

00377

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

Facultad de Medicina

**“Efecto de cationes y quinonas
sobre la NADH deshidrogenasa interna
de mitocondrias de
Saccharomyces cerevisiae.”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

REFUGIO ELISA RIVERA PÉREZ

DIRECTOR DE TESIS: **Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez**

MÉXICO, D. F.

JUNIO, 2005



m345302



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

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

NOMBRE: Rivera Pérez Refugio

Elisa

FECHA: 13- Junio - 2005

FIRMA: [Firma]

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 7 de marzo del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) **Rivera Pérez Refugio Elisa** con número de cuenta **503005559** con la tesis titulada: **"Efecto de cationes y quinonas sobre la NADH deshidrogenasa interna de mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*"**, bajo la dirección del(a) **Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez**.

| | |
|-------------|------------------------------|
| Presidente: | Dr. Antonio Peña Díaz |
| Vocal: | Dr. Diego González Halphen |
| Secretario: | Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez |
| Suplente: | Dr. Alejandro Sosa Peinado |
| Suplente: | Dr. Juan Luis Rendón Gómez |

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 6 de junio del 2005

Dr. Juan José Morrón Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado.

RECONOCIMIENTOS

Parte del trabajo de esta tesis se realizó con el apoyo del donativo CONACYT 44564-Q.

Esta Tesis de Maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez, en el Laboratorio 4 y Laboratorio 7 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial estuvo integrado por:

| | |
|------------------------------|---------------------------------------|
| Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez | Facultad de Medicina, UNAM |
| Dr. Antonio Peña Díaz | Instituto de Fisiología Celular, UNAM |
| Dr. Juan Luis Rendón Gómez | Facultad de Medicina, UNAM |

Gracias....

A Quien me ha permitido vivir para alcanzar una meta más...

Maestro Isidro, por haber sembrado en mí la semillita de realizar una maestría y por su gran encomio...

Maestra Hebe, por impulsarme a tomar la decisión, pero sobre todo por su gran apoyo en todos los sentidos...

Maestro Federico, bueno, mejor dicho Dr. Federico Tovar, por su inigualable ayuda en todo momento y por darme la confianza de poder lograrlo...

Juan Pablo, por haberme permitido ser tu alumna y dejarme aprender un poquito de tí, por compartir tus conocimientos como sólo las personas "grandes" lo saben hacer, por tu comprensión y tu valioso apoyo en los momentos difíciles, simplemente por todo...

Oscarote, por tus enojos, por tus regaños, por tus ideas, pero sobre todo por tu ejemplo y tu gran ayuda...

Dr. Federico Martínez y a todos los "habitantes" del laboratorio 7, por permitirme trabajar en su laboratorio y aguantar tantas invasiones... (aún cuando queden deudas pendientes)

A mis tutores y sinodales, Dr. Antonio Peña, Dr. Juan Luis Rendón, Dr. Diego González Halphen y Dr. Alejandro Sosa, por su tiempo y por sus valiosas aportaciones a lo largo de la maestría y en la revisión de mi tesis...

A mis compañeros de trabajo de la ENCB, a mis amigos, todos, por seguir ahí a pesar del abandono...en fin... una gran lista de personas que no quiero pasar por alto, todos ustedes que han contribuido con un granito de arena a este logro... ustedes lo saben...

Fede, que te puedo yo decir, simplemente por permanecer a mi lado y estar aquí siempre...

A mi familia... mis padres, mis hermanos, mi sobrina, primos, tíos...los que están aquí...

...y a los que se han ido....

Gracias...

**“Efecto de cationes y quinonas sobre la NADH
deshidrogenasa interna de mitocondrias de
Saccharomyces cerevisiae.”**

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. Abreviaturas..... | 1 |
| 2. Resumen..... | 2 |
| 3. Abstract..... | 4 |
| 4. Introducción..... | 5 |
| 4.1 La mitocondria..... | 5 |
| 4.2 Estructura y función de los complejos I – IV..... | 7 |
| 4.2.1 Complejo I: NADH – ubiquinona..... | 7 |
| 4.2.2 Complejo II: Succinato – ubiquinona..... | 8 |
| 4.2.3 Complejo III: Ubiquinona – citocromo c..... | 9 |
| 4.2.4 Complejo IV: Citocromo c –O ₂ | 10 |
| 4.3. Las NADH deshidrogenasas y oxidasas alternas en plantas, hongos y bacterias..... | 10 |
| 4.4 Las NAD(P)H:quinona oxidorreductasas tipo II..... | 13 |
| 4.4.1 Clasificación de las NADH deshidrogenasas del tipo II..... | 14 |
| 4.4.2 Interacción de las NADH-2 con la membrana..... | 14 |
| 4.4.3 NADH deshidrogenasas del tipo II en organismos procariontes y eucariontes..... | 15 |
| 4.5 Las NADH deshidrogenasas mitocondriales de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 20 |
| 5. Objetivos..... | 23 |
| 6. Material y Métodos..... | 24 |
| 6.1 Reactivos..... | 24 |
| 6.2 Cepa..... | 24 |
| 6.3 Obtención de las mitocondrias..... | 24 |

| | |
|--|----|
| 6.4 Obtención de la enzima..... | 25 |
| 6.5 Determinación de proteína..... | 25 |
| 6.6 Actividad enzimática..... | 26 |
| 6.7 Gráficos de competencia..... | 26 |
| 7. Resultados..... | 28 |
| 7.1 Obtención de la enzima..... | 28 |
| 7.2 Patrones de velocidad inicial de la NADH deshidrogenasa interna con Q_0 como sustrato..... | 29 |
| 7.3 Patrones de velocidad inicial de la NADH deshidrogenasa interna con DBQ como sustrato..... | 32 |
| 7.4 Patrones de velocidad inicial de la NADH deshidrogenasa interna con DCPIP..... | 36 |
| 7.5 Competencia de DCPIP y la quinona por el mismo sitio de unión..... | 38 |
| 7.6 Inhibición de la actividad de la NADH deshidrogenasa interna con AMP..... | 40 |
| 7.7 Efecto de cationes sobre la actividad de la NADH deshidrogenasa..... | 43 |
| 7.8 Mecanismo cinético de la activación con cationes..... | 45 |
| 7.9 Gráficos de competencia..... | 46 |
| 8. Discusión..... | 52 |
| 8.1 Efecto de quinonas..... | 52 |
| 8.2 Efecto de cationes..... | 58 |
| 9. Conclusiones..... | 61 |
| 10. Referencias bibliográficas..... | 62 |

1. ABREVIATURAS

| | |
|----------------|---|
| AMP | Adenín monofosfato |
| DCPIP | 2, 6-diclorofenolindofenol |
| DBQ | 2,3-dimetoxi-5-metil-6-decil-1,4-benzoquinona decilbenzoquinona |
| NADH | β -nicotinamida adenín dinucleótido reducido |
| Q ₀ | 2, 3-dimetoxi-5-metil-1,4-benzoquinona |

2. RESUMEN

Las plantas, los hongos y muchas bacterias poseen NADH deshidrogenasas alternas que catalizan la misma reacción que el complejo I de la cadena respiratoria clásica de mitocondria, pero no contribuyen a la generación de gradientes protónicos transmembranales. En los organismos eucariontes, este tipo de enzimas se encuentra en la membrana interna mitocondrial, con su sitio catalítico orientado hacia la matriz mitocondrial (NADH:ubiquinona oxidorreductasas alternas internas) o hacia el citoplasma (NADH:ubiquinona oxidorreductasas alternas externas). Las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae* carecen del complejo I, pero contienen al menos dos NADH:ubiquinona-6 oxidorreductasas (NADH deshidrogenasas) que acoplan la oxidación del NADH con la cadena respiratoria mitocondrial. La NADH deshidrogenasa interna cataliza la transferencia de electrones del NADH intramitocondrial hacia la ubiquinona. Sin embargo, el mecanismo cinético de esta enzima no está bien definido. En este trabajo, se utilizó como sustratos de la NADH deshidrogenasa interna de *S. cerevisiae* a dos quinonas como aceptores de electrones, la 2,3-dimetoxi-5-metil-1,4-benzoquinona (Q_0) y decilbenzoquinona. Los patrones de velocidad inicial son congruentes con tres mecanismos posibles para la reacción de la NADH deshidrogenasa interna con el NADH y las quinonas: 1) mecanismo al azar en equilibrio rápido, 2) mecanismo al azar en estado estacionario y 3) mecanismo ordenado en estado estacionario, mientras que para la reacción con NADH y DCPIP se tuvo que el mecanismo es de tipo ping-pong.

En cuanto al efecto de los cationes se encontró que tanto los cationes monovalentes (Na^+ y K^+) como los divalentes (Ca^{++} , Mg^{++}) son activadores no esenciales; es decir, que la catálisis puede ocurrir en su ausencia. Mediante gráficos de competencia se comprobó que los cationes monovalentes actúan en un mismo sitio de la enzima; los divalentes también actúan en un mismo sitio de la enzima, aunque este sitio es distinto al sitio de acción de los cationes monovalentes.

3. ABSTRACT

Plants, fungi and many bacteria contain alternative NADH dehydrogenases that catalyze the same reaction as complex I in the respiratory chain; however, they do not contribute to the generation of transmembrane proton gradients. In eucaryotes, this type of enzymes is associated with the inner mitochondrial membrane, with their catalytic site facing to the mitochondrial matrix (internal alternative NADH:oxidoreductases) or to the cytoplasm (external alternative NADH:ubiquinone oxidoreductases). Mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae* lack complex I, but contain at least two NADH:ubiquinone-6 oxidoreductases (NADH dehydrogenases) that couple the oxidation of NADH to the mitochondrial respiratory chain. The internal NADH dehydrogenase catalyzes the transfer of electrons from intramitochondrial NADH to ubiquinone. However, the kinetic mechanism is not fully established. Interesting results were obtained when two quinones, 2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzoquinone (Q_0) and decylbenzoquinone (DBQ) were used as substrates of the internal NADH dehydrogenase from *S. cerevisiae*. Initial rate patterns suggest three possible reaction mechanisms: 1) rapid equilibrium random mechanism, 2) steady-state random mechanism and 3) steady-state ordered mechanism. In contrast, with DCPIP as electron acceptor, the enzyme follows a ping-pong mechanism. Regarding the effects of cations, the results showed that monovalent (Na^+ , K^+) and divalent cations (Ca^{++} , Mg^{++}) are nonessential activators, indicating that the reaction occurs in the absence of cations. With competition plots, it was found that monovalent and divalent cations react with different sites.

4. INTRODUCCIÓN

Las cadenas transportadoras de electrones situadas en la membrana plasmática de bacterias y arqueas, o en la membrana interna de las mitocondrias de organismos eucariontes, son las fábricas de energía de los organismos que respiran. Estas cadenas transportadoras de electrones de organismos tanto aerobios como anaerobios catalizan la transferencia de electrones a partir de sustratos reducidos como el NADH o el succinato hasta el oxígeno (en el caso de los organismos que llevan a cabo la respiración aerobia), o hasta otros compuestos oxidantes como el fumarato o el nitrato (en el caso de los organismos que realizan el proceso de respiración anaerobia). El transporte de electrones en estas cadenas respiratorias está acoplado a la translocación de protones a través de la membrana plasmática o de la membrana interna mitocondrial, generando un potencial de membrana que permite la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i mediante la ATP sintasa.

4.1 LA MITOCONDRIA

Las mitocondrias están presentes en todas las células eucariotas que usan el oxígeno en el proceso de la respiración, el número por célula, la forma (esférica o filamentosa) y el tamaño varían, no solo con el tipo de célula, sino también con la fase del ciclo celular y con las condiciones de cultivo. Algunos tripanosomas tienen sólo una mitocondria pero algunos ovocitos tienen hasta 3×10^5 mitocondrias. Las células de mamífero típicas tienen varios cientos de mitocondrias y las células de hígado más de 1000. Las células diploides de *Saccharomyces cerevisiae* contienen de 15 a 29 mitocondrias, mientras que las haploides de 7 a 17, y el volumen mitocondrial total es cercano al 12 % del volumen celular. Las mitocondrias típicas son del tamaño de las células de *E. coli*. En las levaduras miden alrededor de 0.3 μm de ancho y 1 μm de largo, pero en las células en división su longitud es mayor a los 10 μm (Broach *et al*, 1991; Campbell y Duffus, 1988; Kocková-Kratochvílová, 1990).

Las mitocondrias están formadas por dos membranas, la externa y la interna, cada una de aproximadamente 5-7 nm de espesor. La membrana interna está plegada, de manera que forma crestas. El espacio que se forma entre la membrana externa y la interna es el espacio intermembranal, y el espacio que se encuentra rodeado por la membrana interna es la matriz mitocondrial.

La mención de las mitocondrias suele traer a la mente el ciclo del ácido cítrico, la vía de la β -oxidación del metabolismo de los ácidos grasos y la fosforilación oxidativa. Además de estos procesos importantes, ocurren muchos otros eventos químicos en ellas: las mitocondrias concentran iones Ca^{2+} y controlan la entrada y salida de Na^+ , K^+ , dicarboxilatos, aminoácidos, ADP, Pi, ATP, y muchas otras sustancias, de este modo las mitocondrias ejercen funciones reguladoras en secuencias catabólicas y biosintéticas (Metzler, 2003).

En la década de los 40's llegó a ser claro que la formación de ATP en la mitocondria está acoplada al transporte de electrones. La fosforilación oxidativa comienza con la entrada de los electrones en la cadena formada por los transportadores de electrones organizados en complejos supramoleculares embebidos en la membrana mitocondrial interna. El tratamiento suave de la membrana interna mitocondrial con detergentes permite la resolución de cuatro complejos transportadores de electrones, cada uno capaz de catalizar la transferencia de electrones a través de una porción de la cadena. Los complejos I y II catalizan el transporte de electrones hacia la ubiquinona a partir de dos diferentes donadores de electrones: el NADH (complejo I) y el succinato (complejo II). El complejo III lleva los electrones desde el ubiquinol hasta el citocromo c, y el complejo IV completa la secuencia transfiriendo los electrones desde el citocromo c hasta el O_2 . Los complejos I – IV están unidos funcionalmente por dos transportadores de electrones solubles, la ubiquinona y el citocromo c.

La ubiquinona, soluble en lípidos, está presente en las membranas de bacterias y las mitocondrias en cantidades relativamente grandes, comparadas con los otros transportadores de electrones. La ubiquinona está localizada en un punto de convergencia de las ramificaciones de la cadena transportadora de electrones, con donadores en cada extremo como el NADH, el succinato, el glicerol fosfato y la colina. Por su parte el NADH transporta electrones entre las deshidrogenasas en el citoplasma y entre deshidrogenasas solubles en la matriz mitocondrial y las flavoproteínas embebidas en la membrana interna. La ubiquinona transfiere electrones y protones entre proteínas dentro de la bicapa lipídica de la membrana (Nelson y Cox, 2000).

4.2 ESTRUCTURA Y FUNCION DE LOS COMPLEJOS I – IV

4.2.1 COMPLEJO I: NADH-UBIQUINONA.

El **complejo I**, también llamado **NADH:ubiquinona oxidorreductasa**, oxida al NADH, que producen en la matriz mitocondrial muchas deshidrogenasas; entre éstas se encuentran la piruvato, la 2-oxoglutarato, la malato y la isocitrato deshidrogenasas, las cuales funcionan en el ciclo de los ácidos tricarbónicos; la β -hidroxiacil-CoA deshidrogenasa del sistema de la β -oxidación de los ácidos grasos, y la 2-hidroxi butirato, la glutamato y la prolina deshidrogenasas. El complejo I está compuesto de al menos 42 cadenas polipeptídicas diferentes, incluyendo una flavoproteína que contiene un grupo FMN, y por lo menos seis centros hierro-azufre. El complejo I de la mitocondria cataliza dos procesos simultáneos y obligadamente acoplados: 1) la transferencia exergónica de un ion hidruro del NADH y un protón de la matriz a la ubiquinona:



y 2) la transferencia de cuatro protones de la matriz hacia el espacio intermembranal. El complejo I es, por lo tanto, una bomba de protones activada por la energía liberada por la oxidación de NADH. La reacción que cataliza es

vectorial, es decir, que mueve los protones en una dirección específica, desde la matriz mitocondrial al espacio intermembranal.

Para enfatizar la naturaleza vectorial del proceso, la reacción total se escribe frecuentemente con subíndices que indican la localización de los protones: P para el lado positivo de la membrana interna (espacio intermembranal) y N para el lado negativo (la matriz mitocondrial):



El amital (un barbitúrico), la rotenona (producto de una planta y que comúnmente se usa como insecticida) y la piericidina A (un antibiótico) inhiben el flujo de electrones desde los centros Fe-S del Complejo I hasta la ubiquinona y por lo tanto bloquean el proceso completo de la fosforilación oxidativa.

4.2.2 COMPLEJO II: SUCCINATO – UBIQUINONA

El complejo II corresponde a la **succinato deshidrogenasa**, la única enzima del ciclo del ácido cítrico unida a la membrana. La enzima contiene un dominio periférico, expuesto a la matriz mitocondrial y un dominio membranal que tiene los sitios de unión a la ubiquinona. La parte periférica está formada por dos proteínas. La primera de ellas, la subunidad A, es una flavoproteína que tiene el sitio de unión para el succinato y, como grupo prostético, un FAD unido covalentemente. La segunda proteína, la subunidad B, presenta tres centros hierro-azufre. Por otra parte, el dominio transmembranal contiene dos cadenas polipeptídicas, las subunidades C y D, cada una con tres segmentos transmembranales que tienen una estructura secundaria de alfa hélice. Los electrones pasan del succinato al FAD y, a través de los centros Fe-S, a la ubiquinona.

Otros sustratos pasan electrones a la ubiquinona mediante deshidrogenasas alternas, por ejemplo: acil-CoA deshidrogenasa y glicerol 3-fosfato deshidrogenasa. El efecto de cada una de estas enzimas que transfieren

electrones es contribuir a la poza de ubiquinonas reducidas. El ubiquinol (QH₂) que proviene de todas estas reacciones es reoxidado por el complejo III, el siguiente componente en la cadena mitocondrial transportadora de electrones.

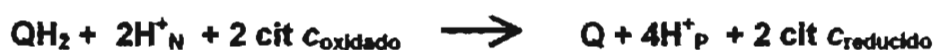
4.2.3 COMPLEJO III: UBIQUINONA – CITOCROMO c

El **Complejo III**, también llamado **Complejo citocromo bc₁** o **ubiquinona:citocromo c oxidorreductasa**, acopla la transferencia de electrones del ubiquinol (QH₂) al citocromo c con el transporte vectorial de protones desde la matriz hasta el espacio intermembranal.

El complejo es un dímero de monómeros idénticos, cada uno con 11 subunidades diferentes. El núcleo funcional está constituido por 3 subunidades: el citocromo b, la proteína hierro-azufre o Rieske y el citocromo c₁. El complejo tiene dos sitios de unión distintos para la ubiquinona: Q_N y Q_P, los cuales corresponden a los sitios de inhibición por dos fármacos que bloquean la fosforilación oxidativa. La antimicina A bloquea el flujo de electrones del grupo hemo b_H a Q, uniéndose a Q_N. El mixotiazol previene el flujo de electrones de QH₂ a la proteína hierro-azufre, se une a Q_P.

El citocromo c es una proteína soluble del espacio intermembranal. Después que su grupo hemo acepta un electrón del Complejo III, el citocromo c se mueve hacia el Complejo IV para donar el electrón a un centro binuclear de cobre en esa enzima.

El complejo III cataliza la transferencia de dos electrones del ubiquinol a dos moléculas de citocromo c, como se ve en la siguiente ecuación:



4.2.4 COMPLEJO IV: CITOCROMO c – O₂

En el paso final de la cadena respiratoria, el **Complejo IV**, también llamado **citocromo c oxidasa**, lleva los electrones del citocromo c al oxígeno molecular, reduciéndolo a H₂O. El complejo IV también es una enzima (13 subunidades; M_r 204,000) de la membrana interna mitocondrial.

Por cada cuatro electrones que pasan a través de este complejo, la enzima consume cuatro H⁺ de la matriz (lado **N**) para convertir el O₂ en dos moléculas de H₂O. También utiliza la energía de esta reacción redox para bombear un protón hacia el espacio intermembranal (lado **P**) por cada electrón que pasa, sumándose al potencial electroquímico producido por los complejos I y III. La reacción completa catalizada por el complejo IV es:



4.3 LAS NADH DESHIDROGENASAS Y OXIDASAS ALTERNAS EN PLANTAS, HONGOS Y BACTERIAS

Las mitocondrias de las plantas y hongos se parecen a las de los mamíferos en muchos aspectos, pero contienen deshidrogenasas adicionales y algunas veces utilizan rutas alternativas para el transporte de electrones. Las mitocondrias son impermeables al NADH (Bakkert *et al*, 2001); sin embargo, las reacciones de la glicólisis y otras deshidrogenaciones en el citoplasma reducen rápidamente el NAD⁺ disponible a NADH, por lo que este compuesto se debe oxidar a NAD⁺ para que la glicólisis siga funcionando. Las mitocondrias de animales tienen sistemas de lanzaderas para llevar los equivalentes reductores del NADH al interior de la mitocondria. Dos de estos sistemas son la lanzadera de glicerol fosfato y la lanzadera de malato-aspartato. En contraste, las mitocondrias de los hongos y las plantas poseen diferentes tipos de deshidrogenasas embebidas en la membrana interna mitocondrial. Algunas están orientadas hacia la matriz y

oxidan el NADH producido en el ciclo de Krebs y la β -oxidación, mientras que otras están orientadas hacia el exterior, es decir, hacia el espacio intermembranal y son capaces de oxidar el NADH formado en el citoplasma.

Así, además de la NADH deshidrogenasa clásica sensible a la rotenona, existen otras enzimas que catalizan la misma reacción química en las cadenas respiratorias aerobias. Las NADH:quinona oxidorreductasas del tipo II, también llamadas NADH deshidrogenasas insensibles a rotenona (NDH-2), se encuentran en las cadenas respiratorias de bacterias (ej. *Escherichia coli*) y arqueas (ej. *Acidianus ambivalens*) (Gomes *et al*, 2001), así como en organismos eucariontes de los reinos de los hongos (Joseph-Horne *et al*, 2001) y las plantas (Kerscher, 2000; Rasmusson *et al*, 1999). Las NADH deshidrogenasas del tipo III (Nqr) -también llamadas NADH:quinona oxidorreductasas translocadoras de Na^+ - se encuentran en las cadenas respiratorias de algunas bacterias (ej. *Vibrio cholerae*) (Barquera *et al*, 2004).

Las estrategias para la oxidación del NADH pueden ser muy diversas y esto se puede inferir de que existen organismos con 1) un sólo tipo de NADH deshidrogenasa, 2) dos tipos de NADH deshidrogenasas, y 3) los tres tipos de NADH deshidrogenasas. Los organismos aerobios contienen al menos un tipo de NADH deshidrogenasa y esto concuerda con la importancia fisiológica de mantener un balance en la relación $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$.

El principal equivalente reductor que se sintetiza en el metabolismo central de la célula es el NADH, convirtiéndolo en el principal donador de electrones de las cadenas respiratorias. En los procariontes, el NADH se produce principalmente por dos enzimas glicolíticas, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y la piruvato deshidrogenasa, y por tres enzimas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, la isocitrato deshidrogenasa, α -cetoglutarato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa. En los eucariontes las reacciones del ciclo de Krebs se llevan a cabo en la matriz mitocondrial, produciendo NADH mitocondrial. La

coenzima reducida es oxidada mediante las NADH deshidrogenasas de la cadena respiratoria, conservándose la energía en el potencial electroquímico transmembranal. Además de este importante papel de producción de energía, el NADH es una fuente potencial de NAD⁺, el principal oxidante celular. Debido a que la concentración de NAD⁺ es pequeña en comparación con la cantidad de sustratos que se oxidan, el NADH que resulta de las reacciones de oxidación debe ser reoxidado rápidamente para restablecer los niveles de NAD⁺, asegurando de esta manera que la oxidación de los sustratos no se detenga por la falta de NAD⁺. Otro punto importante es el hecho de que la relación [NADH]/[NAD⁺] es responsable de la regulación de algunas rutas que llevan a la síntesis de ATP, por lo que el requerimiento celular de NAD⁺ convierte en ocasiones a la reoxidación del NADH en una prioridad tan importante como la síntesis de ATP. Aunque la oxidación de una molécula de NADH por medio de las NDH-2 genera menor cantidad de ATP comparada con la misma oxidación realizada por el complejo I, su actividad puede ser esencial cuando la relación [NADH]/[NAD⁺] es muy alta (Metzler, 2003).

Por otro lado, las mitocondrias de todas las plantas, muchos hongos, con excepción de *S. cerevisiae* y *Sch. Pombe* (Joseph-Horne *et al*, 2001), y algunos protozoarios (Fang y Beattie, 2003) contienen, además de la citocromo c oxidasa, una oxidasa terminal que es resistente a cianuro, azida, monóxido de carbono y óxido nítrico, pero es sensible a ácidos hidroxámicos, tales como el benzohidroxamato (BHAM) o el salicilhidroxamato (SHAM), y a los alquil galatos como el *n*-propil galato (Joseph-Horne *et al*, 2001; Calegario *et al*, 2003). Esta oxidasa alterna se encuentra en la membrana interna mitocondrial, recibe electrones del ubiquinol y cataliza la reducción del oxígeno. En esta ruta de la cadena respiratoria no se bombean protones, por lo que no se conserva energía.

Los inhibidores de la citocromo c oxidasa inducen la transcripción de la oxidasa alterna tanto en plantas como en hongos, así como factores ambientales como

las bajas temperaturas (Calegario *et al*, 2003; González-Meier *et al*, 1999) e infecciones por patógenos en el caso de las plantas (Umbach y Siedow, 2000).

La actividad de la oxidasa alterna en plantas se incrementa considerablemente después de la reducción de un puente disulfuro, dando como resultado una proteína homodimérica unida no covalentemente. La enzima reducida se activa por α -ceto ácidos, en particular, el piruvato (Day y Wiskich, 1995). La oxidasa alterna de hongos no se estimula con piruvato, pero sí con nucleótidos de purina (ADP, AMP y GMP). A diferencia de la de plantas, es una enzima monomérica (Affourtit *et al*, 2001; Umbach y Siedow, 2000).

Se ha propuesto que la oxidasa alterna es importante en condiciones en las que los citocromos de la cadena respiratoria clásica se encuentran dañados o bloqueados, permitiendo el funcionamiento de ciclo de Krebs y protegiendo a la célula contra el estrés oxidativo (Affourtit *et al*, 2001).

4.4 LAS NAD(P)H:QUINONA OXIDORREDUCTASAS TIPO II

Un hecho particularmente relevante es el papel que juegan las NADH deshidrogenasas del tipo II, ya que se ha observado que en varios organismos es el único tipo de NADH deshidrogenasas presente (Kerscher, 2000).

Las NDH-2 son polipéptidos con masas moleculares de alrededor de 50 kDa, que catalizan la transferencia de electrones del NAD(P)H a las quinonas, sin translocar protones. Estas enzimas son resistentes a los inhibidores específicos del Complejo I: pteridina A, capsaicina y rotenona, pero se inhiben parcialmente por la flavona (Melo *et al*, 2004; Velázquez y Pardo, 2001). Las estructuras primarias de estas proteínas suelen contener dos motivos GXGXXG dentro de estructuras β - α - β para la unión de NAD(P)H y de flavín-adenín dinucleótido (FAD) (de Vries *et al*, 1992). En la mayoría de los casos, las

enzimas que oxidan al NADH también pueden oxidar NAD(P)H, el cual es estructuralmente similar al NADH con la excepción de que un grupo fosfato reemplaza el grupo hidroxilo de la posición 2 en la ribosa del AMP. Existen también algunas NDH-2 que, además de la característica típica de dos sitios de unión a ADP, muestran un motivo "EF-hand" que une calcio (Taiz y Zeiger, 2002).

4.4.1 CLASIFICACIÓN DE LAS NADH DESHIDROGENASAS DEL TIPO II

Las deshidrogenasas NDH-2 se clasifican en tres grupos:

GRUPO A: comprende las NDH-2 con dos motivos de unión a adenín-dinucleótidos, involucrados en la unión no covalente de NAD(P)H y flavinas. Las enzimas de este tipo se encuentran en arqueas, bacterias y eucariontes.

GRUPO B: comprende las NDH-2 que poseen dos motivos de unión a adenín dinucleótidos y un pliegue conservado tipo "EF-hand". Hasta la fecha se ha reportado que estas enzimas se encuentran exclusivamente en eucariontes, principalmente en hongos y plantas.

GRUPO C: comprende las enzimas con un solo motivo en la secuencia primaria de aminoácidos GXGXXG conservado en un pliegue $\beta\alpha\beta$ y con una flavina unida covalentemente. En la estructura primaria de algunas de estas proteínas, la ausencia de la segunda región para la unión de dinucleótidos coincide con la presencia de un residuo conservado de histidina, sugiriendo que éste puede estar involucrado en la unión covalente de la flavina. Este tipo de enzimas está presente únicamente en las arqueas hipertermofílicas (Meio *et al.*, 2004).

4.4.2 INTERACCIÓN DE LAS NDH-2 CON LA MEMBRANA

Las membranas están compuestas por una monocapa de lípidos en el caso de las arqueas o por una bicapa de lípidos en el caso de bacterias y mitocondrias;

son hidrofílicas en las superficies externas e hidrofóbicas en el interior. El método más simple para el anclaje de proteínas en la membrana involucra una α -hélice transmembranal que atraviese la membrana una sola vez. Una forma alternativa para el anclaje de proteínas en la membrana es mediante α -hélices paralelas al plano de la membrana. En este caso, las α -hélices suelen ser anfipáticas, con residuos polares predominando a lo largo de un lado de la hélice y cadenas no polares en el lado opuesto de la estructura de la hélice. Algunos ejemplos de este tipo de asociación a la membrana son la prostaglandina sintasa y las succinato:oxidoreductasas del tipo E. Con respecto al anclaje de las NDH-2 a la membrana hay controversia, ya que no se predicen hélices transmembranales. La ausencia de estas hélices y la observación de que los aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos se encuentran en lados opuestos en algunas de las α -hélices, sugieren una interacción proteína-membrana a través de contactos hidrofóbicos de estas α -hélices anfipáticas con la membrana (Melo *et al*, 2004).

La ausencia de dominios transmembranales en la mayoría de las NDH-2 corrobora el hecho de que estas enzimas no contribuyen directamente a la formación de un potencial transmembranal. De hecho, la reacción que catalizan se puede llevar a cabo en un solo lado de la membrana, por lo que no se translocan protones a través de la misma.

4.4.3 NADH DESHIDROGENASAS DEL TIPO II EN ORGANISMOS PROCARIONTES Y EUCARIONTES

Un gran número de microorganismos contiene NADH:quinona oxidoreductasas del tipo II (Tabla 1; Howitt *et al*, 1999), pero sólo unas cuantas han sido aisladas y estudiadas con detalle. A finales de los 1960's, Bragg y Hou reportaron la actividad de dos NADH deshidrogenasas distintas en *E. coli*; las cuales corresponden a la NDH-1 y la NDH-2. La estructura primaria de la NDH-2 presenta dos motivos de unión a ADP, por lo que se le incluye dentro del grupo

A. La forma madura de esta NDH-2A tiene una masa molecular de aproximadamente 45 kDa y está orientada hacia el citosol. Esta enzima oxida únicamente al NADH y no genera fuerza protón-motriz antes de la ubiquinona (Melo *et al*, 2004).

Desde la identificación de la NDH-2 de *E. coli*, se han encontrado varias enzimas homólogas en diversos organismos. Por ejemplo, en la cadena respiratoria de *Azotobacter vinelandii* existe una enzima del grupo A, que contiene dos regiones de unión a ADP y es resistente a la capsaicina. Esta enzima es particularmente activa a altas concentraciones de oxígeno, en contraste con la baja actividad del complejo I en estas condiciones (Bertsova *et al*, 2001).

Existe evidencia bioquímica de la existencia de NDH-2 del grupo C en las arqueas *Sulfolobus metallicus* y *Acidianus ambivalens* (Gomes *et al*, 2001). Las enzimas purificadas de ambos organismos catalizan la reacción de oxidorreducción entre el NADH y la quinona. Estas proteínas son monómeros con masas moleculares aparentes de 47 y 49 kDa, respectivamente, y tienen una molécula de FMN unida covalentemente. Los potenciales de reducción promedio del FMN de las enzimas de *A. ambivalens* y *S. metallicus* son de 70 y 160 mV, respectivamente, los cuales son muy altos comparados con el potencial de reducción del FAD de la NDI1 de *S. cerevisiae*, el cual es de -370 mV (Melo *et al*, 2004).

La NDH-2 de *Trypanosoma brucei* es el primer ejemplo de una NDH-2 eucarionta que contiene FMN. A diferencia de la NDH-2 de arqueas, en la enzima de *T. brucei* el FMN no está unido covalentemente. Esta NDH-2 se ha descrito como un dímero funcional de monómeros de 33 kDa, con el sitio catalítico orientado hacia la matriz. Es una enzima del grupo A (Melo *et al*, 2004).

La levadura aerobia estricta *Yarrowia lipolytica* contiene dos NADH deshidrogenasas, una NAD(P)H deshidrogenasa del tipo II -que está orientada hacia la cara externa de la membrana interna mitocondrial- y el complejo I, capaz de oxidar el NADH de la matriz mitocondrial (Kerscher *et al*, 1999; Kerscher *et al*, 2001). En las mitocondrias de *Neurospora crassa* se han identificado dos enzimas para la oxidación del NADH y NADPH citosólico. Una corresponde a la NDE-1, la cual oxida NADPH y es dependiente de calcio; es decir, contiene un motivo EF-hand además de las dos regiones de unión a ADP, por lo que es una enzima que pertenece al grupo B. La otra corresponde a la NDE-2, la cual oxida NADH. *N. crassa* también contiene una NADH deshidrogenasa interna (NDI1) insensible a rotenona, que oxida el NADH de la matriz mitocondrial (Melo *et al*, 2001).

Tabla 1. Distribución de NADH:quinona oxidorreductasas en genomas totalmente secuenciados de procariontes aerobios o facultativos.

| ORGANISMO | NDH-1 | NDH-2 | Nqr |
|-------------------------------------|-------|-------|-----|
| <i>Aeropyrum pernix</i> | Sí | C | No |
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | Sí | A | No |
| <i>Aquifex aeolicus</i> | Sí | C | No |
| <i>Bacillus subtilis</i> | No | A | Sí |
| <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> | Sí | A | No |
| <i>Bradyrhizobium japonicum</i> | Sí | A | No |
| <i>Brucella melitensis</i> | Sí | A | No |
| <i>Campylobacter jejuni</i> | Sí | No | No |
| <i>Chlamydia pneumoniae</i> | No | No | Sí |
| <i>Chlamydophila caviae</i> | No | No | Sí |
| <i>Corynebacterium efficiens</i> | No | A | No |
| <i>Deinococcus radiodurans</i> | Sí | A | No |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | No | A | No |
| <i>Escherichia coli</i> | Sí | A | No |
| <i>Geobacter sulfurreducens</i> | Sí | A | No |

Tabla 1. Continuación

| ORGANISMO | NDH-1 | NDH-2 | Nqr |
|-----------------------------------|--------------|--------------|------------|
| <i>Haemophilus influenzae</i> | No | A | Sí |
| <i>Halobacterium</i> spp. | Sí | A | No |
| <i>Helicobacter pylori</i> | Sí | No | No |
| <i>Lactococcus lactis</i> | No | A | No |
| <i>Leptospira interrogans</i> | Sí | A | No |
| <i>Listeria innocua</i> | No | A | No |
| <i>Magnetococcus</i> spp. | Sí | No | No |
| <i>Mesorhizobium loti</i> | Sí | A | No |
| <i>Methanosarcina acetivorans</i> | Sí | A | Sí |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | Sí | A | No |
| <i>Neisseria meningitidis</i> | Sí | No | Sí |
| <i>Nitrosomonas europaea</i> | Sí | No | Sí |
| <i>Nostoc</i> spp. | Sí | A | No |
| <i>Oceanobacillus ihayensis</i> | No | A | No |
| <i>Pasteurella multocida</i> | No | No | Sí |
| <i>Pirellula</i> spp. | No | A | Sí |
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> | No | No | Sí |
| <i>Prevotella intermedia</i> | Sí | No | Sí |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Sí | A | Sí |
| <i>Pyrobaculum aerophilum</i> | Sí | Sí | No |
| <i>Ralstonia solanacearum</i> | Sí | A | No |
| <i>Rickettsia prowazekii</i> | Sí | A | No |
| <i>Salmonella enterica</i> | Sí | A | No |
| <i>Shewanella oneidensis</i> | Sí | A | Sí |
| <i>Shigella flexneri</i> | Sí | A | No |
| <i>Sinorhizobium meliloti</i> | Sí | A | No |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | No | A | No |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | No | A | No |

Tabla 1. Continuación

| ORGANISMO | NDH-1 | NDH-2 | Nqr |
|--------------------------------------|--------------|--------------|------------|
| <i>Streptomyces coelicolor</i> | Sí | A | No |
| <i>Sulfolobus solfataricus</i> | Sí | A, C | No |
| <i>Sulfolobus tokodaii</i> | Sí | A, C | No |
| <i>Synechocystis</i> spp. | Sí | A | No |
| <i>Thermoplasma acidophilum</i> | Sí | C | No |
| <i>Thermoplasma volcanium</i> | Sí | C | No |
| <i>Thermosynechococcus elongatus</i> | Sí | A, C | No |
| <i>Tropheryma whipplei</i> | No | A | No |
| <i>Vibrio cholerae</i> | No | A | Sí |
| <i>Wigglesworthia glossinidia</i> | No | A | No |
| <i>Wolinella succinogenes</i> | Sí | No | No |
| <i>Xanthomonas axonopodis</i> | Sí | A | No |
| <i>Xylella fastidiosa</i> | Sí | No | No |
| <i>Yersinia pestis</i> | Sí | A | Sí |

Nota: Los datos se obtuvieron de la base de datos TIGR

Las cadenas transportadoras de electrones de las mitocondrias de plantas también contienen NAD(P)H:quinona oxidorreductasas del tipo II. Existen dos NAD(P)H deshidrogenasas externas, dependientes de calcio, que oxidan el NADH y el NADPH citosólicos directamente. La concentración de Ca^{2+} necesaria para obtener la mitad de la velocidad máxima, in vitro, es de 0.1 –0.5 μ M, que está dentro del intervalo de concentraciones de Ca^{2+} libre en el citosol de una célula de planta, el cual es de 0.1 – 0.2 μ M. También se han detectado tres NAD(P)H deshidrogenasas orientadas hacia la matriz mitocondrial: 1) el complejo I, 2) una NADH deshidrogenasa interna que no bombea protones y que es independiente del Ca^{2+} ; esta enzima tiene una afinidad por el NADH 10 veces menor que la del complejo I y 3) una NADPH deshidrogenasa interna que no bombea protones y que es dependiente de Ca^{2+} (Taiz y Zeiger, 2002).

Se han purificado NAD(P)H deshidrogenasas de 32, 42, 58, 26 y 43 kDa a partir de mitocondria de betabel (Menz y Day, 1996). También se han descrito dos cDNAs diferentes en papa (*Solanum tuberosum*), homólogos de los genes que codifican para las NADH deshidrogenasas insensibles a rotenona en levaduras y bacterias. Las proteínas tienen masas moleculares de 55 kDa (NDA1) y 65 kDa (NDB1) aproximadamente y están localizadas en la superficie interna y externa de la membrana interna mitocondrial, respectivamente (Rasmusson *et al*, 1999). En *Arabidopsis thaliana* se han identificado tres tipos distintos de NDH-2: 1) dos genes parecidos a los *nda*, uno de los cuales, *nda1*, muestra expresión dependiente de luz, 2) cuatro genes estrechamente relacionados con *ndb1* y 3) un homólogo nuevo, *ndc1*, el cual está asociado con los genes de las NDH-2 de cianobacterias (Michalecka *et al*, 2003).

4.5 LAS NADH DESHIDROGENASAS MITOCONDRIALES DE *Saccharomyces cerevisiae*

La cadena respiratoria de la levadura aerobia facultativa *S. cerevisiae* no contiene complejo I. La oxidación del NADH citosólico e intramitocondrial se lleva a cabo por dos NADH deshidrogenasas externas (NDE1 y NDE2) y una NADH deshidrogenasa interna (NDI1) (Joseph-Home *et al*, 2001).

S. cerevisiae carece de transhidrogenasas (Anderlund *et al*, 1999) y debido a que el par redox $NAD^+/NADH$ no puede atravesar la membrana mitocondrial, se requieren sistemas para la reoxidación del NADH. Este proceso de reoxidación del NADH es importante en condiciones aerobias y anaerobias y se lleva a cabo tanto en la mitocondria como en el citosol. Varios procesos resultan en la producción neta de NADH, y éstos, a diferencia de la fermentación alcohólica, no son neutros en términos de óxido-reducción. La mayor parte del exceso en la formación de NADH citosólico está relacionado con la producción de biomasa (Albers *et al*, 1996). La síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos

altamente reducidos son procesos que están asociados a asimilación de NADH. En particular, el NADH se produce en las rutas de biosíntesis de aminoácidos (Albers *et al*, 1996). En condiciones anaerobias, el único medio por el cual *S. cerevisiae* puede reoxidar el NADH es la producción de glicerol (Cronwright *et al*, 2002). En condiciones aerobias, existen varios sistemas para llevar los electrones del NADH citosólico hacia la cadena transportadora de electrones (Bakkert *et al*, 2001; Rigoulet *et al*, 2004). Los sistemas más importantes son las dos NADH deshidrogenasas externas y la lanzadera de glicerol-3-fosfato (Larsson *et al*, 1998). Se ha demostrado que el sistema Nde1p/Nde2p (localizado en la membrana interna mitocondrial con el sitio catalítico orientado hacia el espacio intermembranal), es el responsable de la oxidación directa del NADH citosólico (Luttik *et al*, 1998), mientras que la NADH deshidrogenasa interna, con su sitio catalítico orientado hacia la matriz mitocondrial, es la responsable de oxidar el NADH intramitocondrial (Marres *et al*, 1991).

Las NADH deshidrogenasas externas tampoco bombean protones. Los genes que codifican para estas enzimas se identificaron sobre la base de su similitud con la NDI1. La secuencia de aminoácidos de la Nde1p presenta una identidad del 48% a la de Ndi1p y la secuencia de la Nde2p presenta una identidad del 46% a la de Ndi1p. La identidad de las secuencias peptídicas entre la Nde1p y la Nde2p es de 62% (Joseph-Horne *et al*, 2001; Small y McAlister:Henn, 1998).

La NADH deshidrogenasa interna cataliza la transferencia de dos electrones del NADH de la matriz mitocondrial a la ubiquinona. El gen nuclear único, NDI1, codifica para una proteína precursora de 57 kDa, con una secuencia señal N-terminal de 26 aminoácidos que se elimina cuando se importa a la mitocondria. La proteína madura consiste de una sola subunidad con una masa molecular de 53 kDa, que contiene FAD unido no covalentemente (de Vries y Grivell, 1988). La enzima es insensible a rotenona y a piericidina A, pero se inhibe parcialmente por flavona.

La transferencia de electrones desde el NADH hasta la ubiquinona no contribuye a la generación de una fuerza protón-motriz a través de la membrana interna mitocondrial. La NADH deshidrogenasa interna reacciona específicamente con el NADH; sin embargo *in vitro* puede emplear diferentes aceptores de electrones, como la ubiquinona-2, la ubiquinona-6 -la cual es el aceptor de electrones endógeno o natural,- el 2,6-diclorofenolindofenol y el ferricianuro. Se ha reportado una $K_{m(NADH)}$ de 9.4 μM empleando como aceptor de electrones al 2,6-diclorofenolindofenol (Velázquez y Pardo, 2001), mientras que con Q_6 es de 31 μM (de Vries y Grivell, 1988).

La afinidad de las NADH deshidrogenasas del tipo II por el NADH es un punto delicado, ya que los datos disponibles para estas enzimas son insuficientes para hacer una generalización prudente. El intervalo del valor de las $K_{m(NADH)}$ es muy amplio, y va desde 2 μM en *S. metallicus* (Melo *et al*, 2004), 13 μM en *A. vinelandii* (Bertsova *et al*, 2001) hasta 50 μM en *E. coli* (Melo *et al*, 2004).

Las NADH:quinona oxidorreductasas del tipo II son un ejemplo de enzimas aparentemente redundantes, pero que juegan papeles cruciales en la fisiología de la célula. La plasticidad que introducen en el metabolismo celular se deriva de que sus funciones pueden cambiar según el organismo al que pertenecen y a las condiciones a las que se someten, haciendo de ellas un tema de investigación importante.

5. OBJETIVOS

- Determinar el mecanismo cinético de la NADH deshidrogenasa interna de mitocondrias de *S. cerevisiae* utilizando quinonas como sustrato.**

- Determinar si el DCPIP y la quinona interactúan con el mismo sitio en la enzima.**

- Determinar el efecto de los cationes monovalentes y divalentes sobre la NADH deshidrogenasa interna.**

- Determinar si el sitio de interacción de cationes monovalentes y divalentes es el mismo.**

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 REACTIVOS

El DEAE Bio-gel se adquirió de Bio-Rad. La β -nicotinamida adenin dinucleótido en su forma reducida (NADH), el 2, 6-diclorofenol indofenol (DCPIP), el ácido 3-N-morfolinopropanesulfónico (MOPS), el tris-hidroximetil-aminometano (TRIS-base), y la 2,3-dimetoxi-5-metil-1,4-benzoquinona (Q_0) se adquirieron de Sigma Chemical Co. La 2,3-dimetoxi-5-metil-6-decil-1,4-benzoquinona (DBQ) fue donada por el Dr. Rafael Moreno (Instituto Nacional de Cardiología, México). El Tritón X-100 al 10% se adquirió de Calbiochem.

6.2 CEPA

Para la obtención de la enzima se empleó la cepa de *S. cerevisiae* CEN.PK167-2B (*nde1 Δ nde2 Δ*), que únicamente expresa la NADH deshidrogenasa interna, donada por el Dr. Peter Kötter (Universidad de Frankfurt). La cepa se cultivó en medio YPD (glucosa al 2%, extracto de levadura al 1%, bactopectona al 1%), en agitación a 30°C por 24 horas.

6.3 OBTENCIÓN DE LAS MITOCONDRIAS

Las células se centrifugaron por 5 minutos a 2000 x g y se lavaron dos veces con agua destilada y el paquete se resuspendió con amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (20 mL/6 g de peso húmedo), se añadió β -mercaptoetanol (7 μ L/20 mL de suspensión celular) y la suspensión celular se incubó a 30°C por 10 minutos, se centrifugó (5 minutos a 2000 x g) y el paquete se resuspendió con 1 mL de amortiguador A (600 mM sorbitol, 50 mM KH_2PO_4 , 1 mM EDTA, pH 7.4) por gramo de peso húmedo. Las células se rompieron con perlas de vidrio en un "bead beater" en presencia de fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO) (1 mM concentración final). La suspensión que se obtuvo de la ruptura se centrifugó (5 minutos a 2000 x g, 4°C) y a partir del sobrenadante se obtuvieron las mitocondrias por centrifugación (10 minutos a 12,000 x g, 4°C).

6.4 OBTENCIÓN DE LA ENZIMA

Las mitocondrias se resuspendieron en amortiguador Tris-HCl 20 mM, EDTA 1mM, pH 7.6, a una concentración final de proteína de 15 mg/mL. La suspensión mitocondrial se sonicó y se centrifugó (20 minutos, 17,000 x g). El paquete se resuspendió en el mismo amortiguador y se llevó a una concentración final de proteína de 15 mg/mL. Esta suspensión se le dio un tratamiento con Tritón X-100 (0.18%), NaCl (200 mM) en presencia de 0.5 mM de PMSF por una hora, a 4°C, en agitación, con el objetivo de solubilizar la enzima. La suspensión se centrifugó (30 minutos, 33,000 r.p.m., ultracentrifuga Beckman, rotor 60 Ti) y el sobrenadante se dializó durante toda la noche en un litro de amortiguador Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, 0.02% Tritón X-100, pH 7.6. El dializado se cargó en una columna de DEAE Bio-gel, previamente equilibrada con el amortiguador de elución (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.05% Tritón X-100, pH 7.6) y la proteína se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0-350 mM en el mismo amortiguador. Las fracciones que presentaron mayor actividad enzimática se mezclaron y se almacenaron con 30% de glicerol a -70°C. Se intentó purificar aún más la enzima mediante una columna MONO-Q, pero la pérdida de actividad fue de más del 98%, por lo que se decidió trabajar con las fracciones obtenidas a partir de la columna de DEAE Bio-gel. Cabe mencionar que aun cuando todavía contenía varias proteínas contaminantes, hecho que se observó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (Fig. A), la actividad enzimática que se recuperó fue del 40%.

6.5 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA

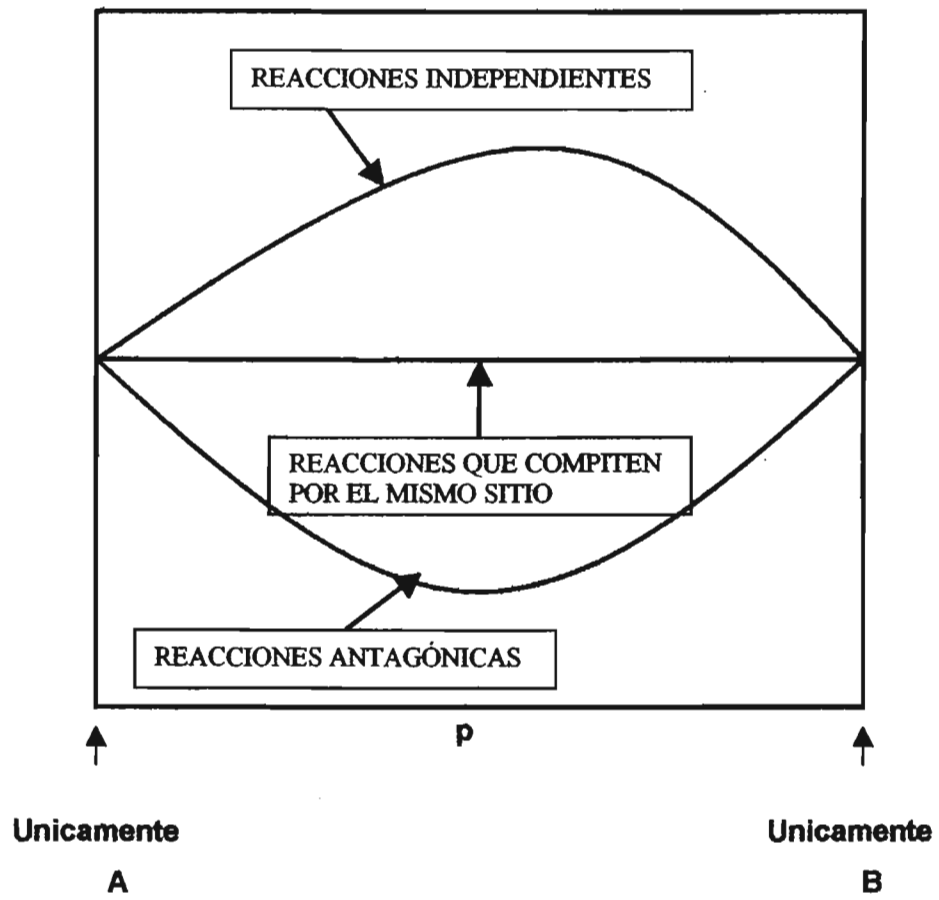
La concentración de proteína se determinó mediante el método de Biuret (Gornal *et al*, 1949) para las suspensiones mitocondriales y mediante el método de Lowry (Lowry *et al*, 1951) para las fracciones eluidas de las columnas.

6.6 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La actividad de la NADH deshidrogenasa interna se determinó espectrofotométricamente en una celda de 1.0 cm de paso de luz, siguiendo la oxidación del NADH a 340 nm cuando el segundo sustrato era cualquiera de las quinonas o siguiendo la reducción del DCPIP a 600 nm cuando el DCPIP se usó como segundo sustrato. La mezcla de reacción contenía 20 mM Mops-KOH, 1 mM EDTA, 200 mM KCl y 0.03% de Tritón X-100, pH 7.0, en un volumen final de 2 mL. Cuando se probó el efecto de los cationes la mezcla de reacción contenía únicamente 20 mM Mops-NaOH o 20 mM Mops-KOH y 0.03% Tritón X-100, pH 7.0. La reacción enzimática se inició al adicionar la enzima (1.53 μg). La velocidad inicial se calculó considerando el cambio de absorbencia en los primeros 20 –30 seg y el coeficiente de extinción molar del NADH ($6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) o del DCPIP ($21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

6.7 GRÁFICOS DE COMPETENCIA

El gráfico de competencia es un método cinético que permite probar si dos reacciones ocurren en el mismo sitio o en sitios diferente de la enzima. El primer paso del método consiste en escoger dos sustratos alternativos A y B. Se elige una concentración de referencia (a_0) del sustrato A con la que se obtenga una velocidad inicial v_0 en ausencia de B y una concentración de referencia b_0 del sustrato B que de la misma velocidad v_0 en ausencia de A. Se prepara una serie de mezclas que contengan el sustrato A y el sustrato B, a concentraciones donde $a = (1-p)a_0$ y $b = pb_0$, respectivamente, con un valor de p que va de cero a uno. Se determina la velocidad total para cada mezcla y se grafica contra p . Una velocidad constante, independiente de p , indica que las dos reacciones ocurren en el mismo sitio activo de la enzima. Si las reacciones ocurren en dos sitios totalmente independientes, el gráfico de v_{tot} contra p será una curva con un máximo. Finalmente, si existen dos sitios pero con inhibición cruzada, el máximo se convierte en mínimo si cada sustrato es más efectivo como inhibidor de la otra reacción que de lo que es como sustrato para su propio sitio (Cárdenas, 2001).



7. RESULTADOS

7.1 OBTENCIÓN DE LA ENZIMA

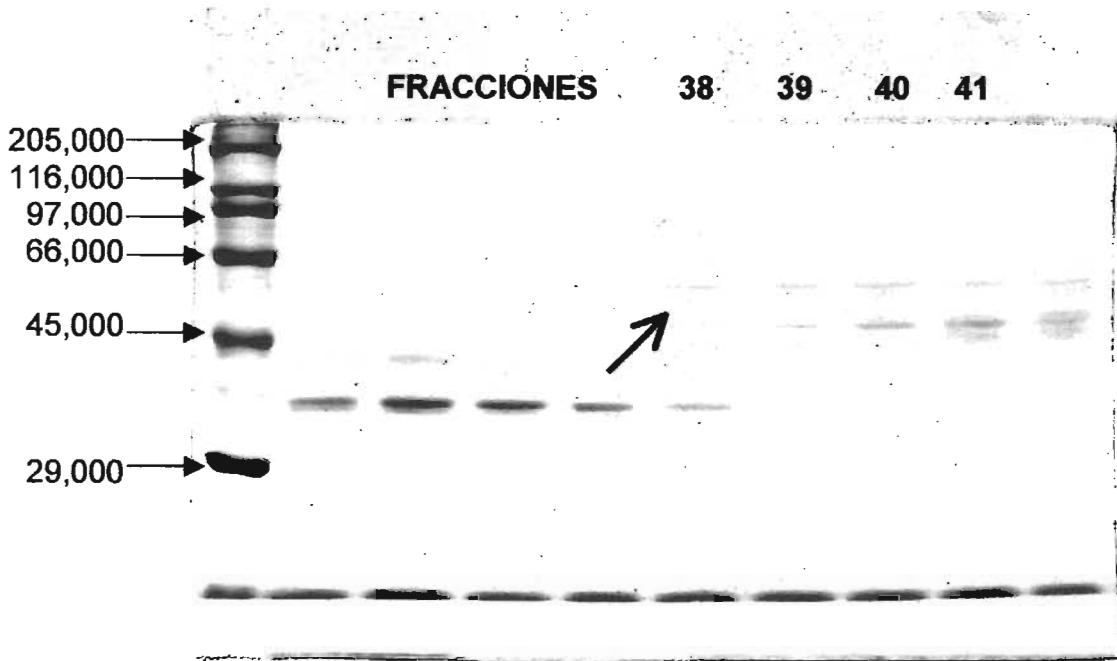


Fig. A . Composición polipeptídica de varias fracciones obtenidas de la columna de DEAE Bio-gel. La columna se equilibró con el amortiguador de elución (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.05% Tritón X-100, pH 7.6) y la proteína se eluyó con un gradiente lineal de 0-350 mM de NaCl en el mismo amortiguador. Carril 1: estándares de masa molecular (valores en Da a la izquierda). Se seleccionaron las fracciones 38-41 ya que presentaron la mayor actividad. La NADH deshidrogenasa interna es una proteína de 53,000 Da.

7.2 PATRONES DE VELOCIDAD INICIAL DE LA NADH DESHIDROGENASA INTERNA CON Q_0 COMO SUSTRATO

Se probó la actividad de la enzima como NADH: Q_0 oxidorreductasa. La actividad aumentó al incrementar la concentración de NADH ante diferentes concentraciones fijas de Q_0 . En cada una de las concentraciones fijas de Q_0 empleadas se obtuvo una curva hiperbólica (inserto de la fig. 1a). La gráfica de los dobles recíprocos ($1/v$ vs. $1/Q_0$) muestra un conjunto de líneas rectas que se cruzan en un punto localizado por arriba del eje $1/Q_0$ y a la izquierda del eje $1/v$ (fig. 1a). Se observó este mismo comportamiento al variar la concentración de Q_0 usando diferentes concentraciones fijas de NADH. La actividad de la NADH deshidrogenasa se incrementó al aumentar la concentración de Q_0 siguiendo una relación hiperbólica en cada una de las concentraciones de NADH (Inserto de la fig. 1b). Las líneas rectas que se obtuvieron al graficar los dobles recíprocos ($1/v$ vs. $1/NADH$) se intersectan en un punto por arriba del eje $1/NADH$ y a la izquierda del eje $1/v$ (fig. 1b).

Estos resultados indican que la NADH deshidrogenasa interna une ambos sustratos, el NADH y la quinona (Q_0), formando un complejo ternario a partir del cual se liberan los productos (NAD^+ y Q_0H_2) por lo que el mecanismo es de tipo secuencial, de acuerdo con el siguiente esquema:



La figura 2 muestra los regráficos de los interceptos que se usaron para obtener una $K_{mQ_0} = 3.85 \mu M$ y una $K_{mNADH} = 10.5 \mu M$.

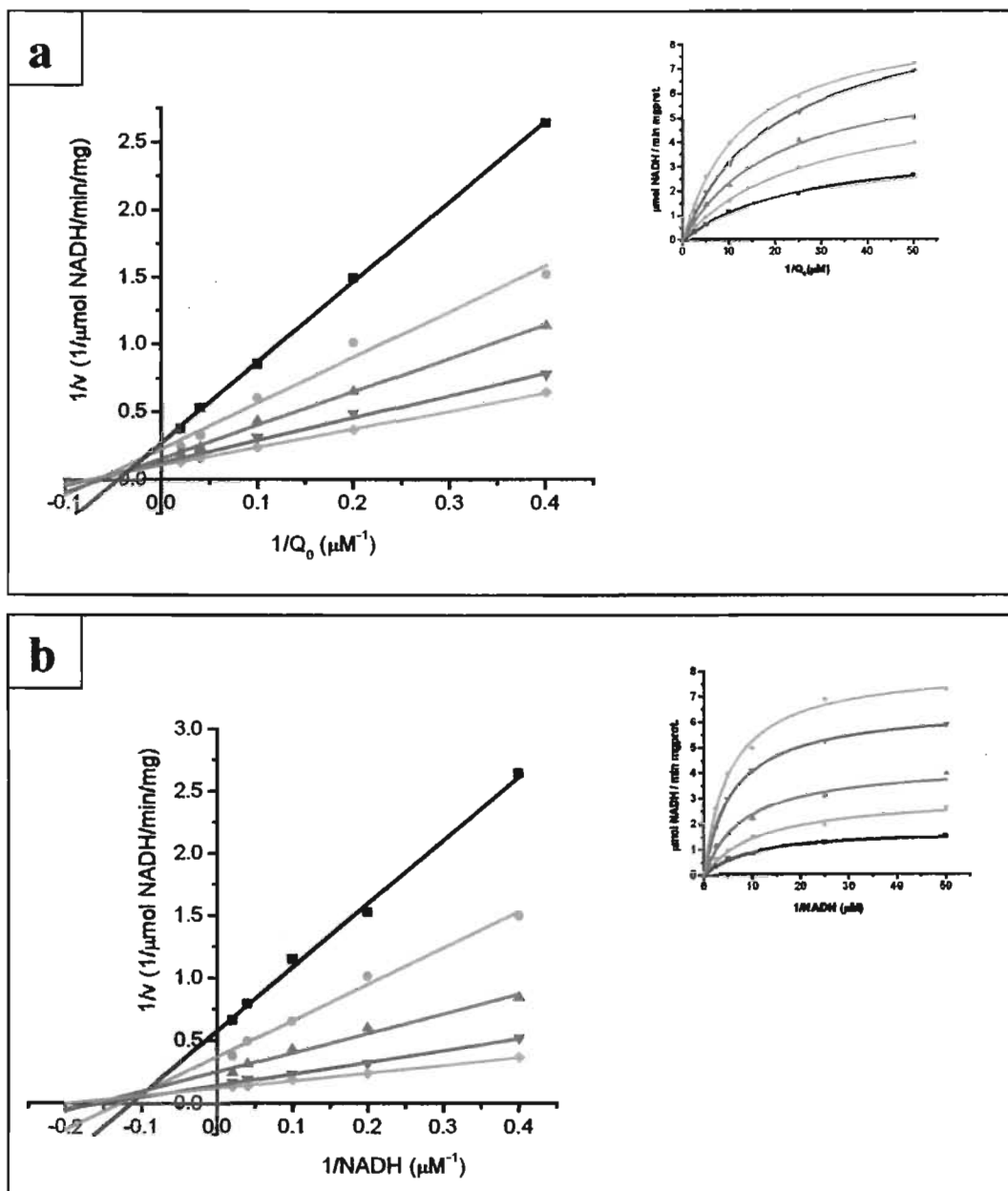


Fig. 1. Efecto de la Q_0 y el NADH sobre la velocidad inicial de la NADH deshidrogenasa interna de mitocondrias de *S. cerevisiae*. La concentración de enzima fue de 0.77 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en amortiguador 20 mM MOPS-KOH, 1 mM EDTA, 200 mM KCl, pH 7.0. (a) Gráfico de los dobles recíprocos de las velocidades iniciales con Q_0 como sustrato variable. Las concentraciones fijas de NADH fueron: ■ 2.5, ● 5.0, ▲ 10, ▼ 25 y ◆ 50 μM . Inserto: Ajuste de los datos a la ecuación de Michaelis-Menten. (b) Gráfico de los dobles recíprocos de las velocidades iniciales con NADH como sustrato variable. Las concentraciones fijas de Q_0 fueron: ■ 2.5, ● 5.0, ▲ 10, ▼ 25 y ◆ 50 μM . Inserto: Ajuste de los datos a la ecuación de Michaelis-Menten.

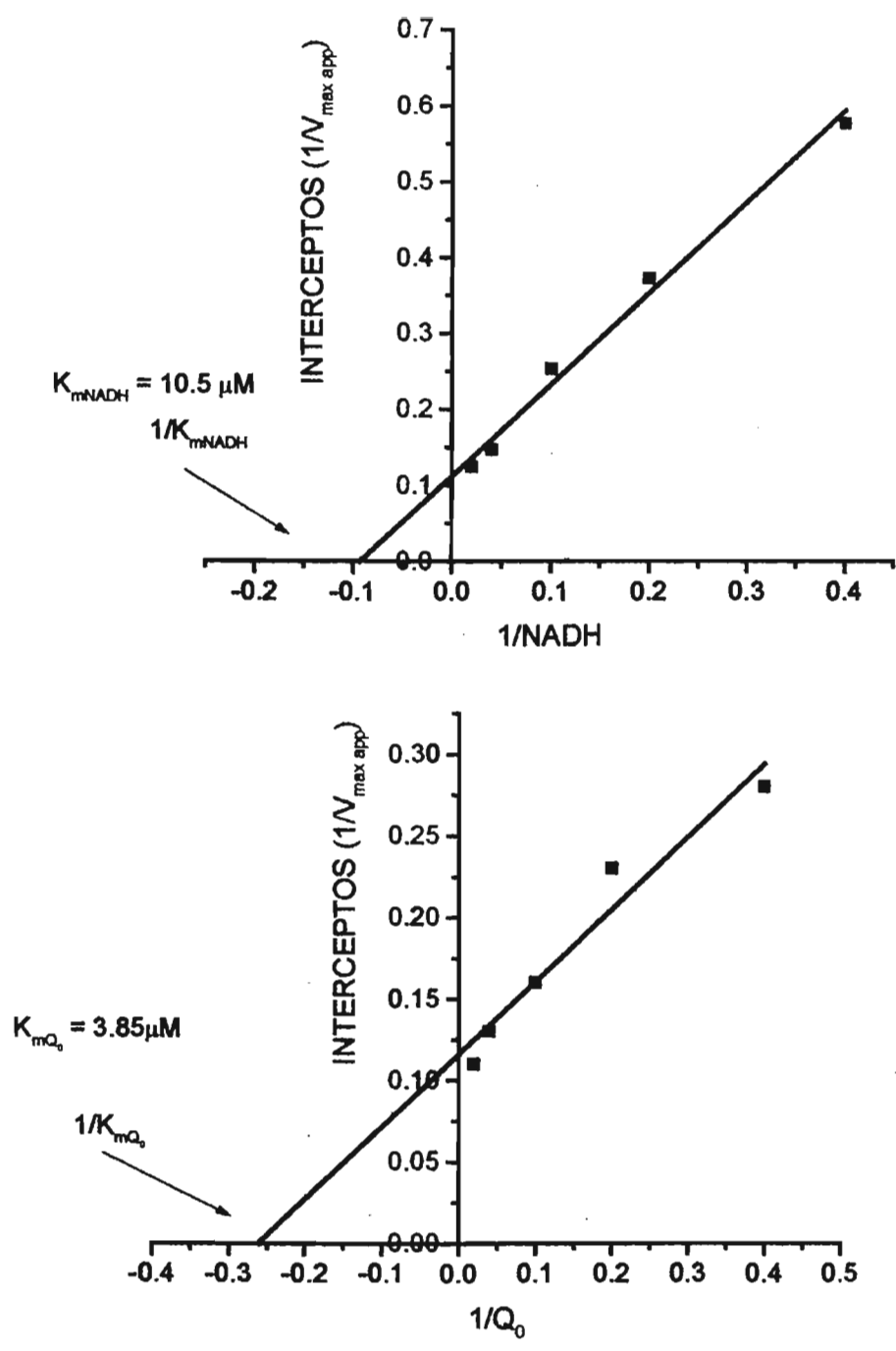


Fig. 2. Regráficos de los interceptos

7.3 PATRONES DE VELOCIDAD INICIAL DE LA NADH DESHIDROGENASA INTERNA CON DECILBENZOQUINONA (DBQ) COMO SUSTRATO

Los resultados de las velocidades iniciales al ensayar diferentes concentraciones de DBQ con diferentes concentraciones fijas de NADH se muestran en la fig. 3a; en el inserto se observa que los datos siguen un comportamiento hiperbólico aún a la concentración de 50 μM de DBQ (inserto de la fig.3a). El gráfico de los dobles recíprocos ($1/v$ vs. $1/\text{DBQ}$) (Fig.3a) muestra un conjunto de líneas rectas que se cruzan en un punto a la izquierda del eje $1/v$ y por debajo del eje $1/\text{DBQ}$. De la misma manera, al determinar las velocidades iniciales de la reacción variando la concentración del NADH con concentraciones fijas variables de DBQ, éstas se ajustaron a curvas hiperbólicas (inserto de la fig. 3b). Al graficar los dobles recíprocos ($1/v$ vs. $1/\text{NADH}$) se obtuvo una serie de líneas rectas que se intersectaron en un punto por debajo del eje $1/s$ y a la izquierda del eje $1/v$.

Este comportamiento sugiere un mecanismo de unión de sustratos y liberación de productos de tipo secuencial, al igual que en el caso de la Q_0 .

Para obtener los valores de K_m se construyeron los regráficos de los interceptos a partir del gráfico de los dobles recíprocos (fig. 4). Los valores obtenidos fueron: $K_{m\text{DBQ}} = 16.6 \mu\text{M}$ y una $K_{m\text{NADH}} = 38.46 \mu\text{M}$.

El punto de intersección de los dobles recíprocos puede ocurrir en diferentes cuadrantes dependiendo de los valores de K_{iB} y K_{mA} . Si K_{iB} es mayor, igual o menor al valor de K_{mA} las rectas se intersectan por arriba, sobre o debajo del eje horizontal. La figura 5 muestra que el valor de K_{iB} con Q_0 es $26.31 \mu\text{M}$, el cual es mayor a la $K_{m\text{NADH}}=10.5 \mu\text{M}$, mientras que para la DBQ $K_{iB} = 4.34 \mu\text{M}$, y es menor que la $K_{m\text{NADH}}=38.46 \mu\text{M}$, concordando con los puntos de intersección obtenidos.

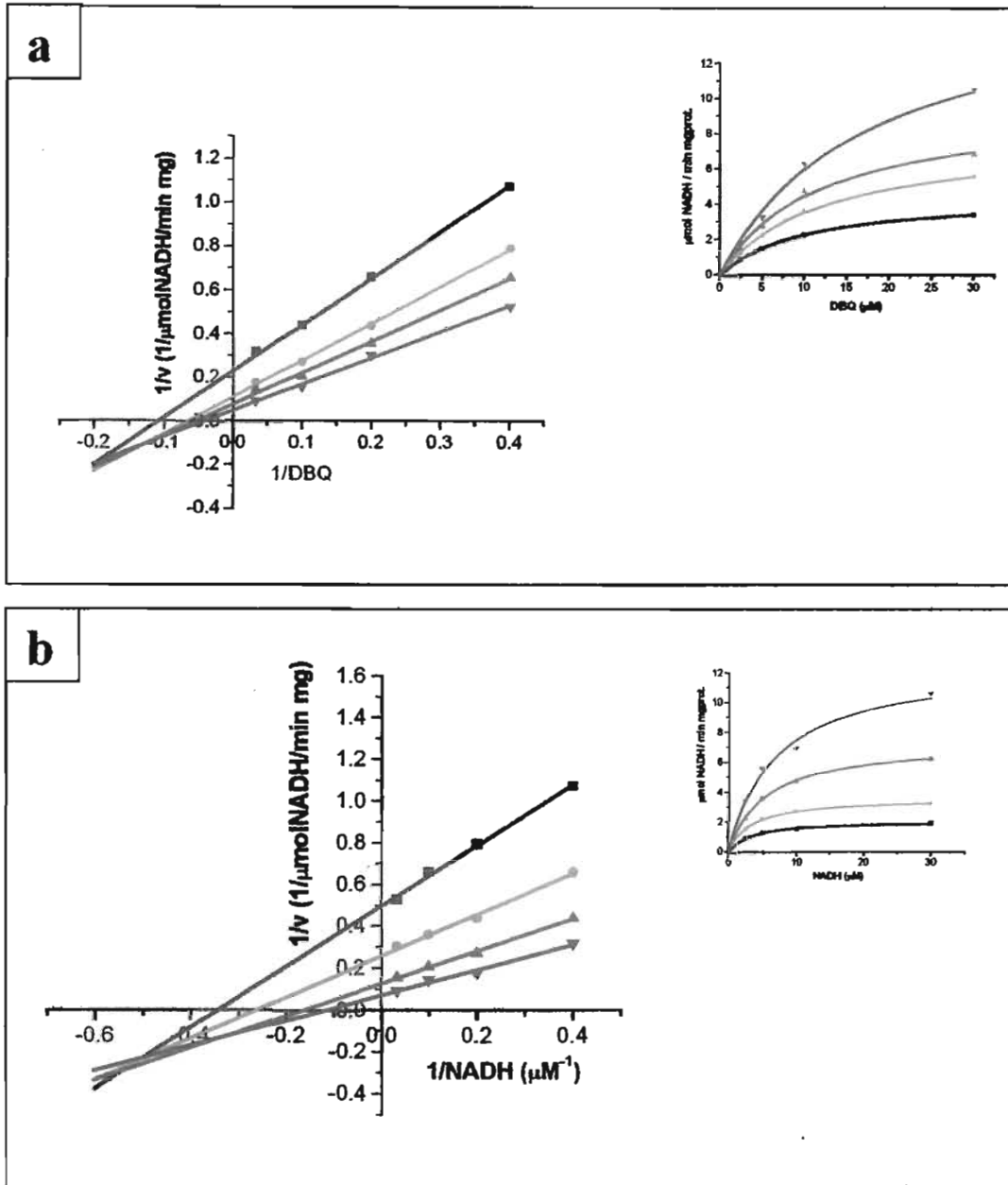


Fig. 3. Efecto de la DBQ y el NADH sobre la velocidad inicial de la NADH deshidrogenasa interna de mitocondrias de *S. cerevisiae*. La concentración de enzima fue de 0.77 $\mu\text{g/mL}$ en amortiguador 20 mM MOPS-KOH, 1 mM EDTA, 200 mM KCl, pH 7.0. (a) Gráfico de los dobles recíprocos de las velocidades iniciales con DBQ como sustrato variable. Las concentraciones fijas de NADH fueron: ■ 2.5, ● 5.0, ▲ 10 y ▼ 30 μM . Inserto: Ajuste de los datos a la ecuación de Michaelis-Menten. (b) Gráfico de los dobles recíprocos de las velocidades iniciales con NADH como sustrato variable. Las concentraciones fijas de DBQ fueron: ■ 2.5, ● 5.0, ▲ 10 y ▼ 30 μM . Inserto: Ajuste de los datos a la ecuación de Michaelis-Menten.

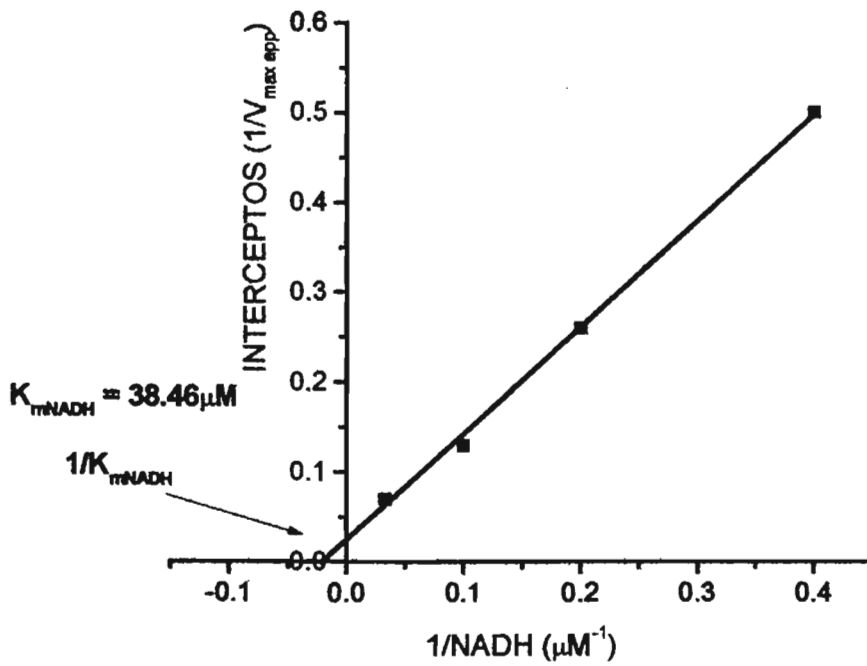
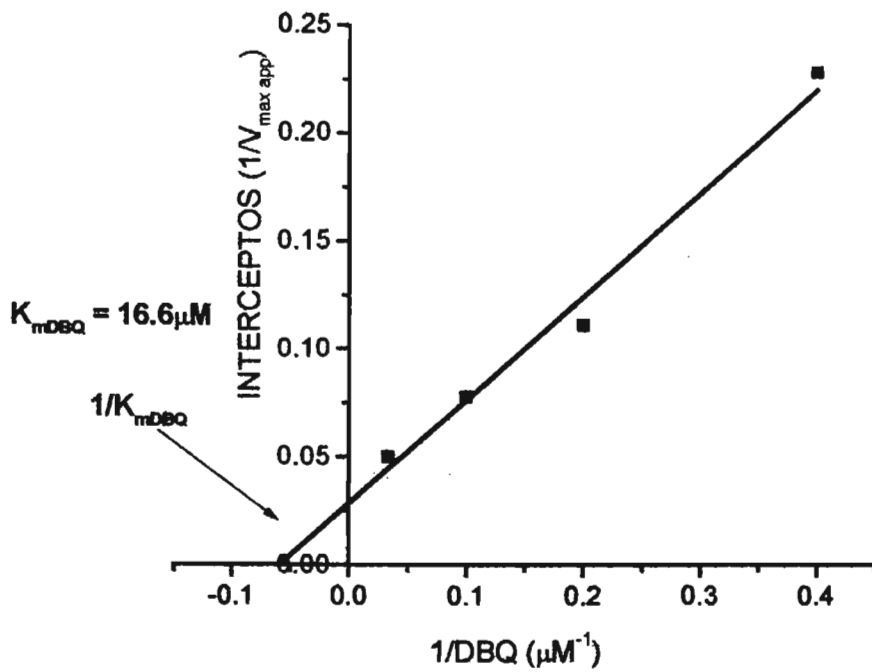
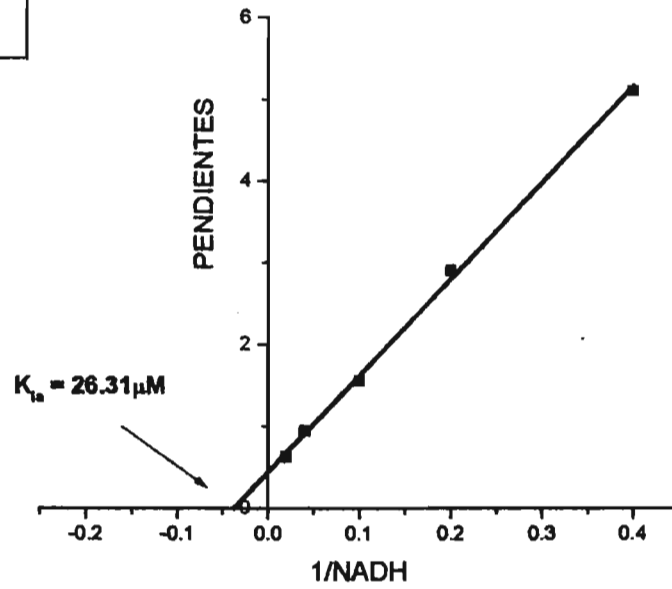


Fig. 4. Regráficos de los interceptos

Q₀



DBQ

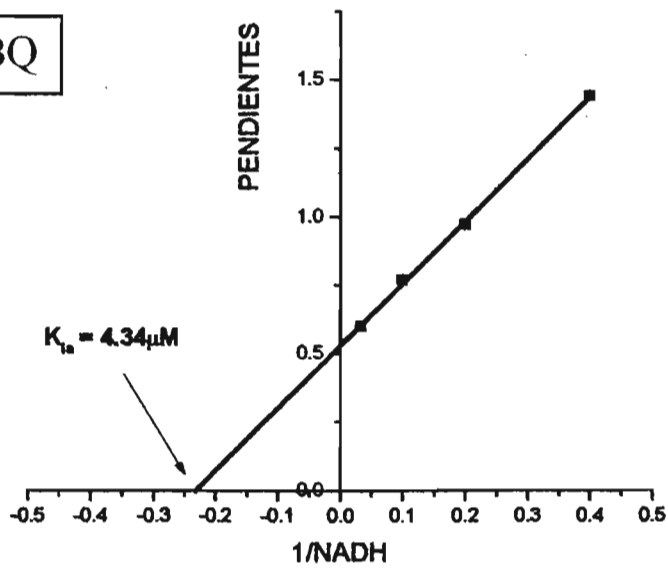
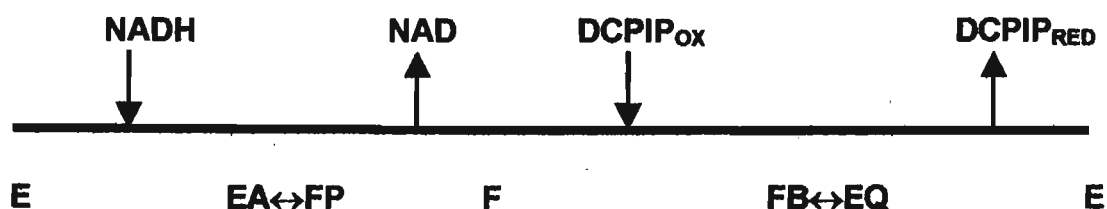


Fig. 5. Regráfico de las pendientes para el cálculo de las K_{1a} .

7.4 PATRONES DE VELOCIDAD INICIAL DE LA NADH DESHIDROGENASA INTERNA CON DCPIP

El 2,6-diclorofenolindofenol es un aceptor de electrones artificial que se emplea debido a su alta solubilidad en soluciones acuosas. Empleando dicho sustrato, Velázquez y Pardo (2001) reportaron para esta enzima un mecanismo cinético de tipo ping-pong:



Para confirmar el mecanismo cinético de la enzima como NADH:DCPIP oxidorreductasa, se determinó la actividad de la enzima con concentraciones crecientes de DCPIP usando diferentes concentraciones fijas de NADH (Inserto de la fig. 6a). El gráfico de los recíprocos de las velocidades iniciales y las concentraciones de DCPIP ($1/v$ vs. $1/DCPIP$) (fig. 6a) muestra una serie de líneas rectas paralelas, lo cual es congruente con un mecanismo de reacción de tipo ping-pong, como se había propuesto. Se observa el mismo comportamiento al graficar el recíproco de las velocidades iniciales obtenidas a diferentes concentraciones de NADH con concentraciones fijas variables de DCPIP (fig. 6b).

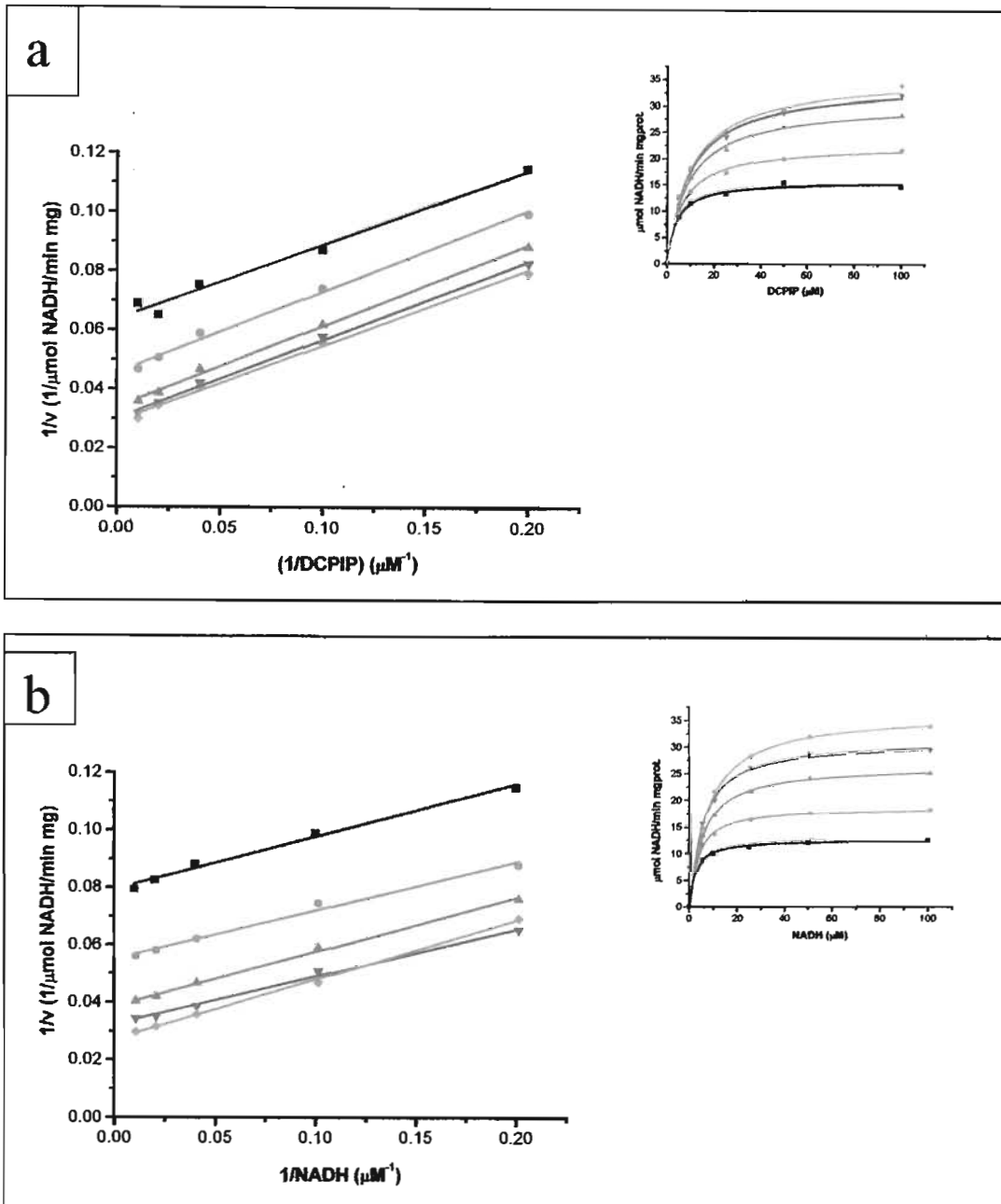


Fig. 6. Efecto del DCPIP y el NADH sobre la velocidad inicial de la NADH deshidrogenasa interna de mitocondrias de *S. cerevisiae*. La concentración de enzima fue de $0.77 \mu\text{g}/\text{mL}$ en amortiguador 20 mM MOPS-KOH , 1 mM EDTA , 200 mM KCl , pH 7.0 . (a) Gráfico de los dobles recíprocos de las velocidades iniciales con DCPIP como sustrato variable. Las concentraciones fijas de NADH fueron: ■ 5.0 , ● 10 , ▲ 25 , ▼ 50 y ◆ $100 \mu\text{M}$. Inserto: Ajuste de los datos a la ecuación de Michaelis-Menten. (b) Gráfico de los dobles recíprocos de las velocidades iniciales con NADH como sustrato variable. Las concentraciones fijas de DCPIP fueron: ■ 5.0 , ● 10 , ▲ 25 , ▼ 50 y ◆ $100 \mu\text{M}$. Inserto: Ajuste de los datos a la ecuación de Michaelis-Menten.

7.5 COMPETENCIA DEL DCPIP Y LA QUINONA POR EL MISMO SITIO DE UNIÓN

Debido a que se obtuvieron mecanismos cinéticos diferentes para la misma NADH deshidrogenasa como NADH:DCPIP oxidoreductasa y como NADH:quinona oxidoreductasa, existía la posibilidad de que la Q_0 y el DCPIP estuvieran interactuando con diferentes sitios de la enzima. Para investigar esta posibilidad se ensayó la actividad de la enzima con concentraciones crecientes de DCPIP en ausencia o presencia de concentraciones fijas de Q_0 . Conforme se incrementó la concentración de Q_0 , la actividad con DCPIP disminuyó (Inserto de la fig. 7). Al graficar los recíprocos ($1/v$ vs. $1/DCPIP$) se obtuvo una serie de líneas rectas que se intersectan en un punto sobre el eje $1/v$, comportamiento que representa una inhibición competitiva por un sustrato alternativo. Este resultado sugiere que tanto la quinona como el DCPIP se combinan con la enzima en el mismo sitio activo y como consecuencia la reducción del DCPIP se inhibe por la presencia de la quinona. Del gráfico de los dobles recíprocos en ausencia de Q_0 (fig. 8) se obtiene una $K_{mDCPIP} = 11.5 \mu M$ y del regráfico de las pendientes vs. $[Q_0]$ (fig. 8) se puede calcular una $K_{iQ_0} = 102 \mu M$.

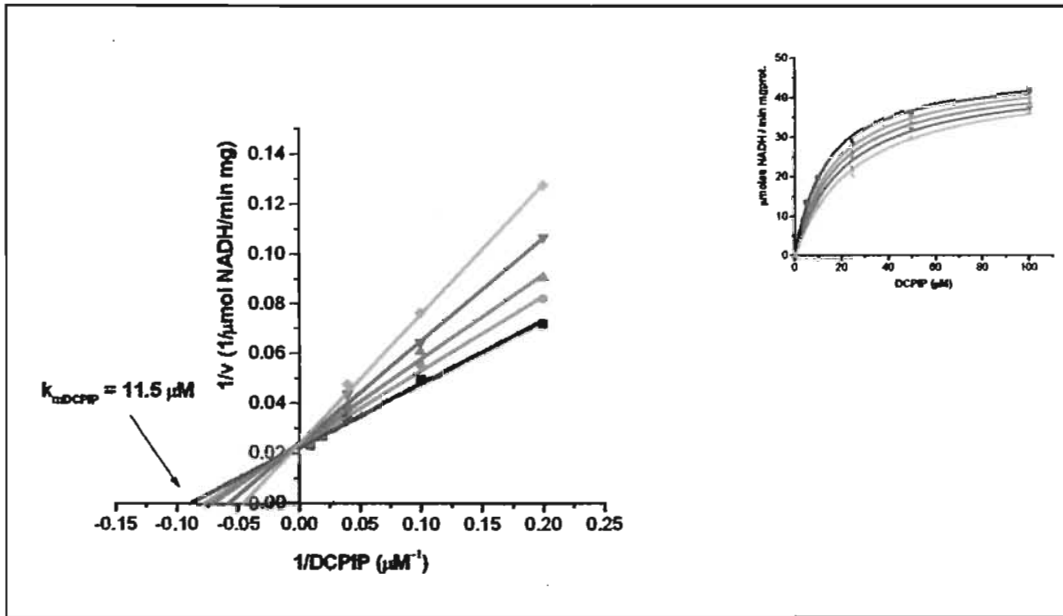


Fig. 7. Competencia de DCPIP y la Q_0 por el mismo sitio de unión en la NADH deshidrogenasa interna de mitocondrias de *S. cerevisiae*. La concentración de enzima fue de $0.77 \mu\text{g/mL}$ en amortiguador 20 mM MOPS-KOH , 1 mM EDTA , 200 mM KCl , $\text{pH } 7.0$, la concentración de NADH fue de $100 \mu\text{M}$. Gráfico de los dobles recíprocos de las velocidades iniciales con DCPIP como sustrato variable. Las concentraciones fijas variables de Q_0 fueron: \blacksquare 0 , \bullet 10 , \blacktriangle 25 , \blacktriangledown 50 y \blacklozenge $100 \mu\text{M}$. Inserto: Ajuste de los datos a la ecuación de Michaelis-Menten.

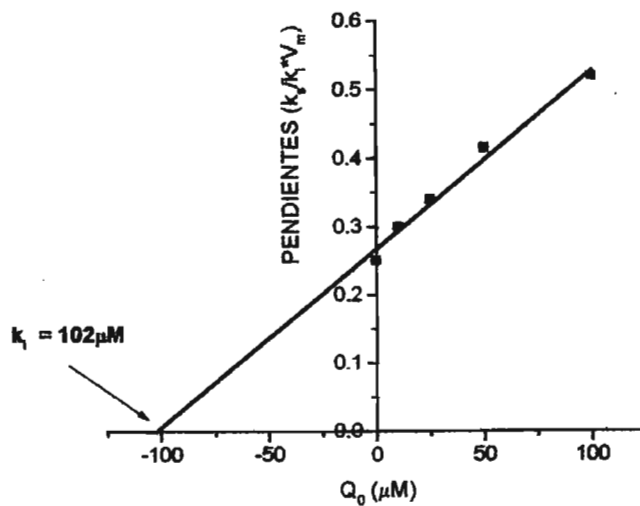


Fig. 8. Re gráfico de las pendientes vs. $[Q_0]$

7.6 INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA NADH DESHIDROGENASA INTERNA CON AMP.

Los patrones de inhibición son herramientas que dan información acerca del orden de la unión de los sustratos y de la liberación de los productos, que es útil para dilucidar o confirmar el mecanismo cinético de una reacción enzimática. Para obtener los patrones de inhibición se empleó como inhibidor al AMP, análogo del NADH. Los patrones de velocidad inicial de la NADH deshidrogenasa interna empleando quinonas como sustrato sugieren un mecanismo cinético secuencial. Si éste fuera ordenado se esperaba que el AMP se comportara como un inhibidor competitivo con respecto al NADH y como inhibidor no competitivo con respecto a la quinona (Q_0); sin embargo, como se puede observar en la fig. 9, los patrones de inhibición corresponden a una inhibición no competitiva con respecto al NADH y con respecto a la quinona, ya que las líneas que se obtienen de los dobles recíprocos se cruzan en un punto localizado a la izquierda del eje $1/v$ y por arriba del eje $1/\text{sustrato}$. Estos resultados sugieren que el AMP puede unirse a la enzima libre y al complejo enzima-sustrato. Los valores de las K_i para el AMP fueron de 12 mM para el NADH y de 6.7 mM para la Q_0 (fig. 10).

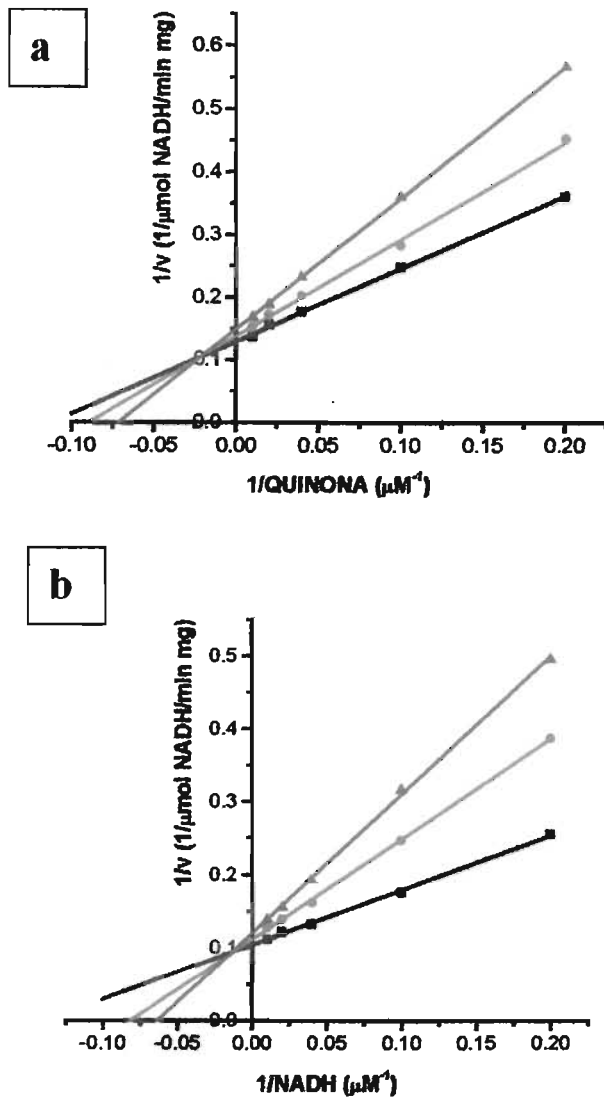


Fig. 9. Inhibición de la actividad de la NADH deshidrogenasa interna de mitocondrias de *S. cerevisiae* con AMP. La concentración de enzima fue de 0.77 $\mu\text{g/mL}$ en amortiguador 20 mM MOPS-KOH, 1mM EDTA, 200 mM KCl, pH 7.0. (a) Gráfico de los dobles recíprocos de las velocidades iniciales con Q_0 como sustrato variable, a una concentración fija de NADH de 50 μM . Las concentraciones fijas de AMP fueron: ■ 0.0, ● 5.0 y ▲ 10 mM. (b) Gráfico de los dobles recíprocos de las velocidades iniciales con NADH como sustrato variable y una concentración fija de Q_0 de 50 μM . Las concentraciones fijas de AMP fueron: ■ 0.0, ● 5.0 y ▲ 10 mM.

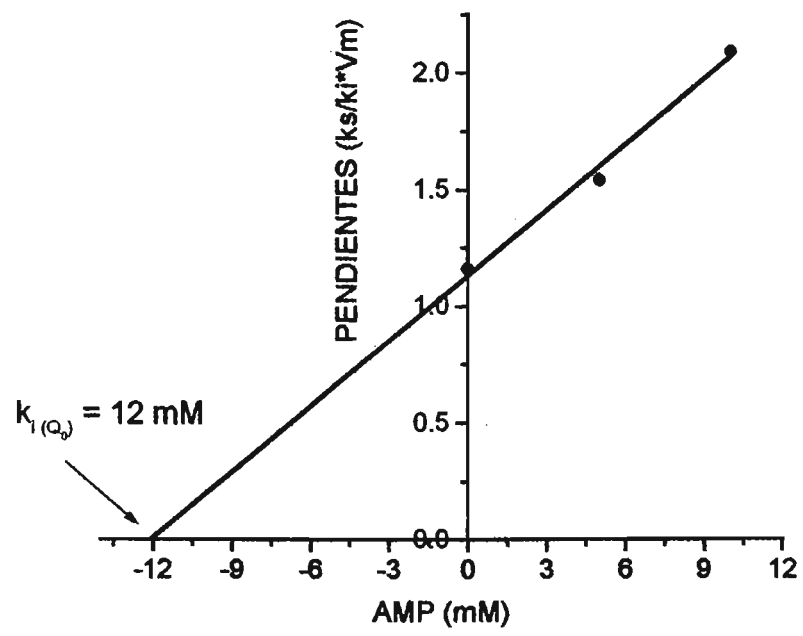
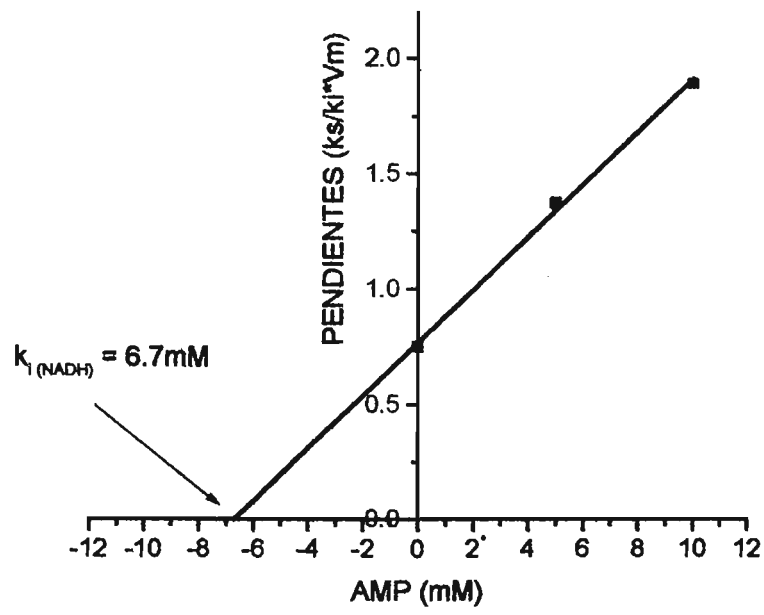


Fig. 10. Regráficos de las pendientes para la determinación de las K_i con AMP como inhibidor.

7.7 EFECTO DE CATIONES SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA NADH DESHIDROGENASA

Al ensayar los cationes monovalentes (Na^+ , K^+) y divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+}) sobre la actividad de la NADH deshidrogenasa interna se observó que aún en ausencia de estos cationes la enzima es activa, teniendo una velocidad inicial de $3.9 \mu\text{moles NADH} \times (\text{min.mg})^{-1}$. Al adicionar los cationes monovalentes o divalentes hasta 200 mM y 40 mM, respectivamente, se obtuvo un incremento en las velocidades iniciales. Al graficar las velocidades iniciales vs. la concentración de los cationes se obtuvieron hipérbolas rectangulares (fig. 11). Ajustando los datos a la ecuación de Michaelis-Menten se obtuvieron los parámetros cinéticos V_m y $K_{0.5}$, los cuales se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Valores de V_m de la NADH deshidrogenasa interna en presencia de cationes y su $k_{0.5}$.

| CATIÓN | V_m ($\mu\text{moles NADH}/\text{min.mg.}$) | $K_{0.5}$ (mM) |
|------------------------------------|--|--------------------------------------|
| K^+ | 11.0 ± 0.5 | 52.4 ± 10 |
| Na^+ | 11.7 ± 0.6 | 56.3 ± 11 |
| Ca^{2+} | 11.3 ± 0.5 | 10.9 ± 1.8 |
| Mg^{2+} | 9.83 ± 0.3 | 2.97 ± 0.5 |

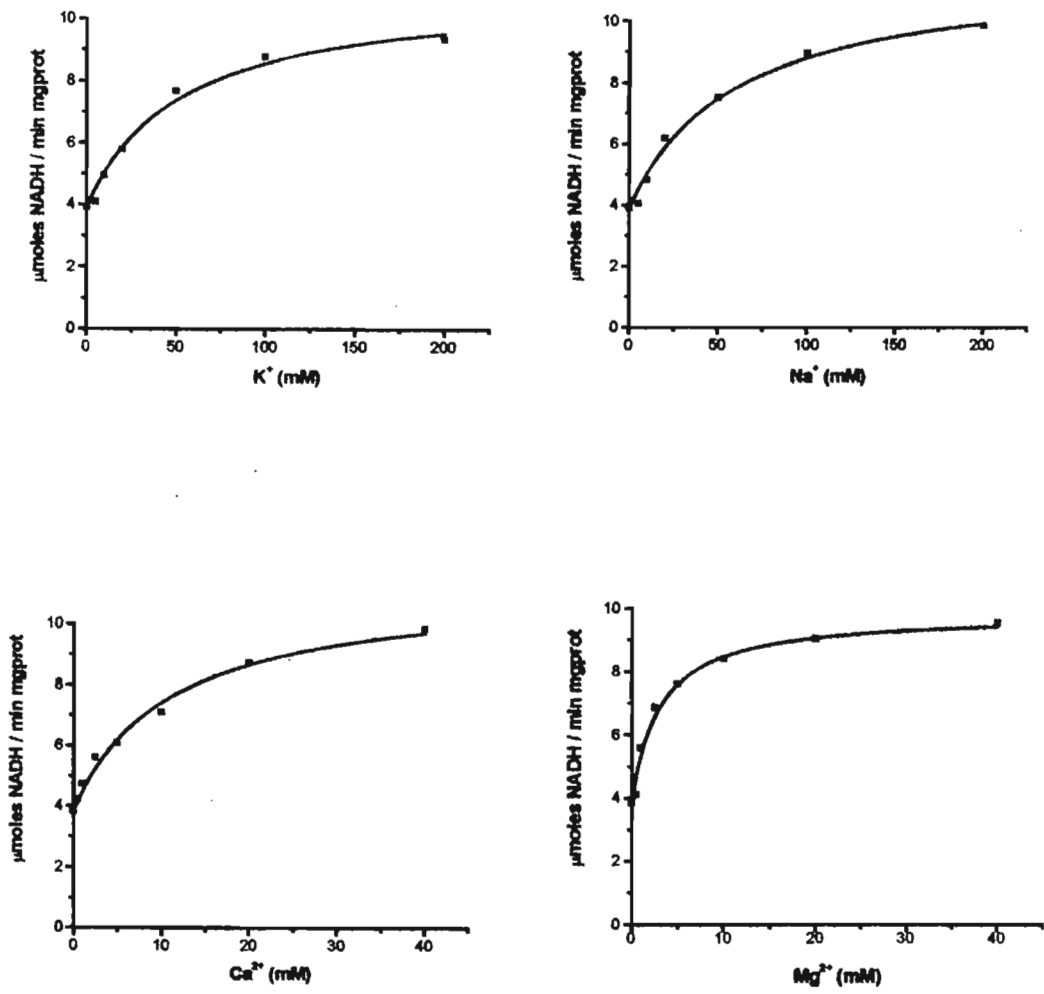
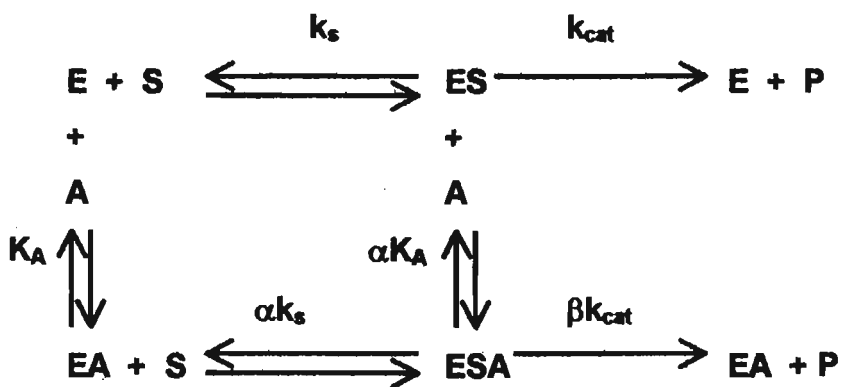


Fig. 11. Efecto de cationes monovalentes y divalentes sobre la actividad de la NADH deshidrogenasa interna de mitocondrias de *S. cerevisiae*. La actividad de la enzima se midió como NADH:Q₀ oxidorreductasa. La concentración de enzima fue de 0.77 µg/mL en amortiguador 20 mM MOPS-KOH, pH 7.0; la concentración tanto de NADH como de Q₀ fue de 50 µM.

7.8 MECANISMO CINÉTICO DE LA ACTIVACIÓN CON CATIONES

La presencia de actividad enzimática en ausencia de los cationes, sugiere que el papel de los cationes como activadores no es esencial. Para probar el mecanismo cinético de activación, se realizaron ensayos en los que se mantuvo fija la concentración de NADH, se varió la concentración de Q_0 y se probaron diferentes concentraciones fijas de cationes (K^+ para cationes monovalentes y Mg^{2+} para cationes divalentes) obteniéndose las velocidades iniciales de la reacción. Los gráficos directos de las velocidades iniciales vs. $[Q_0]$ y sus recíprocos ($1/v$ vs. $1/Q_0$) se muestran en la figura 12. También se realizaron ensayos en los que se mantuvo constante la concentración de Q_0 , se varió la concentración de NADH y se probaron diferentes concentraciones fijas de K^+ y Mg^{2+} . Los gráficos correspondientes se observan en la figura 13. En los gráficos de los dobles recíprocos, tanto con K^+ como con Mg^{2+} , al variar la concentración de quinona ó al variar la concentración de NADH, se obtuvieron series de líneas rectas que se intersectan en un punto a la izquierda del eje $1/v$ y por arriba de los ejes $1/Q_0$ y $1/NADH$, concordando con el siguiente modelo cinético de activación no esencial:



Para el cálculo de las constantes cinéticas α , β y K_A se graficaron los recíprocos de las diferencias de interceptos o de las diferencias de las pendientes de las rectas obtenidas en los gráficos de los dobles recíprocos, contra el inverso de la concentración de los cationes. En la figura 14 se

muestran los gráficos para el caso de K^+ con NADH como sustrato variable. Los valores de las constantes cinéticas para los casos ensayados se dan en la Tabla 3.

Tabla 3. Constantes cinéticas α , β y K_A para el modelo de activación no esencial con diferentes cationes.

| SUSTRATO FIJO | SUSTRATO VARIABLE | CATIÓN | α | β | K_A (mM) |
|-------------------|-------------------|-----------|----------|---------|------------|
| NADH | QUINONA (Q_0) | K^+ | 0.45 | 5.0 | 135.5 |
| NADH | QUINONA (Q_0) | Mg^{2+} | 0.50 | 4.2 | 2.56 |
| QUINONA (Q_0) | NADH | K^+ | 0.09 | 2.2 | 282.0 |
| QUINONA (Q_0) | NADH | Mg^{2+} | 0.40 | 2.2 | 4.86 |

7.9 GRÁFICOS DE COMPETENCIA

El gráfico de competencia es un método cinético que permite saber, de forma sencilla, si dos reacciones catalizadas por una enzima ocurren en el mismo sitio o en sitios diferentes. Este método consiste en realizar mezclas de los dos sustratos y graficar la velocidad total, es decir, la velocidad en presencia de los dos sustratos en función de un parámetro p que define la concentración de los dos sustratos en términos de las dos concentraciones de referencia, de tal manera que cuando $p=0$ y $p=1$ se obtenga la misma velocidad. (Ver la sección de Material y Métodos). Este método se empleó para probar si los cationes usados, que juegan el papel de activadores no esenciales, se unen a un mismo sitio o se unen a sitios diferentes.

En primer lugar se probaron los cationes monovalentes K^+ y Na^+ . Como se muestra en la figura 15a, las velocidades totales obtenidas con las mezclas de

los cationes, manteniendo constantes las concentraciones de NADH y Q_0 , siguen una tendencia lineal horizontal, indicando que ambos cationes monovalentes se unen a un mismo sitio.

Se probaron también los cationes divalentes Ca^{2+} y Mg^{2+} . Al igual que con los cationes monovalentes, la velocidad total obtenida al ensayar las diferentes mezclas de ellos en presencia de concentraciones fijas de NADH y Q_0 , fue independiente de p (fig. 15b), resultado que concuerda con el modelo para reacciones que ocurren en un mismo sitio.

Finalmente, se ensayó un catión monovalente (Na^+) y un catión divalente (Ca^{2+}); al graficar las velocidades totales obtenidas contra p , se observó claramente un máximo (fig. 15c), hecho que sucede cuando dos reacciones ocurren en sitios separados e independientes.

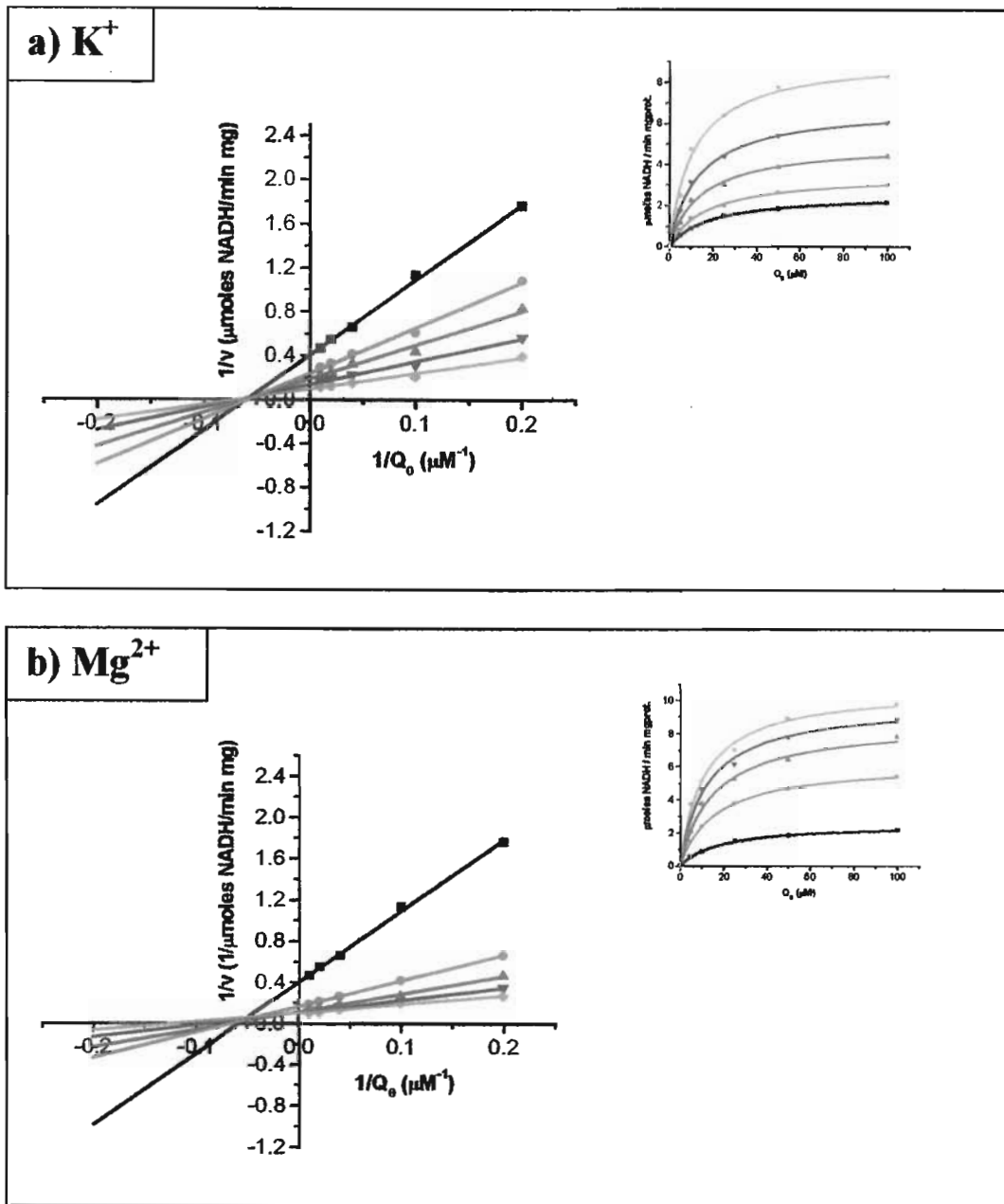


Fig. 12. Efecto de (a) K⁺ y (b) Mg²⁺ sobre la velocidad inicial de la NADH deshidrogenasa interna de mitocondrias de *S. cerevisiae*. La concentración de enzima fue de 0.77 μg/mL en amortiguador 20 mM MOPS-KOH, pH 7.0. Gráficos de los dobles recíprocos de las velocidades iniciales con Q₀ como sustrato variable, la concentración de NADH fue de 50 μM. (a) Las concentraciones fijas de K⁺ fueron: ■ 0, ● 10, ▲ 20, ▼ 50 y ◆ 100mM. Inserto: Ajuste de los datos a la ecuación de Michaelis-Menten. (b) Las concentraciones fijas de Mg²⁺ fueron: ■ 0, ● 1.0, ▲ 5.0, ▼ 20 y ◆ 40mM. Inserto: Ajuste de los datos a la ecuación de Michaelis-Menten.

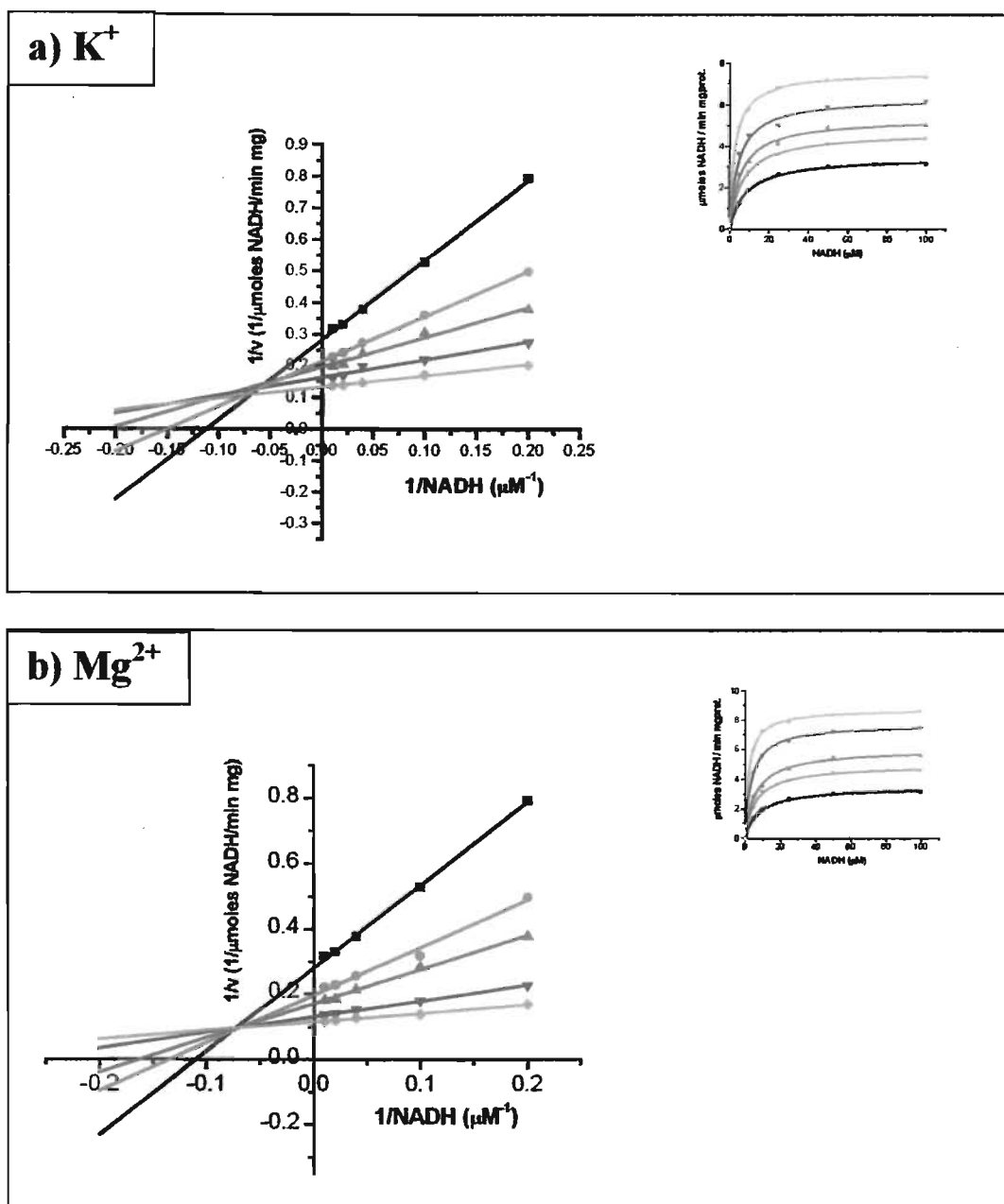


Fig. 13. Efecto de (a) K⁺ y (b) Mg²⁺ sobre la velocidad inicial de la NADH deshidrogenasa interna de mitocondrias de *S. cerevisiae*. La concentración de enzima fue de 0.77 μg/mL en amortiguador 20 mM MOPS-KOH, pH 7.0. Gráficos de los dobles recíprocos de las velocidades iniciales con NADH como sustrato variable, la concentración de Q₀ fue de 50 μM. (a) Las concentraciones fijas de K⁺ fueron: ■ 0, ● 10, ▲ 20, ▼ 50 y ◆ 100 mM. Inserto: Ajuste de los datos a la ecuación de Michaelis-Menten. (b) Las concentraciones fijas de Mg²⁺ fueron: ■ 0, ● 1.0, ▲ 5.0, ▼ 20 y ◆ 40 mM. Inserto: Ajuste de los datos a la ecuación de Michaelis-Menten.

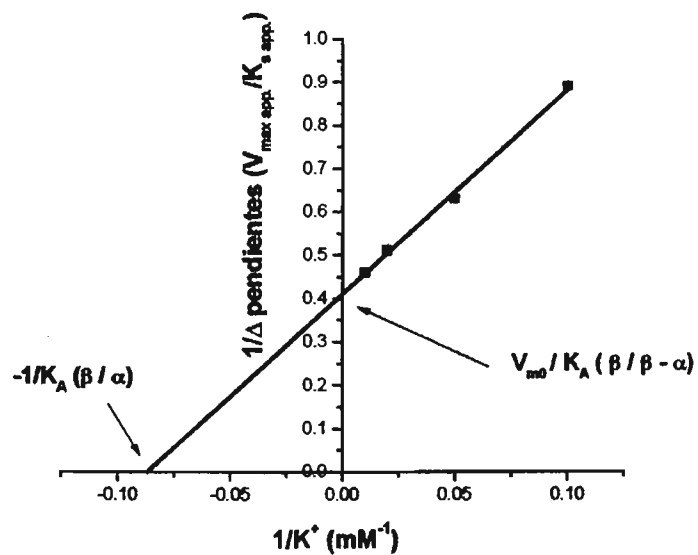
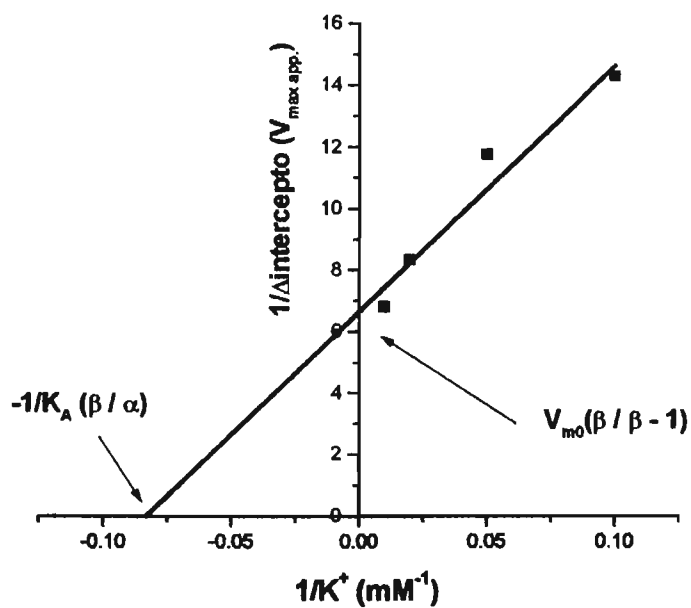


Fig. 14. Regráficos para la determinación de las constantes cinéticas α , β y K_A

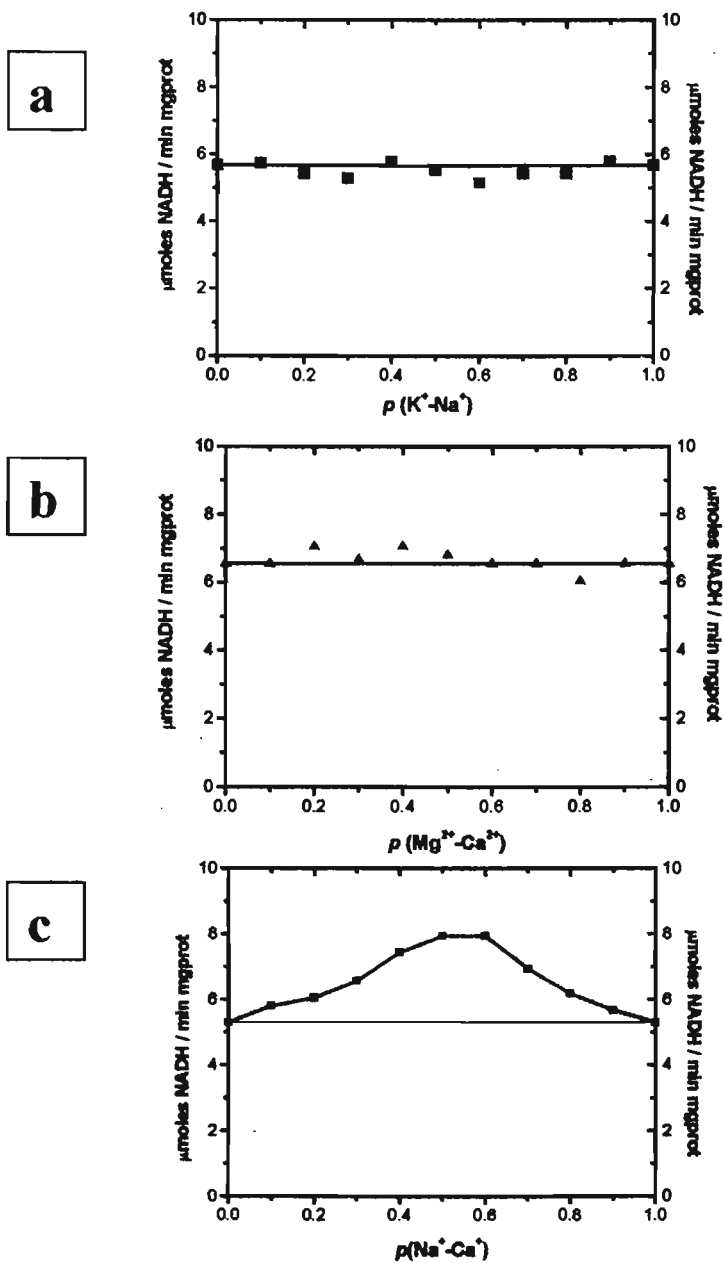


Fig. 15. Gráficos de competencia. La actividad de la enzima se midió como NADH:Q₀ oxidoreductasa. La concentración de enzima fue de 0.77 $\mu\text{g/mL}$ en amortiguador 20 mM MOPS-KOH, pH 7.0, la concentración tanto de NADH como de Q₀ fue de 50 μM .

8. DISCUSIÓN

8.1 EFECTO DE LAS QUINONAS

La forma en que las NADH deshidrogenasas del tipo II interactúan con su sustrato, las quinonas, (moléculas altamente hidrofóbicas), continúa sin ser muy claro. Fisher y Rich propusieron la existencia de al menos dos tipos de sitios de unión para quinona (Fisher y Rich, 2000). El sitio de tipo I se caracteriza por contener un residuo central de histidina, flanqueado hacia abajo por un residuo alifático, generalmente un residuo conservado de leucina, y hacia arriba por un residuo de treonina (tipo IA), leucina (tipo IB) o serina (tipo IC). El sitio del tipo II tiene conservado un residuo de tirosina y uno de alanina en el centro, flanqueados hacia arriba por otro de leucina y hacia abajo por uno de isoleucina y uno de prolina. La mayoría de los sitios de unión predichos están localizados entre las dos regiones de unión a dinucleótidos, aunque su posición relativa no está estrictamente conservada. Al analizar la secuencia de aminoácidos de la NADH deshidrogenasa interna de *S. cerevisiae* se observó que ninguno de estos motivos para unión a quinona está presente. Aparte de los dominios de unión a nucleótidos, segmentos que contienen tres residuos de glicina separados de la forma GXGXXG; el residuo 337 es un triptofano que, como se puede observar en la figura 16, se conserva en las secuencias de diferentes deshidrogenasas alternas. De-Vries, (1992) sugirió, por analogía con el centro de reacción de la deshidrogenasa de bacterias, que este residuo podría jugar un papel importante en la unión de la quinona, ejerciendo una atracción hacia el anillo de la quinona; sin embargo, Schmid y Gerloff, (2004), mediante un modelado de la NDH-2 de *E. coli*, sugieren que este residuo conservado de triptofano (Trp 271 en *E. coli*) interactúa con el NADH.

Neurospora -----MDLFWLWIPASSINAS 17
 Trypanosoma -----
 Yarrowia MLRPLTRAGALSSLTRPAAVTRAFRSLHCSRPAHQHTPLSRGKFKLKFSLATFGAIGLGATALVVSFLVYDISSYKEID 80
 Sacch. NDE1 -----MIRQSLMKTWVANSRRFSLQSKSGLVVKYAKNRSFHAARNLLEDKKVILQKVAPTIGVVAKQSFFKRTG 68
 Sacch. NDE2 -----MLPRLGFARTARSIRRFKMTQIS-----KPTFHSTEVG--KPGPQOKLSKSYTAVFKKNFVR--- 55
 Sacch. NDI -----MLSKNLYS-----NKRLLTSTN-----TIWRFASRSTGVEN----- 32
 Plasmodium -----YTNTLFLYRQTMILSVK 18

 Neurospora RLKSDQGFHYTLREDLFL-FPPGVHVFVSTTGLDGEKFTHHKDKRERVVILS W A Y S F A K D L D P E K Y E R I F I S P R S Y F V 96
 Trypanosoma -----MICRTSFL-RKP-----KVVVV T W A C Y F V R D T K P Q L A E L H V L S T R N H V 46
 Yarrowia DCGDIDVHALALSFRGG-PKNLPIEDSWLDDTDPEKAESSKPRLVVLS W S V A L L N A L K P G D Y N V T L I S P S N Y E L 159
 Sacch. NDE1 KFTLKALLYSALAGTAYVSYSLYREANPSTQVPSDFTFPNGSKRRTLVILS W S V S L L K N L D T T L Y N V V V S P R N Y E L 148
 Sacch. NDE2 --GLKLTFFYTTLAGTLYVSYELYKESNPPKQVPSQSTAFANGLKKKELVIL T W A I S I L L K K L D T S L Y N V T V V S P R S F F L 133
 Sacch. NDI -----SGAGPTSFKTKMVIDP-----QHSDKPNVILS W A I S F L K H I D T K K Y N V S I I S P R S Y F L 89
 Plasmodium NSKIKGIYRSVSNFCNLNKIKVNYINK-----KREKVVILS W G I H F L L N I D F Q K Y D V T L I S P R N Y F T 84

 Neurospora FTPLLASTAVGTLEFRTVLEPIRRLDYGIG-----FHQGWAQDIDFANKTIRVEANANADSASKAVVPIGQGGQLNQASA 171
 Trypanosoma LTPLLPQTTTGTLEFRSICPIITRIQPALAHLNRFSRFCVYDINFQKRVDCISVDNTSVGPHALVNT----- 115
 Yarrowia FTPLMLPSATVGTLELRSITIPVRRICAAAAAH---FVNASANNIDFKERLIECSQRDPVTGDTVN----- 221
 Sacch. NDE1 FTPLLPSTFPVGTIELKSIIVPVRTIARRSHGE-VHYEAEAYDVPENKTIKVKSAKNNDYDL----- 211
 Sacch. NDE2 FTPLLPSTFPVGTIEMKSIIVPVRSIARRTPGE-VHYIEAEALDVPKAKKVMVQSVSEDEYFVS----- 196
 Sacch. NDI FTPLLPSPAVGTVDEKSIIPIVNFALKKKN-VTYEAEATSINFDNRNTVTIKSLSAVSOLYQENHLGL-----H 160
 Plasmodium FTPLLPCLCSGTLNVDACSINIEITLLKKNKIS-GKYLKLECTDIVYKDKYIKCKDNVNNNEIKIN----- 148

 Neurospora RGALEFVVPYDKLVIACGAYSQTFGIEGVREHANFLRDVGDARRIRLRVLSLFLCAYDKGV----- 232
 Trypanosoma ----FDVQYDKLVLAHGAQPNTFNVGAVRACFLREVNEARTIRKRLVONIMTANLP----- 169
 Yarrowia ----FYVVPYDKVVVGCTTINTHGKVG-LOYCHFLLKTVDDSKSIRNQLVANLEKAALP----- 274
 Sacch. NDE1 ----DLKYDYLVVGVGAQPNTFQTPGVYEYSSFLKEISDAQERLKLIMSSIEKAASLS----- 265
 Sacch. NDE2 ----SLSYDYLVVSVGAKTTTTNIPGVYGNANFLKEIEDAQNIRFMKMKTIEQASSFP----- 250
 Sacch. NDI QAEPAEIKYDYLI SAVGAEPNTFQIPGVTDYGHFLKEIPNSLEIRRTAANLEKANLLP----- 219
 Plasmodium ----YDYLVISVGAKTNSFNIKGVDKYAFYIKDIIIDALKIRTKFISNLEACIKGKAGAVTNTITNDSSSSISDSS 220

 Neurospora -----DNLTDEDRANLLHFAIVGPTIIEYASELHDLIHDLSKMYPDLLK-FVRITVYDVSPKVLPMFD 297
 Trypanosoma -----VTSVEEKRLHLHTVVVGPTIIEFSADLAEFLRDVKNINPELVQ-FCKVTVLEAG-EVSTFD 232
 Yarrowia -----STSIDERKRLLSFVVC GPTIIEVMAAEVYDLMNEFLAKHYPKALRNLSVHVHVIQSRSAIINTFD 339
 Sacch. NDE1 -----PKDPERARLLSFVVVGPTIIEFAAELRDYVDQLRKWMPELSK-EIKVTLVEALPNIINMFD 328
 Sacch. NDE2 -----VNDPERKRLHTFVVVGPTIIEFAAELQDYINQLRKWMPDLSK-EMKVILIEALPNIINMFD 313
 Sacch. NDI -----KGDPERRRLSIVVVVGPTIIEAAGELQDYVHQLRKFLPALAE-EVQIHIVEALPIVLNMF 282
 Plasmodium SSIIGDSSSSIGDSSSSISDDLAKKMLHIVVVGPTIIEVAEAEADLVNLIKKNKYKEIYK-YISISIEGGNNLLPTFT 299

Fig. 16. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las NADH deshidrogenasas alternas de *Neurospora crassa*, *Trypanosoma brucei*, *Yarrowia lypolitica*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Plasmodium yoelli yoelli*.

| | | |
|-------------|---|-----|
| Neurospora | QALSKYAMDAFK-RQKIEIRTOHNIERVRPADGKLGSEYGEKLLKIKQYGDKEVAGLVVSTGLMANPLIKQLASKD-- | 374 |
| Trypanosoma | LRVREWGKRRLD-ALGVRI VKGNVAVQ-----EKEVITKSGEVFSTGLVVTSTGVGSPSLTKELK----- | 292 |
| Yarrowia | HSVSEYAMERFK-HDNIDLLINSRVVEVKEDRVLFSDAD---PKDPSKKI I KEVPFGLCLSTGVVDQSPLTKSIVKDIGA | 415 |
| Sacch. NDE1 | KYLVDYAQDLFK-EEKIDLRLLKTMVKKVDATTITAKT-----GGGD----IENIPYGVLVATGNAPREVSKNLMTKLE- | 397 |
| Sacch. NDE2 | KTLIKYAEDLFA-RDEIDLQVNTAVKVVPEPTYIRTLQ-----NGQT----NTDIEYGMLVATGNEPIDFSKTLMSRIP- | 382 |
| Sacch. NDI | KKLSSYAQSNLE-NTSIKVHLRTAVAKVEEKQILLAKT-----KHEDGKI TRETIPYGTLLIATGNKARPVI TDLFKKIP- | 355 |
| Plasmodium | QNI SKFTEKIFKNKLNINVTNYHVIEIDENNFYIKS-----SINKNEEHKKIPYGIIDASGLAQTPLINNFIKKIP | 373 |
| Neurospora | -----FAVPI SPEDRAEARRPKAKLATDARTGGI LVDEHFKVRIE | 414 |
| Trypanosoma | -----VDRTQGRISVDEHLQVLRD | 312 |
| Yarrowia | FNQTNRAIETDPQLRILGTPGQAYAIGDCSTVRTHVLDTALDILKSHVLASRPFSANTQETFEALEKRVHEIKLTVGE | 495 |
| Sacch. NDE1 | -----EQDS-RRGLLIDNKLQLLGA | 416 |
| Sacch. NDE2 | -----EQIN-RRGLLINDKLELLGS | 401 |
| Sacch. NDI | -----EQNSSKRGLAVNDFLQVKGS | 375 |
| Plasmodium | QENNKWLKVN-----QYLQIIGIKFNNIYAIGDCCKQISPINSHHVNEIINCLGN | 423 |
| Neurospora | TQTTDAKGGSEIVPTSSSNSLLRDVFLGDAAVI-----ESQRTLPKTAQVAQAQATYLAKVLNKAN-- | 476 |
| Trypanosoma | GVP-----IPDVYAIGDCATN-----ESN-PLPTLAAVASRQGVYLAKKINAEL-- | 355 |
| Yarrowia | VKRLTAVLQKTLFDSSEHFVRIDELFOEYDADHSGLTYSYELTKMLKDVQKITSLEPATAQRANQGGVYLKGLRKIASI | 575 |
| Sacch. NDE1 | KGS-----IFAIGDCTFHFG-----LEPTAQVAHQEAGEYLAQYFKKAYKI | 456 |
| Sacch. NDE2 | ENS-----IYAIGDCTAHTG-----EPTAQVAHQEAGEYLAKILDKKLQI | 441 |
| Sacch. NDI | -NN-----IFAIGDN-AFAG-----LEPTAQVAHQEAAYLAKNFDKMAQI | 413 |
| Plasmodium | SKITSDVLKQKSKELSNIFPQLSDTRWDYNNKKNKSEMSIKELQEYLFMDKNYKSPPTAQNAKQEAAYLSNIFNNYLY- | 502 |
| Neurospora | -----EGVIDVKDAPGFKFRNWGMVTLGSKWKAHQG---PRDELRG-WAAWVLRSAAYLAKS | 530 |
| Trypanosoma | -----AGKP---FAAPFKYESLGSMSVSLGTSSAVVELN-GPRKLDFVG-LKALFFRSAYLSIV | 409 |
| Yarrowia | GAAAYDTP-----VPYGDIDAAYYKPFKYKHLGNLXAYLGNAAVDFG---KHGTFGGLLGMYIERSAYFSQC | 640 |
| Sacch. NDE1 | DQLNWKMTAKODSEVARLKNQIVKTSQIIEDEKYNHKGALAYIGSDKAIADLAVGEAKYRLAG-SFTFLFKSAYLAMC | 535 |
| Sacch. NDE2 | EQLWDMNLNSTDETEVSRLOKEVNLRSKLDKFNKHMALAYIGSETAIADLHMGDSSYQLKG-MFAFLFKSAYLAMC | 520 |
| Sacch. NDI | PNFQKNLSSRKD-----KIDLLFEENNFKPFKYNDLGALAYLGSERAIATIRSGKRTFFYGGGLMTFFIARRILYLSMI | 486 |
| Plasmodium | -----NSNSNGNTIPFFIEKWKGS LAYVGNHQVVAHLP----FYEIKGGPFSFTFVKIVYMQML | 557 |
| Neurospora | MSWRNRLVPIYWLVSUVFGRGIRSF----- | 56 |
| Trypanosoma | GSWNRRLYVIVNWLGSAIFGRDLTLINDYNDERTWLSLASEGAAREKVSRRMKVKCIDGDSNGNETTARSKVDLPATKQ | 489 |
| Yarrowia | VSEFTRALMFQDWLKRGLFGRDFIAP----- | 66 |
| Sacch. NDE1 | LSFRNRVLVAMDWAKVYFLGRDSSI----- | 50 |
| Sacch. NDE2 | LSIRNRILIAMDWIKVYFLGRDSSV----- | 55 |
| Sacch. NDI | LSARSRLKVFFDWIKLAFTKRDFEFGKL----- | 53 |
| Plasmodium | LTKSRINFIFSELRTKIYGRFFI----- | 51 |

Fig. 16. Continuación.

La NADH deshidrogenasa interna de las mitocondrias de *S. cerevisiae* cataliza la oxidación del NADH de la matriz mitocondrial, transfiriendo los electrones a la Q_6 , quinona que es su sustrato natural. In vitro, diferentes quinonas pueden actuar como aceptores de electrones, incluso el 2,6-diclorofenol-indofenol, un aceptor artificial de electrones inespecífico. Sin embargo, el mecanismo a través del cual se da la oxidorreducción no está bien establecido, hecho que es general para las NADH deshidrogenasas del tipo II.

Son pocos los reportes del mecanismo cinético en este tipo de deshidrogenasas. Los datos que se encuentran disponibles son para la NDH-2 de *T. brucei* (Melo *et al*, 2004), la NDI1 de *S. cerevisiae* (Velázquez y Pardo, 2001) y recientemente para la NDH-2 de *Yarrowia lipolytica* (Eschemann *et al*, 2004). Para todas ellas se ha propuesto un mecanismo de tipo ping-pong. En la determinación del mecanismo cinético de la NDI1 de *S. cerevisiae* se empleó 2,6-DCPIP, el cual no es un sustrato natural; por ello en este trabajo se decidió utilizar dos quinonas, una de baja hidrofobicidad, la Q_0 , y otra con alta hidrofobicidad, la decilbenzoquinona (DBQ). Aunque la DBQ no contiene colas isoprenoides, la cola hidrocarbonada que tiene le confiere propiedades hidrofóbicas que permiten su uso como análogo de la quinona natural, la Q_6 . Con ambas quinonas, los resultados sugieren un mecanismo cinético de tipo secuencial (figs. 1 y 3). Puesto que los patrones de velocidad inicial con las quinonas como sustrato no concordaban con los que se reportaron utilizando al DCPIP como aceptor de electrones, se repitieron los experimentos con el DCPIP. Efectivamente, se comprobó que con este reactivo, el mecanismo cinético es de tipo ping-pong (fig. 6).

Esta diferencia en el mecanismo cinético empleando quinonas ó DCPIP, -aún cuando la Q_0 es bastante hidrofílica-, podría deberse a que las quinonas se unieran a un sitio diferente al del DCPIP. Para dilucidar si las quinonas y el DCPIP competían por el mismo sitio de unión, se realizó una cinética de

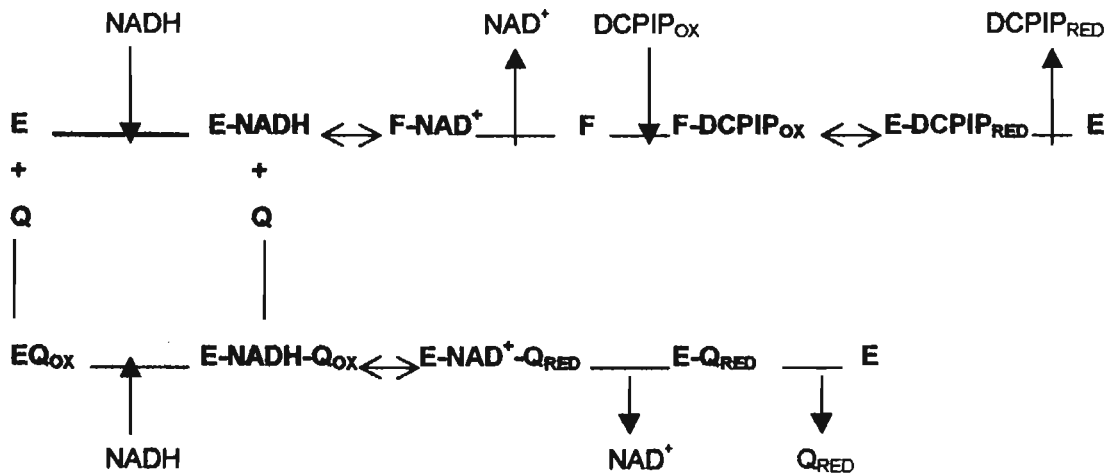
inhibición por un sustrato alternativo, en donde el DCPIP se tomó como sustrato variable y la Q_0 como sustrato alternativo. La figura 7 muestra claramente que la V_{max} no se afectó, mientras que el valor de las K_m aparentes incrementó, tal como está descrito en la ecuación para una inhibición competitiva: $v / V_{max} = [S] / (K_m (1 + (I/K_i) + [S]))$, demostrando que ambos sustratos compiten por el mismo sitio.

Un factor que podría afectar el comportamiento de la enzima es el grado de hidrofobicidad de los sustratos, y por lo tanto la afinidad por los mismos. Sin embargo, los valores de K_m no apoyan esta hipótesis, ya que para el DCPIP y la Q_0 , moléculas hidrofílicas, los valores de K_m son de $6.2 \mu M$ y $3.85 \mu M$ respectivamente, que no difieren mucho entre sí, mientras que para la DBQ, molécula que por su grupo decilo incrementa su hidrofobicidad, el valor de K_m fue de $16.6 \mu M$, que representa un incremento de sólo 4 veces con respecto al valor de K_m para Q_0 . Si el grado de hidrofobicidad jugara un papel determinante para definir el mecanismo de reacción, con las dos moléculas menos hidrofóbicas se hubiera obtenido el mismo mecanismo, y un mecanismo diferente con la más hidrófoba. Sin embargo, los resultados muestran que con las quinonas se obtiene el mismo mecanismo cinético, sin importar su grado de hidrofobicidad, mientras que con el DCPIP resultó un mecanismo diferente, sugiriendo que los diferentes sustratos interactúan con la enzima de formas diferentes. Este hecho también se pudo observar con los resultados de inhibición con AMP, en los que las constantes de inhibición para el NADH ($K_i = 6.7 \text{ mM}$) y la quinona Q_0 , ($K_i = 12 \text{ mM}$) resultan muy parecidas a las que se reportan utilizando DCPIP como segundo sustrato ($K_{i(NADH)} = 5.5 \text{ mM}$ y $K_{i(DCPIP)} = 11.5 \text{ mM}$). Sin embargo, los patrones de inhibición son distintos, ya que para el NADH y el DCPIP como sustratos, se confirma un mecanismo de tipo ping-pong: el AMP es un inhibidor competitivo para el NADH y acompetitivo para el DCPIP. En contraste, empleando el NADH y la Q_0 como sustratos, el AMP fue un inhibidor no competitivo para ambos, resultado no esperado debido a que, por ser un análogo del NADH, se esperaba que el AMP presentara una

inhibición de tipo competitiva con respecto al NADH y no competitiva con respecto a la Q_0 . Cabe mencionar que con respecto al NADH el punto de intersección de las líneas en los dobles recíprocos está muy cercano al eje $1/v$. Este resultado sugiere que ambos sustratos se pueden unir tanto a la enzima libre como al complejo enzima-sustrato, dando lugar a un complejo ternario.

Se reportaron resultados similares para la NDH-2 de *Y. lipolytica*. En ese trabajo se usaron diferentes concentraciones de DBQ en presencia de diferentes concentraciones de NADH y se realizó un gráfico de Hanes (S/v vs. S) en el que las líneas se intersectan muy cerca del eje S/v , por lo que se concluyó que se trata de un mecanismo de tipo ping-pong. Al ajustar sus datos experimentales a la ecuación de un mecanismo ping-pong se obtuvo una $K_{mNADH} = 16.5 \mu\text{M}$ y una $K_{mDBQ} = 7 \mu\text{M}$ (Eschemann *et al*, 2004). En ese trabajo también se realizaron cinéticas de inhibición con un derivado de la quinolona, la 1-hidroxi-2-dodecil-4 (1H) quinolona (HDQ), análogo de la quinona. Se obtuvieron patrones de inhibición no competitiva para ambos sustratos, en este caso el NADH y la DBQ. Los autores sugieren entonces que el inhibidor interactúa con la enzima libre y con el complejo entre la enzima y el NADH. Este resultado abre la posibilidad de que la quinona (DBQ) pueda unirse tanto a la enzima libre como al complejo enzima-NADH.

Existen también posibles híbridos del mecanismo ping-pong Bi Bi clásico y un mecanismo ordenado o al azar en estado estacionario (Segel, 1993). Mannervik (1973) sugirió un mecanismo híbrido ping-pong-ordenado para la glutatión reductasa. En el caso de la NADH deshidrogenasa interna de *S. cerevisiae* podría suceder algo parecido, de modo que dependiendo de los sustratos y del orden de unión a la enzima, será el mecanismo cinético que siga, como se muestra en el siguiente esquema:



8.2 EFECTO DE CATIONES

Los cationes juegan un papel esencial en aproximadamente la tercera parte de las enzimas; pueden modificar la reactividad del sustrato y controlar de manera efectiva una reacción catalizada por una enzima. Los iones metálicos pueden servir para unir y orientar el sustrato con respecto a los grupos funcionales en el sitio activo y pueden proveer un sitio para la actividad oxidorreductora si el metal tiene varios estados de valencia.

La distribución de la carga en el sitio activo de una enzima está diseñada para estabilizar el estado de transición de la reacción catalizada con respecto al sustrato. En las reacciones catalizadas por enzimas es esencial que los reactivos se acerquen con la orientación espacial correcta; de otra manera, la probabilidad de que la reacción ocurra disminuye y la velocidad de la reacción será muy baja. El ambiente electrostático en el sitio activo es el principal factor que sirve para guiar al sustrato hacia el sitio de unión con la orientación

correcta. Los iones metálicos pueden asistir en este proceso, uniendo grupos de una forma estereoquímicamente rígida, ayudando así al control de la acción de la enzima.

Los iones metálicos suelen estar cargados positivamente, y actúan como electrófilos, buscando compartir pares de electrones con otros átomos, de manera que se pueda formar un enlace covalente coordinado o una interacción carga-carga. Aunque los iones metálicos se pueden comportar como los protones, frecuentemente tienen cargas positivas mayores a uno y tienen un volumen iónico más grande, de manera que pueden acomodar muchos ligandos alrededor de ellos al mismo tiempo (Glusker *et al*, 1999).

Desde el descubrimiento del efecto activador del potasio sobre la piruvato cinasa hace más de 60 años, se han identificado muchas enzimas que son activadas por cationes monovalentes, y la lista sigue creciendo. Entre ellas se encuentran: la trombina, la chaperona Hsc 70, la fructosa 1,6-bifosfatasa, la triptofano sintasa y la metilamina deshidrogenasa. (Prasad *et al*, 2003). Los cationes activan las enzimas esencialmente en dos formas, ya sea mediante la formación de un complejo ternario con la enzima y el sustrato o bien alostéricamente. En el primer caso la presencia del catión es indispensable para la actividad catalítica, mientras que en el segundo, el catión incrementa considerablemente la actividad basal.

Las enzimas que son activadas por cationes monovalentes expresan una actividad catalítica óptima en presencia de K^+ , mientras que para Li^+ y Na^+ la efectividad es menor (Prasad *et al*, 2003).

S. cerevisiae se suele cultivar en medios ricos que contienen una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y sales minerales. En estas condiciones, es capaz de acumular potasio hasta una concentración de 200 a 300 mM y solamente de 5 a 15 mM de sodio (Ramírez y Peña, 2000).

Si bien la NADH deshidrogenasa interna de *S. cerevisiae* resultó ser una enzima que se activa por cationes monovalentes y divalentes; la presencia del catión no es indispensable para la actividad catalítica, ya que aún en ausencia de los cationes la enzima presenta una actividad basal de aproximadamente 4 $\mu\text{moles NADH (min. mg)}^{-1}$. La efectividad del potasio y del sodio fue la misma; en ambos casos se alcanzó una V_{max} aproximada de 11 $\mu\text{moles de NADH (min mg)}^{-1}$ con concentraciones de 200 mM de los cationes y concentraciones fijas de NADH y Q_0 de 50 μM . En el caso del calcio y el magnesio la efectividad es similar, aunque el calcio presenta una $K_{0.5} = 10.0 \text{ mM}$, tres veces mayor a la del magnesio que fue de 2.97 mM. Los valores de las constantes cinéticas α y β obtenidas concuerdan con un modelo cinético de activación no esencial, en el que α debe ser menor que 1 y β mayor que 1. Los valores de estas pueden observarse en la tabla 3.

En cuanto al sitio de unión de los cationes, resultó que los cationes monovalentes se unen a un mismo sitio común por el que compiten. También los cationes divalentes compiten por un mismo sitio común. Sin embargo, el sitio de unión de los cationes monovalentes y el sitio de unión de los cationes divalentes es distinto entre ellos. No existen datos reportados sobre el efecto de los cationes sobre este tipo de enzima, aunque se sabe que los iones metálicos se pueden unir directamente a grupos amino y carbonilo de la cadena principal, pero la unión específica se atribuye a las cadenas laterales de los aminoácidos, en particular los grupos carboxilato de los residuos de aspártico y glutámico, y el átomo de nitrógeno del anillo de histidina. Otras cadenas laterales que unen iones metálicos incluyen el triptofano, la cisteína en su grupo tiol, la metionina, la serina, la treonina, la tirosina en sus grupos hidroxilo, la asparagina y la glutamina. El número óptimo de tales grupos de unión está dado por el ión particular junto con el ambiente apropiado, ya sea hidrofóbico o hidrofílico, en el sitio de unión.

9. CONCLUSIONES

- ✓ El DCPIP y las quinonas compiten por el mismo sitio de unión a la NADH deshidrogenasa interna de *S. cerevisiae*.
- ✓ El mecanismo cinético de la NADH deshidrogenasa interna de *S. cerevisiae* empleando quinonas como sustrato es diferente al que sigue con el 2,6-diclorofenolindofenol, un aceptor artificial de electrones.
- ✓ La enzima puede formar un complejo ternario con el NADH y con la quinona
- ✓ Los cationes monovalentes y divalentes activan la enzima.
- ✓ El mecanismo cinético de activación de cationes monovalentes y divalentes es no esencial.
- ✓ Los cationes monovalentes compiten por un mismo sitio de unión.
- ✓ Los cationes divalentes compiten por un mismo sitio de unión.
- ✓ El sitio de unión de los cationes monovalentes es distinto al sitio de unión de los cationes divalentes.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Affourtit, C., M. S. Albury, P. G. Crichton, and A. L. Moore. 2001. Exploring the molecular nature of alternative oxidase regulation and catalysis. *FEBS Letters* 510:121-126.

Albers, E., C. Larsson, G. Lidén, L. Niklasson, and L. Gustafsson. 1996. Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3187-3195.

Anderlund, M., T. L. Nissen, J. Nielsen, J. Villdsen, J. Rydström, B. Hahn-Hägerdal, and M. C. Kielland-Brandt. 1999. Expression of the *Escherichia coli* *pntA* and *pntB* genes, encoding nicotinamide nucleotide transhydrogenase, in *Saccharomyces cerevisiae* and its effect on product formation during anaerobic glucose fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2333-2340.

Bakkert B. M., K. M. Overkamp, A. J. A. van Maris, P. Kötter, M. A. H. Luttik, J. P. van Dijken, and J. T. Pronk. 2001. Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 25:15-37.

Barquera, B., W. Zhou, J. E. Morgan, and R. B. Gennis. 2002. Riboflavin is a component of the Na⁺ pumping NADH-quinone oxidoreductase from *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:10322-10324.

Bertsova, Y. V., A.V. Bogachev, and V. P. Skulachev. 2001. Noncoupled NADH:ubiquinone oxidoreductase of *Azotobacter vinelandii* is required for diazotrophic growth at high oxygen concentrations. *J. Bacteriol.* 183:6869-6874.

Broach, J. R., J. R. Pringle and E. W. Jones. 1991. The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*. Genome dynamics, protein syntehsis and energetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. 333-338.

Calegario, F. F., R. G. Cosso, M. M. Fagian, F. Vasconcelos, W. F. Jardim, P. Jezek, P. Arruda, and A. E. Vercesi. 2003. Stimulation of potato tuber respiration by cold stress in associated with an increased capacity of both plant uncoupling mitochondrial protein (PUMP) and alternative oxidase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 35:211-220.

Campbell, I. and J. H. Duffus. 1988. *Yeast, a practical approach*. IRL Press Limited, England. pp. 185-187.

Cárdenas, M. L. 2001. The competition plot. A kinetic Method to Assess whether an enzyme that catalyzes multiple reactions does so at a unique site. *Methods* 24:175-180.

Cronwright, G. R., J. M. Rohwer. , and B. A. Prior. 2002. Metabolic Control analysis of glycerol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4448.4456.

Day, D. A., and J. T. Wiskich. 1995. Regulation of alternative oxidase activity in higher plants. *J. Bioenerg. Biomembr.* 27:379-385.

de Vries, S., R. Van Witzenburg, L. A. Grivell, and C. A. M. Marres. 1992. Primary structure and import pathway of the rotenone-insensitive NADH:ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 203:587-592.

de Vries, S., and L. A. Grivell. 1988. Purification and characterization of a rotenone-insensitive NADH:Q6 oxidoreductase from mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. Eur. J. Biochem. 176:377-384.

Eschemann, A., A. Galkin, S. Oettmeier, U. Brandt and S. Kerscher. 2004. HDQ (1-hydroxy-2-dodecyl-4(1H) quinolone), a high affinity inhibitor for mitochondrial alternative NADH dehydrogenase: Evidence for a ping-pong mechanism. J. Biol. Chem. 280:3138-3142.

Fang, J., and D. S. Beattie. 2003. Alternative oxidase present in procyclic *Trypanosoma brucei* may act to lower the mitochondrial production of superoxide. Arch. Biochem. Biophys. 414:294-302.

Fisher, J., and P. R. Rich. 2000. A motif for quinone binding sites in respiratory and photosynthetic systems. J. Mol. Biol. 296:1153-1162.

Glusker, J. P., A. K. Katz and C. W. Bock. 1999. Metal ion in biological systems. Rigaku Journal 16:8-16.

Gomal, A. G., C. J. Bardawill and M. M. David. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J. Biol. Chem. 177:751-766.

Gomes, C. M., T. M. Bandejas, and M. Teixeira. 2001. A new type-II NADH dehydrogenase from the archaeon *Acidianus ambivalens*: characterization and in vitro reconstitution of the respiratory chain. J. Bioenerg. Biomembr. 33:1-8.

González-Meler, M. A., M. Ribas-Carbo, L. Giles, and J. N. Siedow. 1999. The effect of growth and measurement temperature on the activity of the alternative respiratory pathway. Plant Physiol. 120:765-772.

Howitt, C. A., P. K. Udall, and W. F. Vermaas. 1999. Type 2 NADH dehydrogenases in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 are involved in regulation rather than respiration. *J. Bacteriol.* 181:3994-4003.

Joseph-Horne, T., D. W. Hollomon, and P. M. Wood. 2001. Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochim. Biophys. Acta* 1504:179-195.

Kocková-Kratochvílová, A. 1990. Yeast and yeast-like organisms. VCH Publishers, New York. pp. 116-123.

Kerscher, S. J. 2000. Diversity and origin of alternative NADH:ubiquinone oxidoreductases. *Biochim. Biophys. Acta* 1459:274-283.

Kerscher, S. J., A. Eschemann, P.M. Okun, and U. Brandt. 2001. External alternative NADH:ubiquinone oxidoreductase redirected to the internal face of mitochondrial inner membrane rescues complex I deficiency in *Yarrowia lipolytica*. *J. Cell Sci.* 114:3915-3921.

Kerscher, S. J., J. G. Okun, and U. Brandt. 1999. A single external enzyme confers alternative NADH:ubiquinone oxidoreductase activity in *Yarrowia lipolytica*. *J. Cell Sci.* 112:2347-2354.

Larsson, C., I. Pahlman, R. Ansell, M. Rigoulet, L. Adler, and L. Gustafsson. 1998. The importance of the glycerol 3-phosphate shuttle during aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14:347-357.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.

Luttik, M. A. , K. M. Overkamp, P. Kotter, S. de Vries, J. P. van Dijken, and J. T. Pronk. 1998. The *Saccharomyces cerevisiae* NDE1 and NDE2 genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH. *J. Biol. Chem.* 273:24529-24534.

Mannervik, B. 1973. A branching reaction mechanism of glutathione reductase. *Bioch. Biophys. Research Communications.* 53:1151-1158.

Marres, C. A., S. de Vries, and L. A. Grivell. 1991. Isolation and inactivation of the nuclear gene encoding the rotenone-insensitive internal NADH:ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 195:857-862.

Melo, A. M. P., M. Duarte, I. M. Moller. H. Prokixh, P. L. Dolan, L. Pinto, M. A. Nelson, and A. Videira. 2001. The external calcium-dependent NADPH dehydrogenase from *Neurospora crassa* mitochondria. *J. Biol. Chem.* 276:3947-3951.

Melo, A. M. P., T. M. Bandejas, and M. Teixeira. 2004. New insights into type-II NAD(P)H:Quinone oxidoreductases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68:603-616.

Menz, R. I., and D. A. Day. 1996. Purification and characterization of a 43 kDa rotenone-insensitive NADH dehydrogenase from plant mitochondria. *J. Biol. Chem.* 271:23117-23120.

Metzler, D. E. 2003. *Biochemistry. The Chemical reactions of living cells.* Second Edition. Academic Press. USA. pp.1013-1050

Michalecka, A. M., A. S. Svenson, F. I. Johansson, S. C. Agius, U. Johanson, A. Brennicke, S. Binder, and A. G. Rasmusson. 2003. *Arabidopsis* genes encoding mitochondrial type II NAD(P)H dehydrogenases have different evolutionary origin and show distinct responses to light. *Plant Physiol.* 133:642-652.

Nelson, D. L. and M. M. Cox. Lehninger. Principles of biochemistry. Third Edition. Worth Publishers. USA. pp. 659-674.

Prasad, S., K. J. Wright, D. B. Roy, L. A. Bush, A. M. Cantwell and E. Di Cera. 2003. Redesigning the monovalent cation specificity of an enzyme. *PNAS* 100:13785-13790.

Ramírez, J. y A. Peña. 2000. Intercambiadores catión/protón en levaduras. *Rev. Latin. Microbiol.* 42:181-187.

Rasmusson, A. G., A. S. Svensson, V. Knoop, L. Grohmann, and A. Brennicke. 1999. Homologues of yeast and bacterial rotenone-insensitive NADH dehydrogenases in higher eukaryotes: two enzymes are present in potato mitochondria. *Plant J.* 20:79-87.

Rigoulet, M. H. Aguilaniu, N. Avéret, O. Bunoust, N. Camougrand, S. Grandier-Vazeille, C. Larsson, I. Pahlman, S. Manon, and L. Gustafsson. 2004. Organization and regulation of the cytosolic NADH metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biochem.* 256/257:73-81.

Segel, I. H. 1993. Enzyme Kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. Wiley-Interscience, USA. pp.660-662.

Schmid, R. and D. L. Gerloff. 2004. Functional properties of the alternative NADH:ubiquinone oxidoreductase from *E. coli* through comparative 3-D modelling. *FEBS Letters* 578:163-168.

Small, W. C., and L. McAlister:Henn. 1998. Identification of a cytosolically directed NADH dehydrogenase in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 180:4051-4055.

Taiz, L., and E. Zeiger. 2002. *Plant physiology online: The electron transport chain of plant mitochondria contains multiple NAD(P)H dehydrogenases.* Third Edition. Sinauer Associates. pp.1-4.

Umbach, A. L., and J. N. Siedow. 2000. The cyanide-resistant alternative oxidases from the fungi *Pichia stipitis* and *Neurospora crassa* are monomeric and lack regulatory features of the plant enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 378:234-245.

Velazquez, I., and J. P. Pardo. 2001. Kinetic characterization of the rotenone-insensitive internal NADH:ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* 389:7-14.