



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

PURIFICACION Y CARACTERIZACION CINETICA
DE LAS DESHIDROGENASAS LACTICAS
MITOCONDRIALES DE *Euglena gracilis*

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

QUIMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA:

ISRAEL GARCIA CANO



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2005

m341944



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 M. en C. Raúl Aguilar Caballero
VOCAL M. en C. Elpidio García Ramírez
SECRETARIO Dr. Ricardo Jasso Chávez
1er SUPLENTE Dr. Ismael Bustos Jaimes
2do SUPLENTE M. en C. Nora Andrea Gutiérrez Nájera

El trabajo se desarrolló en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de
Cardiología "Ignacio Chávez".



ASESOR: Dr. Ricardo Jasso Chávez



SUSTENTANTE: Israel García Cano

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: ISRAEL GARCÍA CANO

FECHA: 11 - MARZO - 2005

FIRMA: 

DEDICATORIA

A mis padres:

Alfonso y Lidia

por que me han heredado el tesoro más valioso que puede dársele a un hijo: amor; por que sin escatimar esfuerzo alguno, han sacrificado gran parte de su vida para formarme y educarme; por que nunca podré pagar todos sus desvelos ni aún con las riquezas más grandes del mundo.

A mis hermanos:

Isai, Aramis y Daniel

por su ejemplo de superación incansable, por su comprensión y confianza, porque gracias a su apoyo y consejos he llegado a realizar una de mis más grandes metas.

con amor, admiración y respeto. LOS AMO

AGRADECIMIENTOS

A Dios, sobre todas las cosas.

A Ricardo Jasso, por que todo lo que sé ahora te lo debo a ti, por toda la paciencia que has tenido conmigo, por todo el tiempo dedicado, por que siempre das lo mejor de ti, porque sabes escuchar y brindar ayuda cuando es necesario, por ser un gran amigo y porque te has ganado mi cariño, admiración y respeto.

Al Dr. Rafael Moreno, por brindarme su confianza y apoyo y sobre todo por el tiempo dedicado.

A todos mis amigos, con los que compartí alegrías y tristezas, esto es un pequeño homenaje por todos los días que me soportaron, de verdad mil gracias: Erika (Pato), Diana (Babuchis), Mago (Barney), Claudia (Claus), Griselda (Gris T), Susana (Gusa), Dulce (Pollo), Edgar (?), Belem (Choco), Cristian (Pica), Aldo (?), Amilcar (Albóndiga), José Carlos (Batiz), Luis, José Luis, Pedro y como olvidar a mis grandes amigos, Eduardo (Lalo), Cristian (Chacho), Oscar (Gordo), Jesús (Chuchin), Diego, Braulio (Merce) y Mateo. Gracias por lo que hemos logrado.

A mis abuelitos, Aurelio, Benita, Conchita por todos los consejos y por estar conmigo. Vicente por que siempre te llevo conmigo.

A mi tío Vicente, por tus palabras y sabios consejos, mi trofeo es también tuyo.

A Diana I. Rocha, por que eres el motivo mas grande que me ha impulsado para lograr esta meta, por soportarme, por tu tiempo... como expresar todo lo que siento por ti, TE AMO.

A Erika Pineda, por tu amistad incondicional, por tu coraje que siempre has demostrado, por el gran apoyo brindado durante estos años, te admiro, te respeto y TE QUIERO.

A todos mis tíos y primos, por confiar en mí desde un principio.

A todos mis amigos y compañeros de laboratorio, David, Jimena, Norma, Alvaro, Rusely, José Salud, Eduardo, Fernando Ibarra, Oralia, Sara, Luz, gracias por su amistad y compañerismo.

A todo mi jurado, por su valiosa asesoría y confianza depositada en este trabajo.

A los que se me olvida mencionar pero que han ayudado de alguna manera a realizar mi sueño.

A la UNAM y la Facultad de Química, por ser mi segunda casa y por el ORGULLO de ser universitario.

GRACIAS.

INDICE

	Página
Resumen	1
Introducción	3
I. Complejos de la cadena respiratoria	3
I 1. Complejo I	3
I 2. Complejo II	4
I 3. Complejo III	5
Esquema I	6
I 4. Complejo IV	7
Esquema II	9
II. Acarreadores de electrones de las cadenas respiratorias	10
II 1. Nucleótidos de flavina	10
II 2. Quinonas	11
II 3. Citocromos	13
II 4. Centro Fe-S	14
III. Lactato deshidrogenasas independientes de piridín nucleótidos en procariontes	16
III 1. Lactato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ (NAD^+ -LDH)	16
III 2. Lactato deshidrogenasa independiente de NAD^+ (iLDH)	17
Tabla I	21
IV. Lactato deshidrogenasas independientes de piridín nucleótidos en eucariontes	22
V. Lactato deshidrogenasas independientes de piridín nucleótidos en <i>Euglena gracilis</i>	22
Tabla II	24
VI. Cofactores de las iLDH	24
Esquema III	25
VII. Antecedentes	25
Hipótesis	27
Objetivos	27
VIII. Materiales y métodos	28
VIII 2. Cultivo de células	28
VIII 4. Curva de crecimiento	28

VIII 5. Aislamiento de mitocondrias	29
VIII 6. Ensayos enzimáticos	29
VIII 7. Efecto del pH sobre la actividad de la D-iLDH y L-iLDH	30
VIII 8. Solubilización de la D-iLDH y L-iLDH	30
Tabla III	31
VIII 9. Tratamiento térmico de la D-iLDH y L-iLDH	31
VIII 10. Marcha de purificación de la D-iLDH y L-iLDH	31
VIII 11. Peso molecular de la D-iLDH y L-iLDH	32
VIII 12. Identificación del cofactor para la D-iLDH	32
VIII 13. Inhibición de la D-iLDH y L-iLDH por DPI	33
VIII 14. Determinación de la oligomerización de la D-iLDH	33
IX. Resultados	35
IX 1. Curva de crecimiento	35
Figura 1	35
IX 2. Aislamiento de mitocondrias	36
Tabla 1	36
IX 3. Efecto del pH sobre la L-iLDH	37
Figura 2	37
Figura 3	38
IX 4. Solubilización de la D-iLDH y L-iLDH	38
Figura 4	39
IX 5. Purificación de la D-iLDH y L-iLDH de <i>E. gracilis</i>	39
Tabla 2	39
Figura 5	40
Tabla 3	41
IX 6. Identificación del cofactor de la D-iLDH	42
Figura 6	42
IX 7. Inhibición de la D-iLDH y L-iLDH por DPI	43
Figura 7	43
IX 8. Determinación de la oligomerización de la D-iLDH	44
Figura 8	44
IX 9. Caracterización cinética de la D-iLDH y L-iLDH	45

Tabla 4	45
Tabla 5	46
X. Discusión	47
XI. Conclusiones	51
XII. Referencias	52

RESUMEN

La lactato deshidrogenasa citosólica forma parte de la glucólisis, se encuentra de forma soluble en el citosol y la reacción que cataliza es la reducción del piruvato dependiente de NAD^+ (NAD^+ -LDH). En bacterias, levaduras y en el protista de vida libre *Euglena gracilis*, existe además de la NAD^+ -LDH otra lactato deshidrogenasa que forma parte de la cadena respiratoria y es independiente de NAD^+ (iLDH). En bacterias, así como en *E. gracilis* la iLDH es membranal y funciona como quinona reductasa, en cambio para levaduras la iLDH se encuentra en el espacio intermembranal y reduce al citocromo c. Se ha determinado que las mitocondrias aisladas de *E. gracilis* poseen enzimas isomero-específicas para la oxidación de D- y L-lactato (D-iLDH y L-iLDH). Debido a las semejanzas funcionales y bioquímicas de las D- y L-iLDH de bacterias y *E. gracilis*, se hizo la purificación de estas dos enzimas del protista, para tratar de determinar si a nivel molecular también comparten semejanzas.

Se determinó que el pH óptimo para la actividad de la L-iLDH es de 8 y que la enzima es estable (al menos 50 minutos) en un intervalo de pH entre 7-9. El porcentaje de extracción de la enzima al solubilizarla con el detergente Lubrol fue 55-60% de la actividad total, a una relación de detergente/proteína (D/P) de 0.7. El solubilizado se hizo pasar por columnas de intercambio iónico y de afinidad. El gel desnaturante (SDS al 10%) mostró que no se había purificado la L-iLDH, pero se observó una banda enriquecida de aprox. 60 kDa, dato que es diferente al reportado para bacterias (40 kDa). Esta fracción fue capaz de reducir quinonas.

En cuanto a la D-iLDH, sí se ha podido purificar en tres pasos, el aislamiento de mitocondrias, la solubilización de la enzima y el tratamiento térmico, encontrando que la enzima utiliza como cofactor al FAD.

Con respecto a la caracterización cinética de la D-iLDH el punto que se tiene que resaltar es que esta enzima es capaz de reducir quinonas de alto y bajo potencial, además, de que el L-lactato es un inhibidor de tipo mixto dato diferente al que se ha reportado para bacterias.

En base a la similitud que hay entre las iLDH que se encuentran en *E. gracilis* y las enzimas que se encuentran en bacterias con respecto a su función fisiológica, a la capacidad de reducir quinonas, y a su localización en la membrana hacen suponer que estas enzimas tienen un origen en común, ya que *E. gracilis* es uno de los organismos mas primitivos con mitocondrias que posee D- y L-iLDH con las mismas características que las de bacterias.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de los organismos heterótrofos obtienen gran parte de la energía que requieren para sus necesidades metabólicas mediante reacciones electroquímicas que involucran a un conjunto de moléculas orgánicas, proteínas y enzimas estrechamente relacionadas con las membranas fosfolípídicas internas de mitocondrias en organismos eucariontes o en la membrana plasmática en organismos procariontes. Estas moléculas funcionan transfiriéndose electrones unas a otras de manera sucesiva, es decir, reduciéndose y oxidándose secuencialmente, recibiendo en su conjunto el nombre de cadena transportadora de electrones.

Una cadena transportadora de electrones ampliamente estudiada es la cadena respiratoria, la cual tiene como característica principal que dona los electrones finalmente a una molécula de oxígeno para formar dos moléculas de agua. Sus componentes se encuentran en la membrana interna mitocondrial y en la membrana plasmática de todas las bacterias aerobias obligadas o facultativas.

I. COMPLEJOS DE LA CADENA RESPIRATORIA

I.1 Complejo I (NADH deshidrogenasa). La NADH:ubiquinona oxidoreductasa, también llamada NADH deshidrogenasa, es el primer componente de la cadena respiratoria y cataliza la siguiente reacción:



Q es la ubiquinona y los hidrógenos marcados con el subíndice P indica la localización de los protones hacia el lado positivo de la membrana interna (espacio intermembranal) y los hidrógenos N hacia el lado negativo (matriz mitocondrial), lo que indica que existe un bombeo de protones (Pardo y cols., 2001).

El complejo I se encuentra embebido en la membrana interna mitocondrial, con el sitio de enlace del NADH orientado hacia la matriz y así capta a este substrato. Este complejo está constituido por 15 subunidades que contienen flavina mononucleótido (FMN) y además 6 centros de hierro-azufre como cofactores que

aceptan y ceden electrones en la reacción intramolecular. Este complejo en las mitocondrias de mamífero (Yagi y cols., 1993) y en *Paracoccus denitrificans* (Meinhardt y cols., 1987) transfiere los electrones del NADH hacia la ubiquinona y es sensible a rotenona, el cual es un inhibidor específico de esta enzima.

En los eucariontes que viven anaerobicamente, el complejo I de la cadena transportadora de electrones, transfiere los equivalentes reductores del NADH hacia la rodoquinona que difiere de la UQ en su estructura y en su potencial redox (Van Hellemond y cols., 1996).

I.2 Complejo II (Succinato deshidrogenasa). Esta constituido por dos polipéptidos. Contiene FAD y comprende cuatro subunidades que no son idénticas: una subunidad A que contiene a la flavina, una subunidad B que contiene tres centros Fe-S y dos subunidades hidrofóbicas C y D que contienen citocromo *b*. Estas últimas son esenciales para la unión de las subunidades catalíticas a la membrana y para la interacción de los sitios catalíticos a las quinonas. (Tielens y van Hellemond, 1998). La reacción que lleva acabo es:

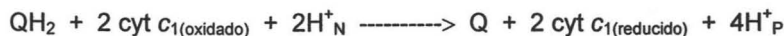


El complejo II no esta asociado con la translocación de protones y la conservación de la energía. Se cree que los electrones pasan del succinato al FAD, de aquí a los centros Fe-S y finalmente a la ubiquinona. El complejo II es la única enzima del ciclo del ácido cítrico que esta enlazada a la membrana mitocondrial.

En cuanto a los inhibidores del complejo II, se ha reportado que el K^+ produce una inhibición en la actividad de la succinato deshidrogenasa en mitocondrias de corazón de perro, la cual no afecta su K_m pero sí su V_{max} . Se ha sugerido que la inhibición inducida por K^+ puede ser el resultado de una modificación conformacional estable que la hace más sensible a moduladores negativos como el oxaloacetato o la coenzima Q oxidada (Chávez y Jay, 1987). También se ha reportado que el Cd^{2+} afecta la respiración sostenida por succinato en mitocondrias de hígado de rata,

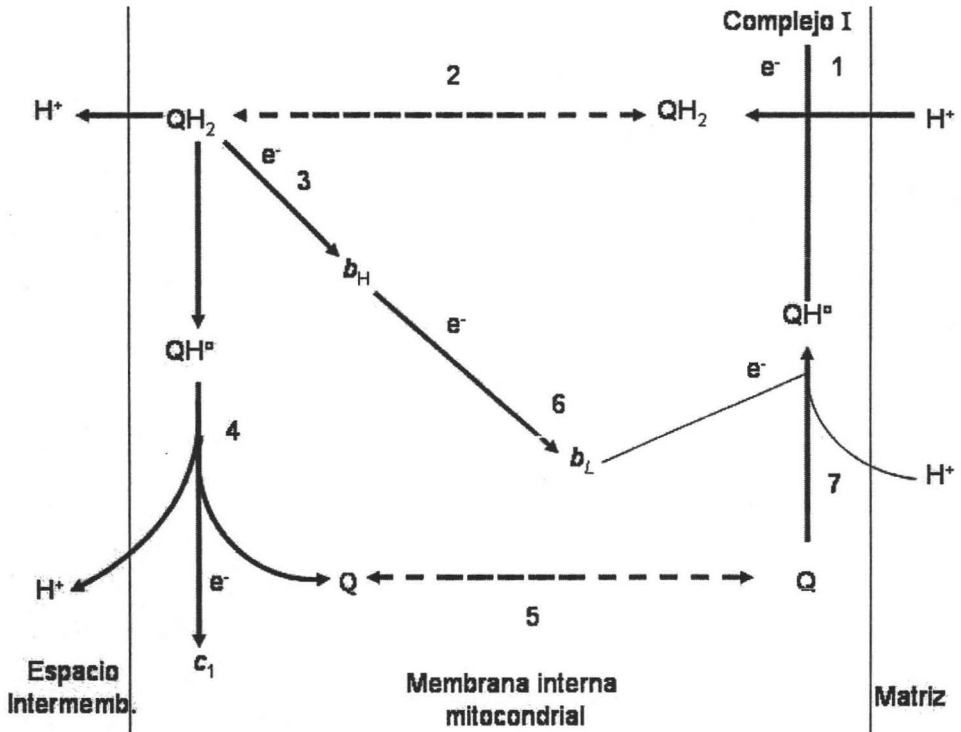
sugiriendo una inhibición de la succinato deshidrogenasa por este metal (Korotkov y cols., 1998).

I.3 Complejo III (Citocromo bc_1 o ubiquinol citocromo c oxidorreductasa). El complejo III cataliza la transferencia de dos electrones del ubiquinol a dos moléculas de citocromo c como se ve en la siguiente ecuación:



En eucariontes este complejo es dimérico y comprende varias subunidades; citocromos b y c_1 y una proteína con un grupo Fe-S tipo Rieske. En cada monómero existen tres subunidades que poseen cuatro centros redox: el hemo b_L (de bajo potencial, -30 mV) y el hemo b_H (de alto potencial, +90 mV) ambos localizados dentro de la subunidad del citocromo b , el citocromo c_1 y el centro Fe-S. Estas son las tres subunidades indispensables para la reacción de oxido-reducción, ya que en procariontes son las únicas subunidades presentes, excepto en *R. sphaeroides*, en donde existe una cuarta subunidad sin grupos redox. Las estructuras cristalográficas del complejo bc_1 de corazón de bovino y de pollo, muestran tres diferentes posiciones del dominio hidrofílico de esta subunidad. Una de éstas se encuentra cercana al hemo b_L , otra cercana al citocromo c_1 y en la tercera está en medio. El centro Fe-S de un monómero interactúa con los grupos redox del otro. El flujo de electrones entre el acarreador del par electrónico ubiquinona y los acarreadores de un electrón (citocromos c , c_1 , b_{562} y b_{566} ; estos dos últimos son llamados así por que el grupo hemo de cada citocromo absorbe a un máximo de 562 y 566 nm, respectivamente) se realiza en una serie de reacciones llamadas el ciclo Q, es un ciclo de transporte electrónico propuesto en el complejo III para explicar la translocación de H^+ durante el transporte de e^- , del citocromo b al citocromo c , (Esquema I).

Esquema I. Ciclo Q. El resultado de esta secuencia en el complejo III es el transporte de dos protones por cada electrón transferido desde el complejo I al citocromo c_1 .



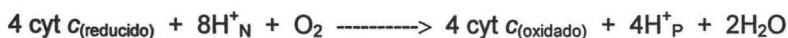
(Tomado de Voet y Voet, 1990)

(1) La coenzima QH° semiquinona se reduce a QH_2 mediante el complejo I en el lado de la matriz de la membrana. (2) QH_2 difunde al lado citosólico de la membrana. (3) QH_2 reduce al citocromo b_H , con la liberación de H^+ . (4) Un segundo H^+ se transloca cuando la semiquinona reduce el citocromo c_1 en el lado citosólico, liberando un segundo H^+ . (5) Q difunde al lado de la matriz. (6) El citocromo b_H reduce al citocromo b_L . (7) Q se reduce a QH° semiquinona mediante el citocromo b_L con la absorción de H^+ de la matriz.

Aunque el flujo de los electrones de este segmento de la cadena respiratoria es complicado, el efecto neto de la transferencia es simple, el ubiquinol es oxidado a ubiquinona y el citocromo *c* es reducido. Actualmente, se acepta que el complejo *bc₁* genera una fuerza protón-motriz por un mecanismo conocido como el ciclo Q modificado, esta fuerza es utilizada para la síntesis de ATP.

El complejo *bc₁* de las mitocondrias de mamífero y de bacterias es sensible a diversos inhibidores como el mixotiazol, el cual se parece estructuralmente a la ubiquinona y se une al citocromo *b*, la antimicina y el HQNO que bloquean la reducción de la quinona y la estigmatelina que se enlaza a la forma reducida de la proteína fierro-azufre, cambiando su potencial redox. Sin embargo, en el protista de vida libre *E. gracilis*, el complejo *bc₁* es parcialmente resistente a mixotiazol en mitocondrias intactas y totalmente insensible a antimicina y a HQNO cuando el complejo esta semipurificado (Covian y cols., 2001).

I.4 Complejo IV (citocromo *c* oxidasa). Este complejo es el terminal de las cadenas respiratorias de las mitocondrias y de muchas bacterias. Cataliza la transferencia de electrones del citocromo *c_{red}*, vía cuatro centros redox (varios polipéptidos, dos citocromos (*a* y *a₃*) y dos átomos de cobre) al aceptor final, que es el O₂; de acuerdo con la siguiente reacción:



En *P. denitrificans*, este consiste de sólo dos subunidades polipeptídicas que corresponden en masa molecular a las dos subunidades más grandes presentes en mitocondrias, la cual contiene además de 5 a 10 subunidades.

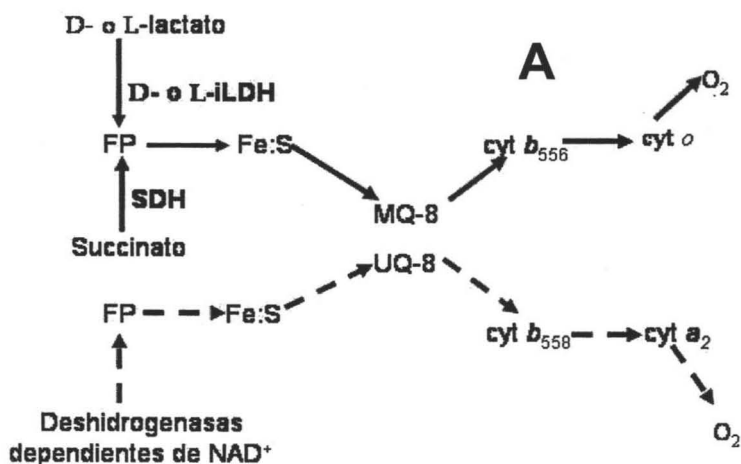
En la mitocondria de levadura se ha observado que el complejo IV está formado por siete subunidades cuyos pesos varían entre 40 y 50 kDa. Es de gran interés que las tres subunidades mayores son muy hidrofóbicas y se sintetizan por medio de los ribosomas mitocondriales, mientras que los cuatro menores son hidrofílicas y se originan en el citoplasma.

Las citocromo *c* oxidasa tipo aa_3 de eucariontes y procariontes son miembros de una superfamilia hemo-cobre de oxidasa relacionadas estructuralmente. Esta superfamilia exhibe variaciones considerables en términos de los grupos hemo (*a*, *b*) o del sustrato oxidable (quinol o citocromo *c*) (Gennis, 1991). El complejo IV funciona como una bomba de protones que contribuye a la fuerza motriz protónica necesaria para llevar a cabo la síntesis de ATP. La subunidad I es una proteína integral de membrana con 12 cruces transmembranales y tres centros redox: un hemo *a* de bajo espín, otro hemo *a* de alto espín y un Cu_B , estos dos últimos formando el centro binuclear a_3-Cu_B , es el sitio donde el oxígeno es activado y reducido a agua. El citocromo a_3 es el componente donde se unen el CO y el CN^- que son inhibidores clásicos de la citocromo *c* oxidasa. La subunidad II contiene el centro binuclear Cu_A que se encarga de recibir los electrones del citocromo *c*.

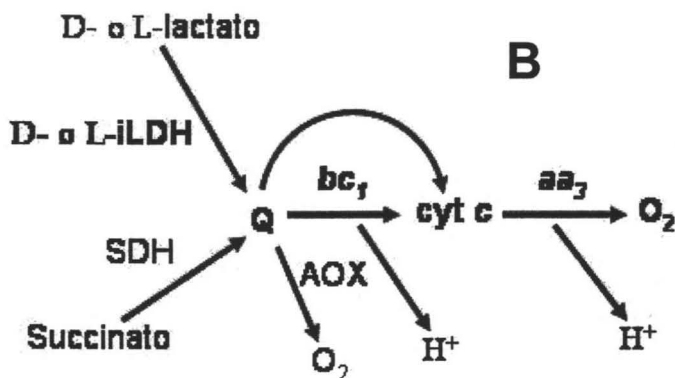
Así, en general las cadenas respiratorias de mamíferos, microorganismos y bacterias, muestran una estructura básica en sus complejos respiratorios, aunque existen una gran variedad de deshidrogenasas particulares de cada organismo.

E. coli sintetiza dos cadenas respiratorias: una está diseñada para la obtención del rendimiento máximo de 2 moles de ATP sintetizado por mol de NADH oxidado en condiciones aeróbicas; la segunda permite la síntesis de solo un mol de ATP por mol de NADH y puede operar a bajas concentraciones de oxígeno (Esquema II A). La cadena respiratoria de *E. gracilis* (Esquema II B), presenta una oxidasa alterna resistente a cianuro, una citocromo *c* reductasa resistente a antimicina y una D- y L-lactato deshidrogenasas independientes de NAD^+ , que ceden los equivalentes reductores directamente a la poza de quinonas.

Esquema II. Cadena respiratoria de *E. coli* (A) y *E. gracilis* (B)



(Esquema II A tomado de Benito y Escamilla BEB, 1982)



(Esquema II B tomado y modificado de Moreno-Sánchez y cols., 2000)

Líneas continuas: condiciones aeróbicas; líneas punteadas: condiciones bajas de O_2 FP: flavoproteínas; Fe-S: centro hierro-azufre; MQ-8: menaquinona-8; UQ-8: ubiquinona-8; cyt b_{556} y cyt b_{558} : citocromos b con una longitud de onda máxima a 556 y 558 nm respectivamente; cyt o : citocromo o ; D- α -L-ILDH: D- α -L-lactato deshidrogenasa independiente de NAD^+ ; SDH: succinato deshidrogenasa; bc_1 : Complejo III; aa_3 : Complejo IV; AOX: Oxidasa alterna.

II. ACARREADORES DE ELECTRONES DE LAS CADENAS RESPIRATORIAS

II.1 Nucleótidos de flavina. Son derivados de la vitamina riboflavina y consisten en un anillo de isoaloxazina, capaz de aceptar dos electrones junto con dos protones. Este anillo está unido a una fosforribosa formando así el mononucleótido de flavina (FMN), el cual puede estar unido a un nucleótido de adenina para construir el dinucleótido de flavinadenina (FAD), (Fig. 1).

Las flavoproteínas contienen un nucleótido de flavina ya sea FMN o FAD y pueden estar unidos de forma no covalente, como en la NADH deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa membranal y en algunas lactato deshidrogenasas independientes de piridín nucleótidos (iLDH) de bacterias y levaduras. (Futai, 1970; Markwell y Lascelles, 1978; Erwin y Gotschilich, 1993). Ambos nucleótidos de flavina cuando están oxidados pueden aceptar un electrón produciendo la forma de semiflavona (Daff y cols., 1996) como la glutatión reductasa o la glucosa oxidasa (O'Donnell y cols., 1994) o bien produciendo (en un solo evento) FMNH₂ o FADH₂ como lo hace la NADH oxidasa de *Streptococcus faecalis* (Ahmed y Clairborne, 1992). El potencial de reducción estándar del FAD y FMN depende de la proteína con la cual esté asociada. El potencial redox estándar relevante es así, el de la flavoproteína en particular y no del FMN o FAD aislados.

Existen flavoproteínas que están asociadas a citocromos (flavocitocromos) y tienen actividad catalítica hacia diversos sustratos, tales como lactato y fumarato, reduciendo directamente al citocromo *c* como en *Shewenella putrefaciens* (Morris y cols., 1994).

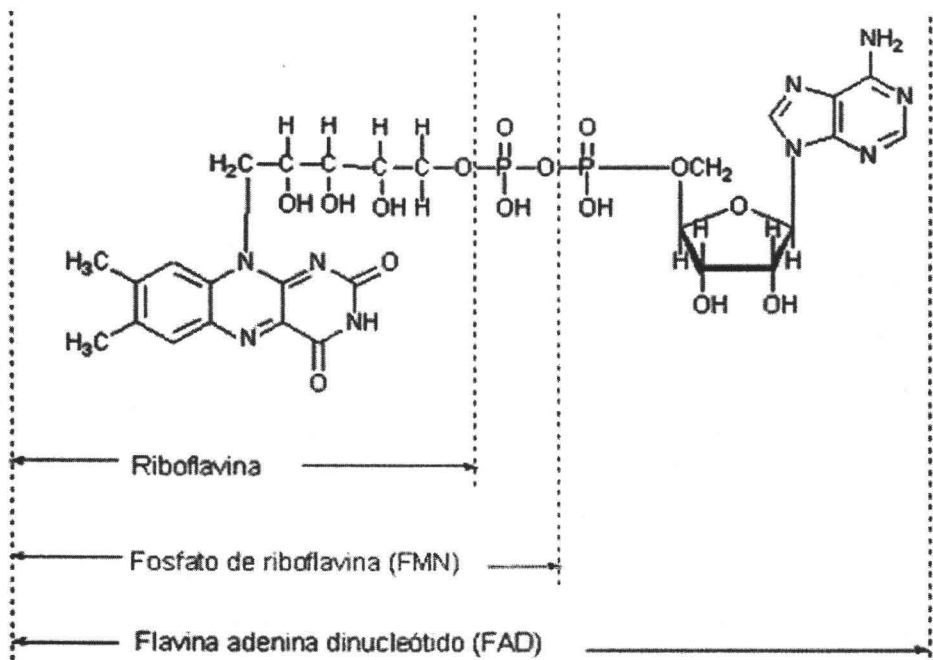


Figura 1. Estructura química de la Riboflavina, FMN y FAD

II.2 Quinonas (también llamadas coenzima Q). Las quinonas llevan a cabo la función de acarrear los electrones desde las deshidrogenasas al siguiente componente protéico en las cadenas respiratorias. En mitocondrias, este grupo protéico puede ser el complejo *bc₁*, pero en *E. coli*, puede ser la citocromo *c* oxidasa, nitrato reductasa o fumarato reductasa (Hernández-Urzuza y cols., 2003) en plantas y *E. gracilis* la oxidasa alterna irreversible a cianuro (Castro-Guerrero y cols., 2004). Las quinonas constituyen el único grupo de moléculas de oxidorreducción que existen libres en la membrana constituyendo una poza, aunque en algunos complejos enzimáticos se ha propuesto que existen moléculas de quinonas unidas de modo no covalente que no se intercambian con la poza, como en la NADH deshidrogenasa y el complejo *bc₁*. Las quinonas consisten de un anillo de benceno con dos oxígenos unidos por doble enlace en las posiciones 1 y 4, y pueden aceptar un electrón para formar el radical semiquinona (UQH[•]) o dos electrones para formar ubiquinol (UQH₂), (Figura 2). Otros sustituyentes del anillo son dos metóxidos en las

posiciones 2 y 3, un metilo en la 5, y una cadena de unidades de isopreno en la posición 6. El número de unidades isoprenoides de esta cadena sirve de base para la nomenclatura de las quinonas. Así dependiendo del organismo las quinonas van desde Q6 hasta Q10. La NADH oxidoreductasa de *Klebsiella pneumoniae* contiene aproximadamente 1.2 nmol de Q6/mg de enzima y 1.5 nmol de Q8/mg de enzima (Gemperli, 2002). En el genero *Candida* se ha analizado la secuencia de genes del RNA ribosomal y se ha demostrado que contiene ubiquinona-7 (Suzuki y Nakase, 2002), En *E. coli* la NADH oxidoreductasa contiene Q8 (Mileykovskaya y Dowhan, 1993).

Esta cadena le confiere a las quinonas una alta hidrofobicidad, por lo que se localizan en el centro de la bicapa fosfolipídica en contacto con las colas hidrocarbonadas, aunque parece ser que el anillo de la forma reducida (quinol) está mas cercano a la interfase membranal. Ya que la ubiquinona es pequeña e hidrofóbica, es capaz de difundir libremente dentro de la bicapa lipídica de la membrana interna mitocondrial.

Existen moléculas semejantes a la coenzima Q, como la plastoquinona de cloroplastos y la menaquinona de bacterias (Ingledew y Poole, 1984). *E. coli* es capaz de sintetizar dos quinonas; ubiquinona-8 y menaquinona-8, las concentraciones de estos dos componentes en la célula son variables y dependen de las condiciones de crecimiento. El potencial de reducción para la ubiquinona-8 y para la menaquinona-8 es de +70 mV y -74 mV, respectivamente.

En *E. gracilis* existen dos tipos de quinonas en su poza, la ubiquinona-9 (UQ9) y rodoquinona-9 (RQ9) con un potencial redox de +100 y -63 mV, respectivamente. Ambas quinonas tienen 9 grupos isoprenoides en la posición 5 de la quinona, pero la RQ9 tiene un grupo amino en la posición 2 del anillo bencénico, en lugar del grupo metoxi de la UQ9, esta diferencia en sus sustituyentes es lo que da la diferencia de potenciales.

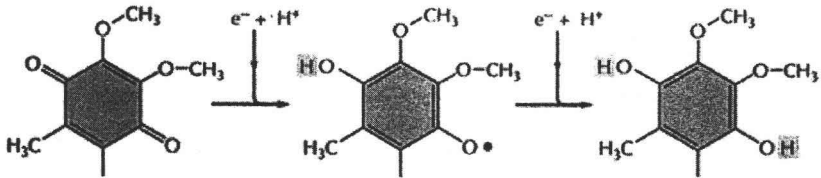


Figura 2. Estructura química de la ubiquinona. Se observa la cola hidrofóbica responsable de su solubilidad en la membrana y se demuestra como se reduce a ubiquinol tomando dos electrones y dos protones en este proceso.

II.3 Citocromos. Son aparte de las quinonas, los otros acarreadores de electrones de las cadenas respiratorias y fotosintéticas. Las porfirinas son la parte de los grupos hemo de los citocromos en donde se lleva acabo la reacción redox, ya que tienen en su centro un átomo de fierro que se oxida y reduce durante la transferencia de electrones (Figura 3). Los grupos hemo de los citocromos *a* y *b* no se encuentran unidos covalentemente a sus respectivas proteínas; no así los grupos hemos de los citocromos tipo *c* que se encuentran unidos covalentemente a través de los residuos de cisteína. Los citocromos tienen también sitios de unión con las membranas que son esenciales para un transporte de electrones eficiente. Por ejemplo, el complejo bc_1 no es funcional cuando el citocromo c_1 no tiene su carboxilo terminal ya que éste funciona en el anclaje a la membrana (Gennis, 1991). En *Rhodobacter capsulatus*, una bacteria púrpura no azufrada, el citocromo soluble *cyt c₂* y el citocromo asociado a la membrana *cyt c₁* son los únicos acarreadores de electrones (Millykallio y cols., 1998) que operan entre el centro de reacción fotoquímica del cloroplasto y el complejo bc_1 de la cadena acarreadora de electrones. El potencial de reducción estándar de los citocromos depende de su interacción con las cadenas laterales de la proteína.

Los citocromos de tipo *a*, *b* y algunos *c* forman parte de proteínas integrales de membrana. Una excepción es el citocromo *c* de la mitocondria, una proteína soluble que se asocia a través de interacciones electrostáticas con la superficie externa de la membrana interna de la mitocondrial.

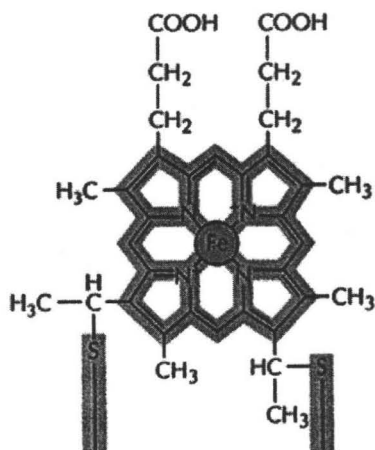


Figura 3. Estructura química del citocromo c. Esquema del grupo hemo que se ancla a la molécula de los citocromos. En este caso el átomo de hierro (Fe) puede pasar reversiblemente de forma oxidada (Fe^{3+}) a reducida (Fe^{2+}).

Los citocromos identificados en las mitocondrias de *E. gracilis* tienen semejanza con los citocromos presentes en mamíferos y en plantas superiores. Además de un citocromo tipo *a* y un citocromo soluble tipo *c*, se ha identificado un citocromo tipo *b*₅₆₁ (Buetow, 1989).

II.4 Centros Fe-S. En algunas proteínas transportadoras de electrones existen otras moléculas que contienen hierro, y no forman parte del grupo hemo sino que se encuentran en asociación con átomos inorgánicos de azufre y/o los átomos de azufre de residuos de cisteína de las proteínas (Figura 4). Los centros hierro-azufre (Fe-S) presentan diversas estructuras, con un solo átomo de hierro coordinado a cuatro residuos de cisteína a través del azufre de sus cadenas laterales, como la ferredoxina hidrogenosomal de *Tricomonas vaginalis* (Liu y Germanas, 1998), mas complejos con dos o cuatros átomos de hierro como las ferredoxinas I y II de *Rhodobacter capsulatus* (Hallenbeck y Gennaro, 1998) y la piruvato-ferredoxina oxidorreductasa en *Desulfovibrio africanus*. (Pieulle y cols.,

1995). Todas estas proteínas participan en la transferencia de un electrón, la cual uno de los átomos de hierro se oxida o se reduce.

Aún con la complejidad que presentan las cadenas respiratorias bacterianas, comparadas con las que se encuentran en eucariontes, es posible generalizar con respecto a los componentes básicos que conforman estos sistemas de transducción de energía. En eucariontes la cadena respiratoria de la mitocondria puede oxidar diversos sustratos como, el glicerol-3-fosfato, el succinato, los ácidos grasos, etc., por medio de deshidrogenasas que a su vez ceden los electrones a la poza de quinonas. En procariontes la cadena respiratoria puede oxidar otros sustratos, además de los ya mencionados, como formato, dihidroorotato, glicerol (Taylor y Zhulin, 1998), prolina, 6-fosfogluconato, L- y D-lactato, (Ingledew y Poole, 1984) mandelato (Hoey y cols., 1987), metanol (Yang y cols., 1998) y piruvato (Pieulle y cols., 1995); que en la mayoría de los casos reduce también a las quinonas. En levaduras existen deshidrogenasas que no ceden sus electrones directamente a la quinona; tales como la L-lactato deshidrogenasa (Gondry y Lederer, 1996) y la L-mandelato deshidrogenasa (Illias y cols., 1998) y en algunas bacterias, la citocromo *b* oxidorreductasa y heterodisulfuro reductasa, (Figura 4).

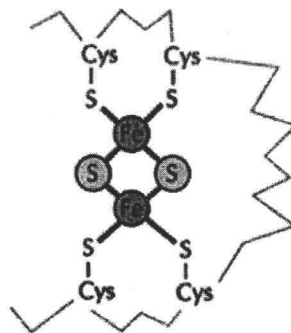


Figura 4. Centro [2Fe-2S]. La NADH:ubiquinona oxidorreductasa de *Vibrio cholerae* contiene un centro [2Fe-2S], (Barquera y cols., 2004).

III. LACTATO DESHIDROGENASAS INDEPENDIENTES DE PIRIDÍN NUCLEÓTIDOS EN PROCARIONTES

III.1 Lactato deshidrogenasas dependientes de NAD⁺. El lactato es un producto final importante de la fermentación de la glucosa y otros carbohidratos. *E. coli* puede formar de 0.8 a 1 mol de lactato por 1 mol de glucosa y *Staphylococcus aureus* en condiciones anaerobias forma mayoritariamente lactato y en condiciones aeróbicas forma acetato; El genero *Streptococcus*, *Pediococcus* y algunas especies del genero *Lactobacillus*, convierten hasta el 85% de la glucosa a lactato (bacterias homofermentativas); y el genero *Leuconostoc* y otras especies de *Lactobacillus* forman 1 mol de lactato por cada mol de glucosa usada (Doelle, 1971). Así, dependiendo del organismo el CO₂, acetato y/o etanol conforman la otra mitad de cada molécula de glucosa oxidada (bacterias heterofermentativas). Las bacterias homofermentativas usan la vía de la glucólisis y en la etapa final convierten al piruvato en lactato, esta reducción del piruvato a L-(+) o D-(-)-lactato es la mejor ruta para la regeneración de NAD⁺ en muchos organismos como en *E. coli* y es catalizada por la lactato deshidrogenasa citosólica dependiente de NAD⁺ (nLDH). En las bacterias heterofermentativas la conversión del piruvato a lactato es también la mejor etapa para la generación de NAD⁺. Se sabe que la generación de L- y D-lactato se lleva acabo por enzimas isomeroespecíficas y cada enzima es distinta en sus parámetros cinéticos y propiedades electroforéticas (Long y Kaplan, 1968). Todas las bacterias ácido-lácticas tienen una gran cantidad de nLDH (Garvie, 1980). Muchas D-nLDH son reversibles pero algunas cuantas son unidireccionales. En *Lactobacillus casei* esta enzima ha sido parcialmente purificada con baja actividad y solo produce lactato cuando el sustrato se encuentra en concentraciones elevadas. Una D-nLDH con mayor reversibilidad es encontrada en *E.coli* (Garvie, 1980).

Las L-nLDH se encuentran junto con las D-nLDH en la mayoría de las bacterias. Las L-nLDH son de dos tipos, las que son activadas por fructosa 1,6-difosfato (FBP) y las otras que no los son. Las bacterias ácido lácticas formadoras de D- o L-lactato tienen L-nLDH las cuales no requieren de FBP y en algunas especies

esta enzima cataliza la reacción reversa. Algunas especies de *Lactobacillus* que tienen L-nLDH reaccionan muy poco con el lactato y solo pueden ser detectadas después de una electroforésis revelando con piruvato, como las enzimas reportadas en *Lactobacillus fermentum* (Gasser, 1970) y *Lactobacillus cellobiosus* (Sharpe y cols., 1972). La L-nLDH que es activada por FBP se encuentra en muchas especies de *Streptococcus* y en algunas otras bacterias. Algunas de estas enzimas muestran un absoluto requerimiento de FBP a pH fisiológico, en *Actinomyces viscosus* la enzima requiere FBP y bajas concentraciones de piruvato. En *Butyrivibrio fibrisolvens* reportan que existe una L-nLDH activada por FBP. La especificidad de la enzima en *Butyrivibrio* no es clara, pero la reacción es más rápida con D-lactato que con L-lactato. La activación de la L-nLDH por FBP es virtualmente irreversible (Garvie, 1980).

III.2 Lactato deshidrogenasas independientes de NAD⁺. En la cadena respiratoria de bacterias existen además de las deshidrogenasas clásicas, otras cuya especificidad por los sustratos es diferente a las que utilizan las mitocondrias de mamífero. Entre estos sustratos están el formato, dihidroorotato, glicerol, mandelato, metanol, piruvato, y D- y L-lactato (Ingledew y Poole, 1984). En *E. coli*, la conversión del lactato a piruvato estimula el transporte de prolina, ácido glutámico, ácido aspártico, asparagina, triptofano, lisina, serina, alanina, glicina (Kaback y Milner 1970) y también en algunos carbohidratos como galactosa y arabinosa, (Barnes y cols., 1971). La oxidación del lactato se realiza por medio de una lactato deshidrogenasa independiente de NAD⁺/NADH (iLDH). Esta enzima se encuentra embebida en la membrana citoplasmática y los equivalentes reductores que se producen de esta oxidación pasan directamente a la poza de quinonas para la obtención de energía y, al igual que las nLDH, se sabe que son enzimas isomero-específicas. Las iLDH son ampliamente distribuidas en muchos géneros de bacterias (Garvie, 1980).

Las iLDH más estudiadas son las de *E. coli*, se ha reportado que son dos enzimas isomero-específicas que oxidan D- o L-lactato y no hay evidencia de que esta oxidación *in vivo* o *in vitro* sea reversible. Se encuentran localizadas en la

membrana interna, tienen orientado su sitio activo hacia el citosol y están involucradas en la cadena respiratoria y en la transferencia de electrones a través de la poza de quinonas.

La D-iLDH de *E. coli* es constitutiva sin importar la fuente de carbono. Esta reacción esta acoplada al transporte de aminoácidos y azúcares; además se sabe que la enzima purificada es una flavoenzima ya que contiene FAD como cofactor y la relación flavina/enzima es aproximadamente de 1 mol de FAD por mol de enzima (Kohn y Kaback, 1973).

Esta enzima ha sido enriquecida hasta 400 veces, la metodología empleada para su purificación involucra la solubilización de la enzima con detergentes, después la precipitación con sulfato de amonio y por ultimo una cromatografía de intercambio iónico (Kohn y Kaback, 1973). EL Triton X-100 incrementa la actividad enzimática hasta 5 veces (Futai, 1970). La enzima pesa aproximadamente 75 kDa, en ausencia de Triton X-100, tiene un pH óptimo entre 7.5-8 y una K_m por D-lactato de 1.4 mM y en presencia de Tritón X-100, el pH óptimo es de 8-9.5 con una K_m por D-lactato de 0.5 mM. Estos cambios se deben a que el detergente se une fuertemente y altera la conformación secundaria de la enzima, por cambios en la hidrofobicidad y en los puentes de hidrógeno, lo que provoca modificaciones conformacionales y estructurales, resultado de los cambios ambientales que rodean a la enzima. La D-iLDH tiene actividad con D-lactato pero no con D-glicerato, L-glicerato, succinato, malato, D-tartrato, L-tartrato, 1-propanol, o isopropanol a concentraciones altas de 0.1 M. La adición de NAD^+ , $NADP^+$, FMN y FAD no tiene efecto en la actividad de la enzima. El L-lactato fue un sustrato para la enzima purificada, pero con una eficiencia catalítica (V_m/K_m) baja con respecto a lo observado con D-lactato. El piruvato fue el producto final de la reacción usando como sustrato ya sea D-lactato o L-lactato. El p-cloromercuribenzoato, N-etilmaleiamida y iodoacetato, a concentraciones de 0.01 M, no tuvieron efecto en la actividad de la enzima, pero el oxamato y oxalato inhibieron a la enzima purificada, con una inhibición de tipo competitivo con K_i de 3.4 y 0.9 μM respectivamente (Futai, 1973).

Se ha reportado que *Paracoccus denitrificans* es capaz de oxidar al D-lactato por medio de una D-iLDH, ($K_m = 0.81$ mM), esta oxidación genera equivalentes reductores, los cuales son importantes para la síntesis de ATP (Zboril y Wenerova, 1996).

La L-iLDH es una enzima primaria en la cadena respiratoria de varios tipos de bacterias como en *E. coli* donde se localiza en la membrana citoplasmática y se sabe que utiliza como cofactor al FMN. La actividad de varias deshidrogenasas (lactato deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa) fueron medidas en extractos de *Rhodopseudomonas sphaeroides*, los cuales fueron cultivados con diferentes substratos bajo condiciones aeróbicas y fototróficas, en donde la actividad de L-iLDH se expresa cuando las bacterias son cultivadas con L-lactato, en contraste, los niveles de malato deshidrogenasa y succinato deshidrogenasa no variaron en las células cultivadas en distintas condiciones. En este organismo, la L-iLDH tiene un pH óptimo de actividad de 7.5, una K_m por L-lactato de 1.4 mM y fue inhibida por oxalato y oxamato con una K_i de 0.03 y 0.96 mM respectivamente. (Markwell y Lascelles, 1978) (Tabla I).

Algunos estudios indican que la L-iLDH es inducida cuando las células de *E. coli* son cultivadas con L-lactato. Futai y Kimura (1977) confirman que la actividad de la enzima es 100 veces mas alta con L-lactato que cuando las células son cultivadas aeróbicamente en glicerol o anaeróbicamente en glucosa.

En *Neisseria gonorrhoeae* la L-iLDH es inducida cuando las células se cultivan en condiciones aerobias usando como fuente de carbono lactato, ya que la actividad especifica aumento en un 40% cuando se emplea este metabolito, a diferencia cuando se emplea glucosa donde la actividad se vio inhibida.

Las enzimas que se encuentran en bacterias heterofermentativas como *Leuconostoc mesenteroides*, y homofermentativas como *Lactobacillus plantarum* B38, muestran una clara diferencia en la actividad especifica y K_m con respecto al substrato D- o L-lactato; *L. mesenteroides* muestra una gran afinidad por L-lactato, mientras que *L. plantarum* B38 tiene una K_m baja para D-lactato (Doelle, 1971) (Tabla I).

Acinetobacter calcoaceticus posee D-iLDH y L-iLDH, se localizan en la membrana citoplasmática y pueden ser solubilizadas con algunos detergentes (Allison, y cols., 1985). Las actividades de estas dos enzimas se expresan después de cultivar a las bacterias en diferentes fuentes de carbono, son inducidas por alguno de los dos enantiómeros de lactato pero no por piruvato y son reprimidas por succinato y L-glutamato.

Con respecto a la especificidad de las iLDH en bacterias, algunas solo pueden oxidar a su sustrato como es el caso de la L-iLDH de *Rhodopseudomonas sphaeroides* y la D-iLDH de *Megasphaera elsdenii*. En *Neisseria gonorrhoeae* la L-iLDH oxida L-lactato y además puede oxidar otros sustratos como pueden ser la L-treonina, la fenilalanina y el L- β -fenil lactato; al igual es el caso de la D-iLDH de *E. coli* la cual puede oxidar además del D-lactato a la D-treonina y al α -DL-hidroxiisovalerato, sin embargo para los dos casos estos sustratos tienen muy poca afinidad y una velocidad de oxidación menor al 10% en comparación con su verdadero sustrato.

Se ha reportado en *Pseudomonas aeruginosa* una D- y L-iLDH cuya actividad está ligada al transporte de aminoácidos; en esta cepa ambas enzimas son inducidas por lactato. Las velocidades de oxidación del D- y L-lactato son diferentes usando distintos aceptores artificiales de electrones. Estas iLDH son localizadas en la membrana de la célula (Brown y Tata, 1987). En las vesículas de membrana de *Staphylococcus aureus* el L-lactato es convertido a piruvato usando al 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) como aceptor artificial de electrones. En *Butyrivacterium rettgeri* las enzimas requieren lípidos para mantener su estructura, los cuales se involucran en el transporte de electrones pero no interactúan con el sustrato. Las iLDH de *B. rettgeri* son extremadamente lábiles y pierden su actividad cuando son guardadas a -20°C y no son estabilizadas por agentes reductores. (Garvie, 1980).

Tabla I. Parámetros cinéticos de algunas iLDH bacterianas

Organismo	Enzimas	PM ² kDa	V _{max} U/mg prot	K _m lactato mM	Inhibidor K _i (mM)	Aceptor de e ⁻	pH ópt. act.	Ref.
<i>E. coli</i> ¹	D-iLDH	75	100	0.5	Oxamato (9*10 ⁻⁴) C Oxalato (3.4*10 ⁻⁴) C	DCPIP o MTT- PMS	8-9.5	A
<i>E. coli</i> ¹	D-iLDH	72	20	0.6	Oxamato 0.001	PMS- MTT	8-9	H
<i>Lactobacillus plantarum</i> B38	L-iLDH	----	36.3	25	-----	DCPIP	6.4	B
	D-iLDH	----	47.3	6	-----	DCPIP	6.2	B
<i>Lactobacillus mesenteroides</i>	L-iLDH	----	109.5	15.4	-----	DCPIP	6.2	B
	D-iLDH	----	336	18.1	-----	DCPIP	5.8	B
<i>Lactobacillus brevis</i>	L-iLDH	----	336	18.5	-----	DCPIP	5.8	B
	D-iLDH	----	448	31.2	-----	DCPIP	5.8	B
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	D-iLDH	----	419	0.2	-----	MTT- PMS	---	C
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	D-iLDH	62.8	-----	0.26	Oxalato ND	DCPIP PMS	7.7	D
<i>R. sphaeroides</i>	L-iLDH	107	-----	0.5	Oxamato (0.96) NC Oxalato (0.03) NC D-lactato (22) C	DCPIP PMS	7.5	E
<i>Paracoccus denitrificans</i>	D-iLDH	54	17	0.81	Tenoittrifluoro- acetona (2.2) NC	DCPIP PMS	---	F
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	D-iLDH	55	200	3.5	-----	DCPIP MTT	7.5	G
	L-iLDH	55	300	0.7	-----	DCPIP MTT	7.5	G

Los valores mostrados se realizaron en extractos crudos. ¹Los ensayos se realizaron con la enzima pura y en presencia de Triton X-100. ² Determinado por SDS-PAGE. C, competitivo; NC, no competitivo; ND, no determinado; A; Khon y Kaback, 1973; B; Doelle, 1971; C; Fischer y cols., 1994; D; Allison y cols., 1985; E; Markwell y Lascelles, 1978; F; Zboril y Wernerová, 1996; G; Diez-Gonzalez y cols., 1997; H; Futai, 1973.

IV. LACTATO DESHIDROGENASAS INDEPENDIENTES DE PIRIDÍN NUCLEÓTIDOS EN EUCARIONTES

Las iLDH de eucariontes, específicamente las de levaduras, son significativamente diferentes a las que se encuentran en bacterias. Las propiedades estructurales de las iLDH de levaduras han sido estudiadas y se sabe que las L-iLDH son flavo-hemoproteínas y las D-iLDH son metalo-flavoproteínas, que catalizan la oxidación de L- y D-lactato, respectivamente, esta reacción se lleva a cabo en el espacio intermembranal de la mitocondria. (Somlo, 1965). Las iLDH de *Saccharomyces cerevisiae* y *Hansenula anomala* son flavocitocromos b_2 y fisiológicamente tienen la actividad de la L-iLDH que transfieren los electrones directamente al citocromo c. Estructuralmente son tetrámeros idénticos, de 30 kDa cada uno de los monómeros los cuales contienen dos dominios diferentes: el dominio de flavodeshidrogenasa, que contiene FMN y el dominio de citocromo, contiene protohemo IX.

Se ha reportado que *Saccharomyces cerevisiae* presenta una mayor actividad de iLDH cuando las células son cultivadas en D- o L-lactato con respecto a las células cultivadas en etanol, piruvato y glucosa (Somlo, 1965). Además, se ha reportado que presenta una D-iLDH unida a la membrana mitocondrial, consta de un solo polipéptido y no presenta ninguna homología con la L-iLDH que se ha reportado en el mismo organismo (Taguchi y Ohta, 1991).

V. LACTATO DESHIDROGENASAS INDEPENDIENTES DE PIRIDÍN NUCLEÓTIDOS EN *Euglena gracilis*

La cadena respiratoria de las mitocondrias aisladas del protista de vida libre *Euglena gracilis* presenta características inusuales, tiene una oxidasa alterna insensible a cianuro y una quinol citocromo c oxidoreductasa sensible a mixiotazol (Moreno-Sánchez y cols., 2000). Además, oxida una gran variedad de sustratos, incluyendo succinato, 2-oxoglutarato, glutamato, malato, NADH externo y otros metabolitos como son succinato semialdehído, ácido γ -amino-butírico y lactato, que

IV. LACTATO DESHIDROGENASAS INDEPENDIENTES DE PIRIDÍN NUCLEÓTIDOS EN EUKARIONTES

Las iLDH de eucariontes, específicamente las de levaduras, son significativamente diferentes a las que se encuentran en bacterias. Las propiedades estructurales de las iLDH de levaduras han sido estudiadas y se sabe que las L-iLDH son flavo-hemoproteínas y las D-iLDH son metalo-flavoproteínas, que catalizan la oxidación de L- y D-lactato, respectivamente, esta reacción se lleva a cabo en el espacio intermembranal de la mitocondria. (Somlo, 1965). Las iLDH de *Saccharomyces cerevisiae* y *Hansenula anomala* son flavocitocromos b_2 y fisiológicamente tienen la actividad de la L-iLDH que transfieren los electrones directamente al citocromo c. Estructuralmente son tetrámeros idénticos, de 30 kDa cada uno de los monómeros los cuales contienen dos dominios diferentes: el dominio de flavodeshidrogenasa, que contiene FMN y el dominio de citocromo, contiene protohemo IX.

Se ha reportado que *Saccharomyces cerevisiae* presenta una mayor actividad de iLDH cuando las células son cultivadas en D- o L-lactato con respecto a las células cultivadas en etanol, piruvato y glucosa (Somlo, 1965). Además, se ha reportado que presenta una D-iLDH unida a la membrana mitocondrial, consta de un solo polipéptido y no presenta ninguna homología con la L-iLDH que se ha reportado en el mismo organismo (Taguchi y Ohta, 1991).

V. LACTATO DESHIDROGENASAS INDEPENDIENTES DE PIRIDÍN NUCLEÓTIDOS EN *Euglena gracilis*

La cadena respiratoria de las mitocondrias aisladas del protista de vida libre *Euglena gracilis* presenta características inusuales, tiene una oxidasa alterna insensible a cianuro y una quinol citocromo c oxidoreductasa sensible a mixiotazol (Moreno-Sánchez y cols., 2000). Además, oxida una gran variedad de sustratos, incluyendo succinato, 2-oxoglutarato, glutamato, malato, NADH externo y otros metabolitos como son succinato semialdehído, ácido γ -amino-butírico y lactato, que

no son comúnmente usados por mitocondrias de otros organismos (Uribe y Moreno-Sánchez, 1992). Sin embargo, no pueden oxidar al piruvato ya que estas perdieron al complejo piruvato deshidrogenasa (Buetow, 1989). El piruvato puede ser transformado a acetilCoA por la piruvato/NADP⁺ oxidoreductasa la cual es inactivada por O₂ (Inui y cols., 1984).

De forma interesante las altas velocidades de transporte de electrones y síntesis de ATP en la mitocondria de *E. gracilis* ocurren cuando el D- y L-lactato son los sustratos oxidables. La oxidación del lactato es por medio de una lactato deshidrogenasa independiente de NADH (iLDH), la cual transfiere los electrones del lactato a la poza de quinonas de la membrana interna de la mitocondria (Esquema II-B); el quinol puede ser oxidado por el complejo citocromo *b-c*₁, por la citocromo *c* reductasa resistente a antimicina o por la oxidasa alterna resistente a cianuro (Moreno-Sánchez y cols., 2000).

Price describió por primera vez la existencia de la actividad de iLDH en *E. gracilis*. Esta actividad está asociada con la fracción mitocondrial y algunos grupos describen la existencia de iLDH solo para el isómero D- en extractos celulares (Collins N. y Merrett M. J., 1975), mientras que Yakota y Kitaoka (1979) encontraron la actividad de ambos isómeros en la mitocondria y fracción microsomal de *E. gracilis*.

En nuestro laboratorio se ha determinado que la actividad de la L- y D-iLDH se encuentra en la fracción mitocondrial, ya que el aumento de la actividad de la D- y L-iLDH estuvo asociada con el incremento en la actividad de la succinato deshidrogenasa y citocromo *c* oxidasa, las cuales son enzimas que se encuentran en la membrana interna mitocondrial (Jasso-Chávez y cols., 2001).

La velocidad de deshidrogenación por las iLDH en las mitocondrias aisladas de *E. gracilis* para ambos isómeros de lactato sigue una cinética de Michaelis-Menten. La constante de disociación (K_s) para ambos isómeros son iguales, aunque la V_{max} fue más alta con D-lactato, cuando se usa DCPIP o Q1 (quinona con una sola cadena lateral isoprenoide con un potencial redox de +100 mV) como aceptor artificial de electrones (Tabla II). Se ha determinado que el oxamato inhibe competitivamente la actividad de la D- y L-iLDH mientras que el oxalato presenta una

inhibición de tipo mixto, esta inhibición se presenta cuando el inhibidor se puede unir a la enzima libre o la enzima modificada con distintas constantes de disociación. Con base en las diferentes afinidades por oxamato y oxalato cuando se usa D- o L-lactato como sustratos; además de la diferencia en solubilidad con distintos detergentes, el peso molecular de dos entidades y los parámetros termodinámicos diferentes, sugieren que son dos las entidades moleculares que catalizan la deshidrogenación de cada isómero.

Tabla II. Parámetros cinéticos de la D-iLDH y L-iLDH de *E. gracilis* en mitocondrias aisladas

	L-iLDH	D-iLDH
<i>Km</i> lactato (mM)	2.45 ±0.3	2.7±0.3
<i>Vmax</i> (nmolDCPIP/ min x mg prot.)	268±31	477±44
<i>Km</i> DCPIP (μM)	35±10	35±5
<i>Km</i> Q1 (μM)	41±7	18.4±5
<i>Vmax</i> (nmol Q1/min x mg prot.)	427±35	617±70
<i>Ki</i> oxamato (mM) competitivo	1.2±0.2	0.51±0.1
<i>Ki</i> oxalato (mM) mixto	0.36±0.07	0.15±0.02

Datos tomados de Jasso-Chávez y cols. (2001)

VI. COFACTORES DE LAS iLDH

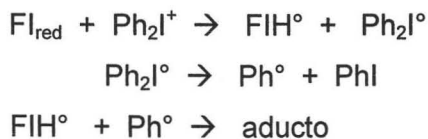
Se ha descrito que los cofactores de las iLDH son flavinas unidas de forma no covalente. Sin importar el organismo en estudio todas la D-iLDH contienen FAD, mientras que para las L-iLDH el cofactor es siempre FMN.

Con respecto al cofactor de la D-iLDH, recientes estudios describen con muchos ejemplos la inhibición de flavo proteínas por la sal de difenileneiodonio (DPI) y compuestos similares (Chakraborty y Massey, 2002). También se sabe que la flavina de la enzima necesita estar reducida y bajo condiciones anaerobias para que la inhibición ocurra, y de esta reacción de la reducción de la flavina con compuestos iodonios resultan en fenil aductos de la flavina. Tew ha propuesto un mecanismo

para la formación del aducto flavina N5-fenil, involucrado en la oxidación de un electrón de la flavina reducida para formar la semiquinona, a expensas de la reducción del DPI el cual forma el radical difenileneidonol (Tew, 1993) (Esquema III).

Se ha demostrado que el DPI es un inhibidor irreversible. El uso del DPI radioactivo ha permitido identificar dos sitios de modificación covalente. El asilamiento del cofactor radioactivo seguido por espectrofotometría, ha demostrada que al FMN se une un grupo fenilo y este se une con mayor eficiencia al estado reducido del FMN (Tew, 1993).

Esquema III



VII. ANTECEDENTES

Se ha reportado que la D-iLDH purificada de la archeobacteria hipertermofílica *Archaeoglobus fulgidus* es estable a 80°C (Reed y Hartzell, 1999) y la D-iLDH de *E. coli* es estable a 60°C por 1 hora. La exposición de las mitocondrias aisladas de *E. gracilis* a temperaturas de 70°C tiene un tiempo de vida media ($t_{1/2}$) para la L-iLDH= 0.16 min y para la D-iLDH= 7 min, estos experimentos se hicieron en ausencia de un ligando, al adicionar oxalato como ligando el $t_{1/2}$ a 70°C para la D-iLDH aumento hasta los 14 min (Jasso-Chávez y cols., 2001).

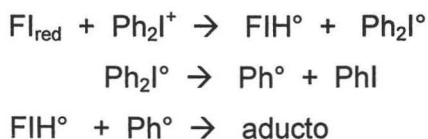
Las diferentes sensibilidades de la actividad de las iLDH de *E. gracilis* a la exposición a la temperatura, dependen del isómero usado indicando claramente que diferentes enzimas estereo-específicas son involucradas en la deshidrogenación de cada uno de los isómeros de lactato (Jasso-Chávez y cols., 2001).

El paramilo (cadena de glucosa con enlaces glucosídicos $\beta[1\rightarrow3]$) es el mayor compartimiento de energía en *E. gracilis*, el cual se degrada por medio de la glucólisis y produce piruvato, éste se reduce a lactato (por medio de una lactato

para la formación del aducto flavina N5-fenil, involucrado en la oxidación de un electrón de la flavina reducida para formar la semiquinona, a expensas de la reducción del DPI el cual forma el radical difenileneidonol (Tew, 1993) (Esquema III).

Se ha demostrado que el DPI es un inhibidor irreversible. El uso del DPI radioactivo ha permitido identificar dos sitios de modificación covalente. El asilamiento del cofactor radioactivo seguido por espectrofotometría, ha demostrada que al FMN se une un grupo fenilo y este se une con mayor eficiencia al estado reducido del FMN (Tew, 1993).

Esquema III



VII. ANTECEDENTES

Se ha reportado que la D-iLDH purificada de la archeobacteria hipertermofílica *Archaeoglobus fulgidus* es estable a 80°C (Reed y Hartzell, 1999) y la D-iLDH de *E. coli* es estable a 60°C por 1 hora. La exposición de las mitocondrias aisladas de *E. gracilis* a temperaturas de 70°C tiene un tiempo de vida media ($t_{1/2}$) para la L-iLDH= 0.16 min y para la D-iLDH= 7 min, estos experimentos se hicieron en ausencia de un ligando, al adicionar oxalato como ligando el $t_{1/2}$ a 70°C para la D-iLDH aumento hasta los 14 min (Jasso-Chávez y cols., 2001).

Las diferentes sensibilidades de la actividad de las iLDH de *E. gracilis* a la exposición a la temperatura, dependen del isómero usado indicando claramente que diferentes enzimas estereo-específicas son involucradas en la deshidrogenación de cada uno de los isómeros de lactato (Jasso-Chávez y cols., 2001).

El paramilo (cadena de glucosa con enlaces glucosídicos $\beta[1\rightarrow3]$) es el mayor compartimiento de energía en *E. gracilis*, el cual se degrada por medio de la glucólisis y produce piruvato, éste se reduce a lactato (por medio de una lactato

deshidrogenasa dependiente de NADH), y el lactato se oxida por la lactato deshidrogenasa mitocondrial, a este conjunto de enzimas se le conoce como lanzadera de lactato. *E. gracilis* no tiene la piruvato deshidrogenasa por lo que es importante la oxidación de lactato ya que se obtiene un mayor beneficio de los equivalentes reductores que se producen de esta oxidación y por lo cual se genera una mayor cantidad de ATP.

De esta forma aprovechando las características termorresistentes que se han reportado para las iLDH de *E. gracilis* nos enfocamos a purificar a estas enzimas para conocer más sobre su participación en el metabolismo energético y para comparar a estas enzimas con las reportadas para bacterias para tratar de determinar si tienen un origen en común.

HIPÓTESIS

Debido a que las iLDH de *E. gracilis* comparten semejanzas en cuanto a su función con las iLDH de bacterias, entonces probablemente sean similares también a nivel molecular

OBJETIVO GENERAL

- Purificar y caracterizar tanto cinética como molecularmente a la D-iLDH y L-iLDH de *E. gracilis*

OBJETIVOS PARTICULARES

- Cultivar a *E. gracilis* en un medio apropiado para obtener una alta expresión de las actividades de D-iLDH y L-iLDH
- Aislar mitocondrias de *E. gracilis*
- Determinar el pH óptimo de actividad de la D-iLDH y L-iLDH
- Purificar a las enzimas
 1. Solubilizar a la D-iLDH y L-iLDH con detergentes
 2. Tratamiento térmico a la D-iLDH
- Determinar los pesos moleculares
- Identificar los cofactores
- Caracterizar cinéticamente a las iLDH (K_m por D- y L-lactato, DCPIP y quinonas efecto del oxalato y piruvato sobre la actividad)

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

VIII.1 Reactivos

El 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP), ubiquinona-1 (Q1), L-lactato, D-lactato, azul de nitrotetrazolio (NBT), albúmina serica bovina, Flavina mono nucleotido (FMN), Flavina adenosin dinucleotido (FAD), *N,N,N',N'*-tetrametilfenilenediamina (TMPD), fenilmetanosulfenil fluor (PMSF), dodecil sulfato de sodio (SDS), cloruro de difenileneiodonio (DPI), CHAPS y los marcadores de peso molecular fueron adquiridos de SIGMA. El Lubrol fue adquirido de ICN. La columna de Sephacryl S-200 fue adquirida de Pharmacia.

VIII.2 Medio de cultivo celular

Los medios de cultivo para el crecimiento de *E. gracilis* cepa Z contienen ácido Málico 15 mM y ácido Glutámico 34 mM, como fuente de carbono (medio Hutner), además, se adicionaron los siguientes minerales y vitaminas en % (p/v): 0.02% CaCO₃, 0.05% MgSO₄, 0.02% (NH₄)₂HPO₄, 0.08% KH₂PO₄. Minerales traza A (0.009% ZnSO₄ 7H₂O, 0.008% MnSO₄ 4H₂O, 0.002% Na₂MoO₄ 2H₂O, y 0.00016% CoCl₂ 6H₂O). Minerales traza B (0.00039% CuSO₄ 5H₂O, 0.00028% H₃BO₃ y 0.000012% NaI). Vitamina B₁₂ 0.005% y Tiamina 0.01%. El pH del cultivo se ajustó a 3.5.

VIII.3 Siembra de células

Se adicionó un inóculo de 0.2×10^6 células/mL a 100 mL de medio de cultivo Hutner, en un matraz Erlenmeyer con capacidad de 250 mL, se incubó a una temperatura de 25 °C en oscuridad y en agitación orbital a 125 rpm.

VIII.4 Curva de crecimiento

Se tomó una alícuota de 0.1 mL del medio a las 21, 27, 48, 52, 71, 99, 120 horas de incubación más 0.9 mL de agua y 10 µL HCl al 37% (1:5 v/v) para inmovilizar a las células, de esta preparación se tomaron 10 µL y se contaron en una cámara de Neubauer.

VIII.5 Aislamiento de mitocondrias

Después de determinar el tiempo óptimo del cultivo donde existe una mayor densidad celular, el cultivo se escaló a 1L de cultivo para el aislamiento de mitocondrias de acuerdo con el método reportado por Moreno-Sánchez y Raya (1988) y por Jasso-Chávez y cols., (2001). Todos los pasos se llevaron a cabo a 4°C. Las células se centrifugaron $1000 \times g$ por 10 min., se resuspendieron y se lavaron con un medio que contenía, 10 mM HEPES y 1 mM EGTA a pH 8, (medio HE). Aproximadamente 1×10^9 células se resuspendieron en 25 mL de medio HE y 0.25 mM PMSF, (un inhibidor de proteasas), esta suspensión se sonicó en tres tiempos de 15 segundos separados cada uno por 1 min de reposo a 20-22 μ de amplitud (70% del máximo poder del sonicador Branson 450 con una punta de 12 mm de diámetro). La suspensión se centrifugo a $600 \times g$ por 10 min., el botón se desecho y el sobrenadante se centrifugo a $7000 \times g$ por 10 min. El rendimiento por 1 L de células fue aproximadamente de 30-40 mg de proteína mitocondrial.

VIII.6 Ensayos enzimáticos

Las actividades de D- y L-ILDH fueron medidas en las mitocondrias aisladas por la adición de 30 mM de D- o L-lactato como substratos oxidables y determinando el consumo de oxígeno con un electrodo de oxígeno tipo Clark a 30°C, en un medio estándar saturado con aire el cual contenía 120 mM KCl, 20 mM MOPS, 0.5 mM EGTA (medio KME) a pH de 8.0; además se adicionó 5 mM KH_2PO_4 y 2 mM de MgCl_2 . Para determinar la actividad de citocromo c oxidasa las mitocondrias de *Euglena* fueron incubadas en el buffer KME en la presencia de 10 mM de ascorbato y 2 μ M de antimicina; la reacción se inicio con 2 mM de TMPD. El consumo de oxígeno por la citocromo c oxidasa fue corregido por la adición de 20 mM de azida.

Otra forma de medir la actividad de la D- y L-ILDH fue midiendo la velocidad de reducción del DCPIP en el cambio de absorbancia a 600 nm y usando un coeficiente de extinción de $21.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a pH de 7.6. Aproximadamente 0.1 mg de proteína mitocondrial se adicionó a una celda que contenía 1 mL de buffer HE con 0.3 mM de DCPIP. La reacción se inicio con la adición de 30 mM de D- o L-lactato.

VIII.7 Efecto del pH sobre la actividad de la D-iLDH y L-iLDH de *E. gracilis*

Para obtener el pH óptimo de actividad se utilizó una mezcla de amortiguadores: MES 20 mM (intervalo de capacidad buffer: 5.5-6.7), PIPES 20 mM (6.8-7.5), HEPES 20 mM (7.5-7.8), TRIS 20 mM (8.5-9), Trietanol amina (9.5-11). Los valores de pH de cada solución variaron de 5 a 9 con intervalos de 0.5 unidades. La actividad se determinó en 1 mL de buffer y 30 mM de D- o L-lactato midiendo la desaparición de 0.2 mM DCPIP a 522 nm, con un coeficiente de extinción molar de $8.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, (se utiliza 522 nm por que a esa longitud de onda se encuentra el punto isosbético del DCPIP que es en donde la especie oxidada y reducida absorben igual a una misma longitud de onda). La reacción se inició con la adición de la proteína (0.1mg proteína), para evitar un preincubación.

Para los estudios de estabilidad sólo se realizó para la L-iLDH, donde las mitocondrias se incubaron por 10, 20, 30, 40 y 50 min a los valores de cada buffer de pH, se tomó una alícuota de las mitocondrias incubadas y la actividad se determinó en medio HE a un pH óptimo de actividad que es de 8. La reacción se inicio con la adición de 30 mM de L-lactato.

VIII.8 Solubilización de la D-iLDH y L-iLDH con detergentes

Para la solubilización de la D- y L-iLDH de *E. gracilis* se utilizaron distintos detergentes: CHAPS, Octilglucósido (OGS), Lubrol, Triton X-100, Tween 20 y Desoxicolato de sodio (DOC) con distintas relación detergente/proteína ya reportadas anteriormente (Jasso-Chávez y cols., 2001) (Tabla III). La cantidad de proteína mitocondrial siempre fue de 7 mg y se llevo a una concentración final de 14 mg/mL, a esta mezcla se le adicionó 0.5 mM de PMSF como inhibidor de proteasas. Estas preparaciones se agitaron por 5 min en un vortex (Daigger genie 2) a la potencia máxima, se centrifugó a $14000 \times g$ por 10 min., el sobrenadante se separó y a esta fracción se le midió la actividad de D- y L-iLDH como se describió previamente.

Tabla III. Detergentes usados para la solubilización de la D-iLDH y L-iLDH

	Detergente %	D/P ¹	CMC ² mM	PM g/mol	Detergente mM	Tipo de detergente
CHAPS	1.8	0.7	6-10	614	29	Z
OGS	0.9	0.3	20-25	292	30	NI
Lubrol	2	0.7	ND	ND	---	NI
Triton X-100	1.4	0.5	0.2-0.9	ND	---	NI
Tween 20	2	0.5	0.059	ND	---	NI
DOC	2	0.8	2-6	414	48	A

¹Relación detergente/proteína. ²Concentración micelar crítica. ND; No determinado. Z; zwitteriónico. NI; No-iónico. A; aniónico.

VIII.9 Tratamiento térmico de la D-iLDH y L-iLDH

Las mitocondrias solubilizadas se calentaron en un baño con agitación a distintas temperaturas: 40, 55, 60 y 65°C a distintos tiempos: 30, 45, 50, 60 y 90 min, en presencia de 10 mM de oxalato como ligando para darle estabilidad a la enzima (Jasso-Chávez y cols., 2001). Después se centrifugó a 12000 xg durante 10 min y se recuperó el sobrenadante, se midió la actividad de D- y L-iLDH, como ya se ha descrito previamente.

VIII.10 Purificación de la D-iLDH

Todos los pasos para la purificación se realizaron a 4°C. Las mitocondrias aisladas de *E. gracilis* fueron diluidas 15-20 mg/mL, en buffer HE. El chaps fue adicionado lentamente hasta alcanzar una relación detergente/proteína de 0.7. La mezcla fue agitada fuertemente durante 5 min, después se centrifugó a 20,000 xg por 20 min. El sobrenadante se incubó a 60°C por 45 min en presencia de 10 mM de oxalato y se centrifugó a 14,000 xg por 10 min. La fracción soluble se mezcló con 50% (v/v) de glicerol y se guardó a -70°C. En estas condiciones, la enzima conservó el 70% de la actividad hasta por un mes. Las etapas de purificación de la D-iLDH fueron monitoreadas por la medición de la actividad (previamente descrito) y por SDS-PAGE.

VIII.11 Peso molecular de la D-iLDH y L-iLDH

El peso molecular de la D- y L-iLDH se determinó por geles desnaturizantes con SDS, (el gel separador contenía: 2.5 mL Acrilamida al 30%; 1.7 mL Tris 2 M a pH 8.8; 75 μ L SDS al 10%; 3.2 mL agua destilada; 3.8 μ L TEMED; y 38 μ L APS 10%. El gel concentrador contenía: 415 μ L Acrilamida al 30%; 250 μ L tris 1 M pH 6.8; 25 μ L SDS al 10%; 1.8 mL agua destilada; 1.8 μ L TEMED; 18 μ L APS al 10%). esto se hizo mezclando 30 μ g de proteína con el buffer de Laemmli (10% (v/v) de β -mercaptoetanol, 4% (p/v) de SDS, 20% (v/v) de glicerol, 0.005% (p/v) de azul de bromofenol, en 125 mM de Tris-HCl pH 6.8). Esta mezcla fue hervida durante 5 min y se cargó en un gel de acrilamida al 10%, el cual se corrió durante 1 hora a 125 V en una cámara Power-Pac 300 de Bio-Rad. El gel se tiñó con una solución de azul brillante de Coomassie al 0.2% (p/v), 50% de (v/v) etanol y 10% (v/v) de ácido acético, durante 45 min. Después el gel se destiñó con una solución de metanol:ácido acético:agua (5:1:4), durante 1 hora.

Para determinar la actividad de la D- y L-iLDH por electroforesis en gel de poliacrilamida, no se les adicionó SDS ni β -mercaptoetanol. Se mezcló 30 μ g de proteína con el buffer de Laemmli (sin SDS) y se cargó en el gel, el cual se corrió durante 4 horas a 175 V, en un baño de hielo. La actividad de la D- y L-iLDH fue detectada incubando al gel con 5 μ M PMS, 10 μ M de NBT y 0.5 mM de D-lactato durante 10 min. La reacción se paró con lavados de agua destilada.

VIII.12 Identificación del cofactor para la D-iLDH

Para conocer la naturaleza del cofactor de la D-iLDH, se tomaron 400 μ g de enzima aislada y se incubó durante 15 min con ácido tricloroacético (TCA) al 10% a 4°C, para extraer la flavina, esta mezcla se centrifugó a 14000 x g por 10 min y se recuperó el sobrenadante. La naturaleza de la flavina se identificó utilizando estándares de FAD y FMN los cuales se inyectaron en el HPLC usando una columna C18 de fase reversa con una longitud de 4.6 x 250 mm, un poro de 5 μ m y un flujo de 1mL/min. El gradiente que se usó fue de 95% de acetonitrilo (ACN) en 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA) a 5% de TFA y se detectó a 360 y 450 nm. Los estándares

fueron sometidos a las mismas condiciones ácidas que la muestra y se utilizó un coeficiente de extinción molar de $12 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Barquera y cols., 2004).

VIII.13 Inhibición de la D-iLDH y L-iLDH por DPI

El difenileneiodonio (DPI) es un inhibidor específico de flavoproteínas, el cual se une de forma irreversible a la flavina. Para el ensayo de D-iLDH se hizo con la enzima aislada y para la L-iLDH se realizó en mitocondrias aisladas. En una celda se adicionaron $30 \mu\text{g}$ de enzima y en los dos casos se incubaron en presencia de 0.5 mM D- o L-lactato (para mantener a la enzima reducida) en un buffer previamente burbujeado con N_2 durante 30 min. mas las distintas concentraciones de DPI a un pH de 8, la mezcla se aireó con N_2 por 10 min, para evitar un mínimo de reacción espuria entre le DPI y el O_2 del medio. La actividad se midió con 0.3 mM de DCPIP y la reacción se inició con 30 mM D- o L-lactato.

VIII.14 Determinación de la oligomerización de la D-iLDH

La estructura cuaternaria de la D-iLDH se determinó por cromatografía de exclusión molecular pasando 3 mg de enzima a través de una columna Sephacryl HS-200 ($1.7 \times 56 \text{ cm}$) con flujo de 0.66 mL/min en un buffer que contenía HEPES 10 mM a pH de 7 y se calculó el coeficiente de distribución (K_{av}) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

donde:

V_e = volumen de elusión (volumen al cual sale la proteína)

V_o = volumen vacío (volumen que hay afuera de las esferas en la columna)

V_t = volumen total (volumen total de la columna)

La columna fue calibrada con los siguientes estándares de peso molecular: (Pharmacia): azul dextran (2×10^6 daltones), ferritina de bazo de caballo (440 kDa), catalasa de hígado de bovino (232 kDa), aldolasa de músculo de conejo (158 kDa), albúmina sérica de bovino (66 kDa), quimiotripsinogeno A de páncreas de bovino (25 kDa), ribonucleasa A de páncreas de bovino (13.7 kDa) y vitamina B12 (1.7 kDa). El

volumen de elusión de la D-iLDH se determinó midiendo el cambio de absorbancia y la actividad enzimática de cada fracción. Así, se graficó el logaritmo del peso molecular de distintas proteínas marcadoras contra el coeficiente de distribución para obtener una curva patrón.

IX. RESULTADOS

IX.1 Curva de crecimiento

Previamente, en nuestro laboratorio se determinó que el medio de cultivo en el cual la expresión de D- y L-iLDH es mayor, es aquel que contenía glutamato-malato (medio Hutner) como fuente de carbono (Jasso-Chávez y Moreno-Sánchez, 2003), por lo cual nosotros decidimos utilizar este medio para el crecimiento de *E. gracilis*.

La curva de crecimiento de *E. gracilis* fue de tipo sigmoideal y la densidad celular fue muy similar a lo ya reportado por nuestro laboratorio (Jasso-Chávez y Moreno-Sánchez, 2003). En la figura 1 se aprecia la fase de latencia, logarítmica y estacionaria; fue en ésta (90-94 h) donde se cosecharon las células ya que se encuentra la mayor densidad celular para el aislamiento de las mitocondrias.

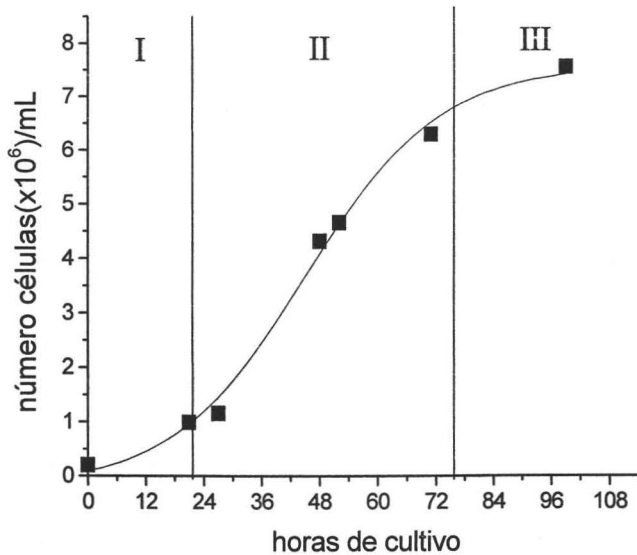


Figura 1. Curva de crecimiento de *E. gracilis*. El inoculo inicial fue de 0.2×10^6 células/mL y la fuente de carbono fue glutamato-malato. I fase de latencia (0-18h), II fase logarítmica (18-70h), III fase estacionaria (70-100h).

IX.2 Aislamiento de mitocondrias

Se ha determinado que las mitocondrias aisladas de *E. gracilis* oxidan una gran variedad de metabolitos y que son capaces de sintetizar ATP (Uribe y Moreno-Sánchez, 1992; Moreno-Sánchez y cols., 2000). En nuestro trabajo no se aislaron mitocondrias acopladas ya que la sonicación fue más estricta con respecto a lo reportado con la finalidad de obtener mayor cantidad de proteína mitocondrial. Además, nosotros no adicionamos albúmina (la cual es un buen quelante de ácidos grasos libres que podrían actuar como desacoplantes), debido a que podría interferir con la identificación de nuestra proteína (de acuerdo a lo reportado en bacterias la D-iLDH pesa aprox. 60-66 kDa). A pesar de esto, nuestras mitocondrias mostraron que el consumo de oxígeno con D- y L-lactato y cyt c oxidasa fue similar al reportado (Uribe y Moreno-Sánchez, 1992; Jasso-Chávez y cols., 2001). Las actividades de deshidrogenasas midiendo directamente la desaparición de DCPIP fueron similares que nuestro grupo de trabajo había reportado anteriormente (Jasso-Chávez y cols., 2001) (Tabla 1).

Tabla 1. Actividades enzimáticas de la D-iLDH y L-iLDH y cyt c oxidasa de *E. gracilis* en mitocondrias aisladas

	natO/min *mg prot.	+ 10 mM oxalato % inhib	+ 10 mM azida % inhib	nmoles DCPIP/min *mg prot.	+ 10 mM oxalato % inhib
D-Lactato	340	97	100	233	95
L-Lactato	230	91	100	276	80
TMPD	450	97	100	----	----

IX.3 Efecto del pH sobre la actividad de la L-iLDH

Debido a que uno de nuestros objetivos fue purificar a la L-iLDH y se ha reportado que esta enzima en bacterias y en *E. gracilis* es muy lábil a la temperatura y al extraerla de la membrana (Edwin y Gotshlich, 1793; Allison y cols., 1985; Jasso-Chávez y cols., 2001), nosotros nos abocamos a establecer las condiciones óptimas de pH de actividad y estabilidad de la L-iLDH en mitocondrias aisladas de *Euglena*. Determinamos que el pH óptimo de actividad fue de 8 (Figura 2) y el pH óptimo de estabilidad fue de 8.5-9 hasta por 50 minutos (Figura 3), lo que sugiere la participación de un aminoácido básico en la catálisis y una carga neta positiva de la proteína.

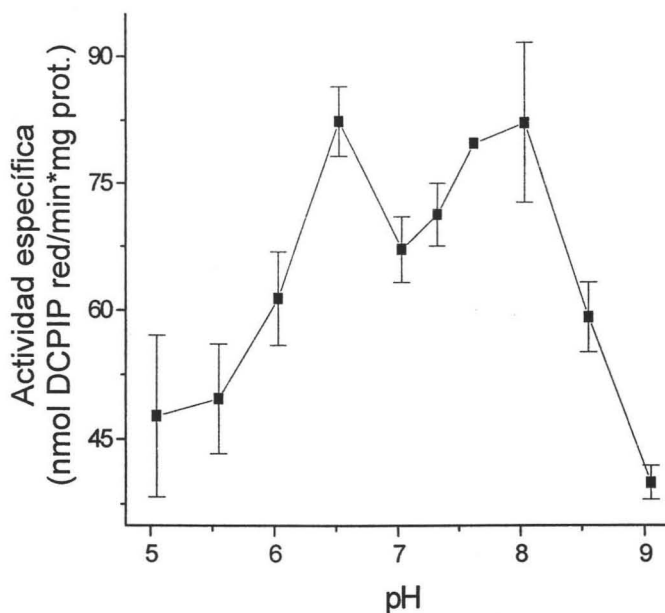


Figura 2. Determinación del pH óptimo de actividad de la L-iLDH

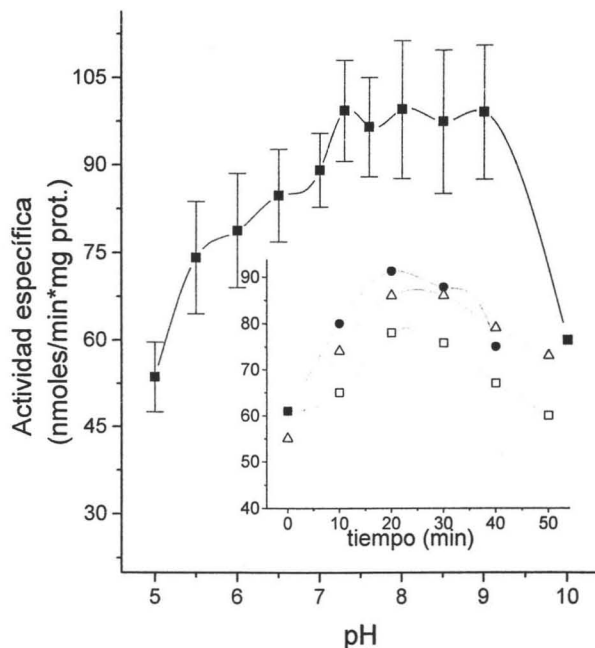


Figura 3. Determinación de la estabilidad a distintos pHs de la L-iLDH de *E. gracilis*. Las mitocondrias se incubaron por 10 min (cuadros cerrados) a los pHs indicados y la actividad se determinó a pH de 8. Los datos mostrados son el promedio \pm E.S. de 4 experimentos. El inserto muestra la actividad a mayores tiempos de incubación a pH de 8 (cuadros abiertos), pH 8.5 (círculos), y pH 9 (triángulos).

IX.4 Solubilización de la D- iLDH y L-iLDH

Se determinó que el mejor detergente para la solubilización de la D-iLDH fue el CHAPS, ya que logró extraer el 95% de la actividad, a una concentración de 23 mM, este valor es tres veces mayor que la CMC reportada para este detergente (reportado por el proveedor Calbiochem), por lo que estamos asegurando que la enzima se encuentra en micelas. Otros detergentes también solubilizaron a la enzima pero con un menor rendimiento con respecto a la actividad total (Figura 4). Para la extracción de la L-iLDH el mejor detergente fue el Lubrol con un 60 % de recuperación, de este detergente solo se sabe que es no-iónico y se desconoce su

peso molecular, por lo cual no sabemos la concentración molar del detergente que se utilizó. El octilglucosido (OGS) es otro detergente no-iónico que logró extraer el 50% de la L-iLDH activa, se utilizó una concentración de 19 mM, valor que esta cerca de la CMC del detergente. El DOC no logró extraer a la enzima de la membrana y el CHAPS la inhibió casi al 100% (Figura 4).

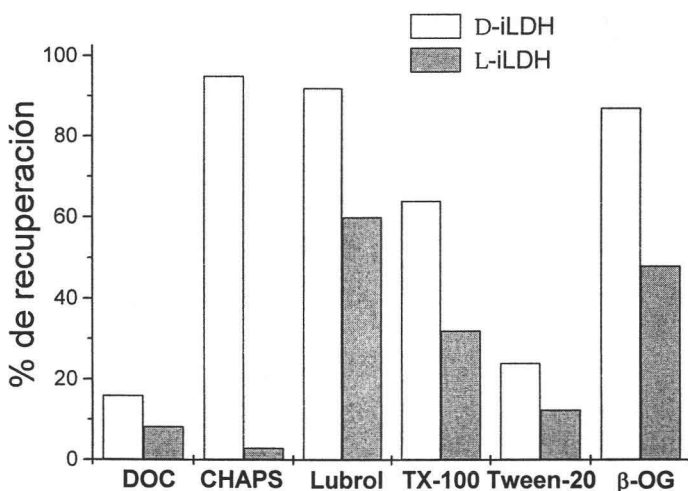


Figura 4. Solubilización de la D-iLDH y L-iLDH de *E. gracilis*

IX.5 Purificación de la D-iLDH y L-iLDH

D-iLDH. La D-iLDH se logró purificar de una forma eficiente y rápida ya que solo consistió en el aislamiento de mitocondrias, la solubilización de las mitocondrias con CHAPS y el tratamiento térmico (Tabla 2).

Tabla 2. Marcha de purificación de la D-iLDH

	mg totales	Actividad específica nmol/min*mg prot.	Actividad total nmol/min	% rend.
Mitocondria	51 ± 8	210 ± 82	10, 700 ± 2190	100
Solubilizado	21 ± 2.0	510 ± 100	10, 710 ± 180	100
60°C 45 min.	1.57 ± 0.25	6000 ± 1400	9450 ± 1500	88 ± 6

La actividad específica se incremento cerca de 30 veces y el por ciento de rendimiento es muy alto con respecto a lo reportado para enzimas bacterianas. El gel desnaturalizante mostró una sola banda de aproximadamente 62 kDa. Una fracción de la enzima fue cargada en un gel nativo revelado por actividad utilizando como aceptores de electrones artificiales al NBT y PMS, este gel mostró una sola banda cuando fue revelado con D-lactato, así se comprobó que la enzima que purificamos es la D-iLDH (Figura 5).

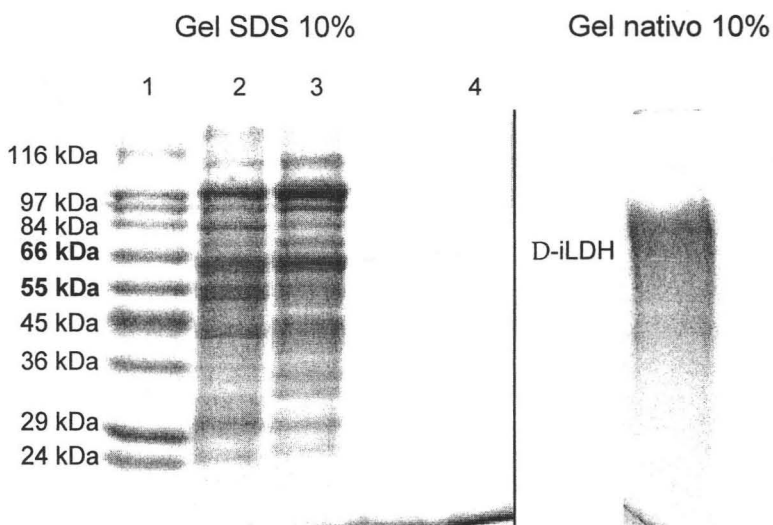


Figura 5. Gel desnaturalizante SDS 10% y gel nativo 10% para la D-iLDH. Pesos Moleculares, carril 1; Mitocondrias, carril 2; Solubilizado, carril 3; D-iLDH, carril 4. El gel nativo se reveló con 10 mM de PMS, NBT y D-lactato durante 10 min. El % de pureza en el gel SDS-PAGE fue del 70%.

L-iLDH. Con respecto a la L-iLDH no se logró purificar con los pasos empleados, además de que no se pudo continuar adelante debido a la inactivación de la enzima (Tabla 3).

Tabla 3. Marcha de purificación de la L-iLDH

	Actividad específica nmoles/min*mg prot.	Proteína total mg	Actividad total nmoles/min
Mitocondrias	32.8	360	11808
Solubilizado	31.2	102.6	3201
Concentrado de Mono Q	61.8	34.2	2113
Concentrado de Sephacryl	15.2	8.2	123
Concentrado de Afinidad	23	2.6	61.5

IX.6 Identificación del cofactor de la D-iLDH

Los experimentos de cromatografía por HPLC que se realizaron para determinar la naturaleza del cofactor de la D-iLDH mostraron que tal como se ha reportado (Barquera y cols., 2004), el estándar del FAD se eluye primero que el de FMN (19 y 20.3 min, respectivamente). De igual forma que el FAD, el tiempo de retención de la flavina de la D-iLDH de *E. gracilis* fue de 19.3 min. De acuerdo con las especificaciones dadas por el proveedor de la columna utilizada para estos experimentos (Altech Co.), una diferencia menor a 0.3 min en los tiempos de retención son confiables para determinar que se trata de la misma molécula (Figura 6).

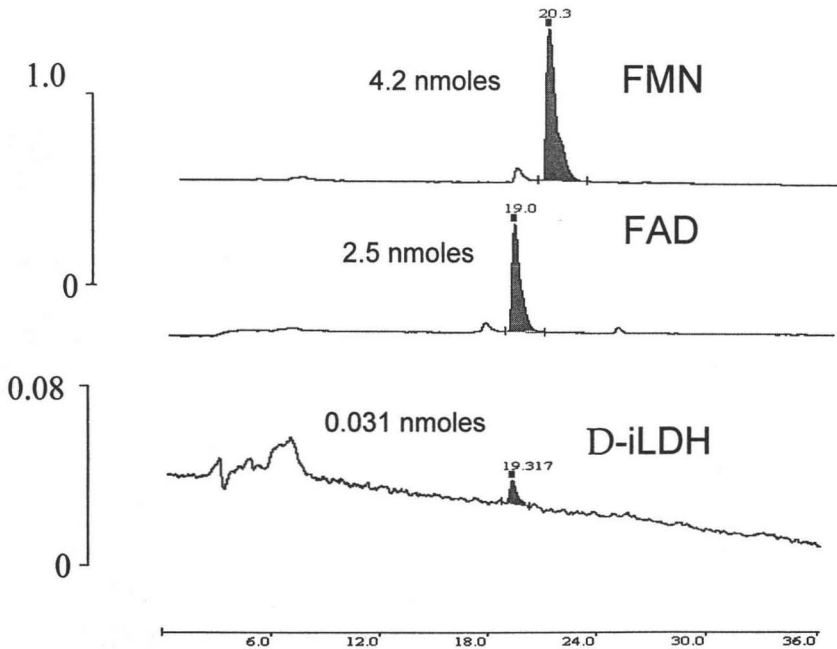


Figura 6. Identificación del cofactor de la D-iLDH por cromatografía (columna C18 de fase reversa) por HPLC.

IX.7 Inhibición de la D-iLDH y L-iLDH por DPI

Para determinar si las dos enzimas de *E. gracilis* son flavoproteínas como se ha reportado para algunas enzimas (Tew, 1993), se determino el efecto del DPI (un inhibidor específico de flavoproteínas) sobre la actividad de la L-iLDH (en mitocondrias intactas) y de la D-iLDH (en la enzima aislada). Como se observa en la figura 8, con 4 mM de DPI las actividades de D- y L-iLDH disminuyeron en 70 y 90 %, respectivamente, lo que sugiere que estas deshidrogenasas en este organismo son flavoenzimas al igual que las iLDH bacterianas (Horikiri y cols., 2003) y que la transferencia de electrones es en un solo paso, ya que el DPI no reacciona cuando la flavina esta completamente reducida (Tew, 1993).

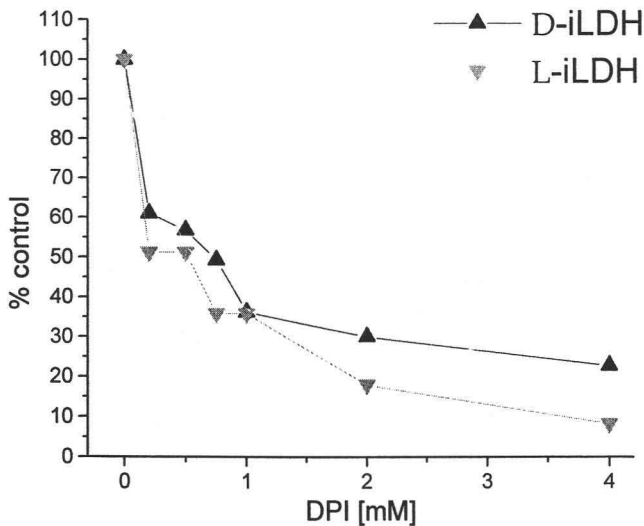


Figura 7. Inhibición de la D-iLDH y L-iLDH por DPI. El 100 % del control para la D-iLDH fue de 566 nmol/min*mg prot. y para la L-iLDH de 77 nmol/min*mg prot. Para la D- y L-iLDH las IC_{50} fueron 1 y 0.5 mM para la respectivamente. Los datos mostrados son el promedio de 2 experimentos.

XI.8 Determinación de la oligomerización de la D-iLDH

El volumen de elución de la D-iLDH a través de la columna de exclusión molecular sephadex S200 fue de 83 mL, lo que generó una K_{av} de 0.35 el cual se interpoló en la curva patrón de marcadores de peso molecular (figura 7) obteniendo un peso molecular de 68 kDa similar al determinado en geles de SDS desnaturalizantes, lo que sugiere que la D-iLDH de *E. gracilis* al igual que bacterias es un monómero.

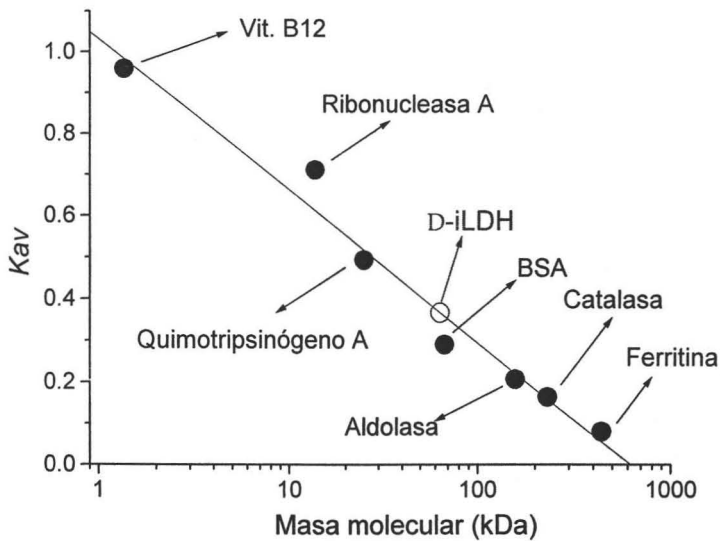


Figura 8. Determinación de la oligomerización de la D-iLDH. Se utilizó una columna Sephacryl S-200 (1.7 x 56 cm), con un flujo de 0.66 mL/min, en un Buffer HEPES 10 mM a pH 8. En materiales y métodos se describe la fórmula para obtener el coeficiente de distribución para la D-iLDH.

IX.9 Caracterización cinética de la D- iLDH y L-iLDH

Aunque la L-iLDH se inactivo rápidamente (aprox. 24 h) con la ultima fracción que se obtuvo después de los pasos de purificación se determinaron algunos parámetros cinéticos (Tabla 4).

Tabla 4. Parámetros cinéticos de la L-iLDH de *E. gracilis* y de bacterias

	L-iLDH <i>E. gracilis</i>	L-iLDH Bacterias
pH óptimo de actividad	8.5-9	7.5 ¹
<i>Km</i> L-lactato (mM)	17	0.5 ¹ y 0.7 ²
<i>Km</i> DCPIP (μ M)	10	----
<i>Vmax</i> (nmol DCPIP/min x mg)	90	300 ²
<i>Km</i> Q ₁ (μ M)	14.3	----
<i>Ki</i> oxalato (mM)	0.15 (C)	0.03 ¹ (NC)
<i>K</i> _{0.5} Triton X-100 (%)	0.04	----

C; competitivo. NC; no competitivo. ¹; Markwell y Lascelles, 1978. ²; Diez-González y cols., 1997.

La L-iLDH de *E. gracilis* fue inhibida por oxalato al igual que la L-iLDH que se encuentra en bacterias (Markwell y Lascelles, 1978). Además la L-iLDH de *E. gracilis* fue capaz de reducir quinonas.

En la tabla 5 se muestran los parámetros cinéticos de la D-iLDH en mitocondrias aisladas, de la D-iLDH aislada de *E. gracilis* y de la D-iLDH purificada de *E. coli*, para su comparación.

Tabla 5. Parámetros cinéticos de la D-iLDH.

	D-iLDH en mitocondrias ¹	D-iLDH aislada de <i>E. gracilis</i>	D-iLDH <i>E. coli</i> ²
pH óptimo de actividad	7.3-7.6	8	8-9
<i>Km</i> D-lactato (mM)	2.7± 0.3	2.0±0.8	1.0
<i>Km</i> DCPIP (μM)	35±10	10	----
<i>Vm</i> (nmol DCPIP/min x mg)	268±31	6000±1400	15,000
<i>Km</i> Q1 (μM)	41±7	8.1	8.5
<i>Vm</i> (nmol Q1/min x mg)	427±35	7000	-----
<i>Km</i> TCHQ (μM)	21	21	-----
<i>Vm</i> (nmol TCHQ/min x mg)	1480	1480	-----
<i>Ki</i> oxalato (mM)	0.09±0.01 (M)	0.14 (M)	0.001
<i>Ki</i> L-lactato (mM)	19 (C)	10 (M)	16 (S)

C; inhibición competitiva. M; inhibición mixta. S; como sustrato. ¹Jasso-Chávez y cols. ²Futai, 1973.

Los parámetros cinéticos de la D-iLDH de *E. gracilis* fueron muy similares a los reportados para la enzima de *E. coli*., en los que destaca la capacidad de reducir quinonas. Los parámetros cinéticos de la D-iLDH en mitocondrias aisladas no cambiaron significativamente con respecto a los determinados en la enzima aislada de *E. gracilis*.

X. DISCUSIÓN

Las mitocondrias del protista de vida libre *E. gracilis* oxidan una gran variedad de sustratos, incluyendo succinato, 2-oxoglutarato, glutamato, malato, NADH externo y otros metabolitos como son succinato semialdehído, ácido γ -amino-butírico y lactato, no comúnmente usados por otro tipo de mitocondrias (Buetow, 1989).

El metabolismo del lactato en *E. gracilis* es muy semejante al que se encuentra en bacterias; ya que en estos organismos la oxidación de lactato esta asociada con la cadena respiratoria y las enzimas que llevan acabo dicha reacción se encuentran unidas a la membrana (Ingledew y Poole, 1984; Kohn y Kaback, 1973).

En este trabajo se realizó una curva de crecimiento celular de *E. gracilis* con la finalidad de determinar el tiempo en el cual se encuentra la mayor densidad celular para que posteriormente se aislaran las mitocondrias; las células fueron cosechadas a las 96 horas de cultivo en este punto de la curva empieza la fase estacionaria por lo tanto hay una mayor densidad celular, esto nos permite obtener un buen rendimiento en el aislamiento de mitocondrias, además de que hay un 90% de células viables; si el tiempo pasa de las 100 horas de cultivo las células empiezan a enquistarse disminuyendo la cantidad de mitocondrias.

La técnica de aislamiento de mitocondrias utilizada tuvo algunas modificaciones con respecto a lo reportado por Moreno-Sánchez y cols., 2000. En nuestro caso no utilizamos albúmina ya que podría interferir con la identificación de nuestra proteína con respecto al peso molecular; de acuerdo a lo reportado en bacterias, la D-iLDH pesa aprox. 60-66 kDa. Tampoco aislamos mitocondrias acopladas por que la sonicación fue más estricta con respecto a lo reportado; con la finalidad de obtener mayor cantidad de proteína mitocondrial. Sin embargo, las mitocondrias obtenidas fueron capaces de oxidar lactato por medio de la D- o L-iLDH ya que el consumo de O_2 fue sensible a oxalato y azida, lo que indica que estuvo acoplado a la cadena respiratoria, lo que sugiere que se obtuvo un buen aislamiento de mitocondrias. La inhibición del consumo de oxígeno por la adición de 2 mM de azida sugiere una inhibición del complejo IV cuya actividad se determinó por la

adición de TMPD y ácido ascórbico respectivamente. La presencia de actividad del complejo IV también fue un indicador de que se aislaron mitocondrias.

Con respecto al efecto del pH sobre la actividad de la L-iLDH en mitocondrias aisladas de *E. gracilis* se sugiere la participación de un aminoácido básico en la catálisis y una carga neta positiva de la proteína ya que el pH óptimo de actividad fue de 8, mientras que el pH de estabilidad fue de 8.5. En la D-iLDH el pH óptimo de actividad había sido determinado en mitocondrias aisladas de *E. gracilis* por nuestro grupo de trabajo (Jasso-Chávez y cols., 2001), el cual es de 7.6. En este trabajo nosotros determinamos que el pH óptimo de actividad en la enzima aislada fue de 8 (datos no mostrados). Estas similitudes proponen que la D- y L-iLDH pueden tener involucrados aminoácidos semejantes en la catálisis. Se ha reportado que el pH de actividad de la D- y L-iLDH en bacterias va de 5 a 9 (Garvie, 1980), las enzimas que se encuentran en *E. gracilis* están dentro de este intervalo.

Al tratar a las mitocondrias de *E. gracilis* con detergentes, hubo una solubilización del 95 y 60% de la D- y L-iLDH con CHAPS y Lubrol, respectivamente, aunque hubo otros detergentes que también solubilizaron a las dos enzimas pero con un menor rendimiento. Así, la solubilización de las enzimas pareciera no depender tanto de la carga del detergente, si no de la estructura química de la molécula que proporcione un mejor ambiente a la enzima para una mayor estabilidad.

Con los pasos de purificación empleados, no se logró purificar a la L-iLDH y no se pudo continuar adelante debido a la inactivación de la enzima. Los pasos utilizados en la purificación de la L-iLDH no ayudaron a aislar a la enzima, el tratamiento térmico inactivo rápidamente a la L-iLDH; la cromatografía de intercambio iónico y de afinidad tampoco ayudó a la purificación ya que la actividad específica y el rendimiento con respecto a la actividad total fueron bajas, además de que los geles desnaturizantes SDS mostraron una gran cantidad de bandas. Con la fracción concentrada que se obtuvo de la cromatografía de afinidad se determinaron varios parámetros cinéticos; el punto que se tiene que resaltar es que la enzima sí fue capaz de reducir quinonas, lo cual nos dice que la L-iLDH de *E. gracilis* lleva

acabo la misma función que en bacterias; se ha reportado las enzimas de *E. coli* pueden ceder los electrones directamente a la ubiquinona (Ingledey y Poole, 1984).

Debido a las propiedades termorresistentes que presenta la D-iLDH se logró purificar rápidamente con tres pasos: aislamiento de mitocondrias, solubilización con detergentes y tratamiento térmico. La capacidad de la D-iLDH aislada para reducir quinonas de alto potencial como la Q1 y de bajo potencial como la TCHQ, sugiere que fisiológicamente la UQ9 y RQ9 que son quinonas endógenas de alto y bajo potencial en *E. gracilis*, podrían ser ambas sustratos de ambas iLDH.

En bacterias, el L-lactato es también un sustrato para la D-iLDH, aunque con muy poca actividad y afinidad comparándolo con D-lactato, en cambio la D-iLDH de *E. gracilis* fue inhibida por L-lactato con una K_i de 10 mM, lo que sugiere que este metabolito podría estar inhibiendo la actividad de la D-iLDH en *E. gracilis*, ya que se ha reportado que en *E. gracilis* la concentración de L-lactato intracelular en el tiempo que nosotros cosechamos es de 20 mM (Jasso-Chávez y cols., 2001).

Con respecto al piruvato se utilizaron concentraciones de 20 mM y sólo inhibió el 22% de la actividad de la D-iLDH. En *E. gracilis* se ha reportado que la concentración intracelular de piruvato es de 0.5 mM por lo cual no existe una inhibición por producto en este organismo.

Con la D-iLDH aislada se demostró que la enzima es un flavoproteína y se definió el grupo que contiene por medio de HPLC el cual fue FAD, al igual a lo que se ha reportado para la D-iLDH que se encuentra en bacterias (Garvie, 1980), además, la actividad de la D-iLDH de *E. gracilis* fue inhibida por el DPI, como ya se mencionó este compuesto es un inhibidor específico de flavoproteínas.

La inhibición por DPI sugiere que la enzima en efecto es una flavoproteína al igual que las enzimas que se encuentran en bacterias; ya que se inhibió la actividad de la L-iLDH en mitocondrias de *E. gracilis* hasta en un 90% con respecto a su actividad inicial. Lo que nos sugiere que las dos enzimas son flavoproteínas, además que la transferencia de electrones es secuencial, ya que el DPI solo reacciona con flavoproteínas que transfieren los electrones de uno en uno.

Por último, se determinó el peso molecular y la oligomerización de la enzima por exclusión molecular, el peso molecular de la enzima fue de 68 kDa siendo un monómero al igual que se ha reportado para bacterias.

XI. CONCLUSIONES

La similitud que existe entre las iLDH que se encuentran en las bacterias y en las mitocondrias de *E. gracilis* en cuanto a la afinidad por quinonas, su localización en la membrana, así como el que formen parte de la cadena respiratoria, sugiere que estas enzimas tienen un origen en común; ya que *E. gracilis* es uno de los organismos más primitivos con mitocondrias que posee D- y L-iLDH con las mismas características que las de bacterias (Garvie, 1980).

Es esencial para nosotros conocer molecular y estructuralmente a las iLDH de *Euglena gracilis*, ya que estas enzimas forman parte de la lanzadera de lactato y están involucradas en la bioenergética de este organismo.

XII. REFERENCIAS

Allison, N., O'Donnell, M. J., and Fewson, C. A. (1985). Membrane-bound lactate and mandelate dehydrogenases of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Biochem. J.* **231**:407-416.

Ahmed, S. A. and Claiborne, A. (1992). Catalytic properties of streptococcal NADH oxidase containing artificial flavine. *J. Biol. Chem.* **267**:25822-25829.

Barquera B, Zhou W, Morgan JE, Gennis RB (2002). Riboflavin is a component of the Na⁺-pumping NADH-quinone oxidoreductase from *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci.* **99**:10322-4.

Benito Mercadé Ma. del Carmen y Escamilla Marván Edgardo, (1982). El sistema respiratorio en las bacterias. *BEB.* **4**:3-10.

Brown PR and Tata R. (1987). Glycolate Inhibition of growth of *Pseudomonas aeruginosa* on lactate medium. *J. Gen. Microbiol.* **133**:1521-6.

Buetow D. E. (1989). The mitochondrion in: The Biology of the *Euglena*. *Academic Press Inc.*, USA, vol. IV, pp247-314.

Castro-Guerrero, N. A., Krab, K., and Moreno-Sánchez, R. (2004). The Alternative Respiratory Pathway of *Euglena* Mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **36**:459-69.

Chavez E. and Jay D. (1987). Control of mitochondrial Ca²⁺ retention by ADP-stimulated glutamic dehydrogenase. *J Bioenerg Biomembr.* **19**:571-80.

Collins N. Merrett M. J. (1975). The localization of glycolate-pathway enzymes in *Euglena*. *Biochem J.* **148**:321-8.

Covian R., Moreno-Sánchez R., (2001). Role of protonatable groups of bovine heart bc₁ complex in ubiquinol binding and oxidation. *Eur. J. Biochem.* **268**:5783-90.

Daff, S., Ingledew, W. J., Reid, G. A. and Chapman, S. K. (1996). New Insights into the Catalytic Cycle of Flavocytochrome b₂. *Biochem.* **35**:6345-6350.

Díez-Gonzalez, F., Russell, J. B., and Hunter, J. B. (1997). NAD-independent lactate and butyryl-CoA dehydrogenase of *Clostridium acetobutylicum* P262. *Curr. Microbiol.* **34**:162-166.

Erwin, A. L. and E. C. Gotshlich. (1973). Oxidation of D-Lactate and L-lactate by *Neisseria meningitidis*: Purification and cloning of meningococcal D-lactate dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **175**:6382-6391.

Eugene M. Barnes, Jr. and H. R. Kaback. (1971). Mechanisms of Active Transport in Isolated Membrane Vesicles I. The site of energy coupling between D-lactic dehydrogenase and β -galactoside transport in *Escherichia coli* membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* **246**:5516-5522.

Fischer R. S., Martin G. C., Rao P. and Jensen R. A. (1994). *Nisseria gonorrhoeae* possesses two nicotinamide adenine dinucleotide-independent lactate dehydrogenases. *FEMS Microbiol.* **115**:39-44.

Futai, M. (1973). Membrane D-lactate dehydrogenase from *Escherichia coli*. Purification and properties. *Biochem.* **12**:2468-2474.

Futai M, and Kimura H. (1977). Inducible membrane-bound L-lactate dehydrogenase from *Escherichia coli*. Purification and properties. *J Biol Chem.* **252**:5820-7.

Garvie, E. I. (1980). Bacterial lactate dehydrogenases. *Microbiol. Rev.* **44**:106-139.

Gasser, F. (1970). Electrophoretic characterization of lactic dehydrogenases in the genus *Lactobacillus*. *J. Gen. Microbiol.* **62**:223-39.

Gemperli AC, Dimroth P, Steuber J. (2002). The respiratory complex I (NDH I) from *Klebsiella pneumoniae*, a sodium pump. *J. Biol. Chem.* **277**:33811-7.

Gennis, R. B. (1991). Some recent advances relating to prokaryotic cytochrome *c* reductases and cytochrome *c* oxidases. *Biochim. Biophys. Acta* **1058**:21-24.

Gondry M, Lederer F. (1996). Functional properties of the histidine-aspartate ion pair of flavocytochrome b2 (L-lactate dehydrogenase): substitution of Asp282 with asparagine. *Biochemistry.* **35**:8587-94.

Hallenbeck, P. C. and Gennaro, G. (1998). Stopped-flow kinetic studies of low potential electron carriers of the photosynthetic bacterium, *Rhodobacter capsulatus*: ferredoxin Y and nifF. *Biochem. Biophys. Acta.* **1365**:435-442.

Haugaard N (1959). D- and L-lactic acid oxidases of *E. coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* **31**:66-72.

Hernandez-Urzuza E, Mills CE, White GP, Contreras-Zentella ML, Escamilla E, Vasudevan SG, Membrillo-Hernandez J, Poole RK. (2003). Flavohemoglobin Hmp, but not its individual domains, confers protection from respiratory inhibition by nitric oxide in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **278**:34975-82.

Horst W. Doelle. (1971). Nicotinamide Adenine Dinucleotide- Dependent and Nicotinamide Adenine Dinucleotide-Independent Lactate Dehydrogenases in Homofermentative and Heterofermentative Lactic Acid Bacteria. *J. Bacteriol.* **108**:1284-1289.

Hoey, M. E., Allison, N., Scott, A. J. and Fewson, C. A. (1987). Purification and properties of L-mandelate dehydrogenase and comparison with other membrane-bound dehydrogenases from *Acinetobacter calcoaceticus*. *Biochem. J.* **248**:871-876.

Horikiri S, Aizawa Y, Kai T, Amachi S, Shinoyama H, Fujii T. (2004). Electron acquisition system constructed from an NAD-independent D-lactate dehydrogenase and cytochrome *c*₂ in *Rhodospseudomonas palustris* No. 7. *Biosci Biotechnol Biochem.* **68**:516-22.

Illias RM, Sinclair R, Robertson D, Neu A, Chapman SK, Reid GA. (1998). L-Mandelate dehydrogenase from *Rhodotorula graminis*: cloning, sequencing and kinetic characterization of the recombinant enzyme and its independently expressed flavin domain. *Biochem J.* **333**:107-15.

Ingledeew John W. and Poole Robert K. (1984). The Respiratory Chains of *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **48**:222-271.

Inui H., Miyatake K. Nakano Y., Kitoaka S. (1984). Occurrence of oxygen-sensitive, NADP⁺-dependent pyruvate dehydrogenase in mitochondria of *Euglena gracilis*. *J. Biochem.* **96**:931-4.

Jasso-Chávez, R., Torres-Márquez, M. E. and Moreno-Sanchez, R. (2001) The membrane-bound L- and D-lactate dehydrogenase activities in mitochondria from *Euglena gracilis*. *Arch. of Biochem. and Biophys.* **390**:295-303.

Jasso-Chávez, R. and Moreno-Sánchez, R. (2003). Cytosol-mitochondria transfer of reducing equivalents by a lactate shuttle in heterotrophic *Euglena*. *Eur. J. Biochem.* **270**:4942-4951.

Kaback, H. R., and Millner, L. S. (1970) Relationship of a membrane-bound D-(-)-Lactic dehydrogenase to amino acid transport in isolated bacterial membrane preparations. *Biochem.* **66**:1008-1015.

Kohn Leonard D. and Kaback Ronald H. (1973). Mechanisms of Active transport in Isolated Bacterial Membrane Vesicles. *J. Biol. Chem.* **20**:7012-7017.

Korotkov, S.M., Skulskii V. A. and Glazunov. V. V. (1998). Cd²⁺ Effecto on respiration and swelling of rat liver mitochondria were modified by monovalent cations. *J. Inorg. Biochem.* **79**:17-23.

Liu, H. Y. and Germanas, J. P. (1998). NMR spectroscopic studies of the hydrogenosomal [2Fe-2S] ferredoxin from *Trichomonas vaginalis*: Hyperfine-shifted ¹H resonances. *J. Inorg. Biochem.* **72**:127-131.

Long GL, Kaplan NO. (1968). D-lactate specific pyridine nucleotide lactate dehydrogenase in animals. *Science.* **162**:685-6.

Markwell J. P and Lascelles J. (1978). Membrane-bound, pyridine nucleotide-independent L-Lactate dehydrogenase of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *J. Biochem.* **332**:413-419.

Meinhardt SW. Kula T. Yagi T. Lillich T. and Ohnishi T. (1987). EPR characterization of the iron-sulfur clusters in the NADH: ubiquinone oxidoreductase segment of the respiratory chain in *Paracoccus denitrificans*. *J. Biol. Chem.* **262**:9147-53.

Moreno-Sánchez, R. y Raya, J. C. (1987). Preparation of coupled mitochondria from *Euglena* by sonication. *Plant Sci.* **48**:151-157.

Moreno-Sánchez, R., Covián, R., Jasso-Chávez, R., Rodríguez-Enríquez, S., Pacheco-Moisés, F., and Torres-Márquez, M. E. (2000) Oxidative phosphorylation supported by an alternative respiratory pathway in mitochondria from *Euglena*. *Biochim. Biophys. Acta* **1457**:200-210.

Morris, C. J., Black, A. C., Pealing, S. L., Manson, D. C. F., Chapman, S. K., Reid, G. A., Gibson, D. M, and Ward, F. B. (1994). Purification and properties of a

novel cytochrome: flavocytochrome *c* from *Shewenella putrefaciens*. *Biochem. J.* **302**, 587-593.

Myllykallio, H., Drepper, F., Mathis, P. and Daldal, F. (1998). Membrane-anchored cytochrome *c_y* mediated microsecond time range electron transfer from cytochrome *bc₁* complex to the reaction center in *Rhodobacter capsulatus*. *Biochem.* **37**:5501-5510.

O'Donnell VB, Smith GC, Jones OT. (1994). Involvement of phenyl radicals in iodonium inhibition of flavoenzymes. *Mol Pharmacol.* **46**:778-85.

Pieulle, L., Guigliarelli, B., Asso, M, M., Dole, F., Bernadac, A. and Hatchikian, E. C. (1995). Isolation and characterization of the pyruvate-ferredoxin oxidoreductase from the sulfate-reducing *Desulfovibrio africanus*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1250**:49-59.

Price C. A. (1961). A zinc-dependent Lactate dehydrogenase in *Euglena gracilis*. *Biochem. J.* **82**:61-62.

Reed DW. and Hartzell PL. (1999). The *Archaeoglobus fulgidus* D-lactate dehydrogenase is a Zn(2+) flavoprotein. *J. Bacteriol.* **181**:7580-7.

Sharpe, M. E., Garvie I. and Tilbury R. H. (1972). Some slime-forming heterofermentative species of the genus *Lactobacillus*. *Appl. Microbiol.* **23**:389-397.

Somlo Marie. (1965). Induction des lactico-cytochrome *c* reductases (D- et L-) de la levure aerobie par les lactates (D- et L-). *Biochim. Biophys. Acta.* **97**:183-201.

Sumita Chakraborty and Vincent Massey (2002). Reaction of Reduced Flavins and Flavoproteins with Diphenyliodonium Chloride. *J. Biol. Chem.* **44**:41507-41516.

Suzuki M, Nakase T. (2002). A phylogenetic study of ubiquinone-7 species of the genus *Candida* based on 18S ribosomal DNA sequence divergence. *J Gen Appl Microbiol.* **48**:55-65.

Taguchi H. y Ohta T. (1991). D-lactate dehydrogenase is a member of the D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase family. *J Biol. Chem.* **266**:12588-12594.

Taylor BL, Zhulin IB. (1998). In search of higher energy: metabolism-dependent behaviour in bacteria. *Mol Microbiol.* **28**:683-90.

Tew D. G. (1993). Inhibition of cytochrome P450 reductase by the diphenyliodonium cation. Kinetic analysis and covalent modifications. *Biochemistry*. **38**:10209-15.

Tielens, A. G. M. and Van Hellemond, J. J. (1998). The electron transport chain in anaerobically functioning eukaryotes. *Biochim. Biophys. Acta*. **1365**:71-78.

Uribe, A., and Moreno-Sánchez, R. (1992). Energy-dependent reactions supported by several substrates in coupled *Euglena gracilis* mitochondria. *Plant Sci*. **86**:21-32.

Van Hellemond J. J., Mirjam Luijten, frits M. Flesch, Cor P.H. Gaasenbeek and A. G.M. Tielens. (1996). Rhodoquinone is synthesized de novo by *Fasciola hepatica*. *Mol. Biochem. Parasitol*. **82**:217-226.

Yagi T., Yano T. and Matsuno-Yagi A. (1993). Characteristics of the energy-transducing NADH-quinone oxidoreductase of *Paracoccus denitrificans* as revealed by biochemical, biophysical, and molecular biological approaches. *J. Bioenerg. Biomembr*. **25**:339-45.

Yang SS, Lee JS, Kim YM, Kim SW. (1998). Sequence of electron carriers in the process of methanol oxidation by a new obligate methylotrophic bacterium. *Biochem. Mol. Biol. Int*. **46**(4):807-19.

Yokota, A., and Kitaoka, S. (1979). Occurrence of glycolate dehydrogenase in mitochondria and microsomas in streptomycin bleached mutant of *Euglena gracilis*. *Agric. Biol. Chem*. **43**:855-857.

Young IG, Stroobant P, Macdonald CG, Gibson F. (1973). Pathway for ubiquinone biosynthesis in *Escherichia coli* K-12: gene-enzyme relationships and intermediates. *J Bacteriol*. **114**:42-52.

Zboril, P. and Wernerová, V. (1996) The isolation and some properties of the membrane-bound lactate dehydrogenase of *Paracoccus denitrificans*. *Biochem. Biol. Int*. **39**:595-605.