

00581

1 lej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

EL SITIO I DE LA CADENA OXIDATIVA MITOCONDRIAL
(SEGMENTO NADH - COQ)

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS
(BIOQUIMICA)

QUE PRESENTA EL MEDICO CIRUJANO
ALFONSO CARABEZ TREJO

MEXICO, D.F.

1985

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

RESUMEN

La cadena mitocondrial de transporte de electrones, es un sistema multienzimático que se encuentra formando parte constitutiva de la membrana interna de la mitocondria. Este sistema multienzimático de acuerdo a sus propiedades funcionales por ejemplo: el sitio en que los sustratos entran al sistema para ser oxidados, la sensibilidad a inhibidores "específicos" etc. han sido separados en el laboratorio en diversos complejos, los cuales reciben nombres de acuerdo a la secuencia de aislamiento. Desde el punto de vista de los sitios de síntesis de energía como ATP, el sistema ha sido dividido en sitio I, II y III. En esta tesis se presentan resultados de estudios experimentales utilizando al sitio I de la cadena de transporte de electrones como modelo para conocer los mecanismos por los cuales ese sitio opera en la mitocondria. Para este estudio hemos utilizado moléculas que interactúan con diferentes componentes del complejo I, como son el poliéter macrocíclico dibenzo 18 corona 6 (poliéter 28) y la benzoquinona sesquiterpénica, perezona. Los resultados obtenidos con el poliéter 28 indican que el complejo I de la cadena de transporte de electrones depende para su máxima actividad oxidativa y fosforilante, de la presencia del catión potasio. La perezona fué utilizada como molécula analoga a la coenzima Q, componente integral del complejo I de la cadena oxidativa mitocondrial. Los resultados obtenidos con éste último compuesto indican que la perezona suple eficientemente a la CoQ natural, facilitando los estudios de determinación de potencial redox, y los de cinética de la transferencia de electrones mediado por la CoQ en el complejo I, de la cadena mitocondrial de transporte de electrones. Esta molécula presenta propiedades que por sí mismas la hacen interesante de estudiar no solamente como sustituto de la coenzima Q sino para poder comprender los mecanismos de regulación y función de la poza de CoQ.

ABSTRACT

Mitochondrial Electron Transfer Chain is an energy transducing multienzymatic complex. Part of this complex is embedded in the mitochondrial inner membrane forming a constitutive fraction of the membrane. On the basis of methodology and the type of reagents used during the fractionation process the system have been resolved in several components, the Electron Transfer Chain Complexes I, II, III and IV. From the point of view of the substrates oxidized and the site of ATP formation the Electron Transfer Chain have been divided in three sites: I,II and III. In the present work experimental data and the results obtained utilizing the Complex I of the Electron Transfer Chain (NADH /CoQ Segment), as a model to understand the mechanism of function of the segment are presented. As tools for the experimental work, two molecules are utilized: a synthetic macrocyclic polyeter dibenzo-18-crown-6 (gift of Dr. Pedersen, Elastomer Division, E.I. DuPont de Nemours, Wilmington Delaware U.S.A.) and the natural sesquiterpenic benzoquinone "perezone" isolated from roots of plant of the genus perezia by Dr. Sandoval V and Dr.F. Walls, a gift of Dr. Esther Garcia and Dr. Virgilio Mendoza. With the former molecule the results indicate that for the optimal phosphorylating and oxidative capacity of the site I it is necessary the presence of the cation K as constitutive component. With the late molecule (perezone) results indicate that the metabolic role of Coenzyme Q as electron transfer chain component can be substituted by the perezone molecule, not with the same efficiency but with enough capacity that permits kinetic and oxido-reduction studies of the activities undertaken by the natural coenzyme Q of the Electron Transfer Chain. This molecule (perezone) will allowed us to understand the role of the CoQ pool, in the electron tranfer chain of the mitochondrial inner membrane.

INDICE

INTRODUCCION-----	7 - 18
CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES Y SU RELACION CON LA FOSFORILACION -----	19 - 23
SITIO I DE LA CADENA OXIDATIVA MITOCONDRIAL	
NUCLEOTIDOS DE NICOTINAMIDA, DESHIDROGENACION Y TRANS- HIDROGENACION-----	24 - 34
FLAVOPROTEINAS Y OXIDO - REDUCCION -----	35 - 38
CENTROS HIERRO - AZUFRE DEL SEGMENTO NADH-CoQ -----	39 - 43
COENZIMA Q 6 UBIQUINONA -----	44 - 49
PAPEL DEL K+ -----	50 - 53
INHIBIDORES "ESPECIFICOS" DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES -----	54 - 58
BIBLIOGRAFIA -----	59 - 68

INTRODUCCION

La energía, en los seres vivos, se libera, conserva, transforma y es utilizada en un gran número de reacciones metabólicas interconectadas. El ingenioso trabajo de muchos investigadores, ha dado como resultado la comprensión del metabolismo energético, que por su detalle ha sobrepasado muchas otras ramas de la bioquímica contemporánea. Muchas preguntas permanecen en la obscuridad, por la complejidad estructural y funcional de las mitocondrias, de tal manera que los mecanismos básicos del metabolismo energético celular aún no pueden ser cabalmente comprendidos.

La respiración animal siempre ha sido objeto de interés, desde 1777 cuando Lavoisier (1) reconoció que los alimentos sufren combustión lenta dentro del cuerpo y, de acuerdo con lo que él pensaba, en la sangre. Las observaciones que Lazarus Spallanzani realizó de 1803 a 1807, establecieron que la respiración se llevaba a cabo en los tejidos; sus estudios no fueron conocidos ni utilizados por sus contemporáneos y fue hasta 1884, cuando McMunn (2) descubrió que las células contenían pigmentos respiratorios que él llamó "Miohematina e Histoematina", que se podían reducir y que en ese estado presentan espectros de absorción de luz característicos. Sus hallazgos se consideraron un "error experimental" principalmente por Hoppe-Seyler ("uno de los bioquímicos más influyentes de la época"), ya que suponía que los pigmentos respiratorios de McMunn eran producto de descomposición de la hemoglobina.

Los estudios espectroscópicos de Keilin (3) en 1925, demostraron la existencia de tres diferentes "pigmentos" con bandas

características de absorción de luz, (604, 564 y 550 nm), que llamó Citocromos a, b y c. (Figura 1A y 1B).

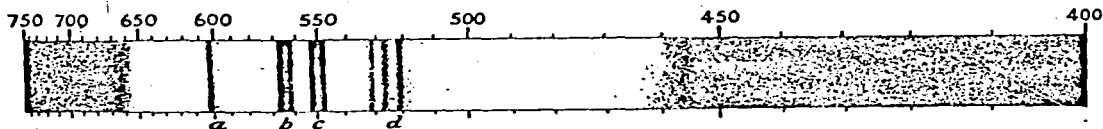


FIGURA 1 A

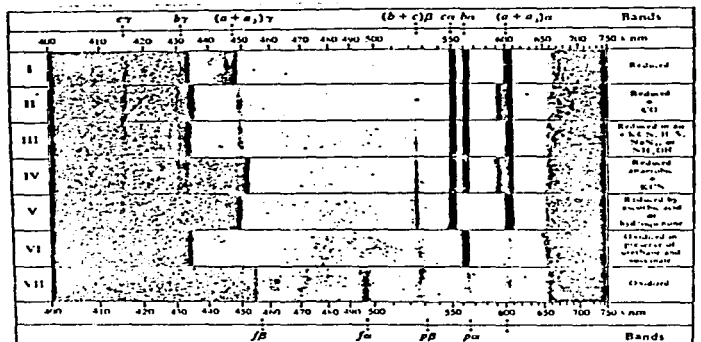


FIGURA 1 B

Como corolario de estos hallazgos, se llegó a la idea de un transporte de electrones, a través de la llamada cadena respiratoria. Este concepto se complementó por el conocimiento de que el proceso, dependía también de la participación de los piridino nucleótidos y las flavinas asociadas a las deshidrogenasas correspondientes.

Fué a principios del presente siglo que los estudios formales de la química de las oxidaciones biológicas, se iniciaron (4).

El conocimiento de que los substratos se oxidan por deshidrogenación se atribuye a Wieland (5), quien de 1912 a 1922 demostró que varios colorantes artificiales, como el azul de metileno, pueden substituir al oxígeno soportando la "respiración" de las células. Los estudios realizados por Harden y Young (4), dieron lugar al aislamiento de los piridino nucleótidos solubles. En 1904 estos mismos autores observaron que al dializar el "Jugo" de levaduras pierde la capacidad para fermentar a la glucosa. A partir de esos estudios concluyeron que el proceso de fermentación depende de una molécula dializable, además demostraron que la fermentación se restablecía al añadir al medio un concentrado del dializado o el mismo "jugo" previamente hervido. Este material dializable y termoestable, llamado por Harden y Young "Cozimasa", resultó ser una mezcla de fósforo inorgánico, difosfato de tiamina y NAD, este último componente no se caracterizó hasta 1935 por von Euler quien demostró que estaba estructuralmente relacionado con el ácido adenílico. Posteriormente, Warburg y Christian (6) describieron su estructura química.

En 1929, a partir de los estudios que se estaban realizando en relación con la presencia de purinas en el músculo esquelético, Fiske y Subbarow aislaron y caracterizaron la molécula del ATP(7).

Posteriormente Lundsgaard (8-10) y Lohman (11-13), demostraron que la hidrólisis del ATP era la fuente de energía para la contracción muscular, y que éste se regeneraba si se dejaba "respirar" al músculo. Simultáneamente se descubrió que la síntesis de ATP acompañaba al proceso llamado glucólisis sin embargo, aún no había sido reconocido que la principal vía para la producción de energía biológica, es la que se realiza en el sistema multienzimá-

tico asociado a la membrana de mitocondrias y de cloroplastos.

Estos organelos contienen enzimas y coenzimas que catalizan la transferencia de electrones y/o hidrógenos, de un donador a un aceptor. La energía generada durante el proceso de oxidación, se transforma y se captura en forma de ATP, el donador más versátil de energía en las células vivas.

Los estudios de Warburg con carbón obtenido de diversas fuentes, lo llevaron a proponer que el hierro encontrado en algunas preparaciones activas, y ausente en preparaciones inactivas (obtenidas por ejemplo de cañas), actuaba como catalizador de algunas oxidaciones. Tratando de identificar de que material se trataba, encontró en el material aislado de tejidos, una sustancia que contiene hierro a la cual dió el nombre de "ATMUNGSFERMENT" lo que significa enzima respiratoria. De acuerdo a sus observaciones emitió su teoría de la "activación del oxígeno", para tratar de explicar por primera vez, las oxidaciones biológicas.

Actualmente se sabe que el hierro "activador" de las oxidaciones biológicas corresponden a los citocromos y que la enzima respiratoria de Warburg coincide en sus propiedades con la citocromo oxidasa.

Los resultados de la época no podían explicarse totalmente con la teoría de Warburg de la activación del oxígeno, Wieland propuso una teoría complementaria que llamó de la "activación del Hidrógeno", de acuerdo con la cual, ciertos átomos de hidrógeno de los metabolitos son activados por la acción de una enzima. El hidrógeno activado sería removido por un "aceptor" de hidrógenos, del tipo del oxígeno o cualquier otro agente oxidante. La teoría de

Wieland encontró apoyo, principalmente en el trabajo de Thunberg, quien junto con otros investigadores de la época encontró que las deshidrogenasas específicas, efectivamente hacían "lábil" ciertos hidrógenos, los cuales a su vez podían ser removidos por las moléculasceptoras de hidrógenos, como el azul de metileno y otros colorantes y, en unos cuantos casos directamente por el oxígeno.

La observación de que la mayoría de los substratos oxidables, aún cuando son activados por las enzimas correspondientes, no pueden ser oxidados directamente por el oxígeno molecular, llevó a A. Szent-Gyorgi (14), a postular que ambas situaciones son verdaderas y que se requiere su acción conjunta y complementaria, para que se realicen las oxidaciones biológicas.

El progreso en el estudio de las oxidaciones biológicas, hizo claro que, ni la teoría de la activación del oxígeno, ni la teoría de la activación del hidrógeno servían en conjunto, para explicar en su totalidad los procesos involucrados en las oxidaciones biológicas. Fué necesario proponer la existencia de "intermedarios" o acarreadores de óxido-reducción. La existencia de moléculas con esas características se demostró en 1921 por F.G. Hopkins (15) quien aisló el compuesto glutatión a partir de diferentes tejidos, y demostró que ésta substancia, puede existir con su azufre reducido como sulfidrilo ($G-SH$) o con el azufre en estado oxidado como disulfuro ($G-S-S-G$). Además demostró que la forma reducida es rápida y fácilmente oxidada por el oxígeno, y que el compuesto disulfuro oxidado es reducido en los tejidos.

Los metabolitos activados, que son oxidados en la mitocondria, a través de la cadena oxidativa, para producir la mayor parte de

la energía utilizable para propósitos biológicos, son relativamente pocos así como de muy diversa naturaleza y origen.

Krebs encontró que la adición de cantidades catalíticas de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, a homogenizados de pechuga de pichón, estimulaba el consumo de oxígeno. Al realizar éstos experimentos en anaerobiosis incubando con piruvato y oxaloacetato demostró que se acumulaba citrato. Utilizando malonato encontró que los metabolitos que se acumulaban eran succinato, cetoglutarato y citrato, lo que le permitió no solamente proponer la existencia de esa vía metabólica como un ciclo sino además, que las oxidaciones biológicas se encuentran ligadas a esa vía metabólica.

La primera observación que correlacionó la oxidación del piruvato y la esterificación de fosfato a los monofosfato de hexosa, se realizó en 1940 por S. Ochoa (16) en homogenizados de cerebro, basándose en los estudios realizados por H. Kalkar (17) con homogenizados de riñon sobre la esterificación de fosfato a la glucosa, demostró que el proceso de fosforilación está ligado a la oxidación de succinato, describiendo en esta forma la naturaleza de la fosforilación oxidativa en el cerebro.

Un avance importante en el estudio de las oxidaciones biológicas, se logró por la introducción de las técnicas de fraccionamiento celular, por medio de homogenización y centrifugación diferencial, ya que con esta metodología se corroboraron muchos de los resultados obtenidos en estudios realizados con rebanadas de tejido, permitiendo lo que con el sistema de rebanadas no se puede lograr, que es separar y definir, claramente a quien de los compo-

nentes celulares corresponden que funciones.

En 1945 Lardy y Cols. (18), describieron una serie de sustancias, que tienen la propiedad que cuando se añaden a concentraciones adecuadas, a homogenados tisulares aumentan la velocidad de las reacciones exergónicas, mientras que disminuyen las funciones de síntesis de ATP. En su trabajo mencionan la publicación pionera de Hotchkiss(19), quien en 1943 encontró que el 2,4-dinitrofenol (DNP), molécula que evita o bloquea la captación de fosfato por la levadura de panadería, cuando el substrato en el medio es glucosa. Sin embargo otros autores, sugieren que este hallazgo experimental corresponde a Clifton (20).

Loomis y Lipman (21), describieron que el DNP puede remplazar al fosfato, ya que en una preparación obtenida al centrifugar un homogenado de riñón de conejo a través de un buffer de bicarbonato de sodio y cloruro de potasio, complementado con un sistema regenerador de ADP (hexoquinasa), encontraron que el DNP a concentraciones de 1.8×10^{-4} M, no afectaba la velocidad de consumo de oxígeno (8.0 y 7.9 uátomos de O_2 , del control y del experimental respectivamente) pero que sí disminuye, la captación de fosfato (17.5 a 1.3 umolas el control y el tratado respectivamente).

En 1949 Kennedy y Lehninger (22), demostraron que, en general, los sistemas enzimáticos de los tejidos animales, responsables de la oxidación de los metabolitos, se asociaban a una fracción, particulada de la célula. Predicción hecha con anterioridad por D. Green en sus estudios relacionados con la localización de los componentes, y el metabolismo de los intermediarios del ciclo de Krebs en la mitocondria (23). Kennedy y Lehninger realizaron sus estudios pioneros sobre la localización del metabolismo de los

lípidos, en homogenados de hígado en KCl y bicarbonato de sodio, preparados en el aparato descrito por Potter y Elvehjem (24). La fracción particulada obtenida por Kennedy y Lehninger, se asoció con los "gránulos grandes" y las estructuras filamentosas (mitocondrias) descritas por Benseley desde 1934 (25), las que posteriormente fueron identificadas por Claude (26) así como por Hogeboom y Schneider (27,28).

Hogeboom, Claude y Hotchkiss (29), (parte del "grupo Rockefeller") realizaron análisis cuantitativos que demostraron que las actividades de la "oxidasa" succínica y la citocromo oxidasa estaban asociadas a la mitocondria.

Con la certidumbre de que la mayor parte de las oxidaciones biológicas se encuentran asociadas a las mitocondrias, Kennedy y Lehninger, realizaron sus clásicos estudios sobre la oxidación de los ácidos grasos a acetato, y su conexión con los diversos intermediarios del ciclo de Krebs, llegando a demostrar claramente, que este proceso metabólico de oxidación se realizaba en el material particulado y separado por centrifugación a partir de homogenados de hígado de rata, identificado plenamente como mitocondrias (30). Las observaciones de Kennedy y Lehninger fueron objetadas por Potter (31) quien basándose en la determinación del "cociente de citolisis" sugería que el proceso metabólico de la oxidación de los ácidos grasos, solamente puede realizarse en células intactas. Sin embargo Kennedy y Lehninger (32), refutaron esos argumentos cuando aplicando el método de Hogeboom, Schneider y Palade para aislar la fracción mitocondrial purificada, demostraron que obtenían los mismos resultados que objetara Potter.

Un avance importante en el estudio de la cadena oxidativa mitocondrial, fué la introducción de las técnicas espectrofotométricas por B. Chance (33), las que permitieron proponer la secuencia de los componentes coloridos en la cadena oxidativa mitocondrial.

En el estado actual del conocimiento sobre estas reacciones, es claro, que tanto en las mitocondrias como en los cloroplastos, el principal donador de hidrógenos para la cadena de transporte de electrones es el agua. El aceptor final de las mitocondrias y de los cloroplastos es diferente, ya que para las mitocondrias es el oxígeno y en los cloroplastos es el NADP.

Al papel del agua como donador de hidrógenos para la cadena oxidativa mitocondrial se le ha dado poca importancia. Sin embargo, si se considera que las transformaciones metabólicas que ocurren, para la oxidación del piruvato a CO₂ y agua a través del ciclo de Krebs, el agua se incorpora a diferentes intermediarios en tres pasos:

- A) hidratación del fumarato a malato,
- B) condensación de la acetil CoA y oxaloacetato,
- C) hidrólisis de la Succinil CoA.

de ésta manera los hidrógenos del agua, incorporados en las reacciones intermedias, son canalizados a la cadena oxidativa mitocondrial.

Slater (34) ha señalado que el término "cadena de transporte de electrones" mitocondrial, prejuzga la importancia de los electrones, por lo que propuso el empleo del nombre de cadena respiratoria ó mejor, el de cadena oxidativa. Este último término también se aplica al sistema multienzimático de cloroplastos.

En la cadena de transporte de electrones mitocondrial, para que la energía se "fije" en el ATP, deben ocurrir una serie de reacciones, las cuales pueden estar directa ó indirectamente relacionadas con la síntesis del ATP.

Hasta el presente se ha establecido que el fosfato inorgánico, no es necesario para las reacciones primarias de conservación de la energía (35), es decir las reacciones de óxido-reducción por transferencia de electrones y que se traducen en la generación de un potencial transmembranal, una carga de superficie de membrana y una diferencia de concentración de protones transmembranal, las cuales pueden determinarse en preparaciones acopladas de fracciones submitocondriales (36,37).

Se ha observado que un aumento en las reacciones que utilizan energía, cualquiera que sea el proceso: biosintético, transporte activo de solutos, contracción muscular, etc., se traduce en un aumento del consumo de oxígeno. A veces el cambio puede ser dramático, por ejemplo durante el vuelo de la mosca, el incremento puede ser hasta de 60 veces (38), por lo que el consumo de oxígeno se considera un reflejo de la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial. A su vez la señal para este aumento en condiciones acopladas, es la disminución del potencial de fosforilación de los adenín nucleótidos citoplasmáticos. El potencial de fosforilación puede expresarse por la siguiente ecuación:

$$\text{Pot.fosf. (citoplasm.)} = G \text{ ATP}(c) = G \text{ ATP} + RT \ln \left(\frac{[\text{ATP}]}{[\text{ADP}][\text{Pi}]} \right) \dots 1$$

A pesar de que, como una consecuencia del aumento de las actividades hidrolíticas de ATP llevaría a la demostración de una

disminución del potencial de fosforilación, ésta ha sido elusiva y difícil de demostrar. En el músculo, tejido en donde los cambios en la utilización de energía, son una condición experimental relativamente fácil de lograr, si se ha podido demostrar una disminución en el potencial de fosforilación (39). Sin embargo ésta, no se ha podido inducir en el corazón, cuando a éste órgano se le impone una carga de trabajo, resultado que se explica porque en éste tejido rápidamente se establecen mecanismos compensatorios, que contrarrestan el efecto de una disminución del potencial (40). Recientemente, se ha logrado inducir en corazón perfundido, una disminución del potencial de fosfato, cuando en vez de un aumento en la carga de trabajo se le somete a un aumento de presión; a condición de que la concentración de ADP utilizada en la ecuación 1 se calcule a partir de concentraciones medidas de ATP, creatina y fosfocreatina (41,42). Lo que explicaría la concentración de ADP libre en el citoplasma, que se mantiene cercano al equilibrio, como consecuencia de la actividad de la creatina cinasa que se localiza exclusivamente en el citoplasma. Si se acepta que ocurre un cambio de potencial de fosforilación entonces, se puede plantear la pregunta de cómo se correlacionan un aumento en la captación y utilización de oxígeno, con un aumento de la síntesis de ATP. Una manera, es que la función acoplada de la cadena respiratoria, medida como consumo de oxígeno, se refleje en un aumento de la síntesis de ATP lo que B. Chance (43) definió como:

"La capacidad de los tejidos vivos, para acelerar la velocidad respiratoria durante la actividad metabólica, y su regreso al estado basal que se caracteriza por una baja velocidad respirato-

ria, cuando la actividad metabólica llega a la fase de restitución de los compuestos químicos utilizados durante la actividad". El mismo autor definió en términos particulares, el concepto de control respiratorio para la actividad mitocondrial como:

"El cociente del valor obtenido en el consumo de oxígeno cuando se añade ADP (ESTADO 3), y el valor del consumo de oxígeno que se obtiene después de que se ha utilizado el ADP" (ESTADO 4).

CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES Y SU RELACION CON LA FOSFORILACION.

Se demostró que la mayor parte de la energía liberada por la oxidación de substratos, ($G_{Ox/Red}$) se conserva en forma de potencial de fosforilación de ATP ($G_{ATP(c)}$)(ecuación 1), cuando el $G_{Ox/Red}$ está definido por:

$$G_{ox/red} = -nF E_h \quad \dots (2)$$

en donde n es el número de electrones transferidos, F es el Faraday (23062 cal volt $-1/equiv-1$) y E_h es la diferencia observada del potencial de reducción entre el par donador y el aceptor de los electrones.

El potencial observado de reducción, para cada par transportador de electrones es definido por:

$$E' = RT/nF \ln [aceptor]/[donador] \quad \dots (3)$$

en donde E' corresponde al potencial medio de reducción en condiciones estándar para cualquier par de elementos de la cadena. En el estado 4 de la respiración (44) o respiración controlada al completarse la fosforilación del ADP, el G del ATP es aproximadamente el 90 % del $G_{ox/red}$, al tomar en cuenta la transferencia de electrones del substrato al oxígeno (45).

Los componentes de la cadena respiratoria pueden dividirse en tres grupos, cada uno de ellos con diferencias de potencial de óxido-reducción relativamente pequeñas (46). Se supone que los tres sitios de mayor caída del potencial redox corresponden a los

tres sitios de fosforilación, cada uno de ellos designados como Sitio I, II y III respectivamente. El sitio I se localiza entre el NAD /NADH ($E_h = -320$ mV) y la CoQ ox/red ($E_h = -.20$ a 0.10 V), el sitio II entre la CoQ ox/red y el citocromo c ($E_h = 0.254$ V) Fe^{3+}/Fe^{2+} , el sitio III entre citocromo a ($E_h = 0.290$ V) Fe^{3+}/Fe^{2+} y $1/2 O_2$ ($E_h = 0.815$ V a 1 atm.) / H_2O .

La diferencia de potencial en el Sitio III de la cadena oxidativa mitocondrial es mayor de 300 mV (0.530V). Sin embargo se sintetiza un solo ATP como ocurre en el sitio I (0.270 V) o en el sitio II (0.220 V). Una posible explicación para esta observación es que no todo el potencial generado en éste sitio se utilice para la síntesis de ATP (47,48). (FIGURA 2).

Los datos permiten postular la existencia de un estado de alta energía o su equivalente, generado en cada uno de los tres sitios. La mayor liberación de energía en el sitio III, está de acuerdo con la observación experimental de la mayor dificultad para que se realice la reversa del transporte de electrones mediada por la hidrólisis de ATP en el sitio III, a diferencia de lo que ocurre en el sitio I. De este último punto puede concluirse que:

- A) Este sitio se encuentra cercano al equilibrio con el potencial de fosforilación y,
- B) La transferencia de electrones del citocromo a, al oxígeno se realiza mediante un proceso de no equilibrio con el potencial de fosfato, sujeto a otro tipo de control (48), en comparación con los sitios I y II que se encuentran en equilibrio con éste, durante el estado 4 de la respiración.

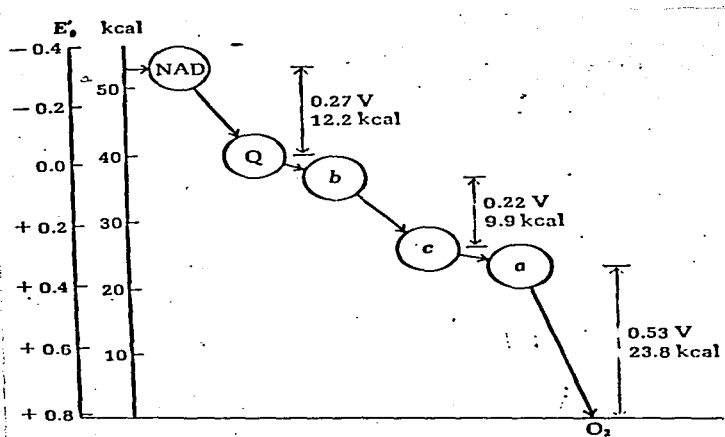


FIGURA 2

La proposición de Wilson de que las reacciones de óxido reducción de los sitios I y II permanecen cercanos al equilibrio con el G_p (cambio de potencial estándar para la síntesis de ATP, en un rango llamado de control dinámico de la fosforilación oxidativa, ha sido sometida a serios cuestionamientos por Lemasters y cols. (49), no por los datos presentados, los cuales por otra parte son casi idénticos a los obtenidos por Lemasters, sino por las diferencias fundamentales en cuanto al tratamiento desde el punto de vista termodinámico de los resultados. Según Lemasters el tratamiento de los datos utilizado por Wilson va en contra de la primera ley de la termodinámica, haciendo evidente que hay un error básico en el análisis del grado de oxidación de los substratos utilizada por Forman y Wilson. El error básico al que se refiere Lemasters es que, según Forman y Wilson, la oxidación de substratos como el hidroxibutirato, por un sistema mitocondrial, rinde más energía que cuando son oxidados por un sistema no mitocondrial. Puntualiza Lemasters que es una regla de la termodinámica que las funciones de estado (H, T y S) son independientes del camino seguido desde un principio hasta un fin. Si consideramos $G = H - TS$, la igualdad señala a G como una función de estado, ya que depende de las funciones de estado H, T y S , por lo tanto también es independiente del camino seguido por la reacción de oxidación del substrato, de donde se concluye que el G ($G = H - T S$) para la oxidación del - hidroxibutirato será igual e independiente de si la oxidación se lleva a cabo en la mitocondria o no.

Para comprobar esta afirmación Lemasters determinó el G de los

sitios I y II bajo dos condiciones experimentales, que consistieron en determinar el CONTROL Respiratorio tanto a bajas ($CR = 2.6$) como a altas ($CR > 5$) concentraciones de fosfato. En el primer caso supuestamente la reacción se encuentra bajo el llamado "control dinámico" aún después de la adición de ADP, ya que la reducción de los citocromos $c+c_1$ debería permanecer prácticamente sin modificarse, experimentalmente sí se observa un cambio en la reducción de los citocromos mencionados. Una explicación posible es considerar que durante los primeros segundos que siguen a la adición de ADP la proporción sustrato-producto (Hidroxi-buti-rato y acetoacetato) no cambia. Haciendo los cálculos del incremento en la reducción de los citocromos, se observa que este cambio genera un cambio en el G_{1+2} (correspondiente al cambio de energía libre de Gibbs del sitio I y II combinados), de 0.2 Kcal/mol, cantidad mucho menor a las 2.2 Kcal/mol calculadas por Wilson.

De lo señalado anteriormente Lemaster concluye que el G_{1+2} se encuentra fuertemente fuera del equilibrio con el G_p durante la transición del estado de "reposo" al estado "activo" de la fosforilación oxidativa.

**SITIO I DE LA CADENA OXIDATIVA MITOCONDRIAL
(SEGMENTO NADH - CoQ)**

A.

NUCLEOTIDOS DE NICOTINAMIDA
DESHIDROGENACION Y TRANSHIDROGENACION.

Los nucleótidos de nicotinamida, fueron las primeras coenzimas identificadas (4) y constituyen la principal vía de transferencia de equivalentes reductores hacia la cadena oxidativa mitocondrial.

Schatz y Racker (53), demostraron que el primer sitio de fosforilación oxidativa, se puede determinar tanto en partículas submitocondriales como en la preparación de Keilin-Hartree, con NADH como donador de hidrógeno y Coenzima Q como aceptor. Utilizando diferentes tipos de inhibidores, concluyeron que esa actividad catalizada por la NADH deshidrogenasa mitocondrial, es muy sensible a rotenona.

La NADH Deshidrogenasa mitocondrial se aisló por Edelcoch (51) y Mahler (52). Mahler utilizó para el aislamiento de la enzima un tratamiento con ácido, etanol y temperatura y demostró que la enzima aislada, es una flavoproteína que contiene hierro y azufre, y que presenta las siguientes características (53) de composición (FIGURA 3A), actividad (FIGURA 3 B) y propiedades espectrofotométricas (FIGURA 3 C), que permiten conocerla casi en su totalidad.

La deshidrogenasa de NADH se ha solubilizado a partir de mitocondrias y partículas submitocondriales (SMP o ETP) y complejo I (EC 1.6.5.3) utilizando detergentes como Digitonina (54,55) y lisofosfatidilcolina (56,57), sustancias necesarias ya que se trata de una proteína integral de membrana. También se aísla por la acción de agentes caotrópicos como la urea y el perclorato a concentraciones hasta de 0.5 M (58).

COMPONENTE	CONCENTRACION nmolas (ng-átomos) por mg de prot.
FMN	13.5 - 14.5
Hierro no Hemo	60 - 65
Sulfuro lábil al ácido	58 - 60

FIGURA 3 A

REACCION.	pH	ACT. ESPECIFICA ¹
NADH menadiona	8.0	400-550 ^a
NADH ubiquinona ₁	8.0	250-350 ^a
NADH ferricianuro	7.5	400-450 ^{a, d}
NADH citocromo c	8.0	220-250 ^b
NADH DCIP	8.0	125-150 ^b
NADH AcPyAD	8.0	12-15 ^c
NADPH menadiona	5.0	13 ^e

1 = μ mol NAD(P)H oxidado min^{-1} mg prot a 38°C, a = v_{NADH}
 b = $v_{\text{acceptor}}^{\text{max}}$ c = 3-acetilpiridino adenil nucleótido^{max}
 e = en presencia de 75 mM de guanidina·HCl

FIGURA 3 B

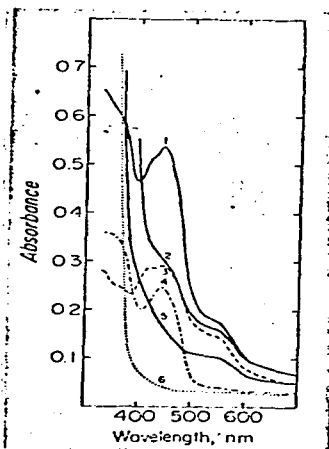


FIGURA 3 C

La deshidrogenasa de NADH aislada de mitocondrias o partículas submitocondriales se divide en dos clases (59), la de alto peso molecular o TIPO I y la de bajo peso molecular o TIPO II. De acuerdo a las características cinéticas de actividad constante de la enzima tipo II se concluye que esta enzima es parte de la enzima tipo I. La heterogeneidad de la deshidrogenasa de NADH se demostró en 1963 por Cremona (60), utilizando un gradiente discontinuo de sacarosa, en el que obtuvo dos fracciones con esa actividad que poseían un volumen específico diferente.

El componente pesado (tipo I) se consideró un polímero o una impureza y esos autores lo descartaron, mientras que el componente ligero (tipo II) fué el que utilizaron para sus estudios.

La demostración de que las preparaciones tipo I y II de la deshidrogenasa del NADH difieren solamente en el grado de dispersión fué aportada por Dooijeward (61) quien además confirmó las observaciones publicadas por Cremona. La evidencia dada por Dooijeward consiste en que una preparación de enzima Tipo I al ser tratada con fosfolipasa, etanol ácido, urea, tiourea o enzimas proteolíticas, cuantitativamente se convierte en la enzima tipo II enriquecida en flavina, cabe hacer notar que los tratamientos utilizados por Dooijeward modifican las características cinéticas y de especificidad de la enzima, como fué demostrado por Singer (62). En estado estacionario o de actividad constante, las dos enzimas pueden describirse en cuanto a sus características cinéticas por un solo mecanismo ordenado de ping-pong operando simultáneamente (63), ya que tanto la constante de asociación del NADH a la enzima oxidada (k_1), la disociación del NADH (k_{-1}) y la

disociación del NAD (k4) son iguales en los dos tipos de preparación. La principal diferencia se encuentra en la constante de velocidad (k2) para el flujo de electrones desde el NADH unido en la enzima hacia el grupo aceptor de electrones en la enzima (seguramente la flavina), que es cuando menos cuatro órdenes de magnitud menor en el tipo II. La k3 (constante de velocidad para la oxidación de la enzima reducida por un aceptor, es dos órdenes (con ferricianuro) o más con ferricitocromo c.

El hecho de que se observe una doble inhibición por sustrato de la enzima tipo I, sugiere la posibilidad de que los dos grupos, donador y aceptor, pueden ser alcanzados por los sustratos a través del mismo puerto (hendidura en la enzima).

Cuando la fracción obtenida de la preparación mitocondrial o del Complejo I, se pasa por una columna de Sephadex G 100, se obtiene como ha demostrado Hatefi, un pico único y simétrico de 75,000d \pm 6% constituido por una flavoproteína, lo que indica un alto grado de purificación del material. La electroforesis de éste material en geles de acrilamida nativa, también dá una sola banda pero cuando ésta electroforesis se hace en presencia de SDS, el material se separa en tres bandas de polipéptido con pesos moleculares aproximados de 51, 24 y + 10 Kd. La enzima aislada es soluble en agua y cataliza la oxidación de NADH a quinonas(63'). Los experimentos de Ragan (64) demuestran que en ese mismo sistema, se obtienen dos péptidos a partir de la enzima soluble (obtenida por tratamiento con agentes caotrópicos), uno de 87 y otro de 5 Kd, lo que coincide con que el contenido de flavina, aislado a partir de la enzima (14 a 14.7 nmolas/mg de proteína) dé una relación molar de 1 a 1 (65).

Comparando la actividad de deshidrogenasa soluble, con la actividad de deshidrogenasa unida a la membrana, la primera tiene menor actividad, por mol de flavina y una K_m mayor para el NADH. Estas modificaciones en los parámetros cinéticos indican que para la actividad óptima de la enzima, se requiere cuando menos uno de los siguientes factores: A) integridad de la membrana, B) un componente que no copurifica con la preparación enzimática ó C) un componente estructural o funcional que se pierde durante el aislamiento o durante la purificación.

La enzima membranal es sensible a cationes de la misma manera que la enzima soluble aislada a partir de una preparación de complejo I. Esta enzima soluble, presenta una menor actividad de deshidrogenasa por mol de flavina y una K_m mayor para el NADH. La adición de guanidina-HCl (hasta 150 mM), a una preparación de enzima solubilizada disminuye la K_m para el NADH y aumenta la V_{max} , llevandolos a valores cercanos a los de la enzima membranal unida al complejo I.

Una explicación posible para el efecto de los cationes, es que en las enzimas dependientes de nucleótidos de nicotinamida o de adenina (66) incluyendo la Transhidrogenasa del NADPH ---- NAD , los residuos de arginina del sitio activo, actúan con carga positiva, como iones guanido, que aparentemente funcionan como sitios de unión o fijación del o los substratos. Estos sitios posiblemente participan en la fijación de los substratos correspondientes, durante la actividad de las enzimas deshidrogenasa y transhidrogenasa (67). Los cationes como la guanidina, actuarían entonces regresando los valores cinéticos de la enzima soluble a los valo-

res conocidos para la enzima membranal, lo que se explicaría si se propone que la deshidrogenasa soluble contiene menos (por ej. pérdida de un polipéptido) grupos arginilo que quedan en una posición menos favorable, para la unión de los substratos, comparando con los grupos arginilo de la enzima nativa de mitocondria, ETP ó de complejo I.

La cadena oxidativa mitocondrial además de oxidar al NADH y al NADPH cataliza la reacción de transhidrogenación de NADH a NADPH y viceversa a través de una enzima, la nucleótido transhidrogenasa (EC 1.6.1.1.). La primera sugerencia de la existencia de ésta enzima transhidrogenasa de los piridino nucleótidos, que cataliza una reacción dependiente de energía, fué dada por Krebs (68), quien encontró que la reacción es sensible al DNP. Esta enzima cataliza la transferencia directa y reversible de hidrógeno entre un dinucleótido de nicotinamida reducido (NADH) y difosfo piridín nucleótido de nicotinamida y adenina oxidado (NADP), de acuerdo a la reacción: $NADH+H + NADP \rightleftharpoons NAD + NADPH$.

La enzima fué descubierta en 1952 por Colowick y cols (69). Un año después los mismos autores describieron la preparación de la enzima transhidrogenasa insoluble, obtenida a partir de tejidos de mamífero y que siempre está asociada a la membrana interna de la mitocondria. La enzima purificada está constituida por un sólo polipéptido con un peso molecular de 97 Kd. Durante su purificación frecuentemente se contamina con las subunidades alfa y beta de la ATPasa, con deshidrogenasa succínica y con deshidrogenasa de NADH. La enzima purificada, es estable hasta por dos meses a 4 C si el medio se complementa con fosfolípidos, si se omite este paso, el 50% de la actividad de la preparación, se pierde en 24

horas.

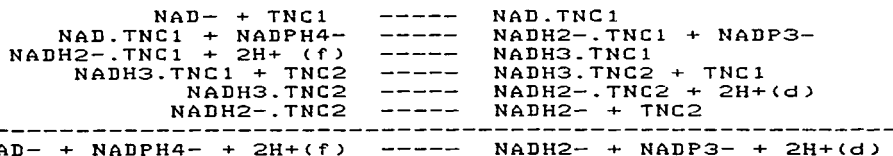
Ernster (70-72) y Kaplan (73) demostraron independientemente, que la reducción de NADP por NADH que se realiza en la mitocondria, es catalizada por una NADPH-transhidrogenasa cuya actividad es dependiente de energía (véase Krebs, (68), con una K_{ap} de equilibrio mayor (500) (74), que la constante de equilibrio para la reacción de transhidrogenación en ausencia de energía, cuya K_{ap} es de 0.79 con un $G_0 = +0.14$ kcal/mol. Se utiliza una unión de alta energía del ATP, por cada molécula de NADP que se reduce obteniendo los mismos resultados con partículas submitocondriales (75).

La reacción de transhidrogenación se realiza por medio de la formación de un complejo ternario ordenado (76), de vida media corta, que se forma a través del mecanismo de Teorell-Chance, proceso durante el cual no se produce recambio con el agua del medio que rodea a la enzima.

Aún cuando la transhidrogenasa de NADH membranaral no se ha purificado completamente, se puede concluir que es diferente a la transhidrogenasa solubilizada obtenida del complejo I, por las siguientes razones:

- 1) La enzima solubilizada puede catalizar la reacción de transhidrogenación NO dependiente de energía.
- 2) Tanto la enzima solubilizada como la unida a membrana son inhibidas por altas concentraciones de NADH+H, NAD y adenín nucleótidos, pero no por adenina, que solamente inhibe a la enzima membranaral.
- 3) El pH óptimo para la enzima membranaral es de 6.0 a 6.5, mientras que la enzima solubilizada no presenta esta característica, medido desde pH 5.0 hasta 9.0.

Skulachev (77), ha presentado evidencias de un efecto electrogénico de los componentes que participan en la reacción de transhidrogenación. Este efecto electrogénico se ha estudiado en partículas submitocondriales, en las que la adición de NADH o de NADPH produce una diferencia de pH a través de la membrana de la partícula, se traduce en una alcalinización del espacio interno, que indica que la reacción de transhidrogenación se acompaña de una liberación de protones hacia el medio de incubación. Los datos de Skulachev fueron confirmados por van de Stadt (78) quien por primera vez demostró una síntesis neta de ATP a partir de ADP y fosfato a expensas de la reacción de $NAD + NADPH \rightleftharpoons NADH + NADP$. Skulachev, apoyándose en la hipótesis quimiosmótica de Mitchell (79), propuso que la transhidrogenasa mitocondrial funciona como bomba transmembranal de protones lo que explica su característica electrogénica, y su mecanismo de reacción. Esta hipótesis le permite explicar para ésta enzima porqué la energía derivada de la cadena oxidativa, puede desplazar el equilibrio de la reacción hacia la reducción de los nucleótidos correspondientes, a través del gradiente de protones generado por la actividad de la cadena oxidativa. El mecanismo propuesto por Skulachev para la acción de la transhidrogenasa es el siguiente:



en donde TNC1 y TNC2 corresponden a dos formas de transhidrogenasa con la propiedad de transportar NADH3 respectivamente, hacia

adentro o hacia afuera de la membrana. Los datos de Skulachev están de acuerdo con los de Rydstrom (80), esencialmente en tres aspectos: 1) la existencia de dos formas de transhidrogenasa una que cataliza la reacción dependiente de energía, y otra que cataliza la reacción no dependiente de energía (TNC1 y TNC2 de Skulachev), 2) el mecanismo de reacción que propone es por medio de la formación de un complejo ternario ordenado, 3) que la energía proveniente de la cadena oxidativa que impulsa la reacción de transhidrogenasa, es aquella representada por el gradiente de protones que se genera durante la actividad de la cadena. En otros aspectos la proposición de Skulachev es incompatible con las proposiciones de Rydstrom en los siguientes puntos: la participación de los protones, por ejemplo, como efecto de la energización, solo a nivel del complejo enzima-NADH, no tomando en cuenta los datos de que las constantes de disociación de los dos complejos binarios (EA y EQ en la terminología de Rydstrom) se alteran drásticamente por la energización. De acuerdo a la hipótesis de Skulachev la sola adición de NADH, en ausencia de NADP, debería ser capaz de alterar el gradiente de protones a través de la membrana de la vesícula, lo que no se ha demostrado experimentalmente. Segundo la hipótesis de Skulachev define las dos formas de transhidrogenasa TNC1 y TNC2 como dos entidades estáticas, sin conversión de una forma en la otra durante la reacción, de manera que no toma en cuenta la dependencia de las velocidades máximas relativas de las reacciones hacia adelante o hacia atrás mediadas por la transhidrogenasa, bajo las condiciones de concentración de $[NADH+]$ $[NADPH]/[NADH][NADP] = 0.003$ (valor que corresponde a

un "potencial de nucleótidos de nicotinamida" de $G^{\circ} = 0.14 + 1.39 \log 0.003 + -3.4 \text{ kcal/mol}$, en donde el valor 0.14 es el G° basado en la constante de equilibrio conocida que es de 0.79 a 30 C y pH 7.5 para la reacción $\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{NADP} \rightleftharpoons \text{NAD} + \text{NADPH}$. Es el potencial de los nucleótidos de nicotinamida el que regula la transformación de la transhidrogenasa de la forma inactiva (TH) a la forma activa (THX). En conclusión el mecanismo propuesto por Skulachev da una interpretación correcta para los aspectos termodinámicos de la reacción, pero por otro lado no toma en cuenta los aspectos cinéticos de la misma.

Un aspecto importante de la reacción de transhidrogenación dependiente de energía ($\text{NADH} + \text{NADP} \rightleftharpoons \text{NAD} + \text{NADPH}$), es que durante el proceso se consume una unión de alta energía, proveniente de la hidrólisis de ATP. La reacción en reversa por otro lado, cuando se estudia en partículas submitocondriales acopladas, no tiene el mismo rendimiento energético. Los resultados obtenidos indican, la síntesis de solamente 22 nanomolas de ATP/min/mg de proteína, según lo reportado por van de Stadt (71). Estos resultados significan que la reducción de NADP, requiere de un elevado consumo de energía (5.0 Kcal / mol), que no es recuperable ya que aparentemente se utiliza para aumentar la afinidad de la enzima por el NADP (4.7 kcal/mol para una $K' = 500$ en donde el $G^{\circ} = -8.4 \text{ kcal/mol}$ (hidrólisis del ATP).

B. FLAVOPROTEINAS Y OXIDO - REDUCCION

La detección inicial de la riboflavina o de un derivado de la misma fue el aislamiento, reportado en 1879 por Blyth, de un pigmento resinoso impuro al que llamó lactocromo. Después de un período de aproximadamente 50 años, varios grupos iniciaron el aislamiento de pigmentos amarillentos de una gran diversidad de fuentes, entre esos compuestos se encuentran el Citoflav, aislado por Banga y Szent-Gyorgy, el Liocromo de Ellinger y Koschara y la Lactoflavina aislada también por Ellinger.

El primer trabajo en el que se describe el aislamiento de riboflavina cristalina fue de Wagner-Jauregg quien aisló de clara de huevo unos cuantos miligramos de ovoflavina, este trabajo dió origen al descubrimiento del papel nutricional de la vitamina B2 . Un aspecto importante en la función de la vitamina, fue la observación de que durante la oxidación de glucosa se produce una coenzima reducida, el NADPH, cuya reoxidación es catalizada por la "VIEJA ENZIMA AMARILLA" de Warburg (81). Al tratar a la enzima con metanol se produce una proteína incolora y un pigmento libre. Kuhn señaló que este pigmento era estructuralmente igual a la riboflavina. Theorell demostró que el grupo prostético de la enzima amarilla no era la riboflavina en sí, sino un derivado que identificó como riboflavina-5'-fosfato, que actualmente y de manera general se conoce como Flavin Mononucleótido (FMN), término incorrecto ya que la unión entre la base nitrogenada y el azúcar no es de tipo glucosídica.

En la cadena oxidativa se identificaron varias flavoproteínas

(82,83), las cuales fueron divididas de acuerdo a la inhibición de la óxido-reducción en presencia de rotenona, en "pozas" de alto y de bajo potencial. La poza de bajo potencial (84) contiene una flavoproteína con propiedades de alta fluorescencia (FpL), y un componente de baja fluorescencia (FpD1). La poza de alto potencial, contiene un componente rápido ($t_{1/2} = 200$ msec) el cual en presencia de rotenona, tiene alta fluorescencia que fue designado como componente FpF y un componente de baja fluorescencia designado como FpD2.

Además de las flavoproteínas "libres" descritas anteriormente, algunas deshidrogenasas como la del succinato, la colina y la sarcosina, poseen su propio componente de flavina como grupo prostético. También se han descrito flavoproteínas de muy baja fluorescencia en las enzimas de la oxidación de ácidos grasos.

En la mayoría de las flavoproteínas tanto el FAD como el FMN se encuentran asociados a la apoproteína por uniones no covalentes, por lo que pueden separarse fácilmente por desnaturalización. Una excepción es la deshidrogenasa del ácido succínico, en esta enzima la unión entre la flavina y la apoproteína sí es covalente, ya que no se disocia por desnaturalización ya sea por tratamiento con ácido o álcali, o la misma ebullición de la enzima. El FAD de esta enzima solamente se puede liberar por proteólisis, lo que confirma el carácter covalente de la unión (85,86).

El primer péptido de flavina fue aislado por Kearney (87,88), la purificación y caracterización del mismo se realizó por el grupo de Wang (86,89). La flavina derivada de esos péptidos es inactiva desde el punto de vista biológico, ya que da resultados negativos en la prueba de la D-aminoácido oxidasa en ensayos

microbiológicos. Este componente presenta desde el punto de vista de caracterización espectrofotométrica un desplazamiento hipercrómico de la banda de 375 nm, cuando pasa de la forma oxidada a la forma neutra; además presenta una curva característica de fluorescencia, dependiente del pH. El máximo de fluorescencia se observa entre pH 3.2 - 3.4 y en ese rango la intensidad es igual a la de la riboflavina libre. Sin embargo a diferencia de la vitamina, la fluorescencia se apaga en relación directa al pH cuando éste se lleva lentamente hacia la neutralidad, de manera que a pH 6.0 o más alto, a los que la vitamina y el FMN muestran su máximo de intensidad de fluorescencia, la del FAD de la deshidrogenasa succínica es cercano a 0.

Tanto la reducción enzimática como la no enzimática de las flavoproteínas, se caracterizan por la aparición de señales transitorias en EPR y de bandas de absorción de 550 a 700 nm.

Estas observaciones son consistentes con el mecanismo de reducción por medio de dos transferencias consecutivas de un electrón. En el sistema de la cadena oxidativa mitocondrial, se generan intermediarios de flavina-semiquinona, mecanismo que parece ser el que ocurre durante el proceso de deshidrogenación catalizado por las flavinas.

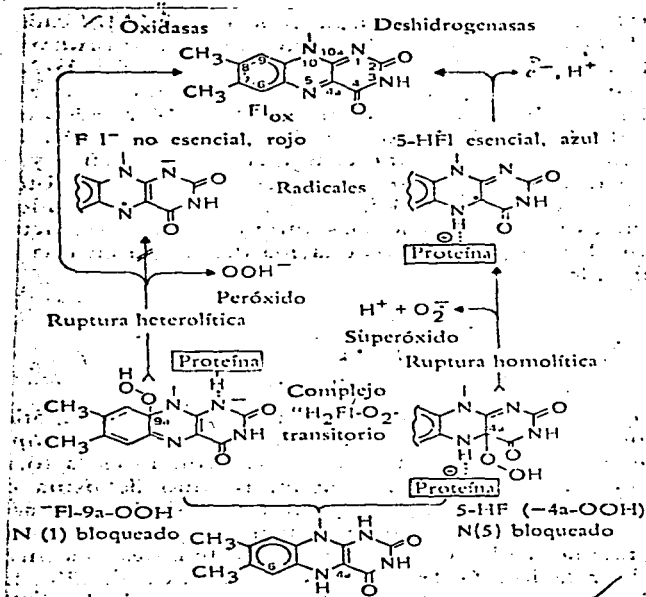
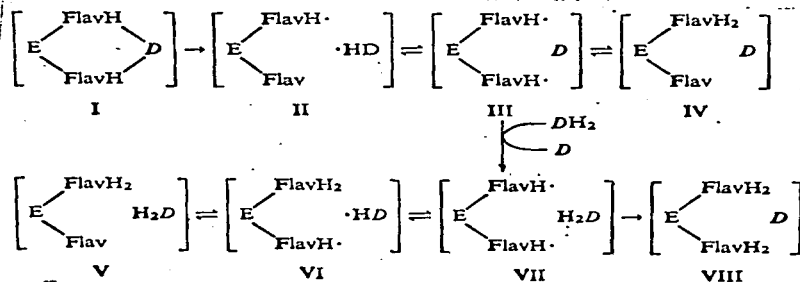
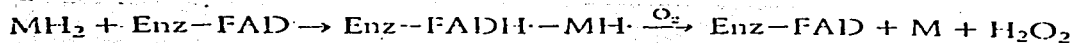


FIGURA 4

C. CENTROS HIERRO - AZUFRE DEL SEGMENTO NADH-CoQ.

Los centros Hierro/Azufre en general, se encuentran asociados a proteína libre de flavinas. Una excepción es la deshidrogenasa succínica, en la cual el centro hierro/azufre que contiene, está unido al mismo péptido al cual se encuentra unida la flavina de la enzima. Fueron descritos por primera vez por Beinert (90) utilizando técnicas de EPR. Los centros hierro-azufre del segmento b-f fueron descritos por Rieske (91). Se han caracterizado 5 de estos centros en el segmento de la NADH:CoQ óxido/reductasa de la cadena oxidativa mitocondrial (90,93) cuyas propiedades de óxido/reducción y localización, se han deducido por estudios de EPR a bajas temperaturas (4 a 20 K). Los cinco centros de Fe/S de éste segmento se encuentran a concentraciones equimoleculares y equimolecularmente cada uno de ellos con el contenido de Flavin mononucleótido en este segmento de la cadena oxidativa. Los potenciales estándar de óxido/reducción son -0.2, -0.245 y -0.305 V para los centros 2, 3-4 y 1 respectivamente (94). Así mismo, las velocidades relativas de reducción dan el siguiente orden de localización 2>3+4>1 (87), la representación esquemática del transporte de electrones en este segmento se presenta en la siguiente figura 5.

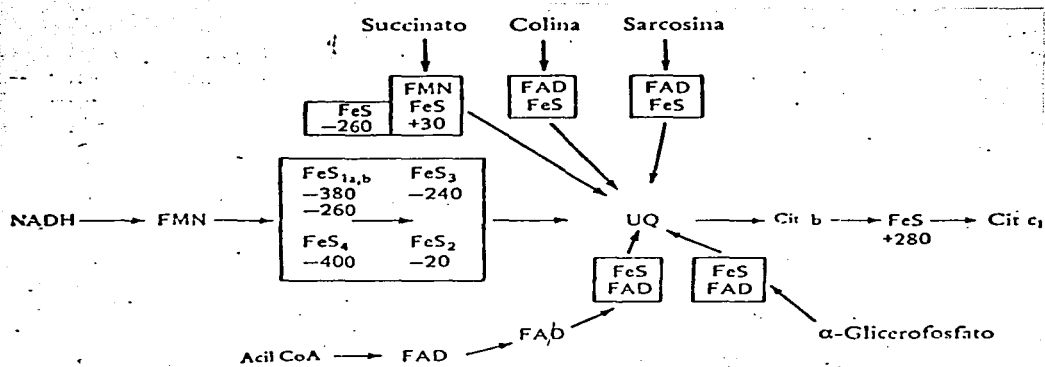


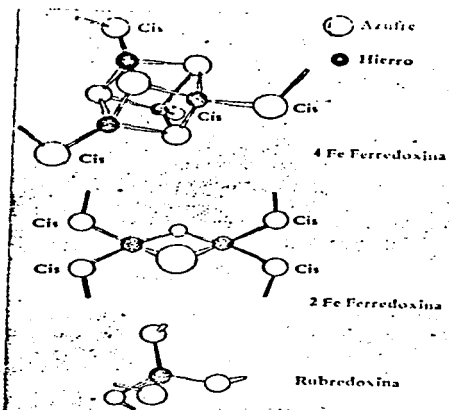
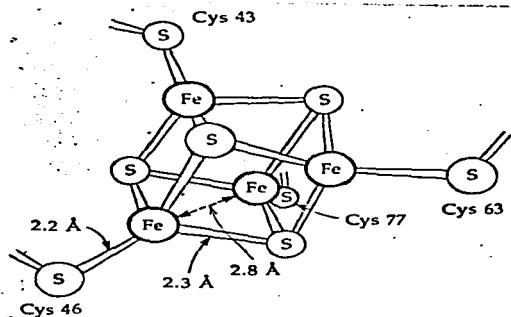
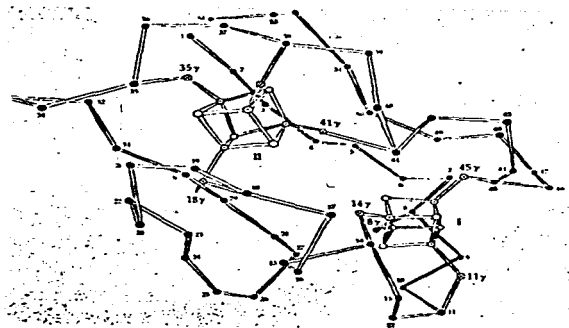
FIGURA 5

Con el avance metodológico que representa la técnica de resonancia paramagnética del electrón (EPR), se ha podido determinar la estructura del sitio de combinación del Hierro con las proteínas que componen dichos centros. La cadena polipeptídica de la apoproteína correspondiente posee 4 cisteínas, cada átomo de azufre de las cisteínas, en forma de mercaptano, se une a un átomo de hierro. Los cuatro átomos de hierro forman un tetrahedro irregular con distancias Fe-Fe de aproximadamente 0.28 nm, los átomos de azufre se entrecruzan en un tetrahedro de 0.35nm de lado, cada uno de ellos por su localización espacial queda unido a tres átomos de Fe. Cada "agregado" que se forma es capaz de aceptar a un solo electrón. (FIGURA 6).

En la mitocondria, en todos los casos estudiados, las enzimas que oxidan a los substratos (NADH, succinato, las acil CoA, -cetoglutarato, colina y sarcosina) son flavoproteínas que contienen un centro Hierro/Azufre como componente integral.

En éstos organelos el potencial de o/r del Centro I de Fe/S se modifica de manera importante por la adición de ATP (95,96), cambio semejante al descrito para los citrocromos bf y a3 (97).

El estudio comparativo entre dos especies de *Sacharomyces* (*Cereviseae* y *Carlsbergensis*) así como de *Candida utilis* (98-100) reveló una estrecha relación entre la presencia de un Centro Fe/S (el que genera la señal $g = 1.94$ en EPR), el sitio sensible a la rotenona y el sitio I de la fosforilación oxidativa. Ya que cuando las células de *C. utilis* se crecen en presencia de concentraciones limitantes de hierro o de azufre, se pierde el sitio de sensibilidad a la rotenona, el centro Fe/S ($g = 1.94$) y el sitio I



{ 4 Fe
4 S²⁻
4 Cis

{ 2 Fe
2 S²⁻
4 Cis

{ 1 Fe
0 S²⁻
4 Cis

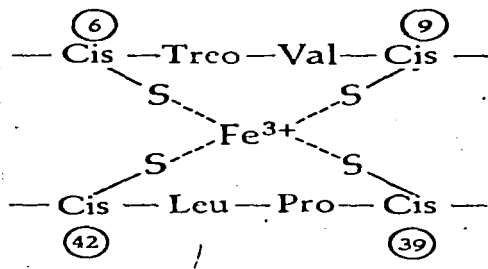


FIGURA 6

de la fosforilación oxidativa, la pérdida es reversible, ya que cuando el medio de cultivo de las células deficientes en los sitios señalados, se complementa con el elemento limitante se recuperan simultáneamente las 3 actividades. Los resultados obtenidos con levaduras se comprobaron utilizando cicloheximida, que induce la desaparición simultánea del Sitio I de la fosforilación oxidativa, del Centro Fe/S ($g=1.94$) y del sitio de sensibilidad a la rotenona (101). De los datos señalados se puede concluir que el sitio de acción de la rotenona se localiza del lado de oxígeno de la NADH deshidrogenasa y no del lado de sustrato oxidable, como había sido propuesto por Chance, a partir de la determinación de los llamados "puntos de entrecruzamiento" (cross over points) (102-105).

D. COENZIMA Q ó UBIQUINONA

La Coenzima Q se detectó por primera vez en 1955 por Festenstein y Morton (106), a partir de extractos de tejidos, pero su participación y función en la cadena oxidativa mitocondrial se empezó a considerar hasta dos años después cuando Crane (107) la aisló de mitocondrias. A partir de esa publicación, la Coenzima Q ha sido aislada de mitocondrias obtenidas de muchas fuentes (108). Sin embargo no es un componente exclusivamente mitocondrial ya que también se ha aislado de microsomas (109), núcleos y cloroplastos (110).

La localización de la Coenzima Q no parece estar restringida únicamente a la membrana y en relación con la cadena oxidativa ya que Alemán en 1966 (111) demostró su presencia en la aldehído oxidasa.

La fracción extramembranal y extramitocondrial de la CoQ parece ser una porción mínima cuando se aplica el método del "factor del citocromo a" de Schollmeyer y Klingenberg (105) para calcular su distribución.

Kroger y Klingenberg (113), describieron que la Coenzima Q participa como un acarreador móvil (114) de electrones, entre las flavoproteínas y los citocromos, y crearon el concepto de "POZA" para la Coenzima Q (115). Tanto ésta como el NAD tienen una conducta semejante desde el punto de vista de los procesos de óxido/reducción ya que se reducen en el estado controlado de la respiración (estado 4) y se oxidan completamente en los estados activo (estado 3) y desacoplado. La reducción de la Coenzima Q y

del NAD siguen funciones lineales con una menor reducción de la CoQ, en comparación con la del NAD, bajo todas las condiciones estudiadas.

Las pozas de NAD y Coenzima Q son homogéneas y de ésta manera colectan hidrógenos de varias deshidrogenasas y los canalizan hacia la secuencia unificada de transferencia de electrones, que es la cadena de citocromos. Esta homogeneidad parece ser necesaria para que se efectúe una coordinación "paralela" termodinámica o cinética entre las diferentes deshidrogenasas.

El trabajo de Widger, utilizando una preparación libre de citocromos, sensible a rotenona de un segmento de la cadena oxidativa mitocondrial que catalizaba la oxidación de NADH por Coenzima Q + Ferricianuro permitió determinar no sólo la concentración sino la fracción activa de la Coenzima Q y reafirmar el concepto de "poza" para este compuesto. Sus observaciones le permitieron demostrar que durante el proceso de óxido/reducción de la coenzima por NADH, se formaba un radical, el de la ubisemiquinona.

Por cálculos realizados, tomando como base el citocromo a, se encontró que la concentración de Coenzima Q es varias veces mayor que la del citocromo a, independientemente de la fuente tisular de donde se obtengan las mitocondrias, por ejemplo: en corazón de res CoQ 4.0 molas/g de Prot, cit. a3 0.5 molas/g de Prot.; en hígado de rata CoQ 1.8 molas/g de Prot, cit a3 0.25 molas/g de Prot.; músculo esquelético de rata CoQ 3.0 molas/g de Prot. cit a3 0.35 molas/g de Prot.

Estos datos indican que la función de la Coenzima Q puede ser no catalítica, o ser un paso limitante en el mecanismo de transporte de electrones de la cadena oxidativa, ya que la rela-

ción promedio con el citocromo a₃ (mol/mol) es de 6 a 8.5 veces. Esta relación se refleja en forma extrema en la levadura, organismo en donde la relación es de 36 (CoQ 5.4 molas/g de prot. cit a₃ 0.15 molas/g de prot) (116) y que confirmaría el concepto de "poza" de la Coenzima Q.

La estequiometría de la cadena oxidativa, tomando como unidad a la Coenzima Q sería:

TABLA I

D. Málica(1)	0.071**
D. Glutámica(1)	0.0014
D. Isocítrica(NAD)(1)	0.0042
D. Isocítrica(NADP)(1)	0.0035
NAD	1.05
NADP	0.571
CoQ	1.0
D. Succínica	0.0285
D. NADH	0.021
Citocromo b	0.105
Citocromo c	0.0571
Citocromo c	0.142
Citocromo a+a ₃	0.142

* Adaptada de Klingenberg (117).
 ** Relación molar referida a la CoQ.
 1) Enzimas NO membranales

De la tabla anterior, por comparación de las relaciones molares, se puede concluir que las funciones de la CoQ y del NADH, podrían ser análogas; esto exclusivamente en base a que sus

concentraciones estequiométricas son similares.

Un importante trabajo en la adscripción de una posible función para la Coenzima Q en el mecanismo de transporte de electrones, fue el de Lester y Fleischer (118), en el que, el tratamiento de partículas submitocondriales con acetona, resultaba en la pérdida de la capacidad de oxidación del succinato, la que se restablecía por la adición de la Coenzima Q ó sus análogos. En esta preparación era necesario añadir además al sistema de reconstitución, citocromo c, lo que ponía en duda la certeza de que la molécula necesaria para la reconstitución fuera la Coenzima Q. En ese mismo trabajo se encontró que la oxidación del NADH se perdía irreversiblemente, la respuesta aparente a este problema fue la presencia de solvente remanente ya que, la liofilización exhaustiva de la preparación, recuperaba en un buen porcentaje la capacidad para oxidar NADH (119). Por otro lado esas observaciones permitieron corroborar que algunos compuestos orgánicos alifáticos o aromáticos actúan como inhibidores del sitio I de la cadena oxidativa mitocondrial.

Redfearn y Burgos (120), publicaron que también la adición de citocromo c a la preparación extraída con acetona recuperaba aproximadamente el 40% de la oxidación de succinato. Esto a pesar de haber comprobado que la extracción con solventes orgánicos de las partículas submitocondriales remueve completamente a la ubiquinona, y después de haber eliminado completamente el solvente por liofilización exhaustiva.

La velocidad de oxidación de la Coenzima Q es dos a tres veces mayor que la velocidad de oxidación del NADH en la preparación de

partículas que transfieren electrones (ETP). Mientras que la velocidad de reducción es igual a la velocidad respiratoria inducida por la oxidación de NADH y mayor que la de otros acarreadores de electrones (121). Sin embargo la velocidad de reducción de la Coenzima Q no debe tomarse como representativa de la velocidad máxima de transferencia de electrones ya que aparentemente las deshidrogenasas son las limitantes, dado que sus velocidades de óxido/reducción difieren por un factor de 5 a 10 veces.

Este punto ha sido recientemente tomado por un grupo europeo de bioenergética, que ha presentado evidencias (122,123), que indican que los sitios de control de la velocidad respiratoria no se encuentran solamente en el punto mencionado (las deshidrogenasas), ni en el acarreador de adenin nucleótidos, como también ha sido postulado, sino que los sitios de control se expresan o desaparecen según las condiciones metabólicas o experimentales a las que se someten las mitocondrias, y en general puede concluirse que esos controles son un reflejo de la actividad metabólica celular, por lo que dependiendo de las condiciones del potencial de fosforilación o del potencial de óxido/reducción de la célula, se manifestarán unos u otros sitios de control.

TABLE I
Distribution of control strength among different steps during State 3 respiration of rat liver mitochondria

Rat liver mitochondria (2-2.5 mg of protein) were incubated as described in Fig. 2 except that oligomycin was omitted; an excess of hexokinase (2 IU) was present. The control strength of the various steps was measured as described in the text. The values are means \pm S.E. of 4 separate experiments.

Step	Control strength
Adenine nucleotide translocator	0.29 \pm 0.05
Proton leak	0.04 \pm 0.01
Dicarboxylate carrier	0.33 \pm 0.04
Cytochrome c oxidase	0.17 \pm 0.01
b _c complex	0.03 \pm 0.005
Hexokinase	0
Total	0.86 \pm 0.06

FIGURA 7

E. PAPEL DEL K⁺

Gromet-Elhanan (124), demostró, en cloroplastos que la fotoreducción de NAD es inhibida por valinomicina y nonactina a altas concentraciones, y que el efecto era independiente de la presencia de K⁺ o de su translocación mediada. Estas observaciones se comprobaron por Keister y Minton (125) y Telford y Barber (126), quienes demostraron que la valinomicina a altas concentraciones inhibía la fotofosforilación en cromatóforos de *Rhodospirillum rubrum*, y que dicho efecto se debía a inhibición del transporte de electrones. McMurray (127) también demostró la capacidad inhibidora de la valinomicina en la fosforilación acoplada y en un sistema de reducción de ferricianuro, tanto en cloroplastos intactos como en partículas subcloroplásticas (128).

En 1943 Boyer y cols. (129), demostraron en un homogenado de músculo que se requería K⁺ para que ocurriera la esterificación de ácido fosfórico durante la oxidación de piruvato, por lo que Potter (130), lo incluía rutinariamente en el medio de incubación en sus pioneros estudios sobre la fosforilación oxidativa, aún cuando él mismo encontró que este catión no tenía efecto sobre la oxidación del succinato.

Kennedy y Lehninger (30,32) en 1949 trabajando con homogenados salinos de músculo reportaron que el efecto era inespecífico ya que el sodio tenía el mismo efecto que el K⁺.

En 1952, Pressman y Lardy (131,132), reportaron que el K⁺ era necesario para la fosforilación oxidativa en mitocondrias aisladas de hígado de rata, con substratos NAD dependientes. Sin embargo

esta afirmación ha sido cuestionada por algunos grupos (133), mientras que otros la favorecen (134) y otros más han descrito un efecto desacoplante del catión (135) utilizando el mismo tipo de preparación.

Weiner y Lardy (136) observaron un efecto desacoplante del sodio en una preparación de mitocondrias de riñón, esta acción desacoplante del sodio es revertida parcialmente por la adición de potasio al medio de incubación.

Los estudios de Gómez-Puyou y cols.(137), demostraron que el K^+ , efectivamente se requiere para el óptimo funcionamiento del sitio I de la cadena oxidativa mitocondrial, utilizando como modelo experimental una preparación mitocondrial, de hígado de rata, depletada de K^+ .

Nuestro trabajo (138), con el polietileno XXVIII demostró que cuando el K^+ se remueve o disloca de su sitio en la membrana, la cadena oxidativa pierde su capacidad funcional en el sitio I. (FIGURA 8).

En ese trabajo (138) además se demostró que la adición de K^+ , restablecía la capacidad funcional del sitio I de la cadena, medida como la capacidad para oxidar sustratos dependientes de NAD. (FIGURA 9).

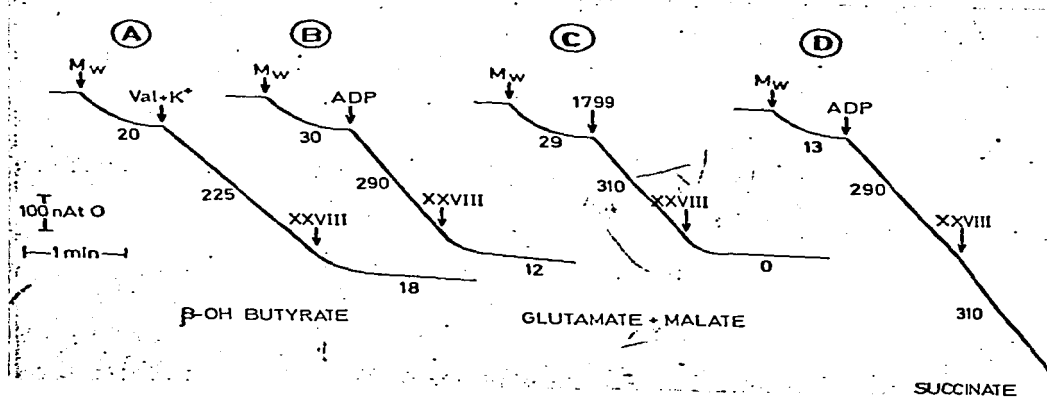


FIGURA 8

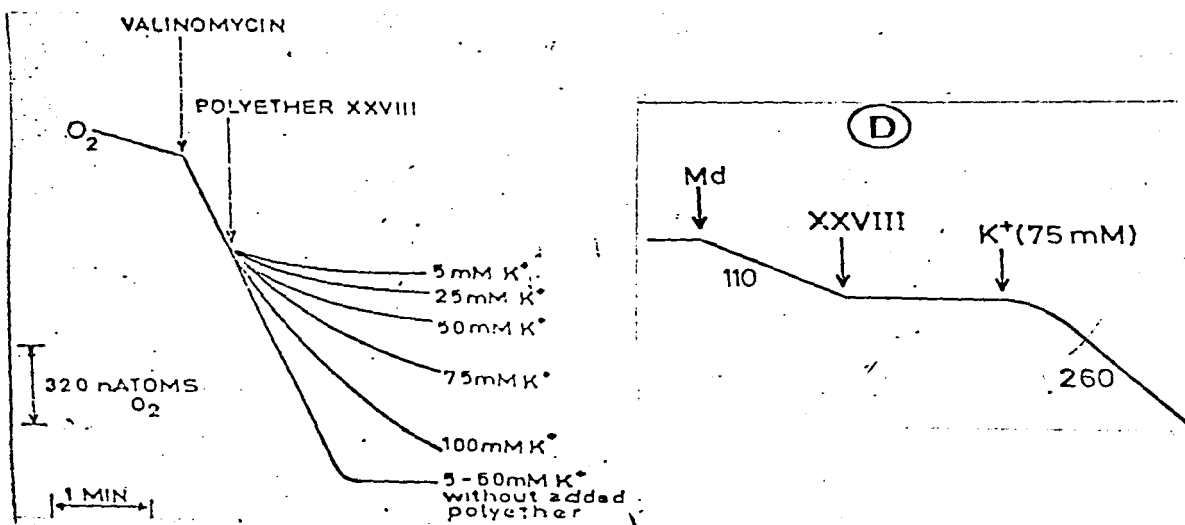


FIGURA 9

En partículas submitocondriales Lotina y Gómez-Puyou (139,140), demostraron que el K^+ es capaz de estimular la oxidación de NADH pero que no afectaba la oxidación de succinato. Por otro lado la octilguanidina (catión al pH del ensayo) inhibe fuertemente la oxidación de ese nucleótido.

Estos estudios permiten concluir que en el sitio I de la cadena oxidativa debe existir un sitio aniónico al cual se une el K^+ , probablemente inmerso en un ambiente de naturaleza anfipática o hidrofóbica, ya que el K^+ es alcanzado por el polietileno XXVIII, cuya naturaleza hidrofóbica está dada por los 2 bencenos que lo componen, junto con la cadena de carbonos que forman la "corona" del compuesto (141). Sin embargo cabe hacer énfasis que dicho sitio puede, no ser fijo o no estar localizado profundamente en la membrana, ya que el K^+ puede ser substituído por Na^+ en ausencia de moléculas mediadoras de ese recambio.

F. INHIBIDORES "ESPECIFICOS" DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES.

Es importante señalar la gran variedad de sustancias que tienen la capacidad de inhibir el transporte de electrones en el segmento NADH-CoQ, tanto desde el punto de vista químico como físico. En otras palabras, no parece haber entre todos estos compuestos alguna semejanza estructural en relación con su capacidad inhibitoria. Entre otras han sido descritas las siguientes moléculas ó grupos de moléculas, con esa capacidad:

1. Rotenona (142). Un veneno producido por plantas.
2. Piericidina (143). Un antibiótico insecticida parecido a la CoQ.
3. La Benzoquinona sesquiterpenica perezona (144)
4. Barbitúricos como el Amital (145).
5. Derivados de alquilguanidinas (146).
6. Esteroides como la progesterona y el dietilestilbestrol (147).
7. Compuestos de síntesis orgánica como los poliéteres macrocíclicos (148).
8. Antibióticos como la cicloheximida (149).
9. Enzimas como las lecitinasas (150).
10. Acetaldehido (151).
11. Triton X 100 a concentraciones subléxicas (152).
12. Compuestos orgánicos alifáticos y aromáticos (153).
13. Ortofenantrolina (154) y
14. Rehina (155).

Los estudios de Garland (156) y Clegg (157), demostraron que el sitio sensible a la Piericidina, en la cadena oxidativa mitocon-

drial, no es un componente común a todos los organismos que poseen un sistema oxidativo, ya que sus estudios en tres diferentes cepas de levadura que tienen el sitio I de la forforilación oxidativa, no presentan sensibilidad a piericidina. En contraste con la piericidina, hasta el presente, no se ha descrito ningún sistema biológico que tenga el Sitio I de la cadena oxidativa y que sea insensible a rotenona. Todas las evidencias experimentales indican que el sitio de acción de la rotenona, se encuentra del lado del oxígeno del Centro II de Fe/S (158). Además de la información respecto al sitio de acción de la rotenona, aparentemente la piericidina y el dietilestilbestrol tienen el mismo sitio de acción que ella (147). Sin embargo, no existe información del sitio preciso de acción y del mecanismo de inhibición de los demás compuestos, excepto para el polieter XXVIII (138), para el que se propone, dada su capacidad de formar clartratos con el K +, que modifica la ubicación o la concentración del K +, del cual depende el máximo rendimiento del Sitio I de la fosforilación oxidativa. Los estudios realizados por Estrada (159), sugirieron como posible sitio de acción para el polieter, utilizando el mismo tipo de metodología para determinar el sitio de acción de la rotenona, que su efecto lo ejerce de manera similar a ésta, es decir por el lado del oxígeno del Centro II de las Ferrosulfoproteínas del sitio I. Estudios recientes parecen indicar que el efecto del polieter se relaciona con el K +, su localización y/o concentración en la membrana.

La pregunta que podría surgir es porqué, hasta un trabajo posterior (138), se pensó en que el mecanismo de acción del poliéter pudiera ser a través de un mecanismo de acción diferente al

de la rotenona, como fué propuesto en el primero (148) y segundo (138) trabajos. El primer trabajo se enfocó principalmente a la descripción de los aspectos fenomenológicos del efecto del poliéter XXVIII sobre la cadena oxidativa mitocondrial, no por ello en la discusión de ese trabajo se dejaron de plantear otras posibilidades u opciones. Es por ello que en el trabajo (138) se orientaron los experimentos a tratar de encontrar cual de las proposiciones era la que podría explicar más, adecuadamente los resultados obtenidos hasta ese momento. En ese sentido desde el primer trabajo se presentaron resultados en los cuales se demostró que el Cs⁺ era capaz de revertir la inhibición inducida por el poliéter de la actividad oxidativa mitocondrial. De manera que en ese tercer trabajo se demuestra que el mecanismo no depende de aniones o del equilibrio del flujo iónico inducido por el poliéter ó de un posible bloqueo del flujo de electrones por combinarse con el Hierro de los ó el Centro Hierro/Azufre de manera similar a como lo hace la rotenona, la piericidina o el amital. En ese sentido consideramos importante en un futuro, determinar la presencia de un complejo poliéter [XVIII-K] en la membrana de diferentes preparaciones mitocondriales, como las partículas submitocondriales ó las preparaciones de Hateffi o Keilin-Hartree. Esto con objeto de determinar la posible presencia de un catión en la membrana y quizá, determinar cual y a quien pertenece el sitio aniónico al que se une el catión para ejercer su efecto regulador sobre la actividad del sitio I. En relación a este punto es importante señalar el uso potencial de la genética en el estudio futuro de éstos componentes de la membrana.

El trabajo desarrollado con el compuesto perezona, no deja de tener relación con el interés primario del laboratorio, que es el funcionamiento del sitio I de la cadena de transporte de electrones, del que constantemente se ha admitido que es uno de los más difíciles y retadores problemas por resolver, en el estudio de la cadena oxidativa mitocondrial. Es en este sentido que nos pareció interesante utilizar a la perezona (160,161) [2-(1,5-Dimetil-4 hexenil)-3hidroximetil-p-benzoquinona].

Químicamente esta sustancia natural es un análogo de la Coenzima Q, término que preferimos sobre el de ubiquinona, ya que éste último indica ubicuidad y se ha demostrado que no todos los organismos o tejidos la contienen. En éste primer trabajo con la perezona, describimos una serie de efectos que tiene sobre la actividad de transporte de electrones en la cadena oxidativa mitocondrial, y además se describen algunas de sus propiedades que parecen ser importantes, en relación con el mecanismo por medio del cual afecta la actividad respiratoria mitocondrial. En el trabajo enviado a publicación (144), se demuestra que el mecanismo probable, por el cual la perezona afecta la transferencia de electrones, de la cadena oxidativa mitocondrial es actuando como quinona, es decir aceptando y donando electrones. Es importante señalar que la velocidad de reducción de la perezona, parece estar muy cercano a la velocidad de reducción de otros componentes de la cadena. Su adición a un sistema mitocondrial, respirando activamente con substratos NAD dependientes, estimulada por ionóforos, desacoplantes o por ADP, se traduce en una inhibición de la actividad respiratoria sin retardo aparente. Sin embargo la oxidación de la molécula, parece ser mucho más lenta ya que si bien se

observa inhibición de la respiración, ésta nunca es de 100%, lo que indica un flujo, limitado, de electrones hacia la cadena. Si la temperatura del sistema de respiración se aumenta, entonces se observa que la capacidad inhibidora de la perezona, se va perdiendo gradualmente en forma proporcional a la temperatura utilizada, perdiéndose a 35o C ó más, dato que se ha interpretado como un aumento en la velocidad de transferencia de electrones dependiente de la temperatura. Es por eso que en el trabajo nos inclinamos porque la perezona sea un aceptor y donador de electrones pero con velocidades significativamente menores a aquellas que poseen las quinonas naturales. Esta propiedad de la perezona podrá ser útil en trabajo futuro a realizar en nuestro laboratorio, para determinar si la Coenzima Q, actúa o puede actuar como un sitio de control de la actividad respiratoria mitocondrial.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Lavoisier, A. Elements of Chemistry in: Great Books of the Western World. Benton, W. ed. in chief, Encyclopaedia Britannica, Inc. The University of Chicago (1978) pp.1-167.
- 2 MacMunn, C.A., (1886) Phil. Trans., 177, 267. citado por Keilin, D. en: Great experiments in Biology. Gabriel M.l. y Fogel S. eds. Prentice Hall, Inc. N.J. 1955. pp.31-37
- 3 Keilin, D., and Hartree, E.F. (1925) Proc. Roy. Soc. (London) B 98, 312.
- 4 Harden, A., and Young, W.J. (1906) Proc. Roy. Soc. (London) B 77, 20.
- 5 Wieland, H., en: On the Mechanism of Oxidation. Yale University Press. New Haven. 1932.
- 6 Warburg, O., Christian, W., and Gricce, A. (1934) Biochem. Z. 282, 157.
- 7 Fiske, C.H., and Subbarow, Y. (1929) Science 70, 381
- 8 Lundsgaard, E. (1930) Biochem. Z. 217, 162.
- 9 Lundsgaard, E. (1930) Biochem. Z. 227, 51.
- 10 Lundsgaard, E. (1931) Biochem. Z. 233, 322.
- 11 Lohman, K. (1929) Naturwiss. 17. 624.
- 12 Lohman, K. (1931) Biochem. Z. 233, 460.
- 13 Lohman, K. (1934) Biochem. Z. 271, 278.
- 14 Szent-Gyorgyi, A. v. (1935) Hoppe-Seyl. Z. 236, 1 citado por: Krebs, H.A. Biological Phosphorylations. H. Kalkar Ed. 1969. Prentice Hall. N.J.
- 15 Hopkins, F.G. (1929) citado en: Knox, W.R. (ed): Gluthatione, en The enzymes Vol. 2, pp. 253.
- 16 Ochoa, S. (1940) Nature, 146, 267
- 17 Kalkar, H. (1939) J. Biol. Chem. 33, 631.
- 18 Lardy, H.A., and Phillips, P.H. (1943) J. Biol. Chem. 149, 177
- 19 Hotchkiss, R.D. (1943) Advances in Enzymology 4, 153
- 20 Clifton, C.E., (1946) Advances in Enzymology and related subjects, N. Y. 6, 269.
- 21 Loomis, N.F. and Lippman. F.L. (1948) J. Biol. Chem. 173, 807

- 22 Kennedy, E.P., and Lehninger, A.L. (1949) J. Biol. Chem. 179,957.
- 23 Green, D.E., Loomis, W.F., and Auerbach, V.H. (1948) J. Biol. Chem. 172,389
- 24 Potter, V.R., and Elvehjem, C.A. (1936) J. Biol. Chem. 114,495
- 25 Bensley, R.R., and Hoerr, N.L., (1934) Anat. Records 60,251.
- 26 Claude, A., (1946) J. Exp. Med. 84, 51 y 61
- 27 Hogeboom, G.H., Schneider, W.C., and Pallade, G.E. (1948) Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 65,320.
- 28 Hogeboom, G.H., Schneider, W.C., and Pallade, G.E. (1948), J. Biol. Chem. 172,619.
- 29 Hogeboom, G.H., Claude, A., and Hotchkiss, R.D. (1946) J. Biol. Chem. 165,615
- 30 Kennedy, E.P., and Lehninger, A.L. (1946) J. Biol. Chem. 164,291
- 31 Potter, V.R. (1946) 163,437.
- 32 Kennedy, E.P., and Lehninger, A.L. (1949) J. Biol. Chem. 179,969.
- 33 Chance, B. (1952) J. Biol. Chem. 197,484.
- 34 Slater, E.C., Kaniuga, Z., and Wojtzak, L. (1966) eds. Biochemistry of Mitochondria, p. 1, Academic Press and PWN, London, Warsaw.
- 35 Slater, E.C., Kemp, Jr., A., and Tager, J.M. (1964) Nature 201,781.
- 36 Lee, C.P., Azzone, G.F., and Ernster, L. (1964) 201, 152.
- 37 Slater, E.C (1965) Arch. de Biologie 76, 235.
- 38 Davies, R. A., and Fraenkel, G. (1940) J. Exptl. Biol. 17, 402.
- 39 Sacktor, B., and Hurbult, E. C. (1966) J. Biol. Chem. 241, 632.
- 40 Neeley, J.R., Denton, R.M., England, P.J., and Randle, P.J. (1972) Biochem. J. 128. 147
- 41 Illinworth, J.A., Ford, W.C.L., Kobayashi, K., and Williamson, J.R. (1975) Rec. Adv. Stud. Card. Struct. Metab. 8, 271.

- 42 Nishiki, K., Erecinska, M., and Wilson, D.F. (1978) Am. J. Physiol. 234, c 73.
- 43 Chance, B., and Williams, G.R. (1956) Advan. Enzymol. 17, 65.
- 44 Slater, E.C., Rosing, J., and Mol. A. (1973) Biochim. Biophys. Acta. 292, 534.
- 45 Erecinska, M., Veech, R.L., and Wilson, D.F. (1974) Arch. Biochem. Biophys. 160, 412.
- 46 Wilson, D.F., Stubbs, M., Oshino, N., and Erecinska, M. (1974) Biochemistry 13, 5305.
- 47 Lee, C.P., Simard-Duquesne, N., and Ernster, L. (1965) Biochim. Biophys. Acta 105,397.
- 48 Wilson, D.F., Owen, C.S., and Holian, A. (1977) Arch. Biochem. Biophys. 182. 749.
- 49 Lemasters, J.J., Grunwald, R., and Emaus, R.K. (1984) J. Biol. Chem. 259,3058
- 50 Schatz, G., and Racker, E. (1966) J. Biol. Chem. 241, 1429.
- 51 Edelcoch, H., Hayaishi, O., and Tiple, L.J. (1952) J. Biol. Chem. 197, 97.
- 52 Mahler, H.R., Sarkar, N.K., Vernon, L.P., and Alberty, R. A. (1952) J. Biol. Chem. 199, 585.
- 53 Galante, Y.M., and Hatefi, Y. (1978) en: Methods in Enzymology Vol. LIII. trabajo No.[4]. Academic Pres. N.Y.pp 15-21.
- 54 Galante, Y.M., Hatefi, Y., (1977) Proc. Natl. Acada. Sci. USA. 75, 402.
- 55 Hatefi, Y., Haavik, A.G., and Griffiths, D. E. (1962) J. Biol. Chem. 237, 1676.
- 56 Rydstrom, J., Hoek, J.B., and Hundal, T. (1974) Biochim. Biophys. Res. Commun. 60,448.
- 57 Rydstrom, J. (1976) Biochim. Biophys. Acta 455,24.
- 58 Hatefi, Y., and Stempel, K.E. (1969) J. Biol. Chem. 244,2350.
- 59 Slater, E.C.,(1966), in Flavins and Flavoproteins(Slater, E.C. ed.) BBA Library Vol. 8 pp 482, Elsevier,Holland.
- 60 Cremona ,T. and Kearney, E.B. (1963), Nature 200, 542.

- 61 Dooijeward, G., DeBruin, G.J.M., Van Dijk P.J., and Slater, E. C. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 501,458.
- 62 Singer, T.P. and Gutman, M. (1971) *Adv. Enzymol.* 34,79.
- 63 Dooijeward, G., and Slater, E.C. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 440, 1 y 16
- 63' Ringler, R.L., Minakami, S., and Singer, T.P. (1963) *J.Biol. Chem.* 238,801.
- 64 Ragan, C.I. (1976) *Biochem. J.* 154,295.
- 65 Hatefi, Y., and Galante, Y.M. in: *The Molecular Biology of Membranes (1977)* (Fleischer, S., Hatefi, Y., McLennan, D.H., and Tzagoloff, A. Eds.) p. 163, Plenum Press, New York and London.
- 66 Vehar, G.A. and Freisheim, J.H. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 68,937.
- 67 Hatefi, Y., Hanstein, W.G., Davis, K.A. and You, K.S. (1974) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 227,504.
- 68 Krebs, H.a. (1954) *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 95,34.
- 69
- 70 Danielson, L., and Ernster, L. (1963) *Biochim. Biophys. Acta* 10,91.
- 71 Ernster, L., Lee, C.P., and Thorndal, U.B. (1969) in: *The Energy Level and Metabolic Control in Mitochondria.* (Papa, S., Tager, J.M., Quagliariello, E., and Slater, E. C. eds.) p. 439, Adriatica Editrice, Bari.
- 72 Lee, C.P., and Ernster, L. Round Table discussion on *Mitochondrial Structure and Compartmentation.* E. Quagliariello, S. Papa, E.C. Slater and J.M. Tager eds. Adriatica Editrice Bari, 1967. 353.
- 73 Kawasaki, T., Staoh, K., and Kaplan, N.O. (1964). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 17, 648.
- 74 Hatefy, Y., and Galante, Y.M. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74,846.
- 75 Grinios, L., Jasaitis, L., Kadzianskas, Y.V.D., Liberman, E.A. Skulachev. V.P., Topali, V.P., Tsofina, L.M. and Vladimorova, M.A. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 216, 1.
- 76 Teorell, H., and Chance, B. (1971) *FEBS Letters* 21,122.

- 77 Skulachev, V.P. (1970) FEBS Letter 11,301.
- 78 van de Stadt, R.J., Nieuwenhuis, F.J.R.M., and Van Dam, K. (1971) Biochim. Biophys. Acta 234, 173.
- 79 Mitchell, P. (1968) "Chemiosmotic Coupling and Energy Transductions". Glynn Research Ltd., Bodmin, Cornwall, England.
- 80 Rydstrom, J., Texeira da Cruz, A., and Ernster, L. (1970) Eur. J. Biochem. 17,56.
- 81 Warburg, O., and Christian, W. (1932) Biochem. Z. 254, 438.
- 82 Chance, B., and Schoener, B. (1966) in: Flavins and Flavoproteins (Slater, E.C. ed.) p. 510, Elsevier, Amsterdam.
- 83 Chance, B., Mela, L., and Wong, D. (1968) in: Flavins and Flavoproteins (Yagi, K. ed.) p. 107, The University Park Press, Baltimore, USA.
- 84 Wang, D. (1967) Fed. Proc. 26,732.
- 85 Kearney, E. B., and Singer, T.P. (1955) Biochim. Biophys. Acta 17,596.
- 86 Wang, T. Y., Tsou, C.L., and Wang, Y.L. (1956) Scientia Sinica 5,73.
- 87 Kearney, E. B. (1960) J. Biol. Chem. 235, 865.
- 88 Singer, T.P. and Kearney, E. B. (1959) in: Vitamin Metabolism (Umbreit, W., and Molitor, H. eds.) p. 709, Pergamon Press, London.
- 89 Wang, T. Y., Tsou, C.L., and Wanh, Y.L. (1965) Scientia Sinica 14, 1193.
- 90 Orme-Johnson, N.R., Hansen, R.E., and Beinert, H. (1974) J. Biol. Chem. 249,1922.
- 91 Rieske, R. E., Hansen, R. E., and Zaugg (1964) J. Biol. Chem. 239, 3017.
- 92 Ohnishi, T., Asakura, T., Yonetani, T., and Chance, B. (1971) J. Biol. Chem. 246,5960.
- 93 Orme-Johnson, N. R., Orme-Johnson, W.H., Hansen, R.E., Beinert, H., and Hatefi, Y. (1971) Biochem Biophys. Res. Commun. 44, 446.
- 94 Orme-Johnson, N.R., Hamsen, R.E., and Beinert, H. (1974) J. Biol. Chem. 249,1928.
- 95 Ohnishi, T. (1973) Biochim. Biophys. Acta 301,105.

- 96 Ohnishi, T., Wilson, D.F., Asakura, T., and Chance, B. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 46,1631.
- 97 Ohnishi, R., Wilson, D. F., and Chance, B. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 49,1087.
- 98 Light, P. A., Ragan, C.I., Clegg, R. A., and Garland, P.B. (1968) FEBS Letters 1,4.
- 99 Garland, P.B. (1970) Biochem. J. 118,329.
- 100 Haddock, B. H., and Garland, P.B. (1971) Biochem. J. 124,155.
- 101 Ohnishi, T., Paniebanco, T., and Chance, B. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 49,99.
- 102 Chance, B., and Williams, G.R. (1955) J. Biol. Chem. 217,409.
- 103 Chance, B., and Williams, G.R. (1956) J. Biol. Chem. 221,477.
- 104 Chance, B. (1967) Fed. Proc. 26,1341.
- 105 Hinkle, P. C., Butow, R.A., Racker, E., and Chance, B. (1967) J. Biol. Chem. 242,5169.
- 106 Festenstein, G.N., Heaton, S.W., Lowe, J.S., and Morton, R.A. (1955) Biochem. J. 59,558.
- 107 Crane, F.L., Hatefi, Y., Lester, R. C., and Widmer, C. (1957) Biochim. Biophys. Acta 25,220.
- 108 Crane, F.L. (1965) in: Biochemistry of Quinone (Morton, R.A. ed) p. 183. Academic Press, N.Y. and London.
- 109 Leonhauser, S., Leybold, K., Krish, K., and Staudinger, H.J. (1962) Arch. Biochem. Biophys. 96,580.
- 110 Jarayaman, J., and Ramasarma, T. (1963) Arch. Biochem. Biophys. 103,258.
- 111 Alemán, V., Smith, S.T., Rajagopalan, K.B., and Handler, P. (1966) in: Flavins and Flavoproteins (Slater, S. ed.) p. 99, Elsevier, Amsterdam.
- 112 Schollmeyer, P., and Klingenberg, M. (1962) Biochem. Z. 335,426.
- 113 Kroger, A., and Klingenberg, M. (1966) Biochem. Z. 344,317.
- 114 Kroger, A., and Klingenberg, M. (1973) Europ. J. Biochem. 34,358.
- 115 Kroger, A., and Klingenberg, M. (1973) Europ. J. Biochem. 39,313.

- 116 Vaneste, W.H. (1966) *Biochem. Biophys. Acta* 113,175.
- 117 Klingenberg, M., *Ergeb. Physiol. Biol. Chem. Exptl. Pharmakol.* 55,131. CITADO en: Kroger, A., and Klingenberg (1967) in: *Current Topics in Bioenergetics*, Vol. II (Sanadi, R. ed.) Academic. Press, N.Y. and London.
- 118 Lester, R.L., and Fleischer, S. (1959) *Arch. Biochem. Biophys.* 80,470.
- 119 Szarkowska, L. (1966) *Arch. Biochem. Biophys.* 113,519.
- 120 Redfearn, E.R., and Burgos, J. (1965) *Nature* 209,711.
- 121 Klingenberg, M., and Kroger, A. (1966) 3rd. FEBS Meeting, Warsaw Abstr. n. M .
- 122 Groen, A.K., Wanders, R.J.A., Westerhoff, H.U., van der Meer, R., and Tager, J.M. (1982) *J. Biol. Chem.* 257.2754.
- 123 Tager, J.M., Wanders, R.J.A., Groen, A.K., Kuns, W., Bohnensach, R., Kuster, U., Letko, G., Bohne, G., Duszynki, J., and Wojtczak, L. (1983) *FEBS Letters* 151,1.
- 124 Gromet-Elhanan, Z. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 223,174.
- 125 Keister, D.L., and Minton, N.J. (1970) *Bioenergetics* 1,367.
- 126 Telford, A., and Barber, J. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 33,343.
- 127 Mc. Murray, W.C., and Begg, R.W. (1959) *Arch. Biochim. Biophys.* 84,546.
- 128 McCarty, R.E. (1969) *J. Biol. Chem.* 244,4292.
- 129 Boyer, P.D., Lardy, H.A., and Phillips, P. A. (1943) *J. Biol. Chem.* 149,529.
- 130 Potter, V.R. (1945) *Arc. Biochem.* 6,439.
- 131 Pressman, B.C., and Lardy, H.A. (1952) 197,547.
- 132 Pressman, B.C., and Lardy, H.A (1955) *Biochim. Biophys Acta* 18,482.
- 133 Opit, L., and Charnok, J.S. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* 110,9.
- 134 Krall, A.R., Wagner, M.C., and Gozanski, D.M. (1964) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 16,77.
- 135 Christiansen, R.O., Loiter, A., and Racker, E. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 180, 207.

- 136 Weiner, M.W., and Lardy, H.A. (1973) *L. Biol. Chem.* 248,7682.
- 137 Gómez-Puyou, A., Tuena de Gómez-Puyou, M. (1974) in: *Perspectives in Membrane Biology* (Estrada-O, S., and Gitler, C. eds) p. 303, Academic Press, N.Y. and London.
- 138 Cárabez, T.A., and Sandoval, Z.F. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 638,125.
- 139 Lotina, B., Tuena de Gómez-Puyou, M., and Gómez-Puyou, A. (1973) *Arch. Biochem. Biophys.* 159,520.
- 140 Lotina, B., Gómez-Puyou, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., and Chávez, C.E. (1973) *Arch. Biochem. Biophys.* 159,517.
- 141 Pedersen, C.J. (1967) *J. Am. Chem. Soc.* 89, 7017.
- 142 Ernster, L., Dallner, G., and Azzone, G. F. (1963) *J. Biol. Chem.* 238. 1124.
- 143 Hall, C., Wu, M., Crane, F.E., Takahashi, N., Takamura, S., and Folkers, K. (1966) *Fed. Proc.* 25, Abs 192.
- 144 Cárabez, T.A., and Sandoval, Z.F. Datos no Publicados.
- 145 Ernster, L., Jalling, O., Low, H., and Lindenberg, O. (1965) *Exp. Cell Res. Suppl.* 3, 124.
- 146 Hollunger, G. (1965) *Acta Pharmacol. Toxicol. Kbh.* 11, Suppl.1.
- 147 Otamendi, M., and Stoppani, A. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* 165, 21.
- 148 Estrada-O, S., and Cárabez, T.A. (1972) *Bioenergetics* 3,429.
- 149 Garber, A.J., Jomain-Bam, M., Salganicoff, L., Farber, E., and Hanson, W. (1973) *J. Biol. Chem.* 248,1530.
- 150 Badano, B.N., Boveris, A., Stoppani, A., and Vidal, J.C. (1973) *Mol. Cell Biochem.* 2,157.
- 151 Cederbaum, A.I., Lieber, C.S., and Rubin, E. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* 161,26.
- 152 Chappel, J.B. (1963) *J. Biol. Chem.* 238,410.
- 153 Yuguzhinsky, L.S., Smirnova, E.G., Ratnikova, E.A., Kolesova, G.M. and Krasinskaya, I.P. (1973) *Bioenergetics* 5,163.
- 154 Butow, R.A., and Racker, E. (1965) *J. Gen. Physiol.* 49,149.
- 155 Kean, E.A. (1968) *Arch., Biochem.* 127,528.
- 156 Garland, P.B. (1970) *Biochem. J.* 118,329.

- 157 Clegg, R.A., Ragan, C.I., Haddock, B.H., Light, P.A., Garland, P.B., Swan, J.C., and Bray, R.C. (1969) FEBS Letters 5,207.
- 158 Singer, T.P., and Gutman, M. (1970) Adv. Enzymol. 34,79.
- 159 Estrada-O, S., and Gómez-Lojero, C. (1976) in: Mitochondria Bioenergetics, Biogenesis and Membrane Structure. (Packer, L., and Gómez-Puyou, A. eds) P. 167 Academic Press, NY and London.
- 160 Río de la Loza, L., Disertación en la Academia de Medicina del 30 de octubre de 1852.
- 161 Walls, F., Salmón, M., Padilla, J., Joseph Nathan, P., y Romo, J. (1965) Bol. Inst. Quim. (Méx) (U.N.A.M.)XVIII, 1.

Specific Inhibition by Macrocylic Polyethers of Mitochondrial Electron Transport at Site I*

Sergio Estrada-O. and Alfonso Cárabez†

*Department of Biochemistry
Centro de Investigación y Estudios Avanzados del
Instituto Politécnico Nacional
P.O. Box 14-740
México 14, D. F. Mexico*

Received 10 January 1972

Abstract

The macrocyclic polyethers dibenzo-18-crown-6 (XXVIII) and dicyclohexyl-18-crown-6 (XXXI) inhibit the valinomycin-mediated K^+ accumulation energized by glutamate, α -ketoglutarate, malate plus pyruvate or isocitrate but not that promoted by succinate, ascorbate plus TMPD or ATP. The polyethers inhibit the oxidation of the former group of substrates without preventing either the oxidation of succinate or ascorbate plus TMPD or the hydrolysis of ATP.

The substrate oxidation inhibited by the macrocyclic polyethers is relieved in intact mitochondria by increasing the concentration of K^+ in the medium. It is also completely reverted by supplementing the medium with valinomycin, Cs^+ and phosphate, or else by the addition of vitamin K_3 .

In submitochondrial sonic particles the macrocyclic polyethers inhibit the oxidation of NADH as well as the ATP-driven reversal of electron flow at the site I of the electron transport chain. They also block the oxidation of NADH in non-phosphorylating Keilin-Hartree particles as well as in Hatefi's NADH-Coenzyme Q reductase. The polyethers do not inhibit electron transport in mitochondria from the yeast which lack the first coupling site.

The inhibition of electron transport by the polyethers do not require of the addition of alkali metal cations such as K^+ in intact mitochondria or other membrane preparations.

It is established that the macrocyclic polyethers XXVIII and XXXI, already characterized as mobile carrier molecules for K^+ in model lipid membranes, inhibit electron transport at site I of the electron transport chain from mitochondrial membranes.

* Supported in part by a Grant from the Research Corporation.

† Permanent address: Departamento de Bioquímica Facultad de Medicina, Ciudad Universitaria, México 20, D. F.

It is suggested that the ability of the polyethers to coordinate alkali metal cations in aqueous versus lipid environments, but not K^+ transport *per se*, is related to their rotenone-like induced inhibition of electron flow in mitochondrial membranes.

Introduction

Previous observations by Pedersen [1, 2], Eisenman, Ciani and Szabo [3], Pressman [4] and Tosteson [5] have shown that macrocyclic polyethers XXVIII and XXXI (dibenzo, 18-crown-6 and dicyclohexyl, 18-crown-6 respectively), behave as K^+ -mobile carriers in lipid bilayers, erythrocyte membranes and two phase water-mock (water-bulk) lipid systems. Data by Lardy [6] have also shown that the macrocyclic polyethers synthesized by Pedersen [1] perturb the distribution of alkali metal cations and substrate oxidation in mitochondrial membranes.

The observations hereby presented indicate that the above macrocyclic polyethers specifically inhibit electron flow at the NADH-cytochrome segment of the mitochondrial respiratory chain. This inhibitory effect is exerted by the polyethers in intact mitochondria from rat liver and beef heart, in submitochondrial sonic particles, in Keilin-Hartree preparations and in Hatefi complex I (NADH-coenzyme Q reductase) from beef heart sarcosomes. The above results are evaluated with respect to the possible relation existent between K^+ transport, membrane K^+ requirements or cation complex-coordinates formed in the membrane and the ability of polyethers to inhibit electron flow at the NADH-cytochrome segment of the respiratory chain.

Materials and Methods

Membrane Preparations

Rat liver mitochondria were prepared as described by Johnson and Lardy [7]; beef heart sarcosomes were isolated as indicated by A. L. Smith [8]; yeast mitochondria from *S. cerevisiae* were prepared after Mattoon and Balcaavage [9]; submitochondrial sonic membrane fragments were isolated as described by Ch. T. Gregg [10]; The Keilin-Hartree heart muscle preparations were prepared as described by King [11] and NADH-coenzyme Q reductase (Complex I of the respiratory chain) was semi-purified as shown by Hatefi and Rieske [12].

Measurement of Ion Movements, Oxygen Consumption and Light Scattering Changes in Mitochondria

A continuous recording of oxygen consumption, light scattering changes and variations in the extramitochondrial concentration of K^+

INHIBITION OF MITOCHONDRIAL ELI

and protons was carried out developed and constructed by [13-15].

Measurement of Electron Trans.

The energy linked reduction shown by Lee and Ernster [activity was estimated as descri phosphorylation was assayed a ATPase activity was measure [18] and inorganic phosphate [19]. Protein was determined l

The macrocyclic polyethers from Dr. C. J. Pedersen, Dupo antibiotic nigericin was kindly Lilly laboratories.

Effect of Polyethers XXVIII a Oxidation in Intact Mitochond

A detailed study on the eff mitochondrial oxidative phos [6]. Such information showe caused an inhibition of glutan previously accumulated by chondria. Evidence describe the possible mechanism of t polyethers in mitochondria. P polyether XXVIII inhibits g induced efflux of K^+ p valinomycin into mitochong counter movement of protons organelles. Moreover, the at (menadiione) after the polye inhibited oxidation of glut stimulate a simultaneous up release of the accumulated glutamate is substituted by contrast, when glutamate is (Panel B, Fig. 1), polyether g either to inhibit oxygen upta K^+ movements. The addition

and protons was carried out by means of an apparatus designed, developed and constructed by Chance, Mayer, Pressman and Graham [13-15].

Measurement of Electron Transport Reactions and ATPase Activity

The energy linked reduction of NAD^+ by succinate was measured as shown by Lee and Ernster [16]. The NADH-coenzyme Q reductase activity was estimated as described by Hatefi and Rieske [12]. Oxidative phosphorylation was assayed as indicated by Chance and Williams [17]. ATPase activity was measured by the method of Lardy and Wellman [18] and inorganic phosphate was determined by the method of Sumner [19]. Protein was determined by the Biuret Method [20].

The macrocyclic polyethers XXVIII and XXXI were a generous gift from Dr. C. J. Pedersen, Dupont de Nemours Laboratory, Delaware. The antibiotic nigericin was kindly supplied by Dr. Marvin Gorman, The Eli Lilly laboratories.

Results

Effect of Polyethers XXVIII and XXXI on Ion Movements and Substrate Oxidation in Intact Mitochondria

A detailed study on the effect of different macrocyclic polyethers on mitochondrial oxidative phosphorylation has been published by Lardy [6]. Such information showed that both polyethers XXVIII and XXXI caused an inhibition of glutamate oxidation parallel to the efflux of K^+ previously accumulated by valinomycin-like ionophores into mitochondria. Evidence described in Fig. 1 provided the clue to understand the possible mechanism of the respiratory inhibition induced by the polyethers in mitochondria. Panel A from Fig. 1 shows that 5×10^{-5} M polyether XXVIII inhibits glutamate oxidation simultaneous to an induced efflux of K^+ previously accumulated by 2×10^{-7} M valinomycin into mitochondria. The polyether does not cause a counter-movement of protons parallel to the ejection of K^+ from the organelles. Moreover, the addition of 8×10^{-3} μmoles vitamin K_3 (menadione) after the polyether, not only completely overcomes the inhibited oxidation of glutamate but also allows valinomycin to stimulate a simultaneous uptake of K^+ . In turn, anaerobiosis causes release of the accumulated K^+ . Similar results are obtained when glutamate is substituted by α -ketoglutarate, L-malate or isocitrate. In contrast, when glutamate is replaced for by succinate in the medium (Panel B, Fig. 1), polyether XXVIII shows to be completely ineffective either to inhibit oxygen uptake or to reverse the valinomycin mediated K^+ movements. The addition of nigericin after the polyether catalyses a

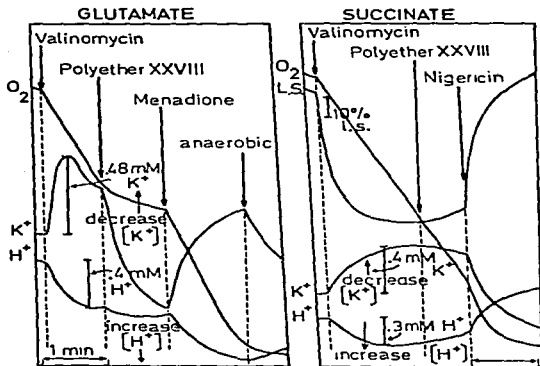


Figure 1. The effect of polyether XXVIII, menadione and nigericin on the oxidation of glutamate or succinate and the K^+ and H^+ movements respectively stimulated by valinomycin in intact mitochondria. The reaction mixture contained 5 mM KCl, 5 mM triethanolamine (TEA)-HCl (pH 7.4), 3 mM inorganic phosphate (TEA) pH 7.4, 220 mM sucrose, and 1.4 mg mitochondrial N in a 5 ml volume at 28°C. Valinomycin and polyether XXVIII were added at concentrations of 2×10^{-7} M and 5×10^{-5} M respectively; where indicated vitamin K₃ or menadione and nigericin were added at concentration of 8×10^{-3} μ moles and 1.4×10^{-6} M respectively. Panel A contained 10 mM glutamate (TEA) pH 7.4, and panel B 10 mM succinate (TEA) pH 7.4.

reversal of the K^+ and H^+ movements induced by valinomycin, and a discrete enhancement of succinate oxidation [21]. Almost identical negative inhibitory effects of the polyether are found when succinate is substituted by ascorbate plus TMPD. At a concentration of 5×10^{-5} M, polyether XXVIII does not affect the oxidative phosphorylation of glutamate (substrate from site I) [6], succinate (substrate from site II) [6], or ascorbate plus TMPD (substrate from site III) (0.9 P/O value without, and 0.83 with 5×10^{-5} M polyether XXVIII were found for the latter pair). Moreover, when ATP hydrolysis is used as energy source for alkali ion transport (Fig. 2), polyether XXVIII does not affect the oscillatory uptake of K^+ and the light scattering changes catalysed by valinomycin plus K^+ . The further addition of nigericin causes a rapid loss of the accumulated K^+ and a reversal of the light scattering decrease

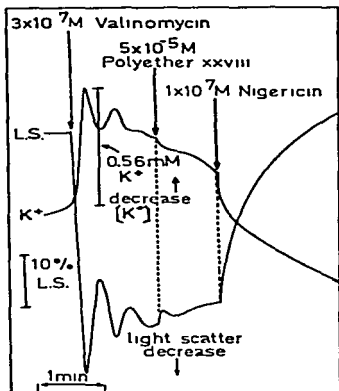


Figure 2. The effect of polyether XXVIII and nigericin on the ATP-energized K^+ movements and light scattering changes induced by valinomycin in intact mitochondria. The reaction mixture contained 5 mM KCl, 10 mM triethanolamine-HCl (pH 7.4), 200 mM sucrose 5 mM ATP-Tris (pH 7.4) and 1.2 mg mitochondrial N in 5 ml volume at 28° . Valinomycin, polyether XXVIII and nigericin were added at the indicated concentrations.

trace. In the presence of K^+ and at concentrations one or two orders of magnitude higher than 5×10^{-3} M, polyether XXVIII moderately uncouples the oxidative phosphorylation of succinate or ascorbate plus TMPD. At such concentrations, it also stimulates ATP hydrolysis in media containing alkali metal cations with the selectivity $K^+ > Rb^+ > Cs^+$. However, even at 10^{-3} M, the above compound does not inhibit succinate oxidation regardless of the addition of high concentrations of alkali metal ion. Thus, from the above results it is apparent that polyether XXVIII inhibits oxygen as well as K^+ uptake only when cation transport is energized by substrates oxidized at the level of the site I of the respiratory chain.

Dicyclohexyl, 18-crown, 6 (polyether XXXI) shows identical oxidizable substrate selectivity than dibenzo, 18-crown, 6 (polyether XXVIII) to inhibit oxygen uptake in intact mitochondria or submitochondrial membrane fragments. However, compound XXXI is

quantitatively less active than polyether XXVIII to inhibit glutamate oxidation. In fact the former compound moderately stimulates state IV respiration in the presence of succinate and K^+ even at concentrations (10^{-6} M) where polyether XXVIII shows negligible effects on succinate oxidation. The apparent valinomycin-like "uncoupling" effect [22] of polyether XXXI, may be related to its quantitatively greater ability, with respect to compound XXVIII, to transport K^+ across lipid bilayers of the Mueller-Rudin type [3]. Thus, because of the undesirable "uncoupling" effect of compound XXXI, polyether XXVIII was used in all experiments described below.

Effect of Different Anions and Cations on the Inhibition of Electron Transport by Polyethers in Intact Mitochondria

Figures 3-6 indicate that some of the cation chelating properties of polyether XXVIII [23] are related to its ability to inhibit substrate oxidation at site I of the electron transport chain. Similar to nigericin-like ionophores [24], the ionic selectivity of polyether XXVIII to inhibit oxygen uptake is dependent on the anion present in the medium (Fig. 3). The polyether does not show appreciable ionic discrimination to inhibit oxygen uptake in the presence of anions such as acetate or formate (lower tracing, Fig. 3); however, it clearly discriminates between K^+ and other alkali metal ions when inorganic orthophosphate is used as co-ion (upper tracing, Fig. 3). A previously postulated role of anions, as source of protons for facilitating the membrane exchange of alkali metal ions [24] could be the explanation for the above results. The oxygen uptake block mediated by the macrocyclic mobile carrier is also sensitive to the ionic gradients established across the mitochondrial membrane. As seen in Fig. 4, the increase in the concentration of extra-mitochondrial K^+ , gradually reverts the respiratory inhibition induced by the polyether at the NADH-cytochrome segment of the respiratory chain. Moreover, Fig. 5 illustrates that 20 mM CsCl and valinomycin overcome the polyether induced-inhibition of glutamate oxidation previously stimulated by 2,4-dinitrophenol in the absence of added alkali metals. Twenty mM of cations such as Li^+ or Na^+ do not replace for Cs^+ in the above effect.

Effects of Polyether XXVIII on Electron Transport at Site I of the Respiratory Chain in Submitochondrial Membrane Fractions

The above results suggested that the site-specific inhibition of respiration induced by the macrocyclic polyether was related with its ability to form coordination complexes with alkali metal ions in the membrane or with an induced transport of K^+ across the intact

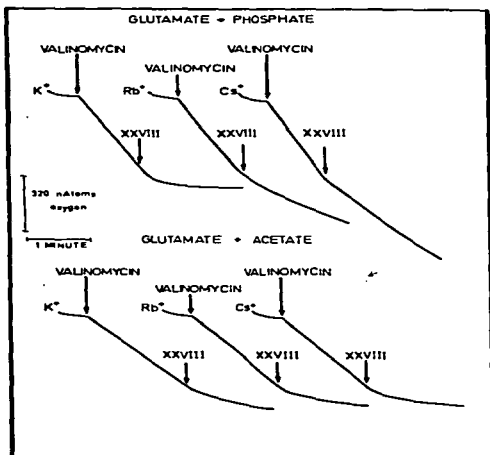


Figure 3. The effect of phosphate or acetate on the ionic selectivity of polyether XXVIII to inhibit the oxidation of glutamate stimulated by valinomycin in mitochondria. The reaction mixture contained 8 mM KCl, mM triethanolamine HCl, pH 7.4, 10 mM glutamate-(TEA) pH 7.4, 200 mM sucrose and 1.2 mg mitochondrial N. Valinomycin and polyether were added at concentrations of 2×10^{-7} M and 5×10^{-5} M respectively. Where indicated the TEA-salts of acetate or phosphate were present at a concentration of 5 mM.

mitochondrial membrane. The possibility that such inhibitory action could be directly exerted at the level of the electron transport mechanism in the respiratory chain was subsequently evaluated in different mitochondria membrane preparations. Figure 6 shows the inhibitory effect of polyether XXVIII on the oxidation of NADH by submitochondrial sonic particles. After the oxidation of NADH is coupled by oligomycin in these system [16] polyether XXXIV [1, 2] plus nigericin and K⁺ uncouple substrate oxidation [25, 26] and polyether XXVIII subsequently inhibits oxygen uptake (Panel A, Fig. 6). The reversed electron transfer energized by ATP from succinate to NAD⁺ is also inhibited by the macrocyclic polyether in submitochon-

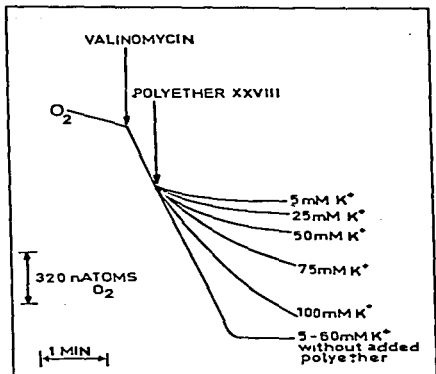


Figure 4. The reversal by increasing concentrations of KCl of the inhibition by polyether XXVIII of the oxidation of glutamate stimulated by valinomycin. The media was essentially the same to that described in Fig. 3 except for the addition of 5 mM phosphate as penetrant anion and the indicated concentrations of KCl.

drial sonic membrane fragments (Panel B, Fig. 6). Moreover, as shown in Table I, the oxidation of NADH occurring in Keilin-Hartree preparations and purified NADH Co Q reductase is also completely blocked by polyether XXVIII. It is also apparent that the respiratory chain inhibited by the polyether, catalyses an antimycin sensitive oxidation of vitamin K_3 [27] which bypasses the polyether inhibited site in intact mitochondria (Fig. 1A) as well as in mitochondrial membrane fragments (Table I).

*Effect of Polyether XXVIII on Electron Transport from Mitochondria of Yeast *S. cerevisiae**

In contrast with the above results, when polyether XXVIII is tested as an inhibitor of electron transport in mitochondria from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* which lack the first coupling site [28] and are insensitive to rotenone, it is observed that this preparation is also insensitive to the macrocyclic polyether (Panels A and B, Fig. 7).

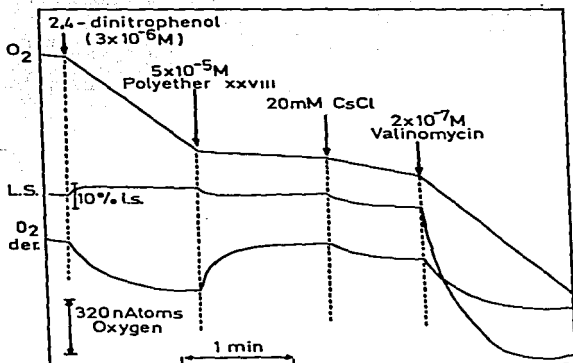


Figure 5. The reversal by Cs^+ plus valinomycin of the inhibition by polyether XXVIII of the mitochondrial oxidation of glutamate stimulated by 2,4-dinitrophenol, in medium initially lacking of added alkali ions. Except for the omission of KCl and the addition of 10 mM acetate instead of phosphate, as well as that of 15 mM choline-chloride the basic medium was essentially that from Fig. 3. Other additions were supplemented at the described concentrations.

Discussion

Macrocyclic polyethers XXVIII and XXXI appear as very interesting model compounds. Not only they complex and transport alkali metal cations through hydrophobic interfaces [1, 3-6, 29, 30] but, as shown in this work, they also inhibit electron flow at the NADH-cytochrome segment of the mitochondrial respiratory chain. The central question arising from this phenomenology is whether the above effects are: (a) circumstantially associated but completely unrelated in their respective mechanism, or (b) mechanistically related. The latter possibility seems to be very appealing as a working hypothesis. By analogy with nigericin, which may be considered as an example of a mobile carrier [21], it is apparent that polyether XXVIII inhibits electron flow, in intact mitochondria studies, associated with its ability to form coordination complexes with alkali metal cations. Similar to nigericin [15, 31], the oxygen uptake block catalysed by the polyether is reverted in intact mitochondria by the increase in the concentration of K^+ in the presence

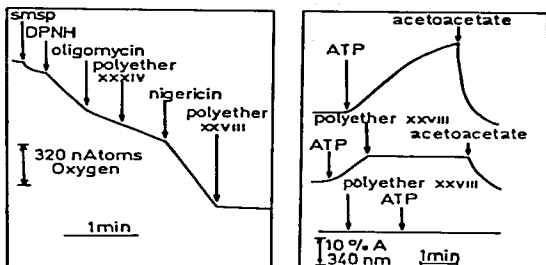


Figure 6. The inhibition by polyether XXVIII of the oxidation of NADH (Panel A) and the reversed electron transfer energized by ATP from succinate to NAD⁺ (Panel B) in submitochondrial sonic particles. The reaction mixture from panel A contained: 15 mM KCl, 50 mM Tris-acetate (pH 7.4), 1.5 mM NADH, 1.0 μ g/ml oligomycin, 8×10^{-6} M polyether XXXIV, 2.3×10^{-7} M nigericin, 5×10^{-5} M polyether XXVIII and beef heart submitochondrial sonic particles equivalent to 1.5 Mg N in a 3.0 ml volume at 25°. The media from panel B contained 20 mM Tris HCl pH 8.0; 4 mM MgCl₂; 0.25 sucrose, 1 mM KCN, 1 mM ATP and approximately 0.65 mg mitochondrial protein. The reaction was initiated by the addition of 10 mM succinate and 1.5 mM DNP.

of valinomycin, as well as by the possible competition induced for transport or complex formation between Cs⁺ and K⁺ (Figs. 4-5) in hydrophobic versus aqueous environments (see McLaughlin *et al.*, [29]). Moreover, parallel also to nigericin [24], anion translocation regulates the ionic selectivity of the respiratory block induced by the polyethers (Fig. 3). The above observations possibly implicate that the translocation of the K⁺-polyether complex into the hydrophobic core of the membrane is dependent on the nature of the alkali metal cation present in the aqueous versus the hydrophobic environment, as well as on the distribution of cations, protons and anions across the membrane. Parallel to the above results, it is noteworthy that polyether XXVIII inhibits electron flow through an effect similar to that of rotenone. The fact that it inhibits the oxidation of NADH-linked substrates in intact mitochondria, without altering the phosphorylation and oxygen uptake linked to the oxidation of succinate or ascorbate plus TMPD, falls in this line. Also, in support to the above contention, is the observation that the polyether inhibits the reversal of electron transport coupled to NAD⁺ reduction (Fig. 6B) as well as the oxidation of NADH in sonic membrane fragments, Keilin-Hartree preparations and NADH-Co Q reductase

TABLE I. The effect of macrocyclic polyether XXVIII on the oxidation of NADH by different mitochondrial membrane preparations

Membrane preparation	Oxygen uptake rate		
	Without additions	Plus rotenone	Plus polyether XXVIII
	nAtoms O ₂ per min per 5 mg protein		
Submitochondrial sonic particles	405	0	20
Sonic particles plus menadione	400	396	403
EDTA sonic particles	380	42	80
Keilin-Hartree preparation	365	0	24
Hatefi complex I (NADH-Co Q reductase)*	350	0	0

The reaction mixture for assaying the oxidation of NADH in submitochondrial sonic particles and EDTA sonic particles was supplemented with 10 mM Tris-Cl⁻ pH 7.4, 250 mM sucrose, 1.5 mM NADH and approximately 2 mg N in 3 ml volume at 25°. Menadione was added at a concentration of 8×10^{-3} μ moles. NADH oxidation was assayed in the Keilin-Hartree preparation in a medium containing 20 mM KH₂PO₄ pH 7.8, 1.5 mM NADH, 9×10^{-6} M cytochrome *c*, 200 mM sucrose and 1.2 mg N in 3.0 ml volume. NADH oxidation was measured for the NADH-Co Q reductase preparation in a medium containing: 5 mM KH₂PO₄ pH 8.0, 5 mM Na₂S₂O₃, 5 mM Tris-Cl⁻ pH 8.0, 1 mM histidine (Cl⁻) pH 8.0, 1.5 mM NADH, 0.67 M sucrose 1.5 mg aolectin and 0.5 mg N of complex I in 1.0 ml volume. Rotenone and polyether XXVIII were added at 5×10^{-6} M and 5×10^{-4} M respectively.

* The activity of NADH-Co Q reductase is expressed in μ moles NADH oxidized/min/5 mg nitrogen.

(Fig. 6A and Table I), through and antimycin sensitive oxidation of vitamin K₃ which bypasses the polyether inhibited site.

Polyether XXVIII seems not to require of added alkali metal cations to inhibit electron transport in intact mitochondria or submitochondrial membrane fragments (Fig. 6, Table I). These data could lead to the wrong conclusion that K⁺ or any other metal ion is not involved in the mechanism of electron flow inhibition mediated by the polyethers. However, in contrast with this latter point of view, data to be published elsewhere (Cárabez and Estrada-O., in preparation) indicate that in mitochondria, and only in the presence of added alkali ions such as K⁺, but not Li⁺ or Na⁺, the polyether abates the fluorescence of ethidium bromide, a dye which monitors microscopic variation of charge surface in biological and model membranes [32, 33]. Rotenone reproduces the effects of polyethers XXVIII in the above parameter, without detectable K⁺ requirements.

The results hereby presented point toward three alternatives regarding the association existing between polyether-cation complex formation and/or K⁺ transport with respect to the flow of electrons at the NADH-cytochrome segment of the respiratory chain. Possibility (1)

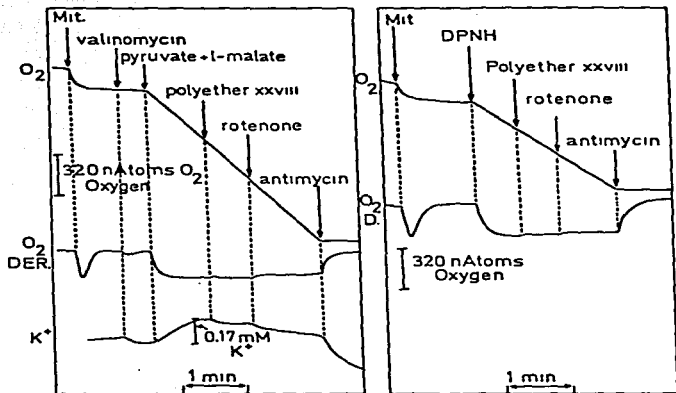


Figure 7. The effect of polyether XXVIII, rotenone and antimycin on the oxidation of pyruvate plus malate and K^+ movements induced by valinomycin as well as the oxidation of NADH by mitochondria from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The basic reaction mixture in both experiments was essentially that from Fig. 3. Other additions where indicated were: 2×10^{-7} M valinomycin 8 mM of both pyruvate and L-malate, 1 mM DPNH, 5×10^{-5} M polyether XXVIII, 2×10^{-6} M rotenone, 8×10^{-7} M antimycin and yeast mitochondria equivalent to 2.6 mg N in 5 ml volume at 20° .

implicates that the ability of the macrocyclic polyether to coordinate either an electron carrier bound K^+ in the membrane lipid phase, or iron in a hydrophobic environment in a non-heme iron protein, is associated to its induced electron transport block. The latter possibility has also been suggested for rotenone mode of action in the respiratory chain [34]. Possibility (2) would indicate that the transport and membrane accumulation of the K^+ -polyether complex could affect *per se* the operation of the NADH-cytochrome segment of the respiratory chain. The relatively high ability of this *locus* to microscopic variations in the physical properties of the membrane [35, 36], caused by the polyether- K^+ charged pair as well as by charged compounds such as the guanidines [37, 38], by Na^+ [39] or by lead ions [40], could be partly responsible for the effects observed. Possibility (3) implies that neither

K^+ is inextricably related with alkali ion requirements of the respiratory chain, nor with the intimate molecular mechanisms of the electron transport block mediated by macrocyclic polyethers. Instead, a given alkali metal cation would only be required for the proper solubility of the cation-polyether complex into the lipid phase and to its target site, at hydrophobic *loci* of the mitochondrial membrane. This hypothesis, which we strongly favour, implies that polyether XXVIII is sharing with rotenone a similar mechanism of respiratory inhibition and that the lipid versus the aqueous solvation of polyether XXVIII, is a function of the stability of the cation polyether complex in either phase, which depends on the nature of the chelated cation. In fact, the ionic selectivities of the aqueous association constants of polyether-cation complexes [29, 30, 41], are different from their permeability ratios determined from potential measurements in lipid bilayers [29]. Following this line it is possible that Cs^+ reverts the respiratory inhibition caused by the polyether in mitochondrial membranes (Fig. 5), by primarily removing this compound from its target site at the NADH-cytochrome segment of the respiratory chain.

A final consideration is worth noting in assessing the significance of the inhibition by neutral K^+ -coordinating compounds of electron transport sites in energy transducing membranes. Previous observations by Baltschefskey and Arwidsson [42] showed that valinomycin inhibited photophosphorylation at only one of two possible sites in the cyclic electron transport of chromatophores from *Rhodospirillum rubrum*. Gromet-Elhanan [43] has also found that valinomycin or nonactin inhibit various photophosphorylating and photoreducing systems of *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. Moreover, an inhibitory effect of valinomycin in ferricyanide reduction was observed by McCarthy [44] in chloroplasts and subchloroplast particles. Such inhibition was relieved by NH_4Cl . Moreover, similar to the macrocyclic polyethers in mitochondria, the inhibitory effect of valinomycin or nonactin in photophosphorylating membranes, was apparently independent of the presence of transportable ions such as K^+ [43]. We consider that it is more than a coincidence the parallelism existent between ionophores and electron transport in both membrane systems. Thus, similar alternatives to those suggested in the present manuscript concerning the inhibition of electron transport by macrocyclic polyethers in mitochondrial membranes, may also be considered to understand the inhibition of electron transport [43] by valinomycin or nonactin in photophosphorylating membranes.

References

1. C. J. Pedersen, *J. Amer. Chem. Soc.*, 89 (1967) 7017.
2. C. J. Pedersen, *Fed. Proc.*, 27 (1968) 1305.

3. G. Eisenman, S. M. Ciani and G. Szabo, *Fed. Proc.*, 27 (1968) 1289.
4. B. C. Pressman, *Fed. Proc.*, 27 (1968) 1283.
5. D. C. Tosteson, *Fed. Proc.*, 27 (1968) 1269.
6. H. A. Lardy, *Fed. Proc.*, 27 (1968) 1278.
7. D. Johnson and H. A. Lardy, *Meth. in Enzymol.* X (1967) 94.
8. A. L. Smith, *Meth. in Enzymol.*, X (1967) 81.
9. J. R. Mattoon and W. N. Balcavage, *Meth. in Enzymol.*, X (1967) 135.
10. Ch. T. Gregg, *Meth. in Enzymol.*, 10 (1967) 181.
11. T. E. King, *Meth. in Enzymol.*, X (1967) 202.
12. Y. Hatefi and J. S. Rieske, *Meth. in Enzymol.*, X (1967) 235.
13. B. C. Pressman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 53 (1965) 1076.
14. B. C. Pressman, *Meth. in Enzymol.*, X (1967) 714.
15. S. N. Graven, S. Estrada-O. and H. A. Lardy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 56 (1966) 654.
16. C. P. Lee and L. Ernster, in: *Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria* (J. M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello and E. C. Slater, Eds.), *Biochim. Biophys. Acta Library* 7 (1966) 218.
17. B. Chance and G. R. Williams, *Advanc. Enzymol.*, 17 (1956) 65.
18. H. A. Lardy and A. Wellman, *J. Biol. Chem.*, 201 (1953) 537.
19. J. B. Sumner, *Science*, 100 (1944) 413.
20. E. E. Jacobs, M. Jacob, D. R. Sanadi and L. B. Bradley, *J. Biol. Chem.*, 223 (1956) 147.
21. B. C. Pressman, E. J. Harris, W. S. Jagger and J. H. Johnson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 58 (1967) 1949.
22. E. J. Harris, M. Hoffer and B. C. Pressman, *Biochemistry (Wash.)*, 6 (1967) 1348.
23. G. Eisenman, G. Szabo, S. G. McLaughlin and S. M. Ciani, in: *Molecular Mechanisms of Antibiotic Action on Protein Biosynthesis and Membranes* (D. Vazquez, Ed.), Springer-Verlag (1971) in the press.
24. S. Estrada-O. and C. Gómez-Lojero, *J. Biol. Chem.*, 245 (1970) 5606.
25. M. Montal, B. Chance and C. P. Lee, *J. Membrane Biol.*, 2 (1970) 201.
26. R. S. Cockrell and E. Racker, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 35 (1969) 414.
27. T. E. Conover and L. Ernster, *Biochim. Biophys. Acta.*, 58 (1962) 189.
28. G. Schatz and E. Racker, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 22 (1966) 579.
29. S. G. A. McLaughlin, G. Szabo, G. Eisenman and S. M. Ciani, Abstracts, *14th Annual Meeting of the Biophysical Society*. (1970) Baltimore, Feb. 25, p. 96a.
30. H. K. Frensdorff, *J. Amer. Chem. Soc.*, 93 (1971) 3.
31. S. Estrada-O., S. N. Graven and H. A. Lardy, *J. Biol. Chem.*, 242 (1967) 2925.
32. C. Gitler, B. Rubalcava and A. Caswell, *Biochim. Biophys. Acta*, 193 (1969) 473.
33. S. Estrada-O., B. Rubalcava and C. Gitler, *J. Bioenergetics* (in preparation).
34. A. L. Tappel, *Biochem. Pharmacol.*, 3 (1960) 289.
35. P. Mitchell, in: *Chemiosmotic Coupling in Oxidative and Photosynthetic Phosphorylation*. (1966) Glynn Research Ltd. Bodmin, Cornwall, England.
36. P. Mitchell, in: *Chemiosmotic Coupling and Energy Transduction*. (1968) Glynn Research Ltd. Bodmin, Cornwall, England.
37. B. C. Pressman and J. K. Park, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 11 (1963) 182.
38. S. M. F. Ferguson, S. Estrada-O. and H. A. Lardy, *J. Biol. Chem.*, 246 (1971) 5645.
39. A. Gómez-Puyou, F. Sandoval, E. Pena, E. Chávez and M. Tuena, *J. Biol. Chem.*, 244 (1969) 5339.
40. A. R. Krall, T. T. Meng, S. J. Harmon and W. J. Dougherty, *Fed. Proc.*, 30 (II) (1971) 1357.

41. R. M. Izzat, J. H. Rytting, D. P. Nelson, B. L. Haymore and J. J. Christensen, *Science*, 164 (1969) 443.
42. H. Baltscheffsky and B. Arwidson, *Biochim. Biophys. Acta.*, 65 (1962) 425.
43. Z. Gromet-Elhanan, *Biochim. Biophys. Acta*, 223 (1970) 174.
44. R. E. McCarthy, *J. Biol. Chem.*, 244 (1969) 4292.

BBA 48151

ON THE MECHANISM OF ACTION OF POLYETHER XXVIII AT SITE I OF THE ELECTRON-TRANSFER CHAIN IN RAT LIVER MITOCHONDRIA

ALFONSO CARABEZ^a and FRANCISCA SANDOVAL^{b,*}

^a Centro de Investigaciones en Fisiología Celular Sección de Microscopía Electrónica and ^b Departamento de Bioquímica Facultad de Medicina, UNAM, Apartado postal 70-600, Mexico City 20 D.F. (Mexico)

(Received April 14th, 1981)

Key words: Polyether XXVIII; Electron transport inhibition; K⁺ requirement; Respiratory chain; (Rat liver mitochondria)

In rat liver mitochondria, the macrocyclic polyether, dibenzo-18-crown-6 (polyether XXVIII) inhibits the oxidation of NAD-dependent substrates, as stimulated by ADP, uncouplers and valinomycin plus K⁺. It does not inhibit the oxidation of succinate. It is concluded that polyether XXVIII inhibits electron transfer in the NADH-CoQ span of the respiratory chain. This is a process that is reversed by menadione. Inhibition of oxidation of NAD-dependent substrates in K⁺-depleted mitochondria induced by the polyether is reversed by concentrations of K⁺ higher than 60 mM, and also by Li⁺, a cation that does not complex with polyether XXVIII. As assayed by swelling mitochondria, reversal of the inhibition of electron transfer is accompanied by influx of monovalent cations. Polyether XXVIII also inhibits in submitochondrial particles the aerobic oxidation of NADH, but not that of succinate; this inhibition is also reversed by K⁺ at high concentrations, and Li⁺. The data are consistent with the hypothesis that a monovalent cation is required for maximal rates of electron transport in the NADH-CoQ span of the respiratory chain.

Introduction

It has been reported [1,2] that polyether XXVIII inhibits the coupled oxidation of NAD-dependent substrates in intact rat liver mitochondria. It also inhibits NADH oxidation in yeast mitochondria, submitochondrial particles, Keilin-Hartree preparations, and in complex I of Hatefi [3,4]. As polyether XXVIII forms clathrates with K⁺, Rb⁺ and Cs⁺, but not with Li⁺, in cell-free systems [5], it is probable that the afore-mentioned inhibition of respiration is a consequence of this property. In this work, this possibility has been explored, particularly since it has been reported that alkali metal ions are required for maximal rates of electron transport in the NADH-

CoQ segment of the respiratory chain [6-8].

The stimulation of NADH oxidation by monovalent cations has been ascribed to their effect on the surface charge of the membrane which in turn modifies the affinity of the enzyme towards the negatively charged substrate [7]. However, this explanation is not entirely satisfactory, since positively charged lipophilic cations, which in principle would seem to exert a similar effect on the surface charge of the membrane, do not stimulate, but instead induce strong inhibition of the oxidation of NAD-dependent substrates in intact mitochondria [9,10] and NADH in submitochondrial particles [11]. The apparent controversy could indicate that in addition to modifications of the membrane surface charge, electron transport in the respiratory chain somehow depends on the presence of a monovalent cation. This has been studied by measuring the characteristics of the action of polyether XXVIII on electron transport. The results indicate that polyether XXVIII inhibits the

* To whom correspondence should be addressed.
Abbreviations: polyether XXVIII, dibenzo-18-crown-6; 1799, hexafluoroacetone; acetone 2:1 adduct; menadione, 2-methylnaphthoquinone.

oxidation of NADH by chelation of a membrane-bound cation that is required for maximal rates of electron transport in the NADH-CoQ span of the respiratory chain.

Materials and Methods

Rat liver mitochondria were prepared according to the method of Schneider and Hogeboom [12] in 0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, adjusted to pH 7.4 with Tris base. K^+ -depleted mitochondria were prepared as described by Gómez Puyou et al. [6]. The K^+ content of the latter preparations was less than 15 nmol/mg protein, as determined by flame photometry in perchloric acid extracts (10% final concentration) of the mitochondrial preparation.

Oxygen uptake was measured polarographically using the conditions described in Results in a Yellow Springs Oxygraph (model 55). Rat liver EDTA/submitochondrial particles were obtained as described by Lee et al. [13]. The K^+ content of these particles was 8 nmol/mg protein. Swelling of the mitochondria was recorded spectrophotometrically at 546 nm under the conditions described in Results. Protein was assayed by the biuret method [14].

Polyether XXVIII was kindly supplied by Dr. Frensdorf from E.I. DuPont de Nemours (Willington, Delaware, U.S.A.) and recrystallized twice from ethanol/water (2 : 1, v/v). The uncoupler 1799 was a generous gift of Dr. E. Racker, Cornell University. All reagents used were of the highest purity commercially available.

Results

In agreement with previous reports [1,2], the results of Fig. 1A show that polyether XXVIII inhibits the ADP-stimulated oxygen uptake with β -hydroxybutyrate as substrate. Inhibition of respiration is also observed when it is stimulated by valinomycin or by uncouplers of oxidative phosphorylation with glutamate plus malate as substrates (Fig. 1B and C). In contrast, polyether XXVIII does not inhibit the oxidation of succinate as stimulated by ADP (or by uncouplers or by valinomycin + K^+ , data not shown), rather a moderate enhancement of respiration is attained (Fig. 1D). These observations therefore suggest that polyether XXVIII interferes with

processes that occur on the substrate side of cytochrome b.

One of the most obvious characteristics of polyether XXVIII is its ability to chelate K^+ [2,5]. Since influx of certain NAD-dependent substrates is apparently linked to the influx of K^+ [15,16], the inhibiting action of the polyether could be due to an impairment in the entrance of the substrate. However, this does not seem to be the explanation for the observed inhibition of respiration, since menadione reverses the action of polyether XXVIII (Fig. 2), and because inhibition is also observed in the presence of β -hydroxybutyrate (Fig. 1A). Rather, the data seem to suggest that polyether XXVIII affects electron transport in the NADH-CoQ span of the respiratory chain.

As it has been reported that K^+ is required for maximum rates of electron transport and phosphorylation [4,6,8,17], it was considered that the inhibiting action of the polyether XXVIII could be due to removal of intramitochondrial K^+ which could be required for maximal rates of NADH oxidation. The results of Fig. 3 indicate that the extensive swelling that occurs in the presence of valinomycin + K^+ and oxidizable substrates is reversed by the addition of polyether XXVIII. The partial release of accumulated intramitochondrial K^+ as mediated by valinomycin and K^+ parallels inhibition of respiration (cf. data of Figs. 2B and 3). Although the results may be consistent with the idea that polyether XXVIII induces release of cations and subsequent arrest of electron transport, it is equally possible that release of intramitochondrial K^+ is a consequence and not the cause of inhibition of electron transport.

To explore further this possible action of polyether XXVIII, its effect on the oxidation of NAD-dependent substrates by K^+ -depleted mitochondria was tested. The results of Fig. 4A show that in mitochondria incubated with 7.5 mM K^+ and valinomycin, polyether XXVIII exerts a strong inhibition of respiration. However, if the mitochondria are incubated with Li^+ , which under the experimental conditions employed induces stimulation of respiration (Fig. 4B), the inhibiting effect of the polyether is only 20% as compared to that obtained in the presence of K^+ . Moreover, Li^+ reverses the inhibiting action of the polyether (Fig. 4C).

Thus, these experiments suggest that formation of

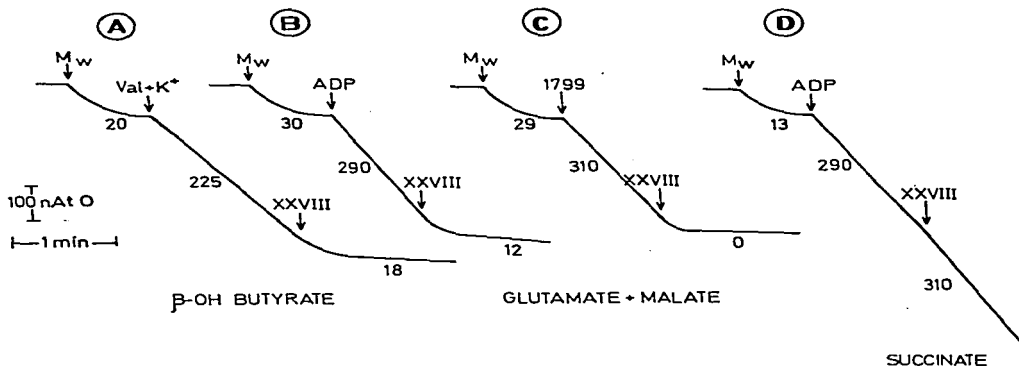


Fig. 1. Inhibitory effect of polyether XXVIII on mitochondrial respiration induced by different compounds in the presence of NAD-dependent substrates and succinate. The basic incubation media contained: 250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 4 mM phosphate buffer, which had been neutralized with Na^+ , 1 mM $MgCl_2$, 6 mM KCl, 3 mM oxidizable substrates, and 3 mg mitochondrial protein in a final volume of 3.0 ml. Where indicated, 66 μg polyether XXVIII/mg protein, 0.9 μg valinomycin (Val), 0.8 mM ADP, and 3 μg 1799 were added. With succinate as substrate 3 mM ADP was added. The numbers on the trace indicate ngatoms (nAt) O/min. M_w , washed mitochondria.

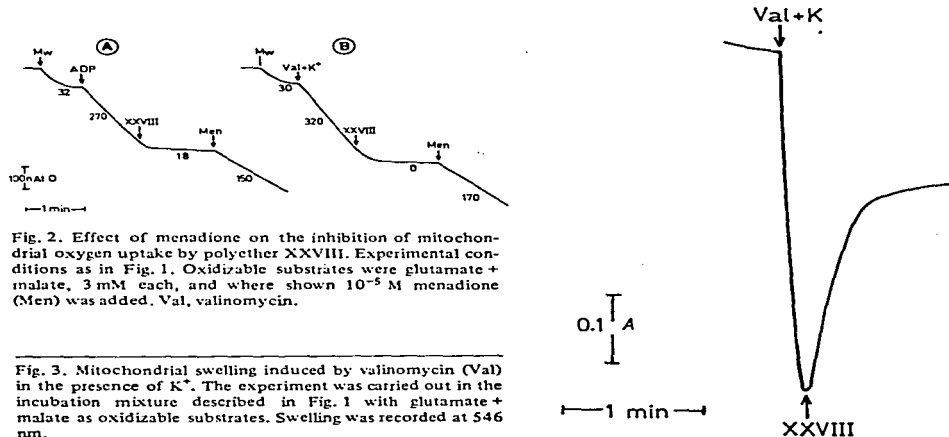


Fig. 2. Effect of menadione on the inhibition of mitochondrial oxygen uptake by polyether XXVIII. Experimental conditions as in Fig. 1. Oxidizable substrates were glutamate + malate, 3 mM each, and where shown 10^{-5} M menadione (Men) was added. Val, valinomycin.

Fig. 3. Mitochondrial swelling induced by valinomycin (Val) in the presence of K^+ . The experiment was carried out in the incubation mixture described in Fig. 1 with glutamate + malate as oxidizable substrates. Swelling was recorded at 546 nm.

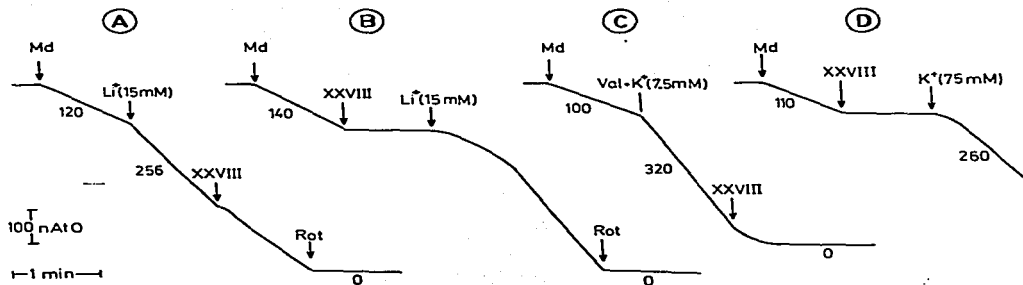


Fig. 4. Effect of polyether XXVIII on the aerobic oxidation of glutamate + malate by K^+ -depleted mitochondria. The K^+ content of the mitochondrial preparation was 17 nmol/mg. The incubation conditions were as in Fig. 1 except that K^+ was omitted from the incubation mixture. Additions of polyether XXVIII, and valinomycin (Val) were also as in Fig. 1. Rotenone (Rot) (0.3 μ g/ml) was also added to compare its effect with that of polyether XXVIII. Li^+ and K^+ were added at the indicated concentrations. Md, K^+ -depleted mitochondria.

polyether XXVIII-metal ion complexes results in inhibition of electron transfer. In the presence of Li^+ , which does not form complexes with polyether XXVIII [2,5], hardly any inhibition of respiration is observed. Moreover, the reversal of the inhibition of respiration by Li^+ further suggests that electron transfer in the NADH-CoQ span of the respiratory chain depends on the presence of monovalent cations, a conclusion that is further supported by the observation (Fig. 4D) that the inhibition of electron transport is also reversed by increasing the concentration of K^+ to 75 mM. Fig. 5 shows that under conditions in which high concentrations of K^+ induce reversal of the polyether XXVIII-induced inhibition of electron transport, extensive influx of cations takes place.

The action of polyether XXVIII was also studied by examining its effect on the aerobic oxidation of NADH by submitochondrial particles. As shown in Fig. 6, polyether XXVIII induces significant inhibition of the aerobic oxidation of NADH through a process that is released by Li^+ (trace A). If the respiration is stimulated by 7 mM K^+ (trace B), polyether XXVIII induces a marked decrease in the respiration rate. In contrast, trace C shows that preincubation of submitochondrial particles with polyether XXVIII diminishes the aerobic oxidation of NADH, and that

this inhibition is released by 60 mM K^+ . Polyether XXVIII does not affect the aerobic oxidation of succinate (Fig. 6D) in agreement with the data in whole mitochondria.

The afore-mentioned observations strongly suggest that the chelation of an internal metal ion (K^+ in all probability) by polyether XXVIII induces inhibition of electron transport. However, the possibility exists that it is the metal ion complex of polyether XXVIII

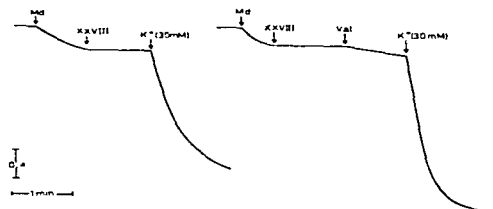


Fig. 5. Mitochondrial swelling of K^+ -depleted mitochondria. Incubation conditions as in Fig. 3, except that K^+ -depleted mitochondria were employed. The substrate was glutamate + malate. Other additions as shown. Val, valinomycin; Md, K^+ -depleted mitochondria.

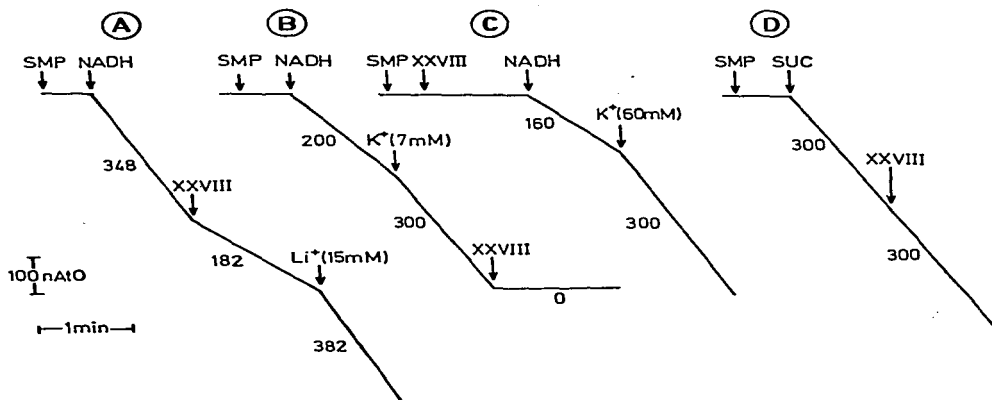


Fig. 6. Effect of polyether XXVIII on the oxidation of NADH by submitochondrial particles (SMP). The incubation mixture contained 250 mM sucrose, 1 mM EDTA adjusted to pH 7.4 with Tris base and 1.5 mg particle protein. Respiration was initiated by 0.75 mM NADH. Final volume 3.0 ml. K^+ or Li^+ was added where shown at the indicated concentrations. Polyether XXVIII was added (where shown) at 30 μ g/mg protein. Trace D contained 3.3 mM succinate (SUC) instead of NADH.

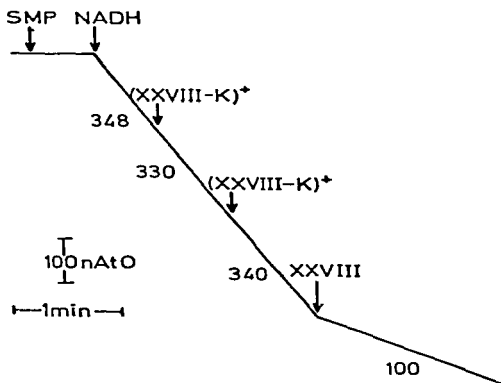


Fig. 7. Effect of polyether XXVIII- K^+ complex on the oxidation of NADH by submitochondrial particles (SMP). The con-

ditions were as in Fig. 6. Polyether XXVIII- K^+ complex was added at each of the times shown at a concentration of 25 μ g/mg. The polyether XXVIII- K^+ complex was prepared by suspending 20 mg of the free polyether in 1 ml of water. To the suspension a saturated solution of KCl was added dropwise until most of the crystals dissolved. The solution was filtered through a Millipore filter (0.45 μ m). The concentration of the polyether in the filtrate was determined by measuring the absorbance at 275 and 280 nm. The concentration found was 9 mg polyether/ml solution. Free polyether XXVIII was added at a concentration of 30 μ g/mg.

which is the species active in the inhibition of electron transport. Fig. 7 shows that a previously formed (polyether XXVIII- K^+) complex has no effect on the aerobic oxidation of NADH by submitochondrial particles, while free polyether XXVIII does inhibit oxygen uptake in particles previously exposed to the polyether XXVIII- K^+ complex. Thus, it would appear that the chelation of a metal ion is the factor that induces inhibition of electron transport.

ditions were as in Fig. 6. Polyether XXVIII- K^+ complex was added at each of the times shown at a concentration of 25 μ g/mg. The polyether XXVIII- K^+ complex was prepared by suspending 20 mg of the free polyether in 1 ml of water. To the suspension a saturated solution of KCl was added dropwise until most of the crystals dissolved. The solution was filtered through a Millipore filter (0.45 μ m). The concentration of the polyether in the filtrate was determined by measuring the absorbance at 275 and 280 nm. The concentration found was 9 mg polyether/ml solution. Free polyether XXVIII was added at a concentration of 30 μ g/mg.

Discussion

Polyether XXVIII is a molecule that forms clathrates with K^+ , Rb^+ and Cs^+ , but not with Li^+ [2,5]; it also induces the translocation of metal ions across biological and model membranes [18,19]. In mitochondria polyether XXVIII has been reported to inhibit electron transport. In agreement with the latter findings, it is now shown that polyether XXVIII inhibits in mitochondria the oxidation of NAD-dependent substrates as stimulated by ADP, ionophores and uncouplers, as well as the oxidation of NADH by submitochondrial particles. On the other hand, polyether XXVIII does not exert a detrimental affect on electron transfer in the cytochrome *b* to oxygen segment of the respiration chain in both intact mitochondria and submitochondrial particles.

The inhibition of electron transfer in the NADH-CoQ span of the respiratory chain by polyether XXVIII differs from that induced by rotenone [20] and piericidin [21], since the data presented show that the inhibiting action of polyether XXVIII is highly dependent on the ionic composition of the incubation mixture. Indeed, the results presently described indicate that the inhibiting action of polyether XXVIII is reversed by relatively high concentrations of K^+ , or by Li^+ at lower concentrations, characteristics that are not shared by rotenone or piericidin. The possibility that the polyether XXVIII-metal ion complex induces inhibition of electron transport may be ruled out by the lack of effect of the polyether XXVIII- K^+ complex on the aerobic oxidation of NADH by submitochondrial particles. Also, the alternative possibility that it is the free form of the polyether that induces arrest of electron transport may be discarded, since in the presence of Li^+ (which does not form complexes with crown XXVIII [5]) no inhibition of respiration is observed. Thus, it is logical to conclude that the inhibition of electron transport depends on the presence of a mitochondrial metal ion that may be chelated by polyether XXVIII and also, that a metal ion is required for maximal rates of electron transfer in the NADH-CoQ span of the respiratory chain.

It has been reported that maximal rates of electron transport in the NADH-CoQ segment may be induced by K^+ and other monovalent cations [6,817]. This effect of metal ions has been explained by their modi-

fication of the surface charge of the membrane [7]. However, if the latter idea is entirely correct, it would be expected that the neutralization of the negative charges of the membrane by other positively charged molecules would induce maximal rates of electron transfer. This is not true, since certain lipophilic cations, such as the alkylguanidines which modify the surface charge of the membrane [22-24], induce a strong inhibition of electron transfer in the NADH-CoQ span of the respiratory chain in whole mitochondria [10]. Thus, although part of the favorable effect of monovalent cations on electron transfer is certainly due to modification of the surface charge [7], it is very likely that monovalent cations affect other parameters involved in electron transport.

The present findings can be satisfactorily explained by assuming the existence of sites occupied by monovalent cations in the NADH-CoQ segment of the respiratory chain. The removal or chelation of these cations by polyether XXVIII (K^+ in all probability) would induce inhibition of electron transfer. This site can apparently be occupied by a number of cations; under our experimental conditions, the existence of this site becomes apparent from the lack of an inhibitory effect of polyether XXVIII on electron transfer in whole mitochondria, or submitochondrial particles incubated with Li^+ . Moreover, Li^+ very effectively reverses the inhibiting action of polyether XXVIII, apparently by replacing the cation that had been removed by polyether XXVIII.

Acknowledgements

We want to express our thanks to Drs. Armando Gómez Puyou and Antonio Peña for many helpful discussions and criticism of the manuscript. We also are indebted to Analine Morales Soto for her expert secretarial assistance. Part of the experimental work was supported partially by CONACyT, PNCB-209. This work was carried out with the technical assistance of Jorge Sepulveda.

References

- 1 Estrada-O, S. and Cárabez, T.A. (1972) *Bioenergetics* 3, 429-443
- 2 Lardy, H. (1968) *Fed. Proc.* 27, 1278-1282
- 3 King, T.E. (1967) *Methods Enzymol.* 10, 202-208

- 4 Hatefi, Y. and Rieske, J.S. (1967) *Methods Enzymol.* 10, 235-239
- 5 Pedersen, C.J. (1968) *Fed. Proc.* 27, 1305-1309
- 6 Gómez Puyou, A., Sandoval, F., Peña, A., Chávez, E. and Tuena de Gómez Puyou, M. (1972) *Biochemistry* 11, 97-102
- 7 Nalecz, M.J. and Wojtezak, L. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80, 681-689
- 8 Lotina, B., Tuena de Gómez Puyou, M. and Gómez Puyou, A. (1973) *Arch. Biochem. Biophys.* 159, 520-527
- 9 Hollunger, G. (1955) *Acta Pharmacol. Toxicol.* 11, Suppl. 1
- 10 Pressman, B.C. (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 401-409
- 11 Gómez-Puyou, A., Sandoval, F., Tuena de Gómez-Puyou, M., Chávez, E. and Pinto, E. (1972) *Bioenergetics* 3, 221-233
- 12 Schneider, W.C. and Hogeboom, G.H. (1950) *J. Biol. Chem.* 183, 123-127
- 13 Lee, C.P., Azzone, G.F. and Ernster, L. (1964) *Nature* 201, 152-159
- 14 Layne, E. (1957) *Methods Enzymol.* 3, 450-451
- 15 Lynn, W.J. and Brown, R.H. (1966) *Arch. Biochem. Biophys.* 114, 260-268
- 16 Gamble, J.L. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 323, 240-246
- 17 Pressman, B.C. and Lardy, H.A. (1955) *Biochim. Biophys. Acta* 18, 482-487
- 18 Frensdorff, H.K. (1971) *J. Am. Chem. Soc.* 93, 3-15
- 19 Eisenman, G., Ciani, S.M. and Szabo, G. (1968) *Fed. Proc.* 27, 1289-1304
- 20 Ernster, L., Dallner, G. and Azzone, G.F. (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 1124-1131
- 21 Hall, C., Wu, M., Crane, F.L., Takahashi, H., Tamura, S. and Folkers, K. (1966) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 25, 373-377
- 22 Schafer, G. and Bojanowsky, D. (1972) *Eur. J. Biochem.* 27, 364-369
- 23 Schafer, G. (1974) *Eur. J. Biochem.* 45, 57-62
- 24 Schafer, G. and Rieger, E. (1974) *Eur. J. Biochem.* 46, 613-619

PEREZONE A SESQUITERPENIC BENZOQUINONE, AN INHIBITOR OF THE
MITOCHONDRIAL ELECTRON TRANSPORT CHAIN.

ALFONSO CARABEZ* AND FRANCISCA SANDOVAL

Centro de Investigaciones en Fisiología Celular
Departamento de Bioenergética
Apdo. Postal 70-600, México 04510, México.

RUNNING TITLE: Perezone as Inhibitor of the Mitochondrial
Electron Transport.

*To whom correspondence should be sent.

ABSTRACT

Perezone (2-(1,5-Dimethyl-4-hexenyl)-3-hydroxymethyl-p-benzoquinone), a sesquiterpenic benzoquinone isolated from roots of plants of the genus *Perezia* shows oxidoreduction characteristics that suggest that the compound can be used for studies of the electron transfer chain of rat liver mitochondria.

Perezone inhibits electron transport in the mitochondrial respiration through a process different from that induced by rotenone, amital or antimycin A. The inhibiting action of perezone is temperature dependent, the 80-90% inhibition at 20°C decreases progressively as the temperature increases. At 35°C perezone fails to inhibit respiration

In addition to its inhibiting effect on electron transport, perezone can act as an electron donor and acceptor, as shown by the ability of the compound to act similarly to naphthoquinone in a reaction center preparation. Most likely perezone acts as an "electron sink" which results in inhibition of electron transport.

INTRODUCTION

Quinones have a wide distribution among nature, and many of them are clinically important as antitumoral drugs (1) and some have been proved to be important tools for in the study of some cellular functions as they form an important group of molecules that act as substrates for flavoenzymes. They can undergo a two electron reduction with the possibility of forming a semiquinone radical (2). The antitumoral and cytotoxic activities of some of these compounds are believed to be mediated by one electron reduction mechanism (3). In this case the quinones are reduced to an intermediate state, the semiquinone free radical superoxide (O_2^-) with the subsequent regeneration of the quinone (4).

Quinones also play an important role in the redox cycles catalyzed by flavoenzymes. In an artificial system, the reduction of quinones produces high amounts of the free radical superoxide and also the reduction of pyridine nucleotides. A possible consequence of the reaction is lipid peroxidation (5).

Perezone is a sesquiterpenic benzoquinone, originally isolated from roots of plants of the genus *Perezia* by Rio de la Loza (6). The structure as established by NMR studies (7) is shown in Figure 1. Due to its structural properties perezone may affect electron transfer, thus it was decided to explore its possible effects on some physiological functions that depend on redox phenomena, as these could be related to its pharmacological action (8). This manuscript describes the effects of Perezone on some mitochondrial functions. The experimental findings reported indicate that this compound modifies the oxido/reduction processes of the electron transfer chain. The mechanism by which this compound apparently exerts its

effects seems to be related to its chemical characteristics as quinone. In fact, Perezone possesses a dissociable -OH group, with an apparent pK of 6.95, which seems to play an important role in the mechanism of action of Perezone.

MATERIALS AND METHODS

Rat liver mitochondria were prepared according to the method of Schneider and Hogeboom (9) in 0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, adjusted to pH 7.4 with Tris base.

Oxygen uptake was measured polarographically using the conditions described under Results in a Yellow Springs Oxygraph (Model 55).

Reaction centers were prepared from Rhodopseudomonas sphaeroides (R-26) according to the method of Clayton and Wang (10) and were gift from Dr. H. Celis of this University.

Perezone was extracted and purified by E. García and V. Mendoza from the Chemistry Department of the School of Pharmacobiology at the U.M.S.N.H. Uncoupler 1799 was a gift of Dr. E. Racker at Cornell University. All reagents were of the highest purity available.

RESULTS

Perezone inhibits mitochondrial respiration as stimulated by ADP, valinomycin, gramicidin and 1799 with glutamate-malate and succinate as oxidizable substrates (figure 2). To further characterize the observed inhibition and due to the fact that Perezone has a dissociable -OH group at the quinone ring, its inhibitory action was analyzed. At low pH the inhibition is higher than that observed at alkaline pH (Figure 3A). The dependence of the inhibition on pH could be explained if it is taken into account that the titration of a solution of Perezone with NaOH shows a pKa at pH 6.95 (Figure 3B). At pH above its pK Perezone would be largely in dissociated form, which could diminish the partition coefficient of Perezone into the mitochondrial membrane, and thus a lower inhibiting action.

The effect of Perezone on the valinomycin stimulated oxygen uptake is critically dependent on the temperature of incubation (Figure 4). At 4° C in which respiratory rates are low, Perezone does not affect the rate of respiration. As the temperature of the incubation mixture is gradually increased up to 25°C, the rate of the valinomycin stimulated respiration augments. In the temperature range of 4°C to 25°C in the presence of valinomycin and Perezone the rate of respiration remains more or less constant at approximately $16 \text{ natoms min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. However at an incubation temperature of 35°C, Perezone hardly affects the valinomycin stimulated respiration as a result of a dramatic increase in the rate of respiration of mitochondria incubated with valinomycin and Perezone (see inset Fig. 4). This observation suggests that the overall kinetics of electron transport in mitochondria may undergo drastic changes between 25°C and 35°C.

As the inhibitory action of Perezone on electron transport could be related to its redox properties, the oxido/reduction potential of the Perezone molecule was determined at pH 7.1 by a combination of spectrophotometrically and potentiometric methods. Oxidation of the compound was induced by increasing amounts of ferricyanide added to the solution of Perezone previously reduced by dithionite (Figure 5). From the data obtained a redox value of +480 mV for Perezone was calculated. A plot of the redox potential versus the oxidation-reduction ratio revealed two slopes which may correspond to a one and a two-electron reduction of Perezone.

To test the possible electron transfer capacity of Perezone in a biological system, a reaction center preparation isolated from Rhodospseudomonas sphaeroides was used. It was found that in this system Perezone may act as an efficient electron acceptor. For comparison data with naphthoquinone, the electron acceptor that is commonly used in these preparation (11), are also included (Figure 6). In relation to the experimental results, it is interesting that with glutamate+malate as oxidizable substrate, menadione partially reverse the inhibiting action of Perezone. Menadione added before Perezone diminishes its inhibiting effect (Figure 7). Indeed in the presence of menadione, Perezone decreases the rate of valinomycin stimulated respiration to 47 natoms $O \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, a rate almost three times higher than that observed in the absence of menadione (see Figure 2). Essentially the same results are observed if menadione is added to the Perezone inhibited respiration (not shown).

All the preceding observations are consistent with the idea that Perezone acts as an analogue of endogenous quinones, that may mediate electron transport, but at lower rates. Thus Perezone may be an electron transfer buffer which induces a diminution of electron transport. In fact, Perezone

induces electron transport in rotenone and amytal poisoned mitochondria to a rate essentially similar to that at which maximal inhibition of respiration is induced by Perezone (Figure 8).

DISCUSSION

As determined in the present work, Perezone a sesquiterpenic benzoquinone shows a mid redox potential of +480 mV. It induces inhibition of the mitochondrial respiratory activity with NAD- dependent and succinate as oxidizable substrates, regardless of whether it is stimulated by ADP phosphorylation or by uncouplers. This indicates that Perezone acts on electron transfer notwithstanding other possible effects on mitochondrial functions, noteworthy is that to attain full inhibition of respiration, concentrations of Perezone higher than 250 uM are required. To explain the mechanism of action of Perezone in mitochondrial respiration, two observations should be considered. The first is that Perezone inhibits the oxidation of glutamate+malate at concentrations which also increased the respiration of rotenone inhibited oxygen uptake. The second is that Perezone mediates electron transfer, as evidenced by the ability of the compound to transfer electrons from the reaction center preparation of Rhodospseudomonas sphaeroides to cytochrome C.

Therefore we believe that in the mitochondrial membrane, Perezone may act as an acceptor and donor of electrons, but at rates significantly lower than those of the endogenous quinones. Thus electron transfer would be drastically inhibited by Perezone. In contrast, in conditions in which reduction of endogenous quinones is largely diminished (as occurs in the presence of rotenone), the electron transfer properties of Perezone become.

The data obtained with Perezone can thus be explained if at temperatures below 25°C the rate limiting step of respiration is limited by endogenous quinone oxido-reduction, and thus a further limitation of electron transfer as induced by Perezone would induce a drastic diminution of oxygen uptake.

On the other hand at 37°C overall electron transfer would be limited at another step and thus Perezone would have little or no effect on respiration. However this suggestion requires further experimental elaboration.

In view of the hitherto described effects of Perezone on electron transfer, several questions may arise as to why roots of plants of the genus *Perezia* possess unusually high concentrations of Perezone i.e. it has been reported (12) that from a kilogram of dry roots 4.2 g of Perezone crystals may be obtained. This suggests that electron transfer of these plants may present unusual characteristic features.

REFERENCES

- 1.- Driscoll, J.S., Hazard, G.F., Wood, H.B., and Goldin, R. (1974) *Cancer. Chemoter. Rep. Part 2*, 4, 1-362.
- 2.- Iyanagi, T., and Yamazaki, I. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 216, 282-294
- 3.- Bachur, N., Gordon, S.L., and Gee, M.V. (1978) *Cancer Res.* 38, 1745-1750.
- 4.- Patel, K.B., and Wilson, R.L. (1973) *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 69, 814-825.
- 5.- Smith, M.T., Thor, H., and Orrenius, S. (1982) in: *Microsomes, Drug Oxidation and Drug Toxicity* (Sato, R., and Kato, R., eds.) J.S.P. Tokyo; 605-612.
- 6.- Río de la Loza, L., *Disertación en la Academia de Medicina*, Octubre 30, 1852.
- 7.- Walls, F., Salmon, M., Padilla, J., Joseph-Nathan, P., and Romo, J. (1965) *Bol. Inst. Quim. (U.N.A.M.)*, XVIII, 1-18.
- 8.- Hassan, H.M., and Fridovich, I. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 196, 385-395.
- 9.- Schneider, W.C., and Hogeboom, G.H. (1950) *J. Biol. Chem.* 183, 123-127.
- 10.- Clayton, R.K. and Wang, R.T. in: *Methods in Enzymology*, Vol. XXIII (San Pietro, R. ed.) Academic Press, New York and London (1971) 696-704.
- 11.- Crofts, A.R., Crowther, D., Celis, H., Almanza de C.S., and Tierney, G. (1977) *Biochem. Soc. Trans.* 5, 491-495.
- 12.- García, T., Domínguez, E., and Romo J. (1965) *Bol. Inst. Quim. (U.N.A.M.)* XVII, 16-18.

FIGURE 1. Perezone molecule.

FIGURE 2. Inhibitory effect of Perezone on respiration of rat liver mitochondria as stimulated by different compounds, Glutamate + Malate and Succinate as oxidizable substrates. The basic incubation media is: 250 mM sucrose; 1 mM EDTA, 4 mM phosphate buffer pH 7.4 (NaOH), 1 mM $MgCl_2$, 6 mM KCl, 3 mM oxidizable substrates and 3.0 mg mitochondrial protein in a final volume of 3.0 ml. Where indicated 16 ug of Perezone (P)/mg of mitochondrial protein, 0.9 ug valinomycin (VAL), 0.8 mM ADP, 2 ug gramicidin (GRAM) and 0.3 ug 1799. Numbers on the side of traces indicate ngAtoms (nAt) O/min. Mw, washed rat liver mitochondria. Temperature 25°C.

FIGURE 3. A. Inhibition of mitochondrial respiration by Perezone as function of pH, glutamate + malate as substrate and valinomycin. The pH was adjusted to those in the figure. Incubation conditions as in Figure 2. B. Titration curve of a aqueous solution of Perezone. Experimental conditions were: to a solution of Perezone (10 mg/ml) NaOH or HCl was added to the desirable pH and absorbance at 522 nm was measured. Each point represents the mean value of three separate titrations.

FIGURE 4. Effect of Perezone on mitochondrial respiration at various temperatures. Experimental conditions as in Figure 2. Inset plot oxygen consumption attained with Perezone and valinomycin at the indicated temperatures.

FIGURE 5. Oxido/Reduction Potential of Perezone. Experimental conditions were: to 25 ml of Perezone solution at pH 7.1 (TRIS, buffer) an excess of dithionite was added. To that solution small amounts of ferricyanide were added to certain mV, as measured with platinum/calomel electrode in a PMQ 22 Radiometer pH meter. An aliquot of the solution was scanned in a DW2 A dual beam spectrophotometer (Aminco). Calculations were made by establishing the oxidized/reduced ratio of Perezone at fixed wavelengths and applying the Nerst equation. n =number of electrons that can be accepted by Perezone molecule.

FIGURE 6. Cytochrome c oxidation by reaction centers from Rhodopseudomonas sphaeroides (mutant R-26) in that presence of 1,4-Naphtoquinone and Perezone. Incubation conditions: 0.12 μ M of reaction Centers in 0.3 M Sucrose, 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.5, 2 μ M cytochrome C in a final volume of 3.0 ml. Where indicated Perezone (60 μ M) or 1,4-naphtoquinone (60 μ M) was added. Recording was made in a dual beam Spectrophotometer (Aminco DW2 A) with side illumination attachment. The excitation beam was filtered with a Kodak wratten filter 87 C for infrared light, the photomultiplier was covered with blue-green filter (Corning # 9782).

FIGURE 7. Effect of Perezone on Valinomycin stimulated mitochondrial oxygen consumption in the presence of menadione. Experimental conditions as in Figure 2 with menadione $1 \times 10^{-5} M$. Perezone was added at the following final μM concentrations: a=13, b=33, c=67, d=100, e=134 and f=268. The inset shows a plot of the data of the experiment.

original

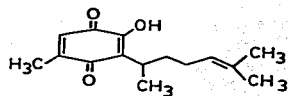
FIGURE 8. Effect of Perezone on the respiration of mitochondria incubated with and without rotenone. The experimental conditions were as in Figure 2 with glutamate-malate as substrate and Valinomycin to stimulate respiration. In the trace depicted by (o—o) the Valinomycin stimulated oxygen uptake was inhibited by the addition of 0.3 μg rotenone per mg. of protein; this yielded a rate of 1 to 5 $natom\ O\ min^{-1}\ mg^{-1}$. The subsequent addition of Perezone resulted in the indicated rates. In the trace marked as (●—●) Perezone was added without the addition of rotenone.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted with QFB. Ester García and M. in C. Virgilio Mendoza from the Chemistry Department at the School of Farmacobiólogo of the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (U.M.S.N.H.) for isolation and purification of Perezone. Also we are indebted with Mr. J. Sepúlveda and R. Paredes for technical assistance.

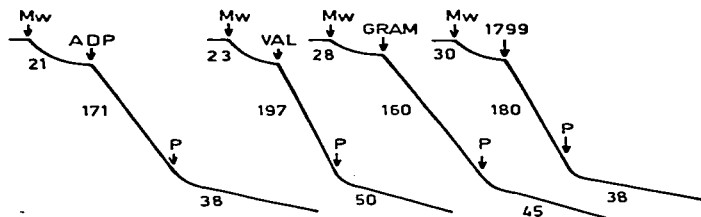
Supported in part by a grant from CONACyT No. PCCBBNA 005020.

PEREZONE

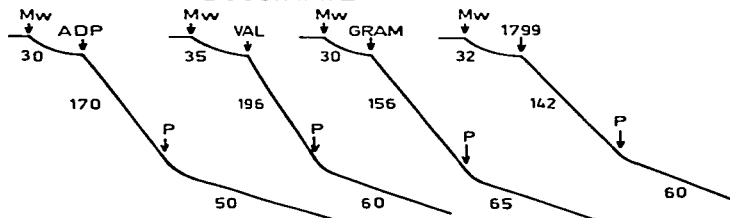


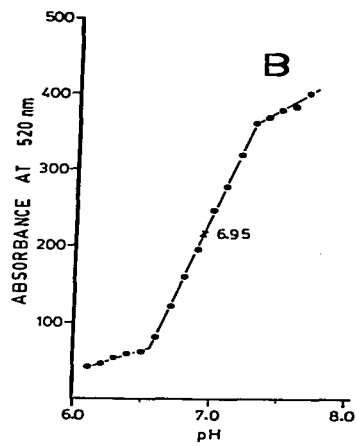
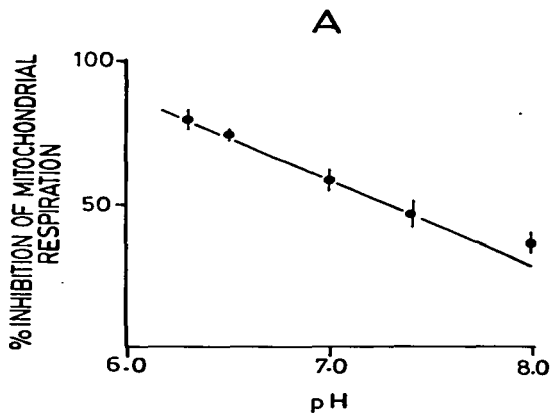
2-(1,5-DIMETHYL-4-HEXENYL)-3-HYDROXY-
METHYL-p-BENZOQUINONE

GLUTAMATE + MALATE

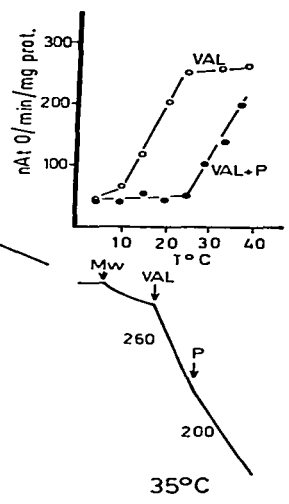
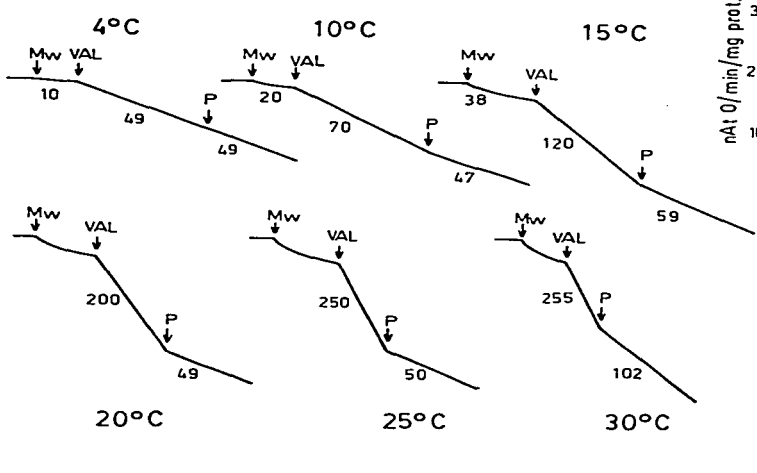


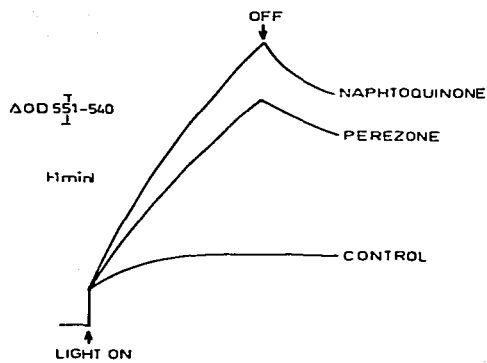
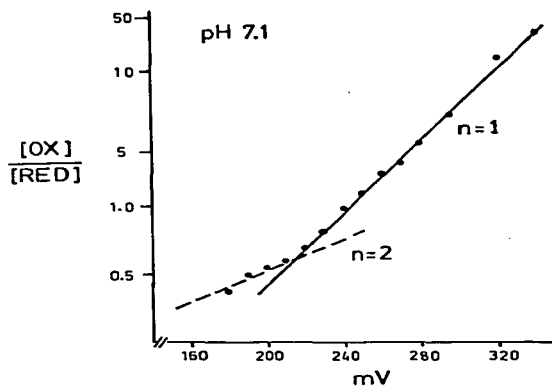
SUCCINATE



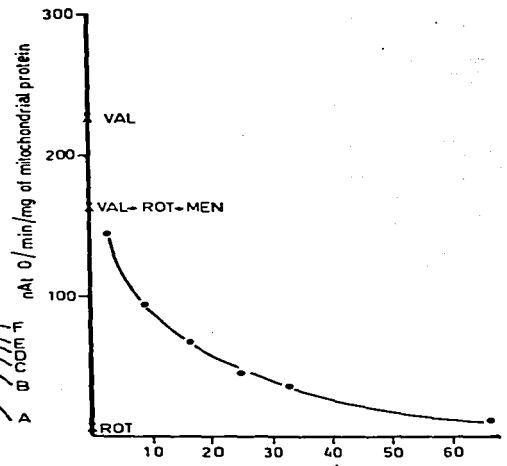


GLUTAMATE + MALATE

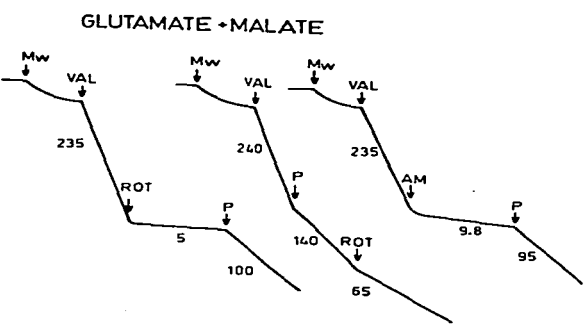




	μg	nAt O	μM
A	3.3	142	13
B	8.3	93	33
C	16.6	68	67
D	25	44	100
E	33.3	34	134
F	66.6	9.8	268



GLUTAMATE + MALATE μg PEREZONE / mg. prot.



GLUTAMATE - MALATE

