone. In addition, the results strongly suggest that the ternary complex F-DCPIP-flavone is still able to catalyze the reduction of DCPIP, although with lower efficiency. Values of K_{ii} ($5.4 \pm 0.6 \mu\text{M}$), K_{is} ($7.1 \pm 1.1 \mu\text{M}$), and β (0.11 ± 0.02) were obtained by global fitting of the data displayed in Figs 5A and 5B to the following equation,

$$v = \frac{V_{\max} * (1 + \beta * [I]/K_{ii}) * [A] * [B]}{K_{\text{DCPIP}} * [A] + K_{\text{NADH}} * [B] + [A] * [B] + K_{\text{DCPIP}} * [A] * [I]/K_{is} + K_{\text{NADH}} * \beta * [B] * [I]/K_{ii} + [A] * [B] * [I]/K_{ii}} \quad [3]$$

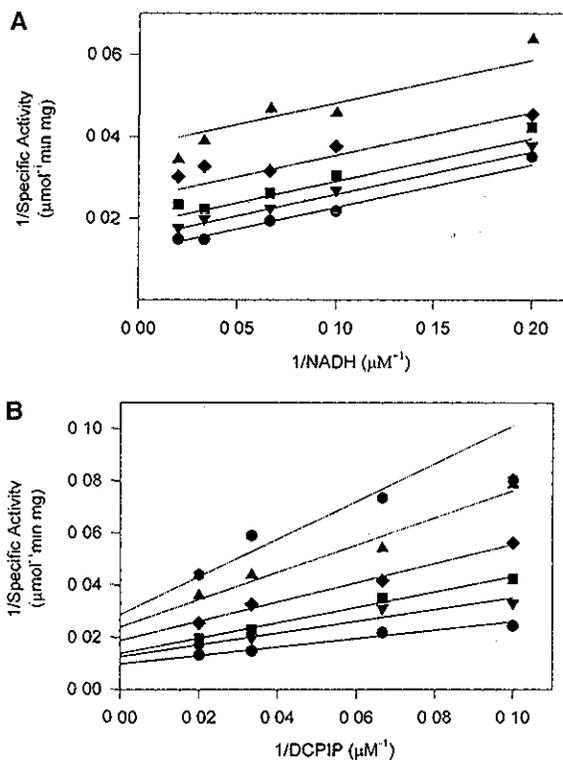


FIG. 5. Inhibition of the internal NADH dehydrogenase by flavone at varying concentrations of NADH and DCPIP. The enzyme (1.5 µg/ml) was incubated in 20 mM of Mops-KOH buffer, pH 7.0, in the presence of varying concentrations of NADH (5, 10, 15, 30, 50 µM) or DCPIP (5, 10, 15, 30, 50 µM) and flavone (● 0; ▼ 2.5; ■ 5; ◆ 10; ▲ 20; and ● 30 µM). The concentration of DCPIP or NADH was fixed at 30 µM (A) Double-reciprocal plot of the initial velocity with NADH as the variable substrate. The concentration of DCPIP was fixed at 30 µM. (B) Double-reciprocal plot of the initial velocity with DCPIP as the variable substrate. The concentration of NADH was fixed at 30 µM.

where V_{max} , K_{NADH} , and K_{DCPIP} were previously defined, βV_{max} represents the maximal velocity at saturating concentrations of the inhibitor, and K_{ii} and K_{is} correspond to the apparent intercept and slope inhibition constants, respectively. Table II summarizes the type of inhibition and the values of the inhibition constants produced by AMP and flavone.

Effect of pH on the stability of the internal NADH dehydrogenase. An important step in the analysis of the behavior of kinetic parameters with pH is the determination of the stability of the enzyme at the selected pH values. In this way, any change in the activity can be ascribed to changes in the values of the V_{max} and not to the pH-dependent inactivation of the enzyme. Therefore, the stability of the enzyme was examined by two different procedures. In the first one, the enzyme (3 $\mu\text{g/ml}$) was preincubated at the desired pH in the absence or presence of NADH, at 25°C in 20 mM buffer. At the indicated times an 80- μl aliquot was withdrawn and diluted in 1 ml of the standard buffer (20 mM Mops-KOH, pH 7.0, 200 mM KCl, and saturating concentrations of NADH and DCPIP) to measure the residual activity. The second procedure was based on the method described by Selwyn (15). The enzyme (1.5–3.75 $\mu\text{g/ml}$) was added to a solution containing 50 μM NADH, 40 μM DCPIP, 20 mM of the buffer adjusted to the desired pH, and 200 mM KCl. The time course of product formation was measured and the data plotted as reported in (15). This method has the advantage of measuring the stability of the enzyme under catalytic conditions, in the presence of substrates and low concentrations of protein.

The results show that the free enzyme and the binary complex E-NADH were highly stable in the pH range from 5.5 to 8.0, maintaining the initial activity after 10 min incubation (data not shown). In addition, Fig. 6 shows that the enzyme is also stable at low protein concentrations and in the presence of both substrates. Maximal stability was observed at pH 5.0 and 6.5, when both curves (20 and 50 μl enzyme) perfectly overlapped, indicating no loss in activity. On the other hand, we found a marginal inactivation at pH 8.5. However, the rate of inactivation at these high and low pH values was too small to affect the measurement of the initial rates in the first 10 s of incubation. Therefore, we concluded that it was safe to assume that the enzyme was stable in the time domain used for the determination of the initial rates.

Effect of pH on the V_{max} of the internal NADH dehydrogenase. In order to obtain the pH profiles for the kinetic parameters and acquire information about the catalytic important groups, the enzyme (1.5–3.0 $\mu\text{g/ml}$) was incubated in 20 mM buffer, in the presence of varying concentrations of NADH and DCPIP, at the indicated pH values. A pH range of 5.5 to 8.0 was used

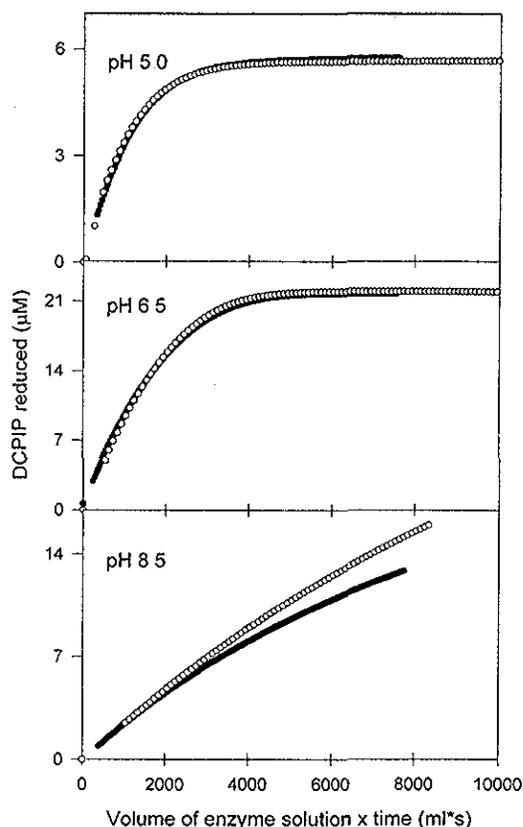


FIG. 6. Effect of pH on the stability of the internal NADH dehydrogenase. The enzyme at two different concentrations (1.5–3 $\mu\text{g/ml}$) was incubated in 20 mM of either Mes-KOH, pH 5.5, Mops-KOH, pH 6.5, or Hepes-KOH, pH 8.5, in the presence of 50 μM NADH and 40 μM DCPIP. The reaction was initiated with the addition of the enzyme and the decrease in absorbance at 600 nm was recorded for 5 min (● 1.5; ○ 0.3 $\mu\text{g/ml}$).

for the characterization, since we found that the enzyme is highly unstable above and below this pH range. Nonlinear regression analysis with Eq. [2] was used to obtain the values of V_{max} , K_{NADH} , and K_{DCPIP} and to obtain the pK_a values of the groups involved in the catalytic process. The following equation was used for the fitting procedure,

$$V_{max\ app} = \frac{V_{max}}{1 + 10^{-pH+pK_1} + 10^{-pK_2+pH}} \quad [4]$$

where pK_1 and pK_2 are the acid dissociation constants of the groups involved in catalysis. The pH profile of V_{max} shows two groups that titrate with a pK_a of 5.3 ± 0.2 in the acidic limb and a pK_a of 7.2 ± 0.1 in the alkaline limb (Fig. 7).

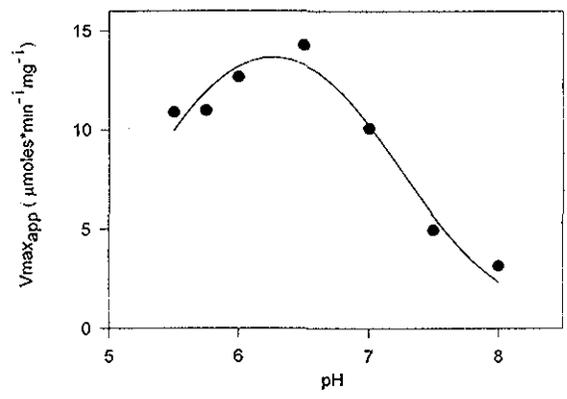


FIG. 7. Effect of pH on the activity of the internal NADH dehydrogenase. The enzyme (1.5–3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was incubated at different pH values in 20 mM of the following buffers: Mes-KOH, pH 5.0–6.5, Mops-KOH, pH 6.5–7.5, or Hepes-KOH pH 7.5–8.5 in the presence of varying concentrations of NADH and DCPIP, and the V_{max} was obtained by nonlinear regression analysis of the data using Eq. [1].

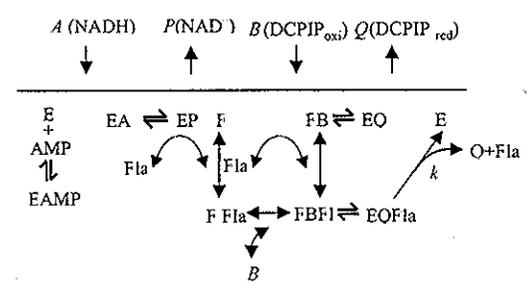
DISCUSSION

Mitochondria of *S. cerevisiae* yeast cells lack complex I but they contain an internal NADH dehydrogenase that catalyzes the oxidation of the NADH in the mitochondrial matrix. The electrons of NADH are transferred to ubiquinone within the membrane. In contrast with complex I, this enzyme is much simpler from a structural point of view and does not pump protons across the membrane. Depending on the culture conditions, this enzyme may or may not be essential for cell growth. Mutants lacking the internal NADH dehydrogenase are unable to grow on highly oxidized carbon sources like acetate and pyruvate, but not on fermentative carbon sources like glucose (4). Under "physiological conditions" this enzyme is expressed when cells change from fermentative to respiratory conditions (4). Interestingly, this enzyme, encoded by NDI1 gene (5), belongs to a growing family of NADH dehydrogenases. Members of this family are found in the plasma membrane of bacteria (16–20), and the internal membrane of fungi (6, 21) and plant (22, 23) mitochondria.

It has been suggested that the internal NADH dehydrogenase from *S. cerevisiae* mitochondria contains either one or two transmembrane segments (21). In support of this notion, it has been reported that the solubilization of some of the enzymes in this family of dehydrogenases requires the addition of detergent (18–20, 23). For other members of the family, the enzyme is released into the supernatant by mild treatments, in the absence of detergents (16, 24). In the case of the *S. cerevisiae* internal NADH dehydrogenase it is likely that the enzyme is loosely associated to the membrane through electrostatic and hydrophobic interac-

tions. Although several algorithms predict either one or two transmembrane segments, a careful analysis of these regions shows an arginine residue in the middle of one of the putative transmembrane segments or several proline residues in the other segment. These segments probably interact with the internal face of the membrane, facilitating the transfer of electrons to the ubiquinone embedded in the lipid phase. In support of this view, we observed that solubilization of the enzyme by 0.18% Triton X-100 requires high concentrations of salt. However, further work is required to solve this problem.

The kinetics of the internal NADH dehydrogenase is consistent with the following scheme,



where NADH binds first to the active site on the free enzyme (E) followed by the transfer of two electrons from NADH to the prosthetic group of the enzyme (FAD), such that the reduced form of the enzyme is produced (F). The enzyme displays high specificity for NADH (neither NADPH nor deamino NADH were oxidized by the enzyme), but accepts different quinones (Q_0 , Q_1 , Q_2) or artificial acceptors of electrons (DCPIP). Interestingly, it seems that NAD^+ does not interact either with the free enzyme (E) or the reduced form of the enzyme (F), since concentrations as high as 10 mM did not affect the activity, such that the release of the first product is an irreversible step in the reaction cycle. This result suggests that electrostatic interactions between the enzyme and the nicotinamide ring of NADH are important for the binding process. In this sense, repulsion of the NAD^+ by a positively charged group at or near the active site could explain the lack of inhibition by NAD^+ . Binding of the second substrate, DCPIP or a quinone, induces the transfer of electrons from FAD to the bound substrate. In contrast with complex I, this enzyme does not generate free radicals during the catalytic cycle, since the reduction of ubiquinone occurs as a two-electron transfer step (6). Analysis of the time course of the reaction showed that the second product, reduced DCPIP, inhibited the enzyme with a K_i of 14.1 μM . In agreement with the proposed ping-pong mechanism, AMP (an NADH analog) was a linear competitive inhibitor of NADH and a linear uncompetitive inhibitor of DCPIP, and flavone was a par-

tial inhibitor. Careful characterization of this inhibition showed that flavone (Fla) is a hyperbolic uncompetitive inhibitor of NADH and a hyperbolic noncompetitive inhibitor of DCPIP. The partial inhibition exerted by flavone was also observed in the presence of ubiquinone (Q₁, Q₂) as substrate (data not shown). Furthermore, the partial inhibition is not an artifact of the purification, since it is still observed in intact mitochondria. This was clearly shown in HEK 293 cells transfected with the internal NADH dehydrogenase gene (25). Addition of an excess of flavone (500 μM) to digitonin-permeabilized transfected HEK 293 cells incubated in the presence of glutamate plus malate inhibited the consumption of oxygen by 80%, leaving a remaining activity of 20% of the initial activity (25). In contrast, the addition of 5 μM antimycin A inhibited completely the respiratory activity (25). Similar results were obtained in mitochondria isolated from *S. cerevisiae* cells. Addition of up to 200 μM flavone to yeast mitochondria incubated in the presence of ethanol (to reduce the NAD⁺ in the mitochondrial matrix) resulted in partial inhibition of the oxygen consumption (data not shown).

Finally, to get information about the amino acid residues involved in the catalytic process we studied the dependence of the kinetic parameter V_{max} on pH. The pH profile of V_{max} showed the contribution of one group titrating with pK_a of 5.3 and a second ionizable group with a pK_a of 7.2 (V_{max}). Independent experiments showed that DCPIP deprotonates with a pK_a of 5.8, suggesting that the group associated with the acidic limb in the V_{max} might belong to DCPIP. Thus, deprotonation of this group in the active site of the enzyme will inhibit the transfer of electrons from FAD to DCPIP_{ox}. If this is correct, binding of DCPIP_{ox} to the reduced form of the enzyme does not affect the pK_a of this ionizable group. The pK_a of 7.2 also suggests the involvement of a histidine residue in the catalytic. Although preliminary results showed irreversible inactivation of the enzyme by diethylpyrocarbonate (a histidine specific reagent), further work is required for the identification of the residues involved in the pH profiles.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Dr. Rafael Villalobos for reviewing the manuscript. This work was partially supported by Grant IN200897 from Dirección General de Asuntos del Personal Académico.

REFERENCES

- 1 Grigorieff, N. (1998) *Curr Opin Struct Biol* **9**, 476-483.
- 2 Dutton, P. L., Moser, C. C., Sled, V. D., Daldal, F., and Ohmishi, T. (1988) *Biochim Biophys Acta* **1365**, 245-257.
- 3 De Vries, S., and Marres, C. A. M. (1987) *Biochim Biophys Acta* **895**, 205-239.
- 4 Marres, C. A. M., De Vries, S., and Grivell, L. A. (1991) *Eur J Biochem* **195**, 857-862.
- 5 De Vries, S., Van Witzenburg, R., Grivell, L. A., and Marres, C. A. M. (1992) *Eur J Biochem* **203**, 587-592.
- 6 De Vries, S., and Grivell, L. A. (1988) *Eur. J. Biochem* **176**, 377-384.
- 7 Kitajima-Ihara, T., and Yagi, T. (1998) *FEBS Lett* **421**, 37-40.
- 8 Seo, B. B., Kitajima-Ihara, T., Chan, E. K. L., Scheffler, I. E., Matsuno Yagi, A., and Yagi, T. (1998) *Proc Natl. Acad Sci USA* **95**, 9167-9171.
- 9 Kloet, S. R., Van Wermeskerken, R. K., and Koningsberger, V. V. (1996) *Biochim Biophys Acta* **47**, 138-143.
- 10 Guérin, B., Labbe, P., and Somlo, M. (1979) *Methods Enzymol* **55**, 149-163.
- 11 Segel, I. H. (1993) "Enzyme Kinetics," pp 623-625. Wiley-Interscience, New York.
- 12 Boeker, E. A. (1984) *Biochem J* **223**, 15-22.
- 13 Duggleby, R. G. (1984) *Comput Biol Med* **14**, 447-455.
- 14 Duggleby, R. G., and Wood, C. (1989) *Biochem J* **258**, 397-402.
- 15 Selwyn, M. J. (1965) *Biochim Biophys Acta* **105**, 193-195.
- 16 Hochstein, L. I., and Dalton, B. P. (1968) *J. Bacteriol.* **95**, 37-42.
- 17 Hochstein, L. I. (1975) *Biochim Biophys Acta* **403**, 58-66.
- 18 Imagawa, T., and Nakamura, T. (1978) *J. Biochem* **84**, 547-557.
- 19 Jaworowski, A., Mayo, G., Shaw, D. C., Campbell, H. D., and Young, I. G. (1981) *Biochemistry* **20**, 3621-3628.
- 20 Kawada, N., Takeda, K., and Nosoh, Y. (1981) *J. Biochem* **89**, 1017-1027.
- 21 Melo, A. M. P., Duarte, M., and Videira, A. (1999) *Biochim Biophys Acta* **1412**, 282-287.
- 22 Menz, R. I., and Day, D. A. (1996) *J. Biochem Chem* **271**, 23117-23120.
- 23 Jaworowski, A., Campbell, H. D., Poulis, M. I., and Young, I. G. (1981) *Biochemistry* **20**, 2041-2047.
- 24 Rasmusson, A. G., Fredlund, K. M., and Moller, I. M. (1993) *Biochim Biophys Acta* **1141**, 107-110.
- 25 Seo, B. B., Matsuno-Yagi, A., and Yagi, T. (1999) *Biochim. Biophys Acta* **1412**, 56-65.