

88
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACIÓN ELECTROFORETICA
DEL COMPLEJO III MITOCONDRIAL DE
CORAZON DE BOVINO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

EMMA BERTA GUTIERREZ CIRLOS MADRID

MEXICO, D.F.

ENERO 1992

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	0
INTRODUCCION	
El Complejo III Mitocondrial	1 - 14
Antecedentes Directos	15 - 26
Objetivos	27
MATERIALES Y METODOS	28 - 40
RESULTADOS	41 - 51
DISCUSION Y CONCLUSIONES	52 - 63
REFERENCIAS	64 - 68
APENDICES:	
BARRIDOS DENSITOMETRICOS	69 - 74
ELECTROFORESIS	75 - 89

LISTA DE ABREVIATURAS

- ATP: Adenosín trifosfato.
- Bchl: Bacterioclorofila (siglas en inglés).
- BCIP: Fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolil.
- C₁₂E₈: dodecil octaetilen glicol monoéter.
- CTAB: Bromuro de Cetiltrimetil amonio.
- C-Terminal: Carboxiterminal, extremo carboxiterminal.
- CPC: Cloruro de N-cetilpiridino.
- C-P: Complejo clorofila-proteína.
- DCCD: N,N'-diciclohexilcarbodiimida.
- DOC: Desoxicolato.
- DOCK: Desoxicolato de Potasio.
- DBM: Diazobenzilxilometil.
- DS: Dodecil Sulfato.
- DSLi: Dodecil Sulfato de Litio.
- DSS: Dodecil Sulfato de Sodio.
- DTT: Ditiotreitól.
- EDTA: Acido Tetraacético de Etilendiamina (siglas en inglés).
- EGPA: Electroforesis en Geles de Poliacrilamida.
- EPR: Resonancia Paramagnética del Electrón (siglas en inglés).
- IgG: Inmunoglobulinas tipo G.
- M: molar, molaridad.
- mM: milimolar, μ M: micromolar.
- min: minutos.
- NADH: dinucleótido de nicotidamina y adenina reducido.
- NaSCN: Tiocianato de Sodio.

NBT: Nitroazul de Tetrazolio (Nitro Blue Tetrazolium).

NC: nitrocelulosa.

N-Terminal: amino terminal, extremo amino terminal.

Pi: Fosfato.

pg: picogramos.

P.M.: Peso Molecular.

rpm: revoluciones por minuto.

U.V.: Luz Ultravioleta.

UHDBT: undecilhidroxidioxobenzotiazol ($C_{10}H_{25}NO_3S$).

INTRODUCCION

EL COMPLEJO III MITOCONDRIAL

Las mitocondrias son organelos celulares cuyas dimensiones aproximadas son de 1 μm de ancho por 2 μm de largo (Alberts y col, 1985). Sus funciones son llevar a cabo el proceso de respiración y la síntesis de ATP, moneda de intercambio energético de la célula. Estos organelos están constituidos por una membrana externa que presenta alta permeabilidad (para moléculas de menos de 10 kDa) y que envuelve a una membrana interna, la cual posee numerosas invaginaciones o crestas, su permeabilidad es selectiva y contiene gran cantidad de proteínas entre las que destacan aquellas encargadas del transporte de electrones y de la de síntesis de ATP. Ambas membranas y los espacios existentes entre ellas (el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial) forman los cuatro compartimentos de este organelo, que se muestran en la Fig. 1

El fenómeno de la respiración en las mitocondrias consiste en la oxidación de sustratos provenientes del ciclo de Krebs (como succinato y NADH); durante este proceso se lleva a cabo un transporte de electrones hasta el oxígeno, el aceptor final. Al mismo tiempo, existe la formación de un gradiente electroquímico de protones que son expulsados hacia el espacio intermembranal, (hipótesis quimiosmótica de Mitchell, 1979). Dicho gradiente protonmotriz, acoplado al transporte de electrones, es aprovechado por la ATP sintetasa para generar ATP (Fig 2a). La unión de estos procesos se denomina fosforilación oxidativa.

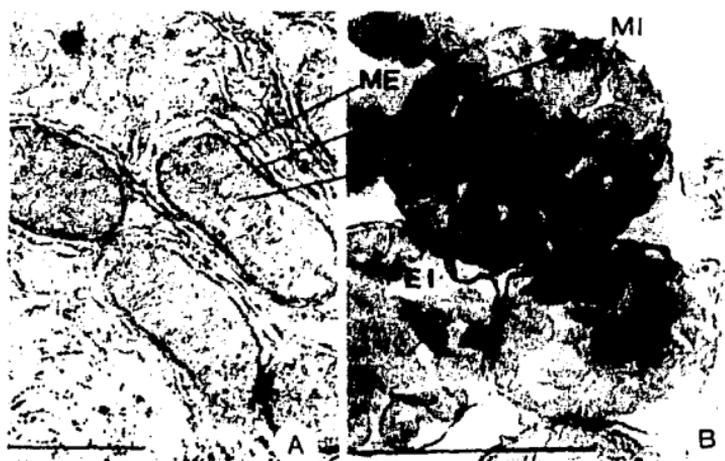


FIGURA 1: Microfotografía electrónica que muestra la estructura de las mitocondrias, con las dos membranas, interna (MI) y externa (ME), el espacio intermembranal (EI) y la matriz mitocondrial (M). A.- Corte longitudinal, B.- Corte Transversal. Tomada de Cárabez y Sandoval. (1990).

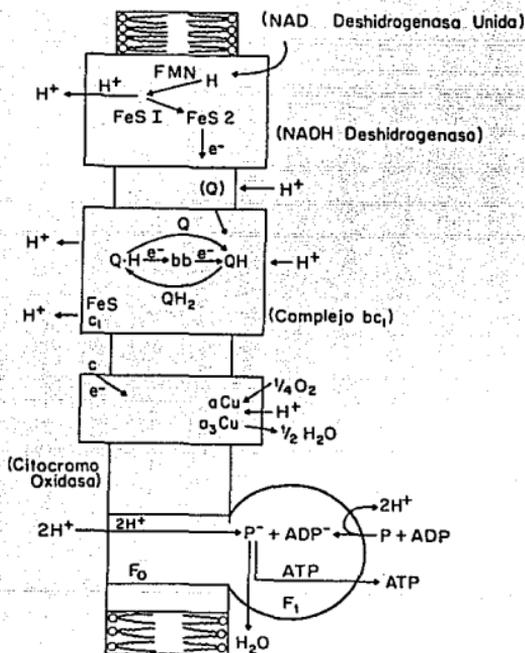


FIGURA 2a: Fosforilación oxidativa de acuerdo a la Teoría Quimiosmótica. Esquema que muestra la secuencia de los complejos proteínicos de la cadena respiratoria que bombean protones mismos que en la membrana acoplante, generan un gradiente protonométriz, aprovechado por la ATPsintasa para generar ATP. Tomado de Mitchell (1979)

Para que se lleve a cabo el transporte de electrones se necesita la presencia de acarreadores con grupos redox. De acuerdo con Warburg y Wienland, pioneros en el estudio de la fosforilación oxidativa deben ser "insolubles en agua y operar secuencialmente, reduciendo y oxidando sustratos, coenzimas y oxígeno molecular" (citados por Mitchell, 1979). En este caso los grupos oxidorreductores están representados por: grupos hemo (tipo a, a₁, b, c y c₁), grupos fierro-azufre (FeS), mononucleótidos de flavina (FMN), flavín adenín dinucleótidos (FAD) y átomos de cobre (Cu a, Cu a₂) (Fig. 2b) los cuáles se encuentran asociados a proteínas oligoméricas, embebidas parcialmente en la bicapa de lípidos.

Los complejos que participan en la fosforilación oxidativa de acuerdo con la numeración de Hatefi y col (1961) y su nombre de acuerdo a la nomenclatura oficial son los siguientes: (Fig. 3)

- I: NADH-ubiquinona oxidorreductasa,
- II: Succinato ubiquinona oxidorreductasa,
- III: Ubiquinol citocromo c oxidorreductasa,
- IV: Citocromo oxidasa.
- V: ATP sintasa.

Estos complejos se unen a la transferencia de electrones "cuesta abajo" con la translocación "cuesta arriba" de protones (Weiss y Leonard, 1987) lo cual permite que los electrones fluyan desde un potencial redox negativo constituido por moléculas como succinato y NADH, capaces de ceder sus electrones fácilmente, a uno de potencial redox muy positivo como el oxígeno (Fig. 4 a y b). La

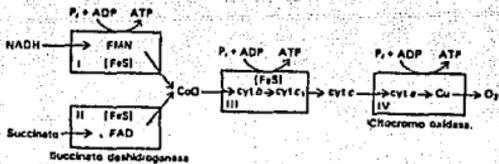


FIGURA 2b: Diagrama que muestra el orden funcional de los complejos oxidorreductores de la cadena respiratoria y que incluye la numeración de los complejos de acuerdo a Hatefi. Tomado de Karp (1987)

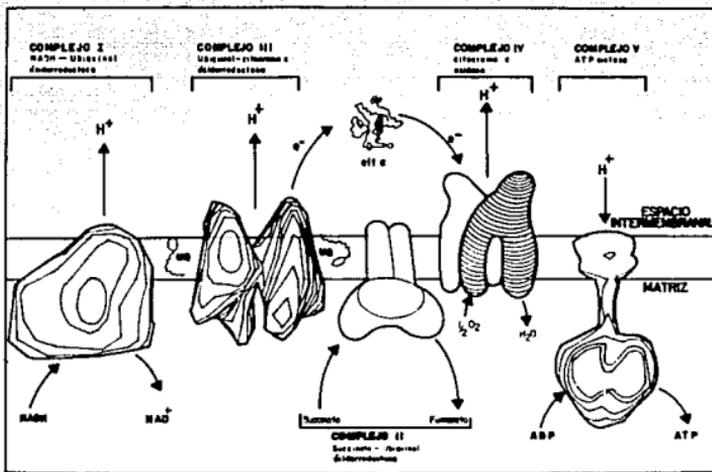


FIGURA 3: Esquema de los complejos respiratorios que se encuentran en la membrana interna mitocondrial; la representación tridimensional del complejo I y III (como dímero) pertenecen a los estudios de Weiss y col. (1987) en el hongo *Neurospora crassa*; para el modelo del complejo II se utilizaron evidencias bioquímicas analizadas por Ohnishi (1983). Capaldi y col (1983) proponen el modelo para la citocromo oxidasa. Para la ATP sintetasa, Gogol y col (1987) realizaron estudios sobre *Escherichia coli*. La estructura para el citocromo c soluble proviene del análisis por cristalografía de rayos X por Salamme (1977). (Tomado de González-Halphen, 1990).

ATP sintasa acopla el flujo de protones hacia la matriz mitocondrial con la síntesis de ATP, transformando la energía electroquímica de la membrana en energía química almacenada en esta molécula (Mitchell, 1975). El movimiento de los complejos proteínicos es lateral e independiente en la membrana, que se encuentra en un estado semifluido debido a su composición lipídica: el coeficiente de difusión estimado para estas proteínas oligoméricas es de $\approx 10^{-8} \text{cm}^2 \text{seg}^{-1}$. Diversos cálculos sugieren que para las velocidades de transferencia de electrones son suficientes las colisiones que ocurren al azar (Alberts y col, 1985) por lo cual parece probable que los electrones se transporten de un complejo a otro por choques múltiples, y que la respiración esté controlada por difusión (Gupte y Hackenbrock, 1988). Por otra parte, el citocromo c soluble y la ubiquinona, pueden moverse fácilmente, llevando a cabo reacciones redox durante el transporte de electrones, ya que se encuentran en mayor concentración y difunden rápidamente (Gupte y Hackenbrock, 1988) por lo que han sido denominadas "funciones distributivas" (González-Halphen y Gómez Lojero, 1982). La ubiquinona es la "coenzima del interior de la membrana", que recolecta los electrones de las flavoproteínas membranales que reducen a su vez, al complejo III (Trumpower, 1981) (Fig 5a). En el caso de los citocromos c solubles, estos distribuyen el poder reductor en la zona intermembranal entre los complejos III y IV, para finalmente, reducir al oxígeno. (Fig. 5b).

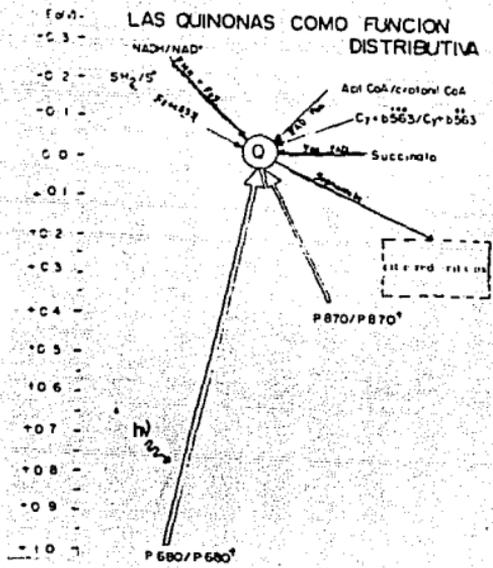


FIGURA 5a: Esquema que muestra el papel que juega la molécula de quinona en la distribución del poder reductor en la fotosíntesis y en la respiración se resalta con línea gruesa su papel en la respiración mitocondrial. Tomado de González-Halphen y Gómez-Lojero (1982).

FMN = mononucleótidos de flavina,
 FAD = flavin adenin nucleótidos,
 FeS = proteína con centro fierro-azufre.

LOS CITOCROMOS SOLUBLES COMO FUNCION DISTRIBUTIVA

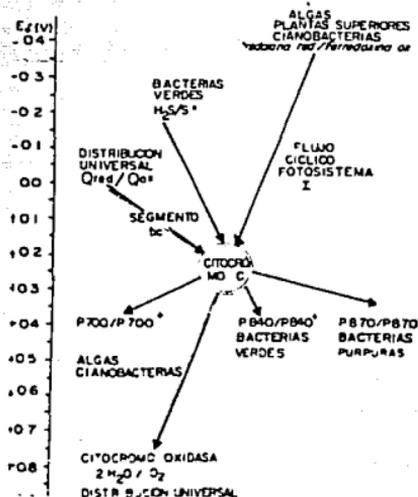


FIGURA 5b: La vía de flujo de electrones durante la respiración, queda completa cuando el citocromo c soluble lleva el poder reductor a la citocromo oxidasa que finalmente reduce al oxígeno, último aceptor, para formar agua. Tomado de González-Halphen y Gómez-Lojero (1982).

Q = coenzima Q,
segmento bc, = complejo III,

El complejo III mitocondrial (ubiquinol-citocromo c oxidorreductasa, también conocido como complejo bc₁), sobre el cual se desarrolla la presente tesis, puede relacionarse con el descubrimiento de los citocromos por MacMunn (1866) quien describió un pigmento respiratorio en los músculos de algunos animales (pájaros y mamíferos) independiente de los pigmentos de la sangre, señalando además las bandas características del espectro en su forma reducida (Fig. 6a). A este pigmento lo denominó miohematina o histohematina. Sin embargo, estos hallazgos fueron desacreditados en su época, debido a que se pensó que eran solamente hemocromógenos derivados de la hemoglobina.

Keilin (1924), utilizó un microespectroscopio ocular semejante al de MacMunn para observar, en diferentes organismos, los espectros de absorción de este pigmento, y encontró que no solamente se hallaba en organismos con músculos, si no hasta en organismos unicelulares. Por lo anterior, decidió denominarlo citocromo (pigmento celular). Además describió la presencia de varios tipos de hemo (a, b, c, ver Fig. 6a) y las posiciones características de sus bandas en los espectros de absorción en la zona del visible: α , β , γ (o Soret) (Fig. 6b).

Gracias a la metodología establecida por Hatefi y col (1961) pudieron separarse los complejos mitocondriales. Por su parte, Rieske (1967) estableció la metodología para aislar el complejo III al solubilizar las mitocondrias con detergentes como colato y desoxicolato de potasio y precipitar a las proteínas con sulfato de amonio, acetato de amonio y cloruro de potasio.

El complejo bc₁ o complejo III mitocondrial tiene un peso molecular aproximado de 250 kDa; en la membrana interna mitocondrial

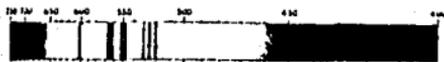


FIGURA 6 a: Imagen espectroscópica de los citocromos obtenida por Keilin (1925) el cual confirmó y amplió las observaciones iniciales realizadas por MacMunn. Este espectro corresponde a al músculo torácico de la abeja, sometido a anaerobiosis. Tomado de Keilin (1925).

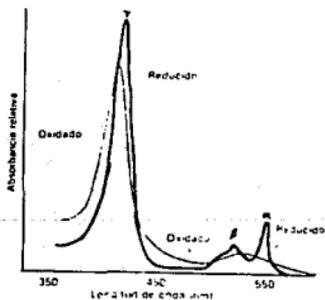


FIGURA 6b: Espectro de absorción que muestra los picos característicos del citocromo c de caballo. La designación de bandas es del rojo hacia el azul empleando letras griegas. El pico τ corresponde a la región del Soret.

Línea gruesa espectro del citocromo reducido, línea delgada. espectro del citocromo oxidado. Tomado de Karp (1987).

se presenta en forma de dímero. El complejo aislado de corazón de bovino consta de 11 subunidades las cuales pueden observarse en un gel de poliacrilamida-SDS, de acuerdo con Shägger y col (1986) (ver Fig. 7a). Tres de estas subunidades participan en la transferencia de electrones y contienen grupos oxidorreductores: el citocromo b (subunidad III), el citocromo c₁ (subunidad IV) y la proteína fierro-azufre de Rieske (subunidad V) (Shägger y col, 1989; Weiss y Leonard, 1987; González-Halphen y col, 1989).

Existen diferentes experimentos diseñados para estudiar la situación espacial (topología) de las subunidades del complejo bc₁ con respecto a la membrana interna mitocondrial. Todos estos estudios han dado lugar al modelo topológico del complejo III que se muestra en la figura 7b (González-Halphen, 1988).

Uno de los métodos más utilizados es la proteólisis parcial con diferentes enzimas, la cual puede realizarse cuando el complejo se encuentra reconstituido en liposomas o en partículas submitocondriales. En este último caso, los productos de digestión pueden identificarse con anticuerpos específicos dirigidos contra las subunidades en inmunoréplicas tipo Western (González-Halphen y col, 1988)

También es posible marcar las subunidades con reactivos hidrofóbicos o hidrofílicos, que reaccionan con las partes de la proteína embebidas en la membrana o bien con las regiones polipeptídicas expuestas (González-Halphen y col, 1988). Como ejemplos de éstos reactivos se encuentran: el reactivo azido derivado de fosfatidiletalonamina, la trifluorometil-yodofenil-diazirina, y la yodación catalizada con lactoperoxidasa.

En otros casos es posible la utilización de los agentes

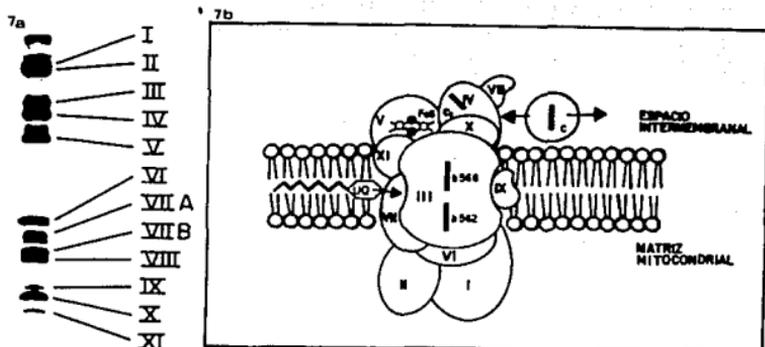


FIGURA 7a: Patrón electroforético del complejo III obtenido mediante la técnica descrita por Shägger y col (1986).
FIGURA 7b: Modelo que muestra la localización de las once subunidades del complejo III en la membrana interna mitocondrial, de acuerdo a los resultados obtenidos con la utilización de reactivos de fotoafinidad, estudios topológicos, etc. (González-Halphen y col, 1988).
 Tomado de González-Halphen, 1990.

entrecruzadores, con reactivos que favorezcan la unión covalente entre las subunidades más cercanas como las carbodiimidias, entre ellas N,N'-diciclohexilcarbodiimida ó DCCD (hidrofóbica) y 1-etil-3-[3-(dimetilamino)-propilcarbodiimida ó EDC (hidrofílica).

Otra forma de conocer la topología de las subunidades en la membrana es la de formar cristales bidimensionales como los que se muestran en la figura 8a y b (Weiss y col, 1986; Weiss y Leonard, 1987) formados por una verdadera sábana de proteína y lípido que puede ser analizada por difracción de electrones, en un microscopio electrónico, dando lugar a modelos estructurales de la proteína (Fig. 8 c).

Recientemente, Yu y col (1991) han podido obtener cristales tridimensionales del complejo III mitocondrial de bovino, en presencia del detergente decanoil-N-metilglucamida, el alcohol heptaetriol, cloruro de sodio y poli(etilenglicol) como precipitantes. Las dimensiones del cristal más grande fueron de 4x2x1 mm, suficientes para obtener información de su estructura por cristalografía de rayos X.

Otro tipo de aproximación es el análisis teórico de la estructura primaria de las subunidades, comparando las secuencias de aminoácidos y construyendo perfiles de hidropatía, dependiendo del carácter hidrofóbico o hidrofílico de los aminoácidos. Dependiendo de la cantidad de aminoácidos de diferente carácter que posea, pueden establecerse zonas que correspondan (grosso modo) a sitios embebidos en la membrana o fuera de ella. Los perfiles de hidropatía proporcionan una idea de la posible conformación y ubicación de las subunidades dentro de la membrana (Link y col, 1987).

Ver figura 9.

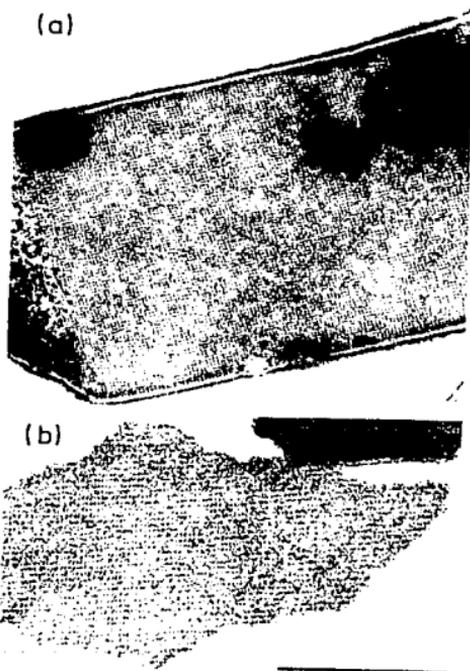


FIGURA 8a: Microfotografía de las láminas de cristales bidimensionales del complejo III completo obtenidos por Weiss y Leonard (1986).

FIGURA 8b: en este caso, se muestran las láminas de cristales bidimensionales del subcomplejo b-c.

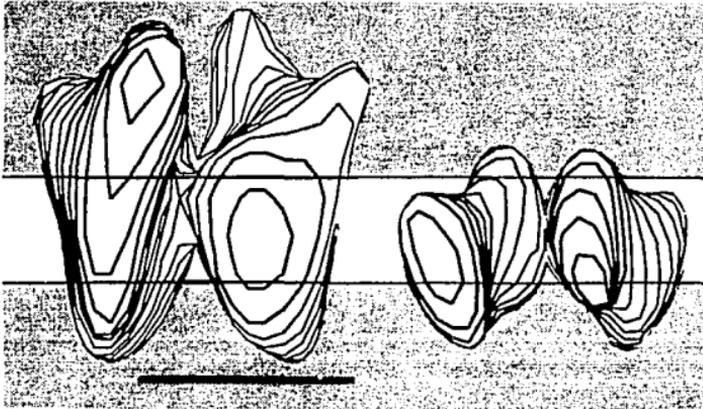


FIGURA 8c: Diagrama de la orientación del complejo bc, del hongo Neurospora crassa en una bicapa lipídica de acuerdo con los estudios de difracción de electrones en cristales bidimensionales lo mismo que para uno de los subcomplejos obtenidos en la separación por ultrafiltración con el detergente Tritón X-100 (Weiss y Leonard, 1987).

A continuación se hace una descripción breve de cada una de las subunidades, (para una revisión ver González-Halphen, 1990 y Trumpower, 1990) señalando algunas características relevantes de cada una.

a) Proteínas Estructurales (Subunidades I y II)

Por su gran tamaño (P.M. 49 y 47 kDa., respectivamente), inicialmente se pensó que eran importantes para la estructura del complejo, por lo que recibieron el nombre de proteínas estructurales (del inglés, core proteins). Su carácter hidrofílico hace que se sitúen fuera de la membrana y equivalen a la parte más larga del complejo de Neurospora crassa de acuerdo con lo observado por Weiss y col (1986) y Weiss y Leonard (1987). En experimentos de reconstitución (Linke y Weiss, 1986) se observó el requerimiento de ambas subunidades en forma dimérica para recuperar la actividad de un subcomplejo bc₁. Recientemente éstas subunidades se han involucrado en la biogénesis del complejo bc, (Crivellone y col, 1988; Gatti y Tzagolof, 1990).

b) Citocromo b (subunidad III):

Posee un carácter muy hidrofóbico (Weiss y col 1986) y como se muestra en los perfiles de hidropatía (Fig. 9) posee de 8 a 9 cruces transmembranales (Cramer y col, 1987). Esta subunidad es el verdadero corazón hidrofóbico del bc₁ y se encuentra anclada en la membrana interna mitocondrial (ver Fig. 7b). Los 2 hemos en esta proteína se unen por interacciones no covalentes a cuatro histidinás

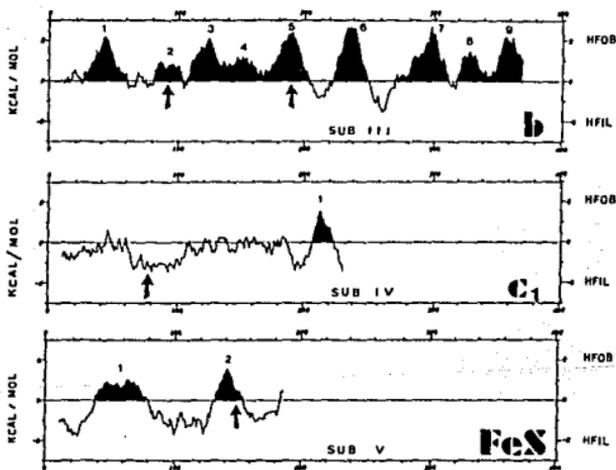


FIGURA 9: Perfiles de hidropatía de las subunidades III, IV y V del complejo bc, de en corazón de bovino. En el eje de las ordenadas se muestra el caracter ya sea hidrofóbico (HFOB) o hidrofílico (HFIL) así como el cálculo de energía libre (kcal/mol). En las absisas se grafica el número de aminoácidos por secuencia. Las regiones sombreadas muestran las zonas hidrofóbicas de cada polipéptido, mientras que las flechas, las regiones que se unen a grupos prostéticos. Tomado de González-Halphen (1990).

muy conservadas en las hélices 2 y 5 (ver perfiles de hidropatía, fig. 9). Estos hemo poseen diferencias en sus espectros ópticos y en sus potenciales redox, por lo que se denominan b_{560} y b_{566} . Esta proteína es la única del complejo sintetizada a partir del genoma mitocondrial, como reminiscencia del genoma ancestral procarionte de este organelo (Katan y col, 1976; Lin y col, 1978; Weiss y Zinganke, 1974).

c) Citocromo c_1 (Subunidad IV)

Posee un carácter anfifílico (Weiss y col, 1986; ver los perfiles de hidropatía en la fig. 9) debido a que tiene un segmento hidrofóbico carboxi-terminal. El hemo se encuentra en el extremo amino-terminal, unido covalentemente por enlaces tio-éter con residuos de dos cisteínas y coordinando con histidina y metionina. Además se encuentra hacia el lado P de la membrana interna mitocondrial, (ver figura 7b) es decir, viendo hacia el espacio intermembranal, donde interacciona catalíticamente con el citocromo c soluble (König y col, 1980; Shimomura y col, 1985; González-Halphen y col, 1988).

d) Proteína hierro-azufre (subunidad V):

También llamada proteína de Rieske en honor de J. S. Rieske, el primero en descubrir la señal de ésta subunidad por EPR. Al igual que el citocromo c_1 , su carácter es anfifílico (Weiss y col, 1986) como se muestra en el perfil de hidropatía de ésta subunidad en la fig. 9. El centro 2Fe-2S se une a la proteína por 2 cisteínas y 2 histidinas. Su porción hidrofóbica le permite unirse al resto del

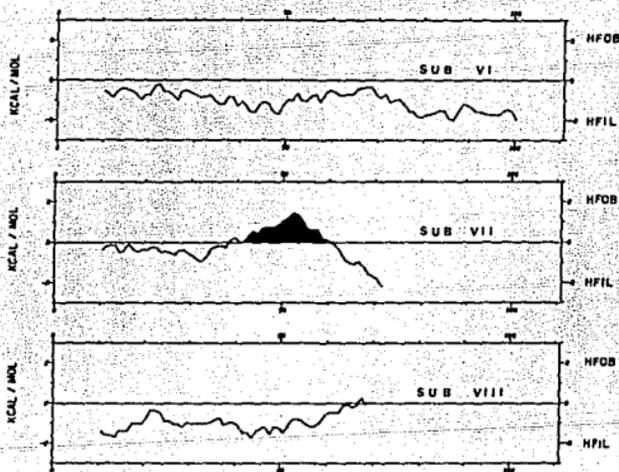


FIGURA 9 (continuación): Perfiles de hidropatía de las subunidades VI, VII y VIII del complejo bc, en corazón de bovino. En el eje de las ordenadas se muestra el carácter ya sea hidrofóbico (HFOD) o hidrofílico (HFIL) así como el cálculo de energía libre (kcal/mol). En las abscisas se grafica el número de aminoácidos por secuencia. Las regiones sombreadas muestran las zonas hidrofóbicas de cada polipéptido, mientras que las flechas, las regiones que se unen a grupos prostéticos. Tomado de González-Halphen (1990).

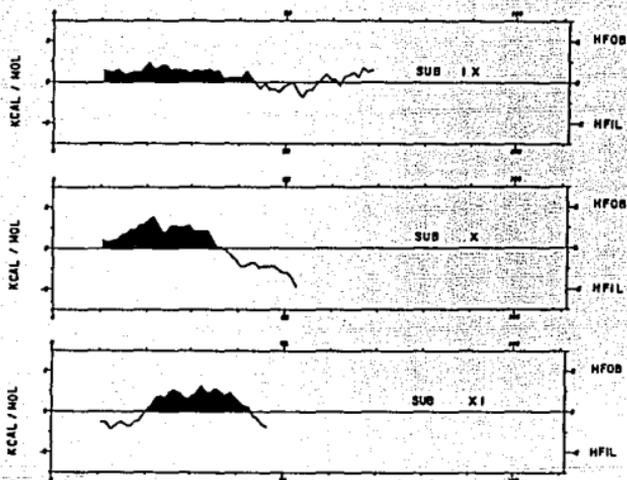


FIGURA 9 (continuación): Perfiles de hidropatía de las subunidades IX, X y XI del complejo en corazón bc, de bovino. En el eje de las ordenadas se muestra el carácter ya sea hidrofóbico (HFOB) o hidrofílico (HFIL) así como el cálculo de energía libre (kcal/mol). En las abscisas se grafica el número de aminoácidos por secuencia. Las regiones sombreadas muestran las zonas hidrofóbicas de cada polipéptido, mientras que las flechas, las regiones que se unen a grupos prostéticos. Tomado de González-Halphen (1990).

complejo, posiblemente a través del citocromo b (González-Halphen y col, 1991), ver figura 7b. De acuerdo con los estudios de formación de subcomplejos por acción del detergente Tritón X-100 esta subunidad se encuentra del lado intermembranal (ver Fig. 7b) en el caso del hongo Neurospora crassa (Weiss y col, 1986) Es la única subunidad que se ha podido separarse del complejo bc₁ y volverse a reconstituir posteriormente (Trumpower y Edwards, 1979; Linke y Weiss, 1986; Weiss y Leonard, 1987; González-Halphen, 1991).

e) Subunidades pequeñas (VI a XI):

En la tabla I se muestran los pesos moleculares de estas subunidades. Sólo se conoce la función de algunas de ellas; en mamíferos como el bovino o el humano se han encontrado once subunidades, en otros organismos existen menos o son inexistentes.

La subunidad VII se conoce como la que une a la ubiquinona (Yu y col, 1990). La subunidad VIII también conocida como proteína de unión contiene una gran cantidad de residuos de glutámico y aspártico en el N-terminal y parece intervenir en la unión entre el citocromo c₁ y el citocromo c soluble el cual tiene carga positiva (Kim y King, 1983). Otra de las subunidades une DCCD (reactivo hidrofóbico), contiene 78 residuos de aminoácidos que forman una alfa hélice muy hidrofóbica (subunidad IX). Finalmente, la subunidad VI de Saccharomyces cerevisiae (equivalente a la subunidad VII de bovino) parece intervenir en la interacción de los dos complejos para su actividad en forma dimérica (Trumpower, 1990).

Actividad del Complejo III:

La reacción general que cataliza este complejo es la siguiente:



donde N se refiere a la parte negativa interna de la matriz mitocondrial y P a la positiva externa del lado citoplásmico de la membrana (espacio intermembranal). (Trumpower, 1990).

Uno de los fenómenos más interesantes que presenta el bc₁, es "la reducción oxidante del citocromo b", que ocurre cuando se añade antimicina al complejo (ver figura 10). En este caso, el paso de electrones a la ubisemiquinona (Q[•]), del lado negativo para su reducción, queda bloqueado, pero el flujo de electrones continúa desde ubiquinol (QH²) que se encuentra en el lado positivo, hasta el citocromo c soluble, situado en el espacio intermembranal. La oxidación por la vía QH² -> FeS -> c₁ -> c, también continúa al agregar un pulso de oxígeno en mitocondrias puestas en anaerobiosis (a través, claro, del citocromo aa₃). Los hemos b permanecen reducidos debido a que el anión ubisemiquinona del lado positivo de la membrana, les sigue donando electrones y el inhibidor antimicina bloquea su oxidación. Si eliminamos la proteína hierro-azufre del complejo, esto también ocurre, ya que es necesaria para reducir al citocromo c soluble pero no al b. En cambio, si se agrega mixotiazol, tanto el citocromo b como el c, no se reducen, pues este inhibidor impide que el ubiquinol done sus electrones a ambos. Sin embargo, si no existe antimicina en el medio, el citocromo b puede reducirse por reversa de

los pasos 4a y 4b que se muestran en la figura 10.

Las características espectroscópicas del citocromo b formado por dos hemo: b_{560} y b_{566} , así como su cinética y termodinámica compleja, sumado a la aparente falta de un acarreador de protones llevaron a Mitchell (1975) a proponer el ciclo Q o ciclo protonmotriz de ubiquinonas para explicar su cinética. Este modelo está basado en los estudios previos de Kroger y Klingenberg (1973), los cuales propusieron la presencia de una "poza de quinonas", donde la ubiquinona, reducida por las diversas deshidrogenasas que intervienen en la cadena respiratoria, forman una poza móvil de ubiquinol-10. Esta poza tiene un carácter muy hidrofóbico y a su vez, dona sus electrones al complejo III y los recibe de éste, para finalmente pasarlos a un citocromo c soluble, que se encuentra en el espacio intermembranal.

En la Fig. 10 podemos ver los fundamentos de este ciclo, que se presenta en el esquema más reciente (Trumpower, 1990) señalando también los sitios de acción de los inhibidores más importantes que actúan sobre el complejo, como son la antimicina, el mixotiazol, la estigamatelina y el UHDBT (Von Jagow y Link, 1986).

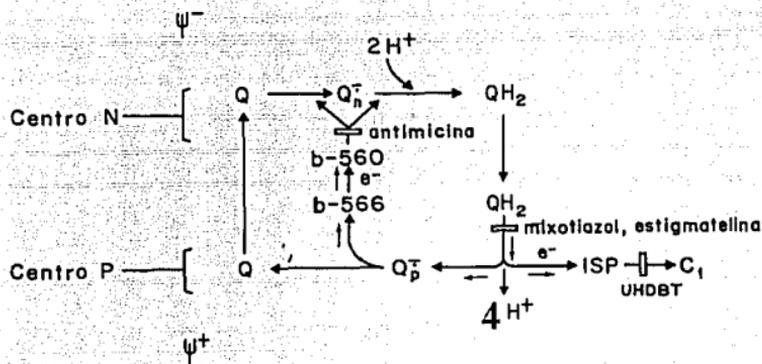


FIGURA 10: Ciclo Q propuesto por Mitchell (1975) modificado por Trumpower (1981, 1990) en el cual se pueden apreciar los sitios que son sensibles a los diferentes inhibidores del complejo (con una barra), el flujo de electrones dentro de la poza de quinonas para reducir y oxidar al citocromo b, así como los dos tipos de hemo b presentes en el complejo, el depósito de cuatro protones y la toma de dos del espacio de la matriz, así como la formación de los aniones ubisemiquinona $Q^{\cdot -}$ del lado positivo y negativo del complejo.

ISP = Iron Sulfur Protein (Proteína Hierro-Azufre).

C = Citocromo c_1 a citocromo c soluble.

P = lado p (positivo externo) de la membrana interna mitocondrial.

N = lado n (negativo interno) de la membrana interna mitocondrial.

QH_2 = ubiquinol,

Q = quinona,

$Q^{\cdot -}$ = anión ubisemiquinona.

Distribución Biológica del Complejo bc₁:

En todos los grupos o fila este complejo de citocromos se encuentra ampliamente distribuido y todos ellos comparten los mismos grupos prostéticos. Cabe señalar que el citocromo c₁ se denomina f en plantas y lleva a cabo la función de oxidar plastoquinol (ubiquinona de los vegetales) así como la de reducir un aceptor proteínico hidrofílico (citocromo c o plastocianina) donde se acopla el paso de electrones a la translocación de protones (para una revisión ver Hauska y col, 1983). Sin embargo, a pesar de éstas semejanzas, existen diferencias entre especies y grupos filogenéticos. En la tabla I se muestran las características de las subunidades del complejo III de bovino, en comparación con las subunidades presentes en otros organismos.

Así, los complejos más sencillos pertenecen a la bacteria aeróbica Paracoccus denitrificans con tres subunidades (Yang y Trumpower, 1986) y a la bacteria fotosintética Rhodospira rubra con cuatro subunidades. En los cloroplastos, este complejo tiene cuatro (Cramer y col, 1991) o 5 (Weiss y Leonard, 1987) subunidades en hongos como Neurospora crassa tiene 9 subunidades y en corazón de bovino once polipéptidos (para una revisión ver Trumpower, 1990). Llama la atención la gran diversidad de polipéptidos y su incremento en complejidad a lo largo de la escala filogenética. Cabe destacar que de los estudios filogenéticos realizados a partir de la alineación de secuencias se ha encontrado, para el caso de las subunidades con grupos prostéticos varios aminoácidos muy conservados:

**TABLA I: COMPOSICION POLIPEPTIDICA DEL COMPLEJO DE CITOCROMOS
 AISLADO DE DIFERENTES ORGANISMOS.**

S U B U N I D A D	MITOCONDRIA		CLOROPLASTOS		BACTERIAS		
	Bovino	<i>N. crassa</i> #	<i>S. cere-</i> <i>viciae</i> #	Espinaca #	<i>Rb. ophae-</i> <i>roides</i> ç	<i>Rb. capsu-</i> <i>latus</i> ç	<i>P. deni-</i> <i>trifi-</i> <i>cans</i> #
I core	50 (49)	50	50	---	---	---	---
II core	46 (47)	46	45	---	---	---	---
III b(b ₆)	42.6(43.7)	42	42	23	42.8	42.1	39
IV c ₁ (f)	27.3(27.9)	29	42	33	32.7	31.2	62
V FeS	21.4(25)	22	25	20	20	22.5	20
VI	13.4(13.4)	14	14	17	13	19.8	---
VII una Q	9.5(11)	12	---	5	5	---	---
VIII unión	9.2(9.2)	11	17	---	---	---	---
IX una DCCD	7.9(8.0)	8	11	---	---	---	---
X	7.2(7.2)	---	---	---	---	---	---
XI	6.4(6.4)	---	---	---	---	---	---

El peso molecular aparente (P.M.) está dado en kilodaltones (kDa), para todos los casos fueron determinados por EGPA-SDS. Además para bovino se calcularon por secuencias de aminoácidos (datos dentro del paréntesis). Datos tomados de: Ljungdahl y col, 1987 (ç); Weiss y Leonard, 1987 (#) y González-Halphen, 1990 (*).

citocromo b: 4 histidinas (82, 183, 96 y 197) propuestas como sitio de unión para los dos hemós.

citocromo c₁: dos cisteínas una histidina y una metionina como unión al grupo hemo.

proteína FeS: 4 cisteínas y 2 histidinas muy conservadas en el sitio de unión del centro fierro-azufre.

Estas tres subunidades con grupos oxidorreductores son necesarias y suficientes para llevar a cabo la transferencia de electrones como en el caso de la bacteria P. denitrificans. Lo anterior conduce a la siguiente pregunta: ¿cuál es la función del resto de las sus subunidades?. Para el caso de las subunidades VII, VIII, IX y X sí se ha propuesto una posible función (que se menciona en la Tabla I). También se ha encontrado que la ausencia de las subunidades II y VI en mutantes de levadura, da lugar a una cantidad de complejo sintetizada menor a la normal, aunque su actividad se mantiene intacta (Gatti y Tzagoloff, 1990); (para una revisión ver Trumpower, 1990). Por lo tanto, existe la posibilidad de que las subunidades sin grupos oxidorreductores participen en el ensamblaje del complejo en la membrana interna mitocondrial durante su biogénesis, ya que como vimos, sólo el citocromo b es sintetizado por el genoma mitocondrial, por lo que es necesario que el resto de las subunidades sintetizadas en el citoplasma sean internadas y reconocidas por la mitocondria, existiendo una coordinación entre los dos procesos de síntesis. Durante su importación, las subunidades deben pasar primero por la membrana externa mitocondrial, altamente permeable, y luego por la interna donde quedarán ensambladas como complejos funcionales.

En conclusión: el complejo bc₁ o complejo III muestra características notables en cuanto a su cinética, comportamiento en el transporte de electrones y composición de subunidades en la escala filogenética, así como en su biogénesis y en la relación entre sus subunidades.

Una de las técnicas referidas en ésta primera parte, es la electroforesis en geles de poliacrilamida (descrito por Shägger y col, 1986) la cuál se utilizó para la presente tesis. En un apéndice se hará una descripción de las características de la técnica de electroforesis en general y en particular del empleo de geles de poliacrilamida.

ANTECEDENTES DIRECTOS

La disociación de las subunidades en el complejo bc, ha sido objeto de estudio por varios grupos de investigación utilizando para ello diversos enfoques experimentales. El interés de esto radica en que el orden de separación de las proteínas, su carácter hidrofóbico o hidrofílico, así como los reactivos disociantes utilizados, pueden aportar ideas de la localización de las subunidades, ya sea dentro o fuera de la membrana interna mitocondrial y de las posibles asociaciones entre ellas. Esto se realiza guiándonos por las características de solubilidad que presenten los diferentes péptidos, sean éstos hidrofóbicos, hidrofílicos o anfifílicos, así como los posibles subcomplejos formados, de acuerdo con la severidad de la disociación. Las uniones de tipo covalente, iónicas, etc., pueden facilitar o impedir la entrada de los agentes disociantes de acuerdo con la estabilidad de la unión, de ahí la necesidad de utilizar agentes que puedan romperlas, por cambios en la fuerza iónica del medio o por diferencias de pH que puedan alterar la carga de los grupos que participan en las uniones entre los polipéptidos, etc.

Las diferentes metodologías pueden compartir características en cuanto al tipo de subunidades que se separen, lo que refleja la accesibilidad del detergente o de otros agentes disociantes a las mismas.

Las técnicas revisadas se mostrarán en esquemas, que representan los pasos de purificación.

Disociación del Complejo III Soluble con la Utilización de Detergentes y Agentes Caotrópicos:

En 1979, Rieske describió las características y el modelo de la disociación del complejo III mitocondrial utilizando sales biliares y sulfato de amonio, así como el efecto del inhibidor antimicina, la reducción del complejo y la utilización de clorhidrato de guanidina, previa congelación del bc₁, sobre la disociación del mismo. El modelo de lo que ocurre se muestra en la Fig. 11, destacando las diferentes rutas de disociación del complejo.

Las posibles vías de disociación conducen siempre a la formación de dos subcomplejos, uno soluble y otro insoluble. Esto ocurre al utilizar una alta concentración del agente caotrópico clorhidrato de guanidina (3 M) sobre el complejo protegido (mediante su reducción por ascorbato o inhibición con antimicina). Lo mismo sucede al emplear clorhidrato de guanidina y sales biliares más sulfato de amonio, sin ningún tipo de protección. De acuerdo con el autor, los sitios sensibles a los agentes disociantes son bloqueados por la acción de la antimicina o por la reducción del complejo, lo cual crea una modificación en la conformación de la proteína o el cambio conformacional de un péptido que obstruye el paso de sales biliares y sulfato de amonio.

El subcomplejo insoluble está compuesto por las subunidades III (citocromo b) y V (proteína hierro-azufre) principalmente, aunque también cabría la posibilidad de que otras subunidades como son la VII, IX y XI que se encuentran cerca del citocromo b en la membrana (González-Halphen y col, 1988) también pudieran formar parte de este subcomplejo, debido a que poseen un dominio hidrofóbico (ver perfiles

de hidropatía, figura 9). Dichas subunidades no aparecen definidas en los trabajos originales de Rieske debido a la baja resolución de los geles de poliacrilamida. Cabe destacar la separación inicial de la subunidad V, la proteína hierro-azufre al utilizar sales biliares, sulfato de amonio o 1 M de clorhidrato de guanidina (Rieske, 1979).

Las subunidades I, II, IV (citocromo c₁), VI, VIII y X constituyen el grupo de subunidades solubles, éstas se encuentran situadas a un lado y otro de la membrana (González-Halphen y col, 1988) y contienen en su mayoría residuos de aminoácidos hidrofílicos, a excepción de la subunidad X, que posee un dominio hidrofóbico, como se observa en los perfiles de hidropatía (ver Fig. 9).

EL citocromo c₁ (subunidad IV) es anfifílico, con una sólo cruce transmembranal y una región hidrofílica relativamente grande que contiene el grupo hemo (para una revisión ver Trumpower, 1990). Podríamos pensar que su cercanía con las subunidades X y VIII provoque que este citocromo se quede en la fase soluble de la separación, debido a una interacción con ellas, mientras que sus residuos hidrofóbicos se mantienen en solución gracias a el detergente presente.

La combinación de otros agentes disociantes como R_{Hg}X (sales mercuriales) y Sulfato de Amonio confirman la formación de subcomplejos solubles e insolubles, como se muestra en la Fig. 11. Las proteínas estructurales (I y II) están marcadas como insolubles, lo cual no concuerda con lo que se observa en otros experimentos donde estas proteínas forman un subcomplejo hidrofílico en el caso del complejo bc₁ de Neurospora crassa (Weiss y col, 1986) y con los perfiles de hidropatía para las subunidades de levadura (Fig. 9), donde se señala su alta hidrofílicidad (Link, y col, 1987). Cabe la

posibilidad de que la acción de las sales mercuriales impidan que estas proteínas se solubilicen.

Otro de los indicios importantes sobre la disociación del complejo III es la acción de clorhidrato de guanidina 0.2 M y congelación. Al congelar el complejo, se puede lograr un cambio en su estabilidad, rompiendo la estructura cuaternaria del mismo. Rieske (1979) señala que esto se debe al efecto del debilitamiento de las asociaciones hidrofóbicas entre polipéptidos, lo cual aumenta la susceptibilidad al efecto caotrópico del clorhidrato de guanidina. Una alternativa es que éste cambie la estructura del agua que se encuentra interaccionando con el complejo, obligándolo a que exponga más los grupos hidrofílicos que contiene, provocando su disociación en subcomplejos y solubilizando mejor a algunos de ellos.

Disociación del Complejo III en Columnas Hidrofóbicas de Fenil-Sefarosa

Otra de las técnicas de disociación del complejo es la reportada por Shimomura y col (1986) por medio de la utilización de columnas de fenil-sefarosa y detergentes como desoxicolato de sodio (DOC), clorhidrato de guanidina, dodecil octaetil glicol monoéster ($C_{12}E_8$) y ditioneitol (DTT). El perfil de disociación para el complejo III se muestra en la Fig. 12.

Para realizar la separación es importante unir el complejo a la columna hidrofóbica, para después eliminar los lípidos que queden asociados a la proteína, ya que se ha visto que son importantes para que la subunidad hierro-azufre interactúe con el mismo (Shimomura y col, 1984). De esta manera, con DOC al 1% y DTT 1 mM es posible disociar a la proteína hierro-azufre. La subunidad VI se separa agregando al amortiguador anterior clorhidrato de guanidina 1.5 M. Posteriormente, aumentando la concentración de este agente a 3 M, se separan las proteínas estructurales, (subunidades I y II). Posteriormente, se utiliza el detergente no iónico dodecil octaetilenglicol monoéster ($C_{12}E_8$) al 1% para la separación del citocromo c, junto con las subunidades VIII y X. Finalmente, en presencia del detergente DSS, a temperatura ambiente, es posible eluir a las subunidades III, VII, IX, X y XI, los polipéptidos más hidrofóbicos del complejo bc₁.

Las subunidades estructurales (I y II) se encuentran como contaminantes en varios de los pasos anteriores, lo que indica su facilidad para disociarse del complejo. Dado su carácter hidrofílico se puede esperar una interacción con las proteínas cercanas de

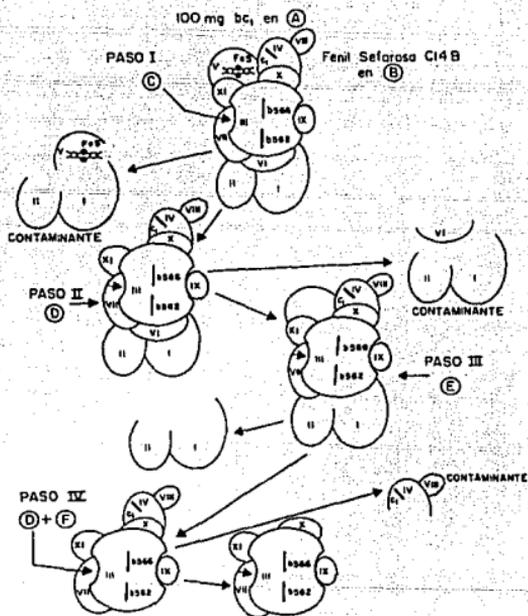


FIGURA 12: Diagrama de disociación del complejo bo, que explica los resultados obtenidos por Shimomura y col (1986), en la cual se utilizó una columna de fenil-sefaraosa y diferentes detergentes:
 A- 25mM Tris-HCl, pH 8; 20% glicerol y congelando a -80°C .
 B- 25 mM Tris HCl pH 8, 0.25% Desoxicolato (DOC), 0.2M NaCl, 1 M EDTA, 1mM Ditiotretitol (DTT), 20% glicerol. Amortiguador para equilibrar la columna.
 C- 25 mM Tris HCl pH 8, 1% DOC, 1mM DTT, 20% glicerol.
 D- 1.5 M Hidrocloruro de guanidina, 1% Colato, 1mM DTT, 20% glicerol.
 E- 3 M Hidrocloruro de guanidina en D.
 F- D más 1% C_{12}E_8 .

carácter soluble y por tanto en la periferia de la membrana, como es el caso de la subunidad VI.

El citocromo c_1 es extraído contaminado con las subunidades VIII y X, como se muestra en el esquema de disociación en la Fig. 12. En estudios con estas subunidades, se ha propuesto que el polipéptido VIII constituye el factor de unión entre el citocromo c_1 y el citocromo c soluble (Kim y King, 1983) por lo que también se le conoce como el polipéptido de unión (del inglés "hinge protein").

Cabe señalar la reciente modificación a esta técnica para formar un subcomplejo b- c_1 (conteniendo únicamente a los dos citocromos) al adicionar Tritón X-100 al 1.5% en lugar del detergente $C_{12}E_8$, lo que señala la existencia de una interacción directa entre estas dos subunidades (González-Halphen y col., 1991).

Disociación del Complejo III en Columnas de Hidroxilapatita en Presencia del Detergente No-Iónico Tritón X-100

Utilizando el complejo III aislado por medio del detergente no iónico Tritón X-100, Shägger y colaboradores (1986), separaron las subunidades del mismo en una columna de hidroxilapatita, creando subcomplejos más proteínas libres por acción del clorhidrato de guanidina y la urea. El esquema de disociación se muestra en la Fig. 13.

Esta técnica de separación va más acorde con la ubicación de las subunidades dentro y fuera de la membrana interna mitocondrial. Aquéllas que se encuentran en la periferia del complejo son las que se separan en primer lugar (subunidades V y XI), al ser poco adsorbidas por la columna de hidroxilapatita, esto lo confirma la utilización de fuerza iónica débil para disociar este primer subcomplejo. A continuación se separan las subunidades IV, VIII y X, que también se localizan en la periferia del complejo. La fuerza iónica utilizada en este caso es baja, indicando la facilidad con que es extraído este subcomplejo, ya que también es solubilizado con bajas concentraciones de detergente.

El citocromo c₁ se separa sin necesidad de aplicar fuerza iónica o detergente, pues se une débilmente a la columna, probablemente a través del citocromo b.

A partir de esta separación, las subunidades restantes son las que se encuentran total o parcialmente embebidas en la membrana interna mitocondrial (de acuerdo con los estudios realizados, mencionados en la introducción) a excepción de las subunidades I, II y VI. El citocromo b queda unido a las subunidades VI y IX. La

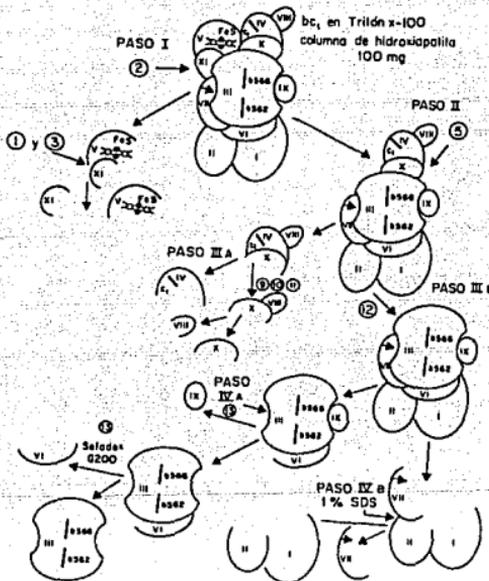


FIGURA 13: Diagrama de disociación del complejo bc, que explica los resultados obtenidos por Shägger (1986) quien utilizó una columna de hidroxilapatita más diferentes detergentes y gradientes de fuerza iónica para separar las subunidades del complejo III. La columna fue equilibrada con 0.05% de Tritón X-100, 100 mM MOPS, 100 mM NaCl. Los amortiguadores utilizados se muestran en la tabla A que acompaña a ésta figura. Para realizarla se utilizó el mismo modelo que en las figuras anteriores.

TABLA A: AMORTIGUADORES UTILIZADOS PARA ELUIR A LAS SUBUNIDADES DEL COMPLEJO III **

TX-100 (%)	NaCl (M)	Fosfato de Na (M)	Fosfato de K (M)	MOPS (M)	Guanidina HCl (M)	Ditlonita de Sodio (M)	PMSF (M)	UREA (M)
0.05	0.05	0.035	----	----	----	----	----	----
1.00	0.40	0.025	----	----	----	0.002	0.0002	2.00
0.05	0.40	0.050	----	----	----	0.002	0.0002	2.00
0.05	0.20	-----	----	0.01	----	----	0.0002	----
0.50	0.20	0.025	----	----	1.50	----	----	----
0.50	0.25	0.085	----	----	----	----	----	----
0.50	----	0.350	----	----	----	----	----	----
1.00	----	0.075	----	----	6.00	----	----	----
0.50	0.20	0.010	----	----	----	----	0.0002	----
0.50	----	0.150	----	----	----	----	----	----
0.50	----	-----	0.25	----	3.00	----	----	----
0.10	0.20	-----	----	0.01	----	----	0.0002	----
0.05	0.10	-----	----	0.01	----	----	0.0002	----

** Todos los amortiguadores ajustados a pH 7.2 con 1 mM de azida de sodio.

separación de la última subunidad indica una interacción más fuerte con este citocromo, a comparación de la formada con la subunidad VI, separada con un detergente no iónico. La utilización de mayor fuerza iónica para separar este subcomplejo de la columna habla de la necesidad de mayor concentración de un sustituyente para reemplazarlo por el mismo. El Tritón X-100 utilizado solubiliza al subcomplejo, pero no lo desnaturaliza.

La disociación del citocromo b, y la subunidades VI y IX se realiza a baja fuerza iónica, demostrando que la interacción entre éstas y el citocromo b es débil y de carácter hidrofóbico.

Las subunidades I, II y VII aún quedan unidas a la columna de hidroxilapatita, y sólo la utilización de DSS, que es un detergente desnaturalizante, causa su separación. A diferencia de las anteriores técnicas, las subunidades estructurales I y II se separan en la última etapa debido a su fuerte unión a la columna de hidroxilapatita.

Esta visión general de las técnicas de separación de subunidades permite distinguir, con base en las observaciones de estructura del complejo descritas en la introducción, a dos grupos de subunidades: las que se encuentran embebidas en la membrana interna mitocondrial y las que se encuentran fuera de ella, interactuando gracias a fuerzas hidrofóbicas, iónicas, o a otro tipo de uniones proteína-proteína, dadas por la secuencia de aminoácidos y los grupos expuestos de estos. En el primer grupo se puede colocar al citocromo b con las subunidades VII y IX. El segundo grupo se integra por las subunidades I, II, VI y VIII; mientras que las subunidades restantes: IV, V, X y XI, quedan incluidas en un tercer

grupo, ya que existen diferencias en cuanto a la solubilidad que presentan en las tres técnicas descritas.

Cabe destacar la importancia de la separación inicial, en casi todos los casos, de la proteína fierro-azufre (subunidad V). Se conoce que inclusive utilizando condiciones no severas de separación, por ejemplo con amortiguador de bicarbonatos (citado por Weiss y col, 1986) es posible separarla fácilmente de la membrana interna mitocondrial (en mitoplastos).

Sin embargo, en la técnica descrita por Rieske (1979), no se indica si la utilización de clorhidrato de guanidina y sales biliares más sulfato de amonio elimina por completo la presencia de lípidos unidos al complejo, con lo cual cabría esperar que se mantuviera la proteína fierro-azufre (subunidad V) unida al resto del complejo (Shimomura y col, 1984; González-Halphen y col, 1991). Esto no sucede en la técnica reportada por Shimomura y col. (1984, 1986) ni en la de Shägger y col (1986), donde una vez que se eliminan los fosfolípidos, la proteína fierro-azufre se desprende con facilidad del resto del complejo.

En el caso del citocromo c, (subunidad IV) podemos apreciar un cierto paralelismo en todos los métodos, Rieske (1979) propone la formación de un subcomplejo insoluble constituido por ésta subunidad y probablemente con las subunidades VIII y X con las cuáles se encuentra interactuando. En la separación realizada con la columna de hidroxilapatita, éstas subunidades quedan unidas al resto del complejo durante la primera separación y en el caso del fraccionamiento con la columna de fenil-sefaroza, al utilizar un detergente que pueda solubilizarlo, el citocromo c, se separa unido a la subunidad VIII.

La subunidad IX queda unida al citocromo b en las técnicas de separación por medio de las columnas de fenil-safarosa e hidroxilapatita, corroborando la información obtenida con los perfiles de hidropatía (Fig. 9).

Antecedentes de la Utilización del Dodecil Sulfato de Litio.

Por otra parte y como antecedentes sobre la utilización de geles a bajas temperaturas, Noll y Stutz (1968) observaron que el ión litio (Li^+) funcionaba como contraión para el detergente dodecil sulfato (DS) impidiendo su precipitación en frío. La utilización de iones del mismo grupo de la tabla periódica, como el Na^+ o el K^+ formaban sales que provocaban la precipitación del detergente a 15°C . Por lo anterior, Litchner y Wolf (1979) comenzaron a utilizar la sal de Li^+ de este detergente para realizar electroforesis de "baja resolución" a pH menores de 7 y temperatura por debajo de los 15°C . Con estos geles lograron la separación de intermediarios biológicos lábiles a temperatura ambiente y a pH 7, como los intermediarios fosforilados de la ATPasa de Na^+/K^+ o de la ATPasa de Ca^{++} .

Jones y colaboradores (1981), describieron un método de electroforesis de "alta resolución" basándose en la técnica descrita por Litchner y Wolf. Utilizaron un gradiente de poliacrilamida-dodecil sulfato, para pH y temperatura bajos, en el estudio de intermediarios unidos al Cu^{2+} de la proteína citocromo c oxidasa. En este caso, el uso de un gradiente de poliacrilamida fue de gran ayuda para aumentar la separación del sistema anterior, corroborando la necesidad de prescindir de los iones potasio y sodio unidos al dodecil sulfato.

En 1979, Delepelaire y Chua realizaron la electroforesis en poliacrilamida-DS a 4°C de membranas tilacoidales de Chlamydomonas reinhardtii y de Pisum sativum para caracterizar los complejos establecidos entre clorofila y proteína (C-P). El dodecil-sulfato de litio al 0.1% (DSL_i) se utilizó en la solubilización de las membranas tilacoidales y en el amortiguador catódico corriendo el gel a 4 °C en la oscuridad. Cabe destacar que las uniones entre la proteína y la clorofila son de tipo hidrofóbico, las cuales se mantienen a baja temperatura, por lo tanto, para proteínas de membrana en general cabe esperar que los ligandos de las mismas se mantengan unidos a las proteínas (como en el caso de citocromos, bacterioclorofilas, etc.) Así mismo, esta técnica permite detectar complejos proteicos que no se disocian a 4°C.

En 1980, Broglie y col., realizaron la caracterización de los complejos proteína-pigmento de Rhodobacter sphaeroides a partir de cromatóforos (vesículas con el aparato fotosintético obtenidas por rompimiento mecánico). Los autores encontraron que la electroforesis a 4°C con DSL_i a concentraciones de 5 y 7.5% de poliacrilamida, minimizaba las condiciones de disociación del complejo bacterioclorofila-proteína (C-P). Para solubilizar a los complejos la proporción de proteína/DSL_i utilizada fue de 1:20 (peso/peso). De acuerdo con los autores este es un método para detectar rápidamente y aislar el complejo C-P de cromatóforos. La desnaturalización débil que ocurre en la electroforesis representa agregados proteína-Bchl (bacterioclorofila), reflejando la organización in vivo del aparato fotosintético de este organismo.

Así mismo, se puede citar el trabajo de Kubo y Takagi (1986) donde se encuentra que la utilización de DSL_i en geles de

poliacrilamida aumenta la resolución en la separación de polipéptidos. En una electroforesis con un sistema continuo de amortiguadores los péptidos con bajo peso molecular migran más rápidamente, ya que "existe una falta de DSLi en la zona frontal del gel" aumentando la resolución al saturar el gel con el detergente (incluso mayor que la obtenida a 25°C con un gel EGPA- DSS).

Otros antecedentes de trabajos en condiciones no desnaturalizantes, empleando dodecil- β -maltósido muestran las posibilidades para crear ambientes que casi no desnaturalicen a las proteínas (Bass y Bricker, 1988).

El estudio de proteínas oligoméricas plantea preguntas adicionales a las que se proponen para las proteínas solubles y monoméricas. Así una de ellas es: si los polipéptidos encontrados en estos complejos son verdaderas subunidades de los mismos o simples contaminantes. Esto es debido a que puede existir más de una técnica para el aislamiento de estas proteínas y que durante el proceso, algunas subunidades que integren al complejo se pierdan o que, dadas las características de la técnica, no sea posible quitar polipéptidos ajenos al mismo; estas posibilidades se dan debido a las características de los agentes disociantes utilizados. Otro punto de interés en el análisis de las proteínas oligoméricas es el conocer como son las interacciones proteína-proteína que mantienen unidas a los polipéptidos en este complejo macromolecular.

OBJETIVOS:

1.- *Caracterizar al complejo III mitocondrial de corazón de bovino con base a su patrón electroforético en geles de poliacrilamida con DSI a 4°C para:*

2.- *Observar, en condiciones seminativas, las posibles interacciones de las subunidades del complejo y de los grupos prostéticos con sus apoproteínas.*

Para lograr este fin, la identificación de las subunidades se realizará con técnicas de segunda dimensión, inmunotransferencias tipo Western, tinciones específicas de los grupos oxidorreductores y barridos densitométricos, éstos últimos para conocer las estequiometrías entre las subunidades del complejo.

Dicho enfoque experimental permitirá conocer más acerca de las interacciones proteína-proteína entre las diferentes subunidades del complejo. Así mismo, será posible encontrar condiciones electroforéticas en las cuales se pueda purificar alguna de las subunidades en particular a nivel preparativo.

MATERIALES Y METODOS

Obtención de mitocondrias:

Para purificar al complejo III se partió de mitocondrias obtenidas por el método reportado por Löw y Vallin (1963) como se describe a continuación: los corazones frescos de res libres de tejido conectivo se pasaron por un molino de carne. La carne molida se licuó durante 5 seg. con intervalos de 5 seg de descanso hasta completar 30 seg con un amortiguador conteniendo sacarosa 250mM, Tris 5mM y EDTA 2 mM, (pH 7.5). Después se centrifugó a 3,000 rpm en el rotor GS-3 (Sorvall) (o 755 g) durante 10 min. El sobrenadante obtenido se filtró a través de una capa doble de gasa y se centrifugó a 10,000 rpm, con el rotor GSA (o 7,500 g) durante 10 min. El precipitado obtenido se resuspendió en un amortiguador que contenía sacarosa 250 mM y Tris-HCl 5 mM (pH 7.5). Después de homogenizar la pastilla en un homogenizador con vástago de teflón, se procedió a centrifugar 10 min a 3,000 rpm (654.6 g) en el mismo rotor. El sobrenadante obtenido se centrifugó a 10,000 rpm, (7273.5 g) 10 min. El precipitado resultante correspondiente a la fracción mitocondrial se resuspendió en el segundo amortiguador utilizado y se guardó a -70°C.

Obtención del complejo III mitocondrial

De acuerdo con la técnica reportada por Rieske (1967).

A) Preparación de la fracción S-1:

Después de haber determinado la concentración de proteína de las mitocondrias por el método del Biuret (como se describe más adelante) estas se diluyeron a una concentración final de 23 mg/ml de proteína con un amortiguador TSH: sacarosa 0.67M, Tris-HCl 0.05M (pH 8.0) e histidina 0.001M. Se añadió desoxicolato de potasio (DOCK) al 10%, pH 9.0 (0.3 mg/mg de proteína) gota a gota, y KCl sólido (74.6 g/l) en agitación constante. A continuación se centrifugó 45,000 rpm (145,000 g) en un rotor 60 Ti (Beckman) durante 16 min, obteniendo un precipitado verde el cual contiene al complejo IV (citocromo oxidasa) y un sobrenadante rojizo. Esta precipitado se resuspendió en amortiguador TSH y se congeló a -70°C. Al sobrenadante se le añadieron 0.25 volúmenes de agua bidestilada fría, y a continuación se centrifugó a 45,000 rpm (145,000 g) en un rotor 60Ti durante 16 min. El sobrenadante resultante se dializó contra 8 volúmenes de Tris-HCl 10 mM (pH 8.0) durante 3 hrs, utilizando una membrana de diálisis que retiene moléculas mayores a 12-14 000 de peso molecular. A continuación se centrifugó 45 min de la misma manera. El precipitado obtenido denominado fracción S-1 que se resuspendió en amortiguador TSH y se congeló a -70°C.

B) Preparación del Complejo III Crudo.

Después de determinar la concentración de proteína de la pastilla S-1 por el método del Biuret, se ajustó a una concentración de 10 mg/ml con amortiguador TSH, añadiendo DOCK al 10% (0.5 mg/mg de proteína) y acetato de amonio saturado al 50% (16.5 ml/100 ml) en agitación constante. La mezcla se dejó reposar 15 min y se centrifugó 16 min a 45,000 rpm (145,000 g) en el rotor 60 Ti. Se añadió al sobrenadante, en agitación constante, acetato de amonio saturado al 50% (6 ml/100 ml), se dejó reposar 15 min y se centrifugó de la misma forma que en el paso anterior. Después de esto, se agregó al sobrenadante acetato de amonio saturado al 50% (3.2 ml/100 ml de muestra) agitando constantemente y se dejó reposar 15 min para después volver a centrifugar de la misma forma. El precipitado obtenido se denomina fracción R4B que se guardó para una eventual preparación del complejo I. Se agregó acetato de amonio sólido (450 g/l) al sobrenadante en agitación, se dejó reposar 10 min y se centrifugó durante 25 min, a 45,000 rpm (145,000 g) en el mismo rotor. El precipitado obtenido es el complejo III con algunos contaminantes, por lo cual se denomina complejo III crudo. La pastilla se resuspendió con amortiguador TSH, almacenándose a -70°C.

C) Purificación del Complejo III.

Se determinó la concentración de proteína del complejo III crudo por el método del Biuret para diluir el total a una concentración de 10 mg/ml. Se añadió colato de potasio al 20% (0.25 mg/mg de proteína), gota a gota y sulfato de amonio saturado (54 ml/100ml) en agitación constante. La preparación se dejó reposar 10 min y se centrifugó 10 min a 45,000 rpm (145,000 g) en el rotor 60 Ti. Al sobrenadante se le añadió sulfato de amonio saturado (8.35 ml/100 ml), dejando reposar y centrifugando de la misma manera. El material aceitoso flotante fue descartado filtrando a través de una malla de fibra de vidrio. Al sobrenadante se le agregó colato de potasio al 20% (la mitad del volumen agregado anteriormente), gota a gota, en agitación constante, además de sulfato de amonio saturado (3.45 ml/100 ml) dejando reposar y centrifugando de la misma manera. El material aceitoso flotante fue descartado del sobrenadante y posteriormente se le agregó sulfato de amonio saturado (11.5 ml/100ml) dejando reposar y centrifugando igualmente. El precipitado obtenido es el complejo III puro que fue resuspendido suavemente en amortiguador TSH. El complejo se guardó a -70°C hasta su utilización. La concentración del complejo III puro se determinó por el método de Lowry que se describe más adelante.

Determinación de Proteína:

A) Método del Biuret:

Descrito por Gornall y col. (1949), esta reacción colorimétrica involucra la unión del cobre en una solución alcalina con las uniones peptídicas y los residuos de tirosina. Se utilizó para medir proteína en un intervalo de mg, utilizando albúmina sérica de bovino de concentración 10 mg/ml para realizar una curva patrón de 0 a 2 mg de albúmina para llevarla a un volumen de 800 μ l con agua destilada. Se añadió a cada tubo 200 μ l de DOCK al 10% y 2 ml de reactivo del Biuret. Se agitaron los tubos y se dejaron reposar 30 min, leyendo la absorbancia a 540 nm. Para las muestras de mitocondrias se pusieron cantidades de 5, 10 y 20 μ l por duplicado.

B) Método de Lowry:

Fue utilizado para medir concentraciones de proteína en el intervalo de micromolas. Reportado originalmente por Lowry y col. (1951), comparte con el método de Biuret, la unión del cobre con la proteína en solución alcalina pero además este método utiliza el paso de reducción del reactivo fosfomolibdico-fosfotungstato por el complejo. La modificación descrita por Markwell y col. (1978) es la que se empleó en este trabajo, utilizando las cuatro soluciones siguientes:

Solución A: Carbonato de Sodio, 2.0%;
Hidróxido de Sodio, 0.4%;
Tartrato de Sodio, 0.16%;
SDS, 0.1%.

Solución B: Sulfato de Cobre, 4.0%.

Solución C: Mezclar 100 volúmenes de A con uno de B.

Solución D: Mezclar el reactivo de Folin y agua destilada en proporciones 1:1 en cantidad suficiente para todos los tubos a utilizar.

Se utilizaron de 0 a 100 μ l de albúmina de bovino en concentración 1 mg/ml, para la curva patrón. Se ajustaron los tubos a un volumen de 1 ml con agua bidestilada, añadiendo 3 ml de la solución C e incubando 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 0.3 ml de solución D mezclando inmediatamente y dejando incubar 30 min a temperatura ambiente. Se midió absorbancia a 660 ó 540 nm.

Preparación de geles de DSLI-Poliacrilamida.

Se utilizó el método de Shägger y col. (1986) modificado para este trabajo (Gutiérrez-Cirlos y González-Halphen, resultados no publicados) en estos geles, la concentración de acrilamida se cambió de 16% a 10% y el detergente no se incluyó en el amortiguador para preparar los geles. La mezcla para polimerizar se realizó de la siguiente manera:

	Gel Separador 10% T y 3% C	Gel de Muestra 4% T y 3% C.
Acrilamida		
49.5%T y 3%C	1.5 ml	0.25 ml
Amortiguador de geles*	2.5 ml	0.78 ml
Glicerol	0.8 ml (1g)	-----
Agua Destilada	2.5 ml	2.1 ml
Persulfato de Amonio (10%)	25.0 µl	25.0 µl
TEMED	2.5 µl	2.5 µl

A continuación se describen los amortiguadores utilizados en el gel y durante la electroforesis:

Amortiguador de geles*: Tris 3M,
HCL 1M. (pH 9)

Amortiguador Anódico ó Inferior: Tris-HCl 0.2M (ajustar a
pH 8.9).

Amortiguador Catódico ó Superior:
Tris 0.1 M,
Tricina 0.1M,
de 0.005% a 0.1% de DSLI por gel.

Solución Digestora: Tris-HCl, 100 mM (ajustar a pH 6.8)
Glicerol 30%
azul de Bromofenol 0.3%

Los geles se polimerizaron en placas pequeñas y se corrieron en un aparato de electroforesis MINIPROTEAN II de BIORAD.

El complejo III se preparó a una concentración de $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ con solución digestora preparada con anterioridad, para cada carril se colocaron $10 \mu\text{g}$. La mezcla se preparó 20 min antes de correr el gel, con el complejo III sin diluir, el DSI en proporción de $10 \mu\text{g}$ de detergente por μg de bc, todo esto en hielo. Los geles se corrieron a 4°C (cuarto frío) una hora a 30 V con el fin de que las proteínas se condensaran en el límite con el gel separador. A continuación se aumentó el voltaje a 100 V durante cuatro horas o hasta que el frente (azul de bromofenol) llegara a la orilla inferior del gel. En todos los casos se evitó que saliera el frente del colorante, para impedir que las subunidades pequeñas del complejo se perdieran.

Al concluir la corrida, los geles se tñieron por medio de varias técnicas, con el fin de observar el efecto de las diferentes concentraciones de DSI sobre las subunidades que contenían grupos oxidorreductores (ver más adelante).

Geles de Segunda Dimensión de Poliacrilamida SDS:

Se hicieron geles en placa de acuerdo con el método que a continuación se describe; basado en la técnica original descrita por Shägger y col. (1986):

	Gel Separador (16%)	Gel de Muestra (4%)
Acrilamida 30%		
Bis 0.938%	16.0 ml	1.6 ml
Amortiguador de geles*	10.0 ml	3.0 ml
Glicerol (0.795% v/v)	4.0 ml	-----
Agua	-----	7.4 ml
Persulfato de Sodio (10%)	100.0 μ l	100.0 μ l
TEMED	10.0 μ l	10.0 μ l

Los amortiguadores utilizados fueron semejantes a los empleados en los geles de DSLi-poliacrilamida, con las siguientes modificaciones:

- A. de Geles*: se agregó SDS al 0.3%
- A. Catódico: con SDS al 0.1%
- A. Anódico: igual al utilizado en los geles con DSLi.

La electroforesis se realizó en aparatos BRL (Vertical Gel Electrophoresis System) con placas de 1.2 mm de grosor. Para el gel de muestra sólo se utilizó la mitad del volumen, con el fin de dejar suficiente espacio para colocar la banda de primera dimensión y formando pozos adicionales a los lados del gel de DSLi.

Como ya se mencionó, en los geles bidimensionales, se utilizan las bandas de los geles obtenidos en la primera dimensión. Estas bandas se digirieron previamente durante 2 hrs agitando constantemente, en una solución con: SDS 25%, glicerol 10% y Tris-HCl 0.0625M, (pH 6.8). En el momento de realizar la digestión, también se agregó DTT (Ditiotreitol) a 25 ml de la solución anterior para obtener una concentración final de 10 mM (o alternativamente β -mercaptoetanol, para obtener una concentración final de 5%).

Para colocar las bandas de gel una vez digeridas se procedió como sigue:

Se quitaron las pinzas que sujetan los vidrios de cada placa y el separador inferior, los vidrios se separaron con un cuchillo, quitando una de las placas (en la que el gel no quedara pegado). Las bandas digeridas (para cada gel de segunda dimensión se colocaron dos) se ponen sobre el gel de muestra, dejando un pequeño espacio entre ellos, el cual se llena con agarosa 1% líquida, teniendo cuidado en no formar burbujas con ella entre los geles y de no tapar los pozos. A continuación, se colocó encima la otra placa de vidrio, y se pusieron en el aparato de electroforesis, deteniendo las placas con las pinzas y procurando que no quedara ningún orificio por donde pudiera salirse el amortiguador superior. Si después de poner este amortiguador quedaban burbujas entre los geles, se utilizó un cuchillo de punta roma para hacer presión sobre las bandas de geles, con la precaución de no romperlas.

Después de lo anterior se agregaron controles de complejo III diluido a una concentración de $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ con la solución digestora semejante a la utilizada en los geles de DSI, pero conteniendo SDS al 5% de β -mercaptoetanol al 2%. Se pusieron $15 \mu\text{l}$ de ésta mezcla en cada carril, los cuales migraron como en un gel de primera dimensión, sirviendo como controles internos en la identificación de las subunidades.

La electroforesis bidimensional se llevó a cabo a temperatura ambiente, una hora a 30 V y toda la noche a 100 V dejando salir el frente. A continuación se sacaron los geles, quitando el gel de muestra y las bandas de primera dimensión, para la posterior tinción del gel de segunda dimensión con azul de Coomassie y/o con plata.

Tinciones Específicas:

A) Tinción con azul de Coomassie:

Esta técnica se utiliza para teñir bandas polipeptídicas en general, de acuerdo con la técnica descrita por Shägger y col. (1986). Se utilizaron las siguientes soluciones:

Solución Fijadora: metanol al 50%,
ácido acético la 10%.

Solución Teñidora: azul de Coomassie G al 0.1%,
ácido acético al 10%

Solución Desteñidora: ácido acético al 10%.

Los geles se incubaron una hora en solución fijadora y en agitación constante, y con solución teñidora durante toda la noche, para desteñirlos al día siguiente con una esponja que absorbiera el excedente de colorante. Alternativamente, con el fin de acelerar el proceso, los pasos de fijación, tinción y destinción se llevaron a cabo calentando los geles en horno de microondas, durante cinco minutos, dos veces, dejando intervalos entre ellos para enfriarlos y asegurándose que cualquiera de las soluciones empleadas no se evaporara completamente.

B) Tinción con 3,3',5,5''tetrametilbenzidina:

Esta técnica fue descrita por Thomas y col. (1976) y se utiliza para teñir específicamente grupos hemo.

Se preparó una solución con tres partes de benzidina 6.3 mM en metanol, y siete partes de acetato de sodio 0.25M, (pH 5.0). El gel fue dejado con esta solución durante una hora en un contenedor plástico forrado con papel aluminio, en agitación constante a 4°C (en el cuarto frío). A continuación se agregó 0.1 ml de Perhidrol al 30% (agua oxigenada, H₂O₂) por cada 100 ml de solución teñidora. Se esperó aproximadamente 15 min a que aparecieran las bandas teñidas. La reacción se detuvo con agua destilada. Cabe hacer notar que esta tinción desaparece con el tiempo, por lo que se fotografiaron los geles más representativos inmediatamente después de revelarlos.

C) Tinción con Batofenantrolina (BPS):

Reportado por Ohmori y col. (1985) para una proteína fierro-azufre del complejo I mitocondrial, esta técnica consistió en lavar las bandas de geles o el gel completo con agua destilada varias veces, a continuación se dejaron tñiendo en una solución de 50 ml conteniendo BPS 0.08% (p/v) y ácido tioglicólico 6.4% (p/v), durante una hora en agitación constante. Las bandas se revelaron durante este período y después se lavó con agua destilada.

D) Tinción con Plata:

Basada en la técnica reportada por Wray y col. (1981) y Oakley y col. (1990) fue utilizada para resaltar las subunidades de bajo peso molecular en los geles de segunda dimensión después de haberlos teñido con azul de Coomassie. Consistió en lo siguiente:

Después de destefir el gel, este se sumergió en glutaraldehído 10%, durante media hora en agitación constante. Este tratamiento además de fijar las proteínas del gel, incrementan la intensidad de la tinción con el nitrato de plata. Posteriormente se lavó exhaustivamente con agua destilada para eliminar el glutaraldehído. Después de esto, el gel se tñó con las siguientes soluciones:

A) 0.8 g nitrato de plata en 4 ml de agua destilada.

la cual se agrega gota a gota en:

B) 21 ml de NaOH al 0.36% y 1.4 ml de hidróxido de amonio

al 29% aforando a 100 ml con agua destilada.

Esta solución se utilizó en los siguientes 5 min después de preparada, poniendo el gel en agitación constante, durante 15 min en un contenedor de vidrio muy limpio. A continuación se lavó el gel con agua destilada 2 veces durante 5 min agregándole la solución D o revelador conteniendo 5 ml de ácido cítrico 1%, 0.255ml de formaldehído 37.3% y aforando a 500 ml con agua destilada (preparada en el momento) en un contenedor de vidrio limpio. Cuando las bandas de interés se notaron con claridad, la reacción se detuvo con metanol al 50%. En caso de obtener una tinción excesiva con esta técnica, se procedió a desteñir en presencia de fijador rápido de KODAK.

Inmunoréplicas tipo Western.

Esta técnica se utilizó para detectar inmunológicamente a las primeras seis subunidades del complejo III en los geles de DSLi-Poliacrilamida. Está basada en la técnicas descritas por Hawakes y col. (1982) y Towbin y col. (1979), con las modificaciones realizadas por González-Halphen y col. (1988). Utiliza los siguientes amortiguadores:

Transferencia: Tris 25 mM,
Glicina 192 mM,
Metanol 20%,
SDS al 0.1%.

TBS: Tris HCl (20 mM) pH 7.5 y NaCl 0.5%.

TTBS: igual que el TBS con Tween-20 al 0.05%.

Soluciones para teñir las bandas:

BCIP: Fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolil.
30 mg en 4 ml de dimetil formamida (DMF)

NBT: nitro azul de tetrazolio (Nitro Blue Tetrazolium).
60 mg en 2.8 ml de DMF y 1.2 ml de agua
destilada.

Después de realizada la electroforesis en geles de DSLi-poliacrilamida, los cuáles tenían 10µg de DSLi por µg de proteína en la solución digestora y 10 µg de complejo III por pozo, se sacaron los geles con guantes para colocarse en el papel de nitrocelulosa de la siguiente manera:

El papel de nitrocelulosa se puso a remojar previamente en el amortiguador de transferencia, lo mismo que las dos esponjas y los dos cuadrados de papel filtro del tamaño de la rejilla de transferencia. Sobre ésta se colocó una esponja, un papel filtro y a continuación el gel de poliacrilamida, posteriormente el papel de nitrocelulosa, (quitándole las burbujas al pasar un tubo de ensaye a modo de rodillo), papel filtro y la esponja. Se cerró la rejilla y se puso en la cámara de transferencia, la cual se llenó con amortiguador de transferencia. La transferencia se llevó a cabo durante 4 hrs a 250 mA con agitación magnética constante. Después de este tiempo, se sacó el papel de nitrocelulosa cortando tiras que correspondieran a los pozos del gel. Se utilizaron 7 tiras de un gel de 10 pozos, uno para cada una de las 6 primeras subunidades del complejo III. El séptimo se utilizó con el anticuerpo dirigido contra el bc, completo (anti- holoenzima). Las tiras de nitrocelulosa se

lavarón con 20 ml de amortiguador TBS dos veces, durante cinco minutos cada una, en agitación constante. A continuación se bloquearon con 20 ml de gelatina al 3% en TBS por cada tira, incubando toda la noche en agitación constante (dicho paso impide la asociación inespecífica de los anticuerpos al papel de nitrocelulosa). Al día siguiente, las tiras se lavaron dos veces con 20 ml de amortiguador TTBS durante 5 min. A cada tira se le añadió el primer anticuerpo contra cada una de las subunidades y contra el complejo III en 20 ml de gelatina al 1% disuelta en TTBS. Las tiras se dejaron incubando durante 5 hrs, en presencia de las siguientes diluciones finales del suero original de conejo (obtenidos por Miriam Vázquez, en el laboratorio de acuerdo con González-Halphen y col, 1988:

Anticuerpo anti-subunidad	Dilución
I	1:100,000
II	1: 2,000
III	1: 2,000
IV	1: 2,000
V	1:100,000
VI	1: 2,000
bc,	1: 20,000

El primer anticuerpo se lavó con 20 ml de TTBS durante cinco minutos (dos veces), en agitación constante. El segundo anticuerpo (de cabra contra IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina) se adicionó en 20 ml de gelatina al 1% en TTBS para cada tira, en una dilución 1:3,000. Con este anticuerpo se dejaron toda la noche en agitación constante. Finalmente, se lavó el segundo anticuerpo dos veces con 20 ml de TTBS durante cinco minutos.

Para revelar, a cada tira se le agregaron 20 ml de una solución de bicarbonato de sodio 0.1 M y cloruro de magnesio 1 mM, (pH 9.8), seguido de 200 µl de BCIP 17.29 mM y 200 µl de NBT 18.33 mM los cuales producen la reacción colorida con la fosfatasa alcalina en los 5 o 10 min siguientes. La reacción se detuvo lavando con agua bidestilada dos veces.

Barridos Densitométricos

Otra de las técnicas utilizadas para el reconocimiento de las bandas obtenidas en los geles con DSLi fue el barrido densitométrico. El aparato utilizado, un UltroScan XL (LKB), se utiliza para mediciones cuantitativas en geles de agarosa, acetato de celulosa, poliacrilamida, geles de enfoque isoeléctrico y de segunda dimensión. El rayo láser es de helio-neón y produce un haz de luz monocromática a 633 nm que confiere una resolución de 55 μm . Por medio de un sistema óptico se enfoca el rayo a la muestra, mientras que otro sistema convierte la corriente de luz en una señal de voltaje (mV). Gracias a un amplificador logarítmico se puede convertir la señal enviada de la luz no absorbida por el gel, (reflejada por las diferentes bandas teñidas), a una señal proporcional a la absorbancia de las mismas. La máxima distancia que puede barrer el rayo láser es de 110 mm.

Los datos obtenidos de absorbancia fueron procesados por medio del paquete computacional GelScan XL, el cual guarda y mide datos de geles de primera y segunda dimensión y que puede comparar hasta 8 muestras de primera dimensión o dos de segunda dimensión en pantalla.

Los geles fueron barridos por el rayo láser fijando la longitud del barrido con el tamaño del gel, por medio de una regla que contiene el aparato, con un intervalo de barrido de 40 μm ; en este caso los barridos fueron sobre geles teñidos con azul de Coomassie, para poder apreciar todas las bandas existentes. Los datos se guardaron en archivos que el mismo programa creó. Para llevar a cabo el análisis de los picos obtenidos se procedió a dibujar una línea base que indicara lo que se consideraba el fondo creado por la tinción.

Para conocer el peso molecular aproximado de cada una de las bandas se utilizaron marcadores como referencia, de los cuales se decidió que las subunidades I, II y VI eran las ideales para ello, por su rápida disociación desde las concentraciones más bajas del detergente (0.005% y 0.0075%). En este caso, tomando sus datos de peso molecular y de la distancia migrada, el programa realizó un método de calibración lineal de éstos valores interpolando a continuación los datos de distancia migrada de cada pico en los diferentes geles.

Cabe señalar que el método de calibración se realizó para cada gel pues la distancia migrada tanto de los marcadores como del resto de las subunidades difiere de gel a gel. En tablas se mostró el desplazamiento en mm de cada banda durante la electroforesis, el área y altura de cada pico, el área relativa (%) y el peso molecular interpolado en daltones.

A continuación, se determinaron las estequiometrías de las subunidades o subcomplejos formados con los datos de peso molecular (P.M.) y de área relativa (%) tomando como valor inicial el de 10,000

daltones, ya que el valor de las subunidades más pequeñas es cercano a éste. Así, se dividieron todos los datos de P.M. obtenidos en cada gel entre 10,000 y a continuación se calculó la estequiometría de los picos obtenidos o de las subunidades reconocidas, dividiendo el por ciento de área relativa entre el valor ajustado de P. M.:

a.- P.M. obtenido por el programa / 10,000

b.- % Area Relativa / a.

RESULTADOS

GELES DE POLIACRILAMIDA-DSL_i.

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DEL DETERGENTE.

Inicialmente se realizaron geles con DSL_i variando la concentración del detergente tanto en la solución digestora como en el amortiguador catódico. Se utilizaron geles con acrilamida al 10%. Cada pozo contenía entre 0 a 18 μg de detergente por μg del complejo III en la solución digestora, con 10 μg de proteína por pozo. En el amortiguador catódico se utilizaron de 0.005% a 0.01% de DSL_i, una concentración diferente en cada gel. Los geles obtenidos se muestran en la Fig. 14.

La menor concentración utilizada en el amortiguador catódico (0.005%) muestra pocas bandas. Sin embargo, a medida que se aumenta la concentración del detergente en el amortiguador negativo, la resolución de las bandas es mayor. Además se puede apreciar la formación de un frente que probablemente sea la formación de micelas del DSL_i, sin embargo este frente desaparece al aumentar la concentración del detergente.

El efecto de la relación proteína/detergente, también se muestra con claridad, ya que en presencia de 18 μg de DSL_i/ μg de bc, en la solución digestora (la concentración más alta utilizada), el patrón de bandas es más definido y se nota una mayor separación de las mismas.

A concentraciones más altas de DSL_i en el amortiguador catódico, que corresponden a 0.05% hasta 0.1%, el patrón de bandas

FIGURA 14: Perfiles electroforéticos que resultan de variar la concentración de DSLi:

Geles de poliacrilamida al 10%, con diferentes concentraciones de DSLi en el amortiguador catódico, desde 0.005% hasta 0.01%. Para cada gel se pusieron de 0 a 18 μg de DSLi/ μg de bc.

Estos geles se corrieron a 4°C. Al final de la electroforesis fueron teñidos con azul de Coomassie.

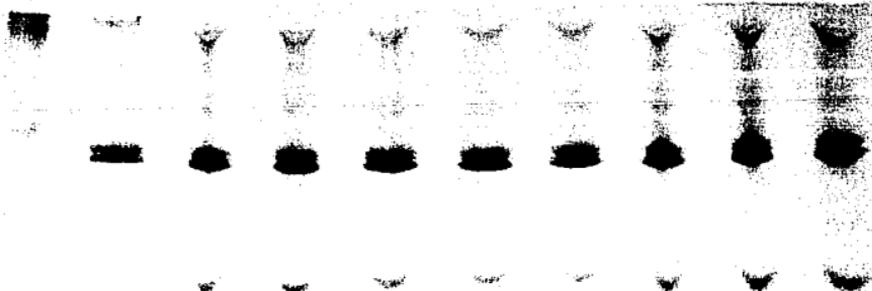
A: 0.005%; B: 0.006%; C: 0.007%; D: 0.008%; E: 0.009%; F: 0.01%.



0 2 4 6 8 10 12 14 16 18

0.005%

A



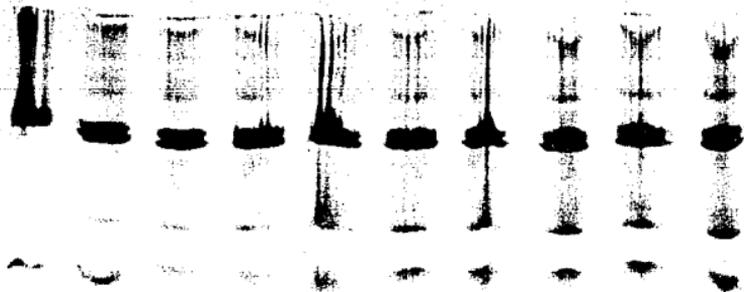
0.006%

B



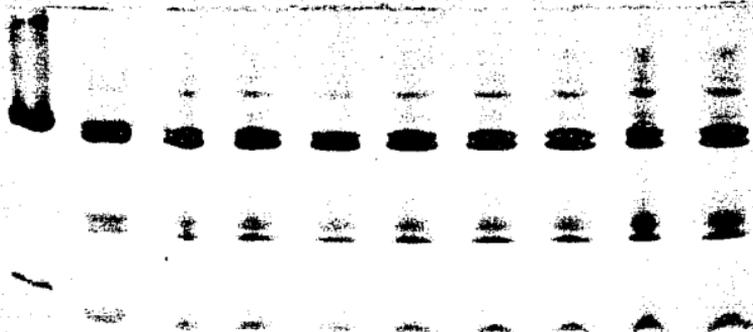
0.007%

c



0.008%

d



0.009%

E



0.01%

F

observado es semejante al obtenido en geles de poliacrilamida-DSS que se muestra en la Fig. 7, con las once subunidades conocidas, reportadas por Shägger y col. (1986) y González-Halphen y col. (1988).

Cabe señalar que la separación de bandas obtenida es con una concentración de acrilamida al 10% ya que si se utilizaban geles con una mayor concentración, por ejemplo, de 16% de acrilamida, el complejo penetraba muy poco y en los casos en que esto ocurría la concentración del detergente era muy alta, tanto en el amortiguador catódico como en la solución digestora (0.05% y de 0 a 40 μg de DSLi/ μg de bc_1).

Tinciones Específicas:

A partir de esta serie inicial de geles, se decidió utilizar una concentración fija en la solución digestora de DSLi (10 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ de bc_1) que se consideró la más representativa en los geles anteriores. A continuación, se procedió a probar el efecto de la concentración del DSLi en el amortiguador negativo, sobre la disociación del bc_1 , sin cambiar la concentración del detergente en la solución digestora para encontrar las condiciones mínimas de disociación de las subunidades. Se corrieron 6 geles con concentraciones desde 0.005% a 0.1% del detergente, en múltiplos de cinco. Estos geles se muestran en la figura 15.

En todos los geles se realizaron cortes de bandas que correspondieran a los pozos de los mismos, con el fin de teñirlos con cada una de las técnicas mencionadas en la metodología. Se empleó la tinción de azul de Coomassie como control.

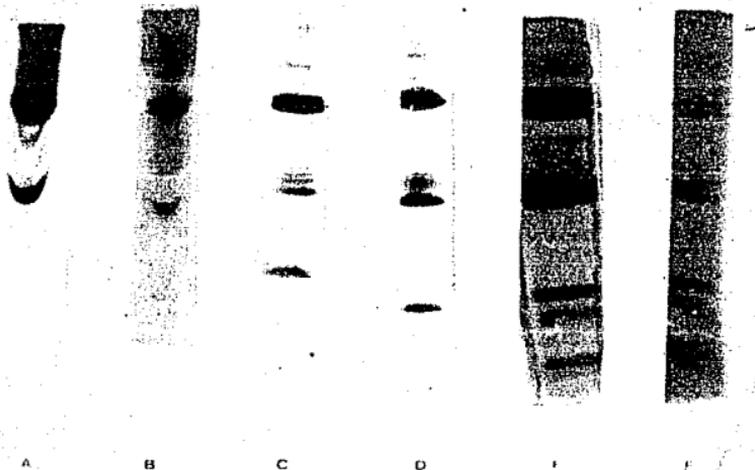


FIGURA 15: Perfiles electroforéticos que resultan de variar la concentración de DSLi en el amortiguador catódico:

Geles con poliacrilamida al 10% y con 0.005% a 0.1% de DSLi en el amortiguador catódico, dos órdenes de magnitud con dos concentraciones cada una. Cada carril contenía 10 μg de bc_1 , en la solución digestora se colocaron 10 μg de DSLi por μg de complejo. La electroforesis se llevó a cabo a 4°C durante 4 hrs. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie.

A: 0.005%; B: 0.0075%; C: 0.01%, D: 0.05%, E: 0.075% y F: 0.1%.

La tinción con 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina que se muestra en la figura 16, para grupos hemo mostró una banda gruesa y difusa de color verde-azul que corresponde a la posición de las subunidades III y IV del complejo, cabe hacer notar que en muchos de los geles se observó sólo una banda intensamente coloreada, correspondiente al citocromo c, (subunidad IV) con altas concentraciones de detergente.

La tinción con batofenantrolina (BPS) dio una coloración muy débil en estos geles, ya que se utilizó muy poca proteína en ellos (10µg para cada pozo). La subunidad V, o proteína fierro- azufre, corresponde únicamente al 10% del total del complejo, lo cual equivale a 4.5 ng fierro de ella en cada carril. La sensibilidad que proporciona esta técnica es insuficiente para detectar una banda con claridad sobre el fondo.

La técnica de tinción con plata se utilizó en el gel de segunda dimensión con el que se analizó el gel corrido con 0.0075% de DSI en el amortiguador catódico, que se consideró como representativo de la fase en que algunas de las subunidades del complejo se disocian conservando al resto del mismo intacto. La tinción con plata hace evidentes a las subunidades más pequeñas confirmando que estas subunidades corrían junto con la V y IV. (Ver figura 17b).

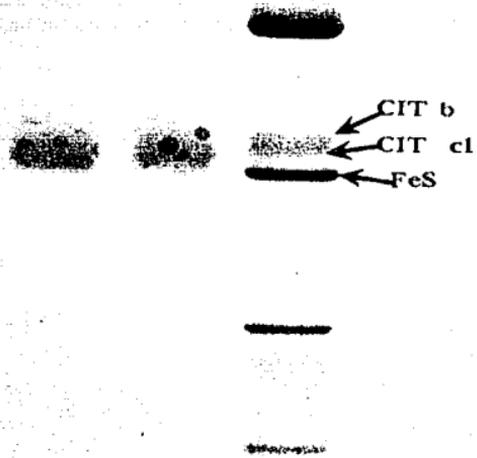


FIGURA 16: Identificación de subunidades con grupos hemo:

Tinción con benzidina (izquierda) de un gel con 0.05% de DSLi en el amortiguador negativo, 10 μ g de bc, por carril y 10 μ g de DSLi / μ g de bc,. A la derecha se muestra una banda del mismo gel teñido con azul de Coomassie como referencia y para identificar a las subunidades con grupos hemo: citocromo c, y del citocromo b, que se muestran con flechas.

**Geles de Primera Dimensión con DSLi, Inmunorréplicas Tipo Western,
Geles de Segunda Dimensión:**

Con objeto de identificar a las subunidades que se permanecieron asociadas durante la electroforesis con poliacrilamida-DSLi, los geles con 10% de poliacrilamida y con 0.005% a 0.1% de DSLi en el amortiguador catódico, se repitieron para utilizarlos en el análisis de segundas dimensiones y de inmunorréplicas tipo Western. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 17.

A continuación se describen los resultados obtenidos para cada concentración del detergente en el amortiguador negativo:

Gel corrido con 0.005% DSLi en el amortiguador catódico:

En la figura 17a se muestra el gel. El citocromo b (subunidad III) se queda en la parte superior del gel de primera dimensión como una banda que migra curvada, este fenómeno es un corrimiento anómalo con respecto a lo que se observa en los geles con DSS; a continuación se observa al citocromo c, y la proteína fierro-azufre (estas dos últimas subunidades se muestran difusas en el gel). Adelante de ellas migran las subunidades estructurales I y II como bandas bien definidas. La subunidad VI presenta una mayor movilidad en comparación con el resto de las subunidades; estas tres últimas subunidades son las primeras que se separan completamente del complejo III.

Las inmunorrélicas tipo Western muestran para las subunidades I, II y VI una sólo banda en cada una, confirmando la completa separación de estas. Para el citocromo b se tinte una banda en la parte superior de la tira de nitrocelulosa, corroborando una migración anormal del mismo, además de presentar una tinción difusa debajo de ella. La subunidad IV (citocromo c₁) se encuentra entre el citocromo b y las subunidades I y II un poco difusa. La proteína fierro-azufre (subunidad V) presenta dos bandas resueltas más una tinción difusa entre ellas.

Con la segunda dimensión realizada, el citocromo b se identifica al inicio del gel como una banda definida, las subunidades I y II migran en el gel aparentemente unidas al citocromo c₁ y a un fragmento de la proteína fierro-azufre. Esta última se encuentra formando una banda desde la posición del citocromo b hasta la del c₁. Una vez más, se confirma que la subunidad VI migra como banda única. Al repetir estos geles se observó que las subunidades VII, VIII y IX migran unidas a la proteína fierro-azufre y probablemente al citocromo c₁.

Gel corrido con 0.0075% de D8Li en el amortiguador catódico:

El gel de primera dimensión, teñido con azul de Coomassie, se muestra en la figura 17b. El citocromo b se observa en la parte superior de éste gel al igual que en el anterior, antes de las subunidades estructurales (I y II), en este único caso, ambas se muestran más separadas entre sí que en los otros geles. Debajo de ellas se observa otra banda, la subunidad VI sigue migrando delante del resto de las subunidades.

FIGURA 17: Análisis de los geles de DSLi por Geles Bidimensionales e Inmunorrélicas tipo Western:

Segundas dimensiones (poliacrilamida-DSS) e inmunorrélicas tipo Western (en papel de nitrocelulosa) para los geles de primera dimensión realizados con DSLi.

Para las segundas dimensiones, que se muestran en la parte superior de la figura, el gel tiene un carril a la izquierda como un control del mismo complejo completamente disociado, Shägger y col (1986) (ver figura 7a) para reconocer a las subunidades.

En el caso de la inmunorrélicas, en la parte inferior de la figura, se muestra la banda de gel teñido con azul de Coomassie a la izquierda de los papeles de nitrocelulosa. De éstos últimos (y de izquierda a derecha) el primero contiene anticuerpo contra el complejo bc₁, a continuación anticuerpo dirigido contra la subunidad I, antisubunidad II, anticitocromo b, anticitocromo c₁, antiproteína hierro-azufre, y antisubunidad VI, las flechas señalan la banda revelada con el anticuerpo. En cada caso, se señala la concentración de DSLi utilizada.



1a D.

bcl

I

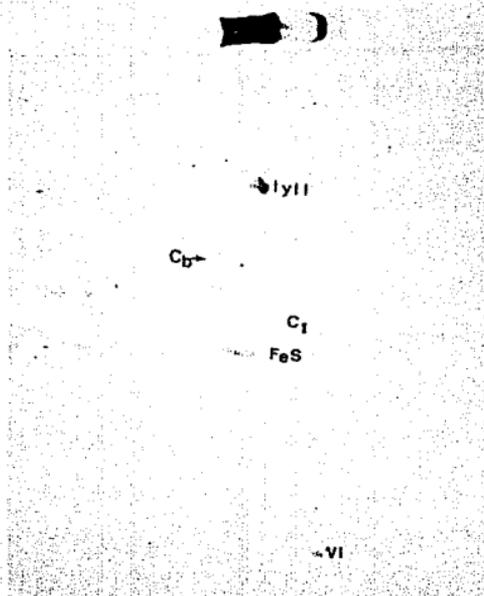
II

CIT b

CIT cl

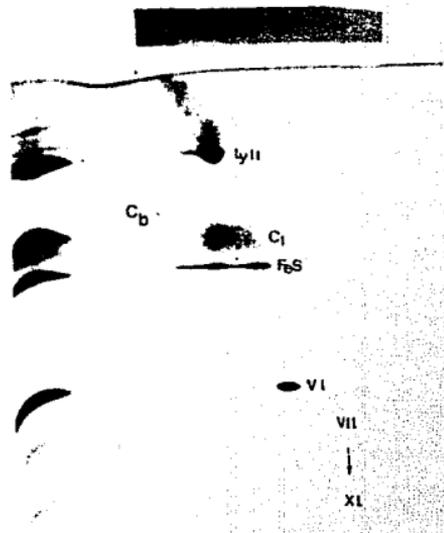
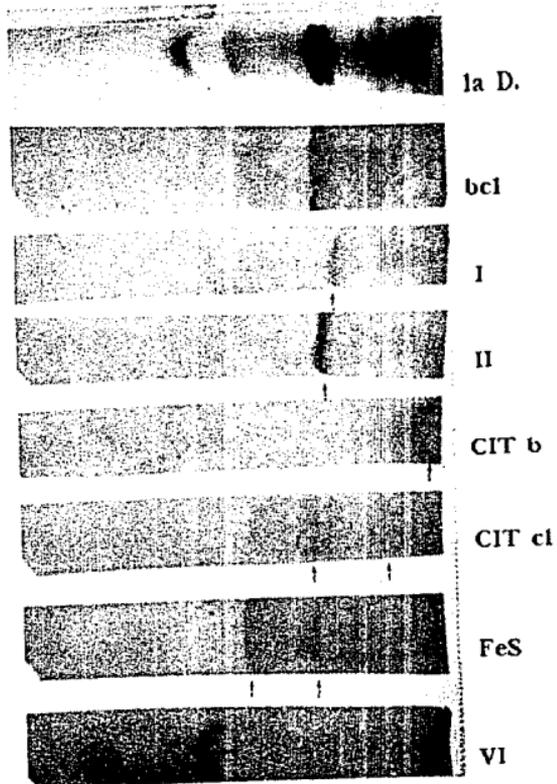
FeS

VI



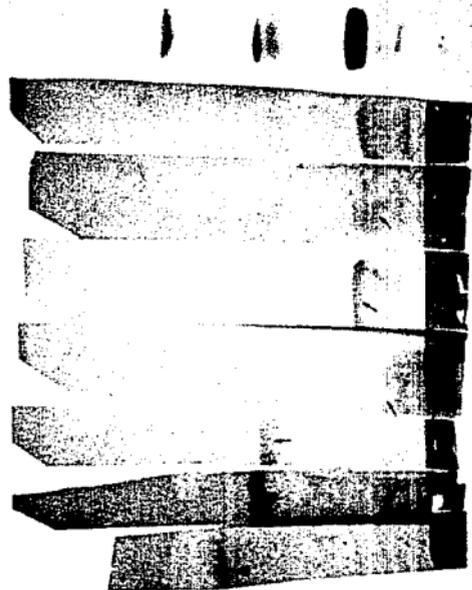
0.005%

17 a



0.0075%

17 b



1a D.

bc1

I

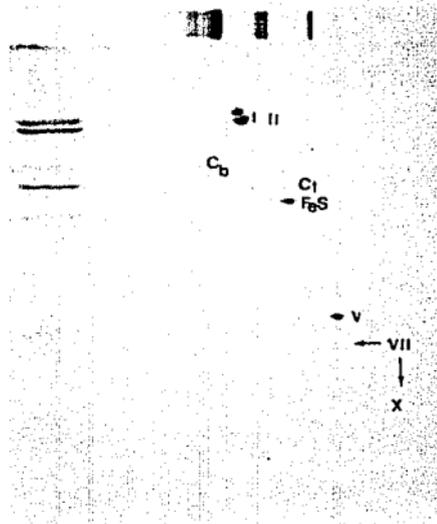
II

CIT b

CIT cl

FeS

VI



I II

C_b

C₁
F₆S

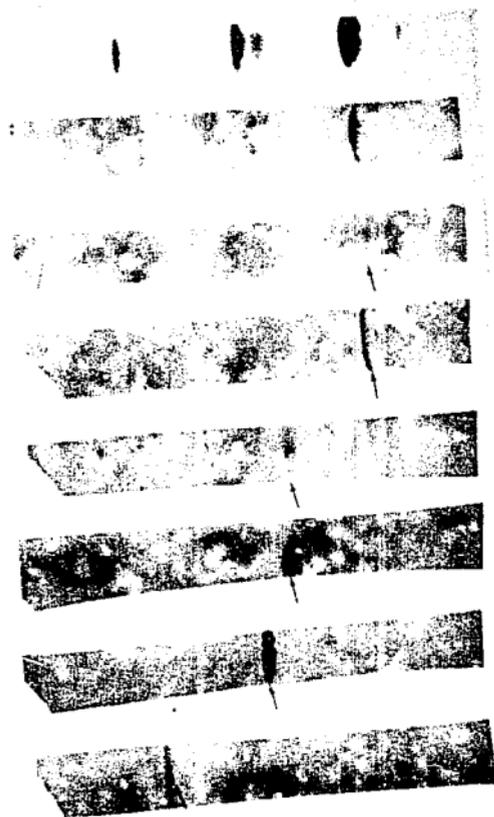
v

VII

X

0.01%

17c



la D.

bcl

I

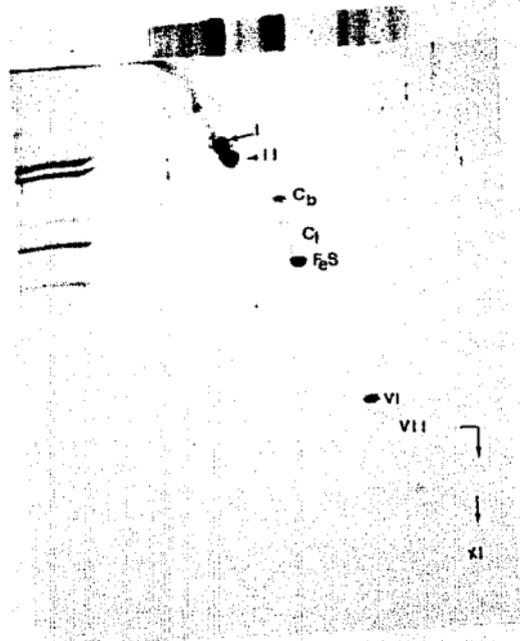
II

CIT b

CIT cl

FeS

VI



Cb

Cl

FeS

VI

VII

XI

0.05%

17 d



1a D.

bcl

I

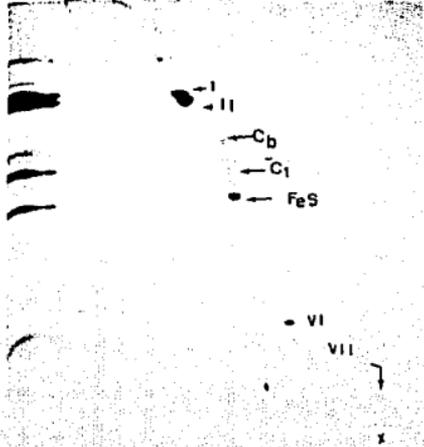
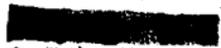
II

CIT b

CIT cl

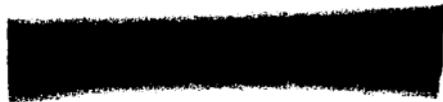
FeS

VI



0.075%

17e



la D.



bcl



I



II



CIT b



CIT cl



FeS

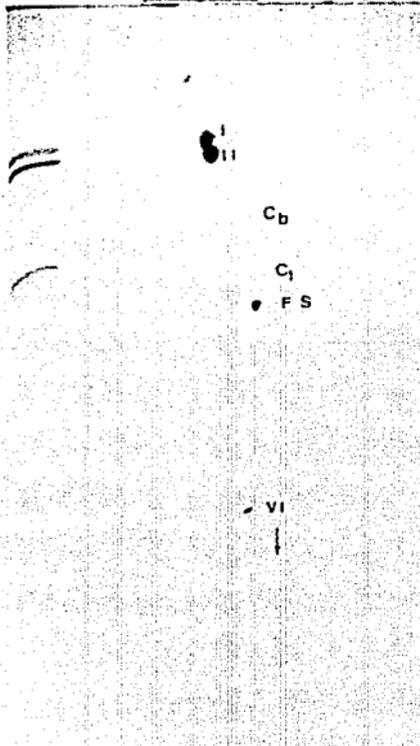


VI

VI

VII y VIII

IX y X



0.1%

17f

En las inmunorrélicas tipo Western para este gel las subunidades estructurales se observan como bandas bien definidas, lo cual confirma que ambas se han separado del complejo III. En el caso del citocromo b, su posición se mantiene en la parte superior del gel. El citocromo c₁ se observa un poco difuso aunque los anticuerpos revelan una banda del mismo teñida antes de las subunidades estructurales. La proteína fierro-azufre se localiza debajo de la subunidad II. La subunidad VI se observa nuevamente, como una banda bien definida.

En la segunda dimensión (en este caso teñida con plata) el citocromo b se sitúa al inicio de la migración de las subunidades, a continuación un fragmento de la proteína fierro-azufre (la cual se observa como una línea corriendo desde el sitio del citocromo b hasta cerca del c₁), seguida por las subunidades estructurales (I y II) que comigran con el citocromo c₁, éste último aparentemente unido a una porción de la proteína fierro-azufre. La banda que se observa a continuación de éstas en la primera dimensión, corresponde a otro fragmento de la subunidad V (proteína fierro-azufre) junto con este fragmento migran las subunidades VII y VIII. La subunidad VI corre delante de este subcomplejo y la IX aparentemente delante de ella.

Gel corrido con 0.01% de D8Li en el amortiguador catódico:

En éste gel de primera dimensión, teñido con azul de Coomassie, (figura 17c) se observa una mayor cantidad de bandas. Las subunidades I y II se sitúan en la parte superior del gel, seguidas del citocromo b, aunque todavía se observa una tinción difusa en esta zona. Debajo

de ellas migra el citocromo c_1 , seguida de la proteína fierro-azufre. La subunidad VI se observa a continuación de ellas con una zona de tinción difusa debajo de ésta.

Las subunidades I y II se observan como bandas definidas en la parte superior del gel al revelar con anticuerpos contra ellas en las inmunorréplicas tipo Western. La subunidad III se observa difusa entre las subunidades estructurales y el citocromo c_1 , éste último formando una banda gruesa antes de la proteína fierro-azufre, también resuelta como una banda. La subunidad VI también queda definida como banda única.

El patrón de migración que se observa para el complejo III en los geles de segunda dimensión, muestra la formación de una diagonal incipiente a 0.01% del detergente en el amortiguador catódico formada por las subunidades I, II, VI y las subunidades de bajo P.M. El citocromo b corre debajo de las subunidades estructurales apartándose de la diagonal, mientras que el citocromo c_1 se observa como una banda difusa y unida a la proteína fierro-azufre. Esta última subunidad forma una línea que va desde el citocromo b hasta antes de la subunidad VI.

Gel corrido con 0.05% de D8Li en el amortiguador catódico:

El gel de primera dimensión teñido con azul de Coomassie, (ver figura 17d) para ésta concentración de detergente utilizada muestra a las subunidades I y II totalmente separadas del resto del complejo y en la posición que les corresponde debida a su P.M. (49 y 47 kDa, respectivamente). Las subunidades con grupos oxidorreductores (III, IV y V) migran por debajo de las estructurales, seguidas de la

subunidad VI. En la parte inferior del gel se aprecian nuevas bandas, correspondientes a las subunidades de bajo P.M. que se disocian a ésta concentración del detergente.

En el caso de las inmunorrélicas tipo Western, los anticuerpos confirman la disociación total de las primeras seis subunidades al formar bandas bien definidas.

La diagonal que se comenzaba a perfilar en el gel de segunda dimensión para 0.01% de DSLi en el amortiguador catódico, se observa más definida con el resto de las subunidades de bajo P.M., aunque las subunidades con grupos redox (III, IV y V) aún se separan de la misma.

Gel corrido con 0.075% de DSLi en el amortiguador catódico:

El número de bandas definidas para el gel de primera dimensión, teñido con azul de Coomassie, (ver figura 17e) mayor que a 0.05% de detergente. Se pueden apreciar las subunidades cuya característica es la de presentar una tinción más intensa, como son I y II, la proteína hierro-azufre, la VI, la VII y la IX. El patrón de bandas en éste gel es muy semejante al observado en los geles de desnaturalizantes poliacrilamida-DSS (reportados por Shägger y col., 1986) a temperatura ambiente (ver Fig. 9). En las inmunorrélicas, al revelar los anticuerpos contra las seis primeras subunidades, se observan bandas bien definidas aunque el citocromo c, se presenta un poco difuso. La diagonal que se forma en el gel de segunda dimensión para ésta concentración de DSLi en el amortiguador negativo muestra a las subunidades III, IV y V (que poseen grupos oxidorreductores) separadas de la misma, es decir, con un corrimiento anómalo con

respecto a su peso molecular aparente.

Gel corrido con 0.1% de DSLi en el amortiguador catódico:

En el gel de primera dimensión (figura 7f) teñido con azul de Coomassie, el patrón de bandas obtenido a ésta concentración es casi igual al reportado por Shägger y col. (1986) en geles de poliacrilamida-DSS a temperatura ambiente (ver Fig. 7). Se pueden distinguir claramente nueve de las once subunidades que migran correctamente de acuerdo con su P.M. Al revelar con anticuerpos contra las primeras seis subunidades en inmunorrélicas tipo Western estas subunidades se observaron totalmente disociadas sin tinción difusa, a excepción del citocromo c_1 , que forma una banda un poco más gruesa que el resto de las subunidades reveladas en las inmunorrélicas. Cabe señalar aquí que incluso en geles disociantes con DSS a temperatura ambiente pero en ausencia de agentes reductores (ditiotreitól o mercaptoetanol) el citocromo c_1 corre como una banda difusa, probablemente debido a una heterogeneidad en el estado redox de las cisteínas.

El gel de segunda dimensión muestra la diagonal que comenzó a formarse a partir de 0.01% de DSLi en el amortiguador negativo, aunque el grupo de las subunidades estructurales no se integra aún a esta diagonal. En este caso, puede apreciarse que todas las subunidades se separaron y resolvieron en el gel de primera dimensión.

Barridos Densitométricos:

Otra de las técnicas de análisis empleada para conocer el comportamiento de las subunidades durante la electroforesis en geles de DSLi consistió en realizar barridos densitométricos de los mismos. En este caso se leyeron los geles por separado. Así mismo, los geles teñidos con benzidina, en especial los de 0.05% de DSLi, se utilizaron como referencia para distinguir las zonas donde se encontraban los citocromos en el gel (Fig. 18). De cada uno de los geles se muestra la gráfica obtenida y la referencia para correlacionar los picos obtenidos con las bandas del gel (ver Apéndice).

Para asignar a las subunidades su peso molecular aparente (P.M.), se utilizaron como marcadores internos aquellas subunidades que se separaron desde las concentraciones más bajas de DSLi (0.005% y 0.0075%) como fueron las subunidades I, II y VI; en los geles con 0.075% y 0.1% se consideró que podían utilizarse las subunidades IV y V como referencia. Con base en ellas se calcularon los pesos moleculares de los picos con mayor absorbancia, corrigiendo aquellas zonas de la gráfica que se consideraron como parte del fondo de tinción. Dichos cálculos se llevaron a cabo con el programa GelScan XL (ver materiales y métodos). Además se realizó la comparación de los geles con 0.005% y 0.0075% de DSLi con el de mayor concentración utilizada (0.1% de DSLi) como referencia, para identificar la posible ubicación de las bandas de las subunidades a cada concentración utilizada del detergente (ver Fig. 19).

En la tabla II se muestra la comparación de los picos

FIGURA 18: Barridos Densitométricos de Geles de DSLi:

Comparación realizada entre los geles con 0.005%, 0.0075% y 0.1% de DSLi para observar la separación de algunas de las subunidades y la formación de subcomplejos bajo la acción del detergente. Las subunidades fueron identificadas con base a las segundas dimensiones correspondientes, inmunorrélicas tipo Western y pesos moleculares aproximados obtenidos de los barridos densitométricos. En el barrido densitométrico realizado para el gel con 0.1% de DSLi en el amortiguador negativo se destaca la situación de las subunidades ya disociadas.

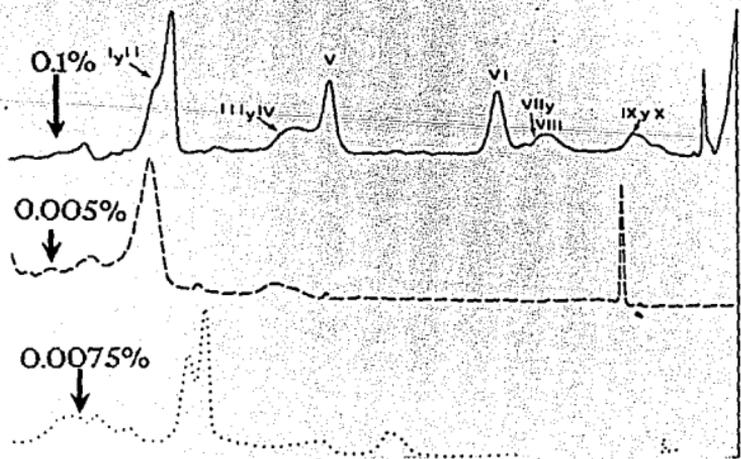
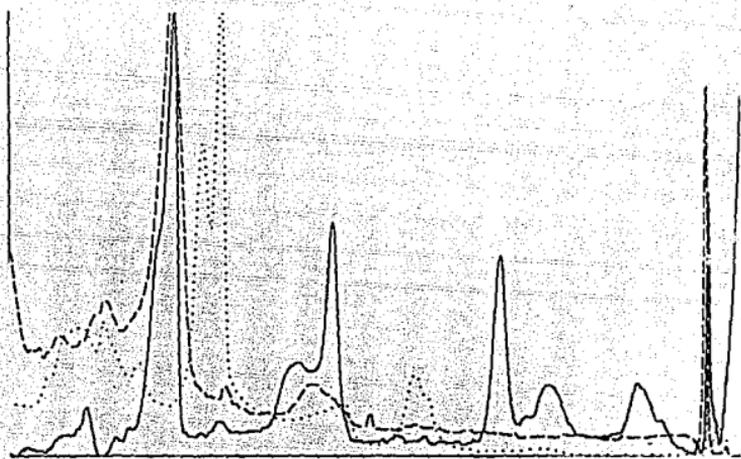


FIGURA 19a: Barridos Densitométricos con Actividad Peroxidásica:

Barrido densitométrico del gel con 0.05% de DSLi teñido con 3',3',5',5'-tetrametilbenzidina (ver Fig. 16) para destacar la región en que se encuentran los citocromos tanto b como c₁.

FIGURA 19b: Comparación con el barrido densitométrico realizado para el gel de 0.1% de DSLi en el amortiguador catódico, la zona de los citocromos se destaca con flechas.

línea continua: actividad peroxidásica.

línea discontinua: tinción del gel con 0.1% de DSLi en el amortiguador catódico con azul de Coomassie.

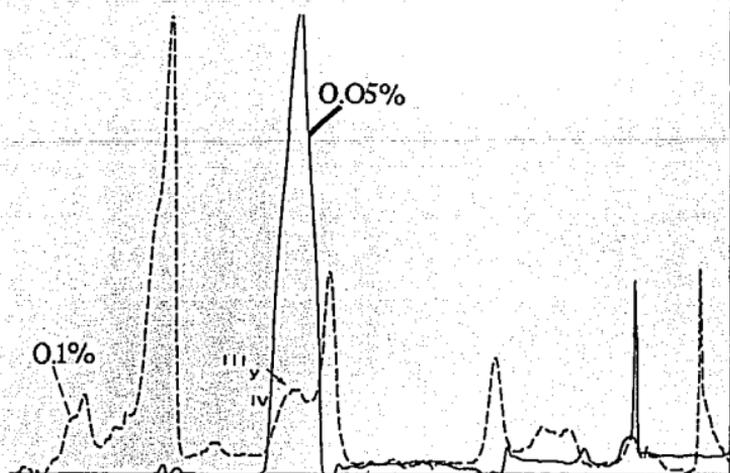
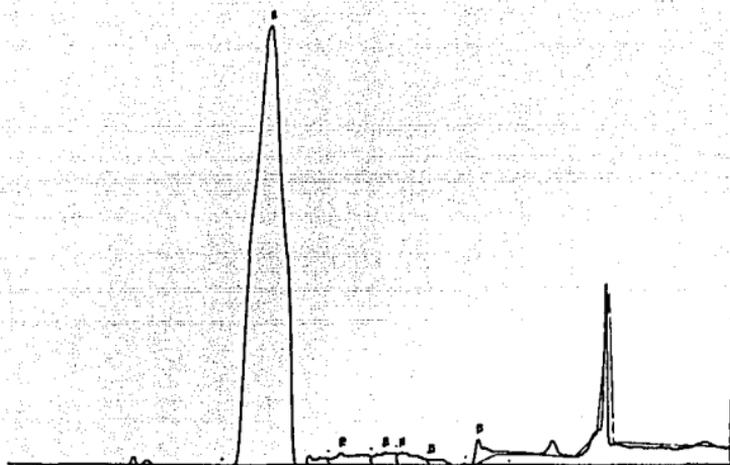


TABLA II: Identificación de los picos observados en los barridos densitométricos de los geles de primera dimensión con DSLI.

λ DSLI	No. de picos identificables	Rel. Área %	Equivalencia a (2a D)	Comentario
0.005	3	2 - 10.9 3 - 77.2 4 - 9.2	2 - b 3 - core* 4 - VI	Core* + IV. V + subun. pequeñas.
0.0075	6	1 - 12.2 2 - 5.6 5 - 23.3 6 - 29.3 7 - 4.8 8 - 6.7	1 - b 2 - b 5 - core + ? 6 - IV + V? 7 - V + ? 8 - VI	Core + IV, V + subun. pequeñas
0.01	5	3 - 5.0 6 - 32.7 8 - 14.2 9 - 7.8 12 - 9.3 13 - 2.4	3 - "b" 6 - I, II, III 8 - IV 9 - V 12 - VI 13 - ?	I: hombro pequeño. Pico 13: subunidades pequeñas.
0.05	9	2 - 4.1 3 - 28.2 5 - 13.2 6 - 10.9 8 - 7.2 9 - 6.5 10 - 6.6 11 - 3.9 12 - 4.9	2 - b? 3 - I y II 5 - IV 6 - V 8 - VI 9 - ? 10 - ? 11 - ? 12 - ?	Restos de b antes de core. Pico 9 en adelante son las subun. pequeñas.
0.075	5	6 - 31.0 9 - 7.7 10 - 15.7 13 - 11.4 15 - 4.1	6 - core 9 - b 10 - IV y V 13 - VI 15 - subun. pequeñas	Core: hombro y pico. b: aún disperso. IV y V cercanas.
0.1	7	3 - 46.0 5 - 9.0 6 - 16.2 7 - 7.9 8 - 2.8 9 - 2.9 10 - 2.5	3 - core 5 - III/IV 6 - V 7 - VI 8 - VII 9 - VIII 10 - IX, X y XI?	Probablemente, las subunidades X y XI están en el último pico.

Core* = subunidades estructurales.

observados en cada gráfica y de las bandas en cada caso, así como la posible identificación de las subunidades con las bandas obtenidas de la segunda dimensión y un comentario de lo que puede estar sucediendo con cada una de las subunidades. Además, a continuación de cada una de las gráficas, se presenta el reporte elaborado por el programa GelScan XL con el cálculo del peso molecular, los posibles subcomplejos formados, el porcentaje de área relativa de cada pico, su altura y área en mm y la distancia migrada de cada una de las subunidades, de acuerdo con el punto inicial fijado en el aparato (Tablas de los barridos densitométricos en el Apéndice).

El cálculo de las estequiometrías de las subunidades y los posibles subcomplejos formados se muestra en la tabla III, señalando el número de pico y el valor obtenido. Para las subunidades estructurales se dividió entre dos el valor resultante en los casos en los que se utilizó el promedio de ellas.

TABLA III: ESTEQUIOMETRIAS APARENTES DE LOS PICOS OBTENIDOS EN LOS BARRIDOS DENSITOMETRICOS

0.005% DSLi -
No. PICO ESTEQUIOMETRIA

1	0.11
2	1.56
3 I/II	14.9/2 = 7.45
4	0.40
5 VI	7.46
6	2.2

0.0075% DSLi -
No. PICO ESTEQUIOMETRIA

1	1.08
2	0.48
3	0.98
4	0.52
5 I	4.03
6 II	6.14
7 FeS	3.57
8	5.10
9	2.57
10	2.48

0.01% DSLi -
No. PICO ESTEQUIOMETRIA

1	0.35
2	0.32
3 I/II	0.55/2 = 0.27
4 C ₁	12.14
5 FeS	7.44
6	5.57
7 VI	1.33
8	15.94
9	6.02

0.05% DSLi -
No. PICO ESTEQUIOMETRIA

1	1.09
2 I/II	11.0/2 = 5.5
3 C ₁	3.52
4 FeS	3.99
5	1.96
6 VI	6.11
7	4.88
8	2.66
9	1.53

0.075% DSLi -
No. PICO ESTEQUIOMETRIA

1 I/II	11.50/2 = 5.74
2	3.3
	9.76
4 VI	7.12
5	2.3

0.1% DSLi -
No. PICO ESTEQUIOMETRIA

1	1.34
2	0.453 FeS
3 I/II	9.8/2 = 4.9
4	0.35
5 C ₁	3.17
6 FeS	6.76
7 VI	5.34
8	2.57
9	2.62
10	3.35

DISCUSION

Disociación del complejo III en geles con diferentes concentraciones de dodecil sulfato de litio

Una de las características importantes del detergente dodecil sulfato de litio (DSL_{Li}), de acuerdo con lo observado por Kubo y Takagi (1985), es que durante la electroforesis el ión Litio (Li⁺) se separa del detergente, quedando sólo el complejo formado por el dodecil sulfato y la proteína. La acción del litio sobre el detergente es impedir su precipitación en frío disminuyendo la temperatura micelar crítica del mismo, por lo que la formación de éstas ocurre a una temperatura de 4 °C y no a más de 15°C como en el caso del DSS, así mismo, este contraión impide que el detergente precipite a bajas temperaturas.

Al contrario del DSS que al parecer propicia una forma desenrollada de las proteína, parecida a un bastón (Reynolds y Tanford, 1970) el DSL_{Li} al encontrarse en frío parece mantener menos desnaturalizada a la proteína, permitiendo uniones entre ligandos, (Delepelaire y Chua, 1979; Broglie y col, 1980). A bajas temperaturas las uniones de tipo iónico entre las subunidades se mantienen y sólo se rompen al aumentar la concentración del detergente.

El utilizar una concentración de 10% de acrilamida en los geles de primera dimensión permite que los subcomplejos con dos o más subunidades asociadas penetren mejor en el gel, separándolas por su P.M. pero permitiendo la migración de aquellas que no formen un subcomplejo. Los geles originales descritos para el bc, (Shägger y

col, 1986) utilizan 16% de acrilamida, lo cual no permitiría la resolución de los subcomplejos formados durante la electroforesis a 4°C. Por otra parte, los geles de poliacrilamida utilizados no presentan grandes variaciones de temperatura, ya que los geles eran lo suficientemente delgados como para que el calor generado por la corriente de la fuente se disipara eficazmente. Además, el sistema de tipo discontinuo utilizado proporcionó una mejor resolución de las subunidades.

Kubo y Takagi (1986) han señalado que la utilización de DSLi a 4°C, aporta una separación igual que el DSS a 25°C que coincide con nuestros resultados para los geles realizados a la máxima concentración utilizada (0.1%) pues el patrón obtenido fue semejante al obtenido con los geles con DSS a temperatura ambiente (ver Fig. 7).

Para la realización de las segundas dimensiones sí se utilizó DSS ya que lo que se requería era la disociación completa de las subunidades y su separación de acuerdo con su peso molecular aparente. La tinción con plata dió la oportunidad de observar el destino de las subunidades de bajo P.M. y se consideró que para la segunda dimensión del gel con 0.0075% de DSLi era oportuno llevar a cabo ésta tinción ya que es la más representativa de la disociación inicial de las subunidades hidrofílicas.

El empleo de segundas dimensiones e inmunorréplicas tipo Western así como los barridos densitométricos fueron de gran ayuda para corroborar los datos observados durante la primera dimensión con DSLi.

Al utilizar 3',3', 5',5'-tetrametilbenzidina (colorante específico para grupos hemo) se observó que las bajas temperaturas

mantienen los ligandos de las proteínas pues las bandas que se tiñen corresponden en posición al citocromo b y al c₁, principalmente, esto se comprueba con las segundas dimensiones y las inmunorélicas tipo western. Esto nos sirvió de referencia en el resto de los barridos densitométricos (ver Apéndice). En el gel que contenía 0.05% de DSLi en el amortiguador negativo no se tiñó una banda extra, lo que indicó la presencia de ambos citocromos en un mismo sitio (ver Figs. 16 y Apéndice de barridos densitométricos).

La separación de las subunidades puede verse muy bien en los geles de segunda dimensión correspondientes. Con 0.01% de DSLi (ver Fig. 17 c) es posible lograr la separación de casi todas las subunidades, observando la diagonal incipiente que lo denota. Al aumentar la concentración hasta el máximo utilizado, esto es, 0.075% y 0.1% de DSLi (ver Figs. 17, e y f), la disociación de las subunidades es total, en este caso, las últimas en separarse son las que poseen grupos oxidorreductores: citocromos b, c₁ y la proteína hierro-azufre, pero aún aquí su migración no se ajusta a la diagonal formada por el resto de las subunidades, indicando que la acción del detergente no es suficiente para separar completamente a estas tres subunidades.

Los datos de los picos analizados en los barridos densitométricos fueron interpolados mediante los valores de migración a la recta obtenida con los valores de los marcadores internos utilizados (las propias subunidades I, II, IV, V y VI). Por ello los valores obtenidos son más confiables y aportan información adicional sobre el comportamiento de las subunidades bajo la acción del DSLi, en especial, cuando forman subcomplejos.

El hecho de que los pesos moleculares no correspondan

exactamente puede indicar que la subunidad o subunidades no se hayan disociado completamente del complejo o que la cantidad de azul de Coomassie que se une a cada subunidad es menor, influyendo en la cuantificación; también es posible que las subunidades se encuentren en cantidades subestequiométricas en relación a los otros componentes del complejo, sin embargo los datos calculados de estequiometría indican lo contrario (ver tabla IX), confirmando las asociaciones entre las diferentes subunidades.

En los geles de poliacrilamida con DSLI realizados con la técnica de EGPA-DSLI a 4°C, se distingue la separación inicial de las subunidades más accesibles a la acción del detergente, es decir aquéllas que se encuentran en las porciones hidrofílicas de la membrana interna mitocondrial, lo cual ocurre a concentraciones bajas del DSLI (0.005% y 0.0075%). Las subunidades que se separan en estos casos son la I, la II, la VI y la XI. Las primeras tres poseen un carácter totalmente hidrofílico, de hecho, las subunidades estructurales I y II de Neurospora crassa forman un subcomplejo hidrofílico al separarlas con el detergente Tritón X-100 (Weiss y col, 1986). Sin embargo cabe mencionar que la subunidad XI posee una zona de su estructura con residuos de aminoácidos hidrofóbicos. Yu y col (1991) purificaron y cristalizaron al complejo III de bovino carente de la subunidad XI y la consideran como un contaminante de la preparación del complejo, aunque también podría ser que su situación en el bc₁ (ver el modelo de la topología del bc₁, Fig. 7) permitiera una mayor accesibilidad del detergente y por tener un tamaño tan pequeño, sea muy fácil perderla durante la purificación del complejo.

A mayor cantidad del detergente, (0.01% y 0.05%) es posible

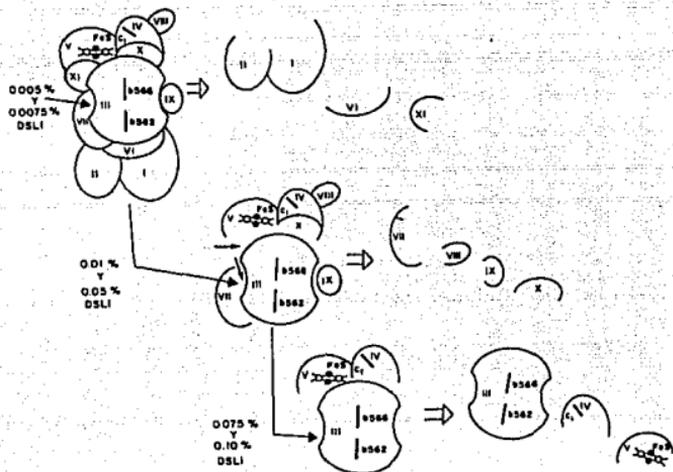


FIGURA 20a: Diagrama de la disociación del complejo bc, que explica los resultados obtenidos en el presente trabajo suponiendo que el citocromo b se agrega por falta de detergente debido a su carácter hidrofóbico (ver perfiles de hidropatía, fig. 9).

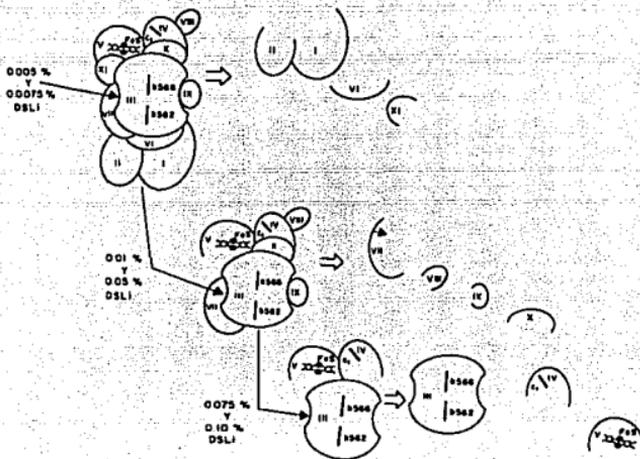


FIGURA 20b: Diagrama de la disociación del complejo bc₁, que explica los resultados obtenidos en el presente trabajo suponiendo que el citocromo b no se separa del resto de las subunidades con las que se encuentra unido en la membrana interna mitocondrial.

separar subunidades que se encuentran interactuando directamente con el citocromo b, como son las subunidades VII, IX y X (ver el modelo topológico del complejo, Fig. 7). Los polipéptidos anteriores poseen una región con residuos de aminoácidos hidrofóbicos, sin embargo a estas concentraciones del detergente es posible solubilizarlos y hacerlos migrar separadamente.

A concentraciones menores de 0.05% de DSLi no es posible solubilizar al citocromo b que es la subunidad más hidrofóbica del complejo, con 8 - 9 cruces transmembranales (di Rago y Colson, 1988; Howell y Gilbert, 1988; Howell, 1989). En estas condiciones, el citocromo b no entra en el gel separador. Sin embargo, al aumentar la concentración de DSLi en el amortiguador catódico, el detergente que incorpora la proteína es mayor y es entonces cuando comienza a solubilizarse eficazmente y a migrar en el gel de separación, hasta recuperar su posición habitual en los geles de segunda dimensión a altas concentraciones de DSLi de acuerdo con su peso molecular, semejante a lo que se observa en un gel de DSS a temperatura ambiente (ver Fig. 7) (Shägger y col, 1986).

En la figura 20a se muestra el modelo de lo que ocurre; el citocromo b aparece separado del resto de las subunidades que lo rodean por su baja solubilidad en presencia de 0.005% y 0.0075% de DSLi en el amortiguador negativo. Sin embargo, al aumentar la concentración del detergente y al mismo tiempo, la solubilidad del citocromo b, es posible que durante la electroforesis la unión entre las tres subunidades con grupos redox permanezca. El resto de las subunidades que rodean al citocromo b quedan solubilizadas con 0.01% y 0.05% de DSLi y migran hacia su P.M. aparente.

Otra posibilidad es que este citocromo quede unido al resto de

las subunidades que no se disocian a 0.005% y 0.0075% del detergente. Esto se muestra en la figura 20b. Al formar un subcomplejo de mayor peso molecular al de las subunidades estructurales, esta migra antes que ellas, quedando al inicio del gel de primera dimensión. Sólo al llegar a 0.01% de DSLi estas subunidades son solubilizadas, dejan libre al citocromo b permitiendo conservar la unión entre las subunidades con grupos redox.

Sin embargo, en los geles de segunda dimensión realizados, el citocromo b a bajas concentraciones de DSLi se observa libre de otras subunidades (excepto quizá por un fragmento de la proteína fierro-azufre) y al principio del gel, lo cual puede descartar al segundo modelo.

Por otro lado, el citocromo c₁ y la proteína fierro-azufre sólo se separan en geles con 0.1% de DSLi (ver Figs. 17f y el apéndice de barridos densitométricos). Para el caso de 0.0075% de DSLi en el amortiguador negativo del gel (Fig. 17b), se aprecian dos picos de altura proporcional en la región de las subunidades estructurales, lo cual puede ser indicio de una unión entre la proteína fierro-azufre y el citocromo c₁, dando un peso molecular cercano al de la subunidad II formando una sólo banda. Lo anterior concuerda con los estudios de marcaje topológico (González-Halphen, 1988) y con los perfiles de hidropatía, así como con estudios de reconstitución de actividad con ambas subunidades aisladas capaces de transportar electrones desde el ubiquinol a el citocromo c soluble, en una vía insensible a antimicina (Shimomura y col., 1985). Así mismo, al unir la proteína fierro-azufre a una columna de A-Sefarosa y poner una muestra de citocromo c₁ puro que corriera en ella, se obtenía la unión de más del 90% de éstas subunidades (Shimomura y col, 1985).

En las tres técnicas de separación de las subunidades del complejo III, analizadas en la introducción, se pudo observar la rápida separación de la proteína fierro-azufre del complejo, lo que define un sitio altamente accesible a la acción de los agentes disociantes. En contraste, al correr los geles de poliacrilamida-DSLi la proteína fierro-azufre se encuentra asociada a las subunidades que conforman el sitio "funcional" del complejo, esto es, las subunidades con grupos redox, lo cual es de gran importancia, pues el detergente mantiene las interacciones entre éstas subunidades. Otra posibilidad es que todavía quedaran lípidos que facilitarían la permanencia de la proteína fierro-azufre en el complejo, como se indica más arriba (Shimomura y col, 1986). Sin embargo, esta última posibilidad es poco probable, ya que se espera la formación de una micela mixta, fosfolípidos-detergente, que migre con el frente del gel.

Al utilizar clorhidrato de guanidina 3M o sales biliares y sulfato de amonio (sin proteger al complejo), el citocromo c₁ es fácilmente disociado del bc₁ (Rieske, 1979), lo anterior no ocurre en la técnica reportada por Shimomura y col (1986), donde ésta subunidad permanece unida al complejo resistiendo la acción del clorhidrato de guanidina, colato de sodio y cambios pequeños de fuerza iónica. Sólomente concentraciones elevadas de detergente no iónico solubilizan a este citocromo y lo separan de la columna de fenil sefarosa. La técnica de columna de hidroxapatita descrita por Shägger y col (1986) muestra también que el citocromo c₁ se separa con facilidad del resto del complejo.

Lo anterior está de acuerdo con la observación hecha en el presente trabajo, de la dependencia a bajas concentraciones de detergente para solubilizar ambas subunidades y confirma las

observaciones de su naturaleza anfifílica realizadas por Weiss y col (1986), González-Halphen y col (1988) y Linke y Weiss (1987). La cercanía de la subunidad VIII con el citocromo c, puede inferirse mediante el uso de técnicas de separación por columna de hidroxapatita y de fenil-sefariosa, ya que en ambas se forma un subcomplejo de estas subunidades.

Una de las características que llama la atención en los geles realizados con DSLi es que el citocromo c, se embarra desde la zona de las proteínas estructurales a la de la posición correspondiente a su peso molecular, esto ocurre desde 0.005% a 0.01% de DSLi en el amortiguador catódico, indicando la formación de un subcomplejo, con las subunidades con grupos redox. La ausencia de β -mercaptoetanol en la solución digestora también puede ser la causa de éste fenómeno, ya que la subunidad IV tiene un comportamiento diferente al utilizar éste agente; en un gel de poliacrilamida-DSS sin β -mercaptoetanol, se observa la formación de una banda difusa correspondiente a esta subunidad (González-Halphen y col 1988).

Cabe señalar la importancia de la conservación de la unión entre proteínas con grupos oxidorreductores en los geles de DSLi, ya que confirma la cercanía con que se encuentran *in vivo*. Esto es importante y puede compararse con lo observado por Rieske (1979) donde al congelar al complejo éste queda protegido de la acción de agentes disociantes, lo cual también sugiere un cambio en la estructura cuaternaria del bc₁. En el caso de los geles con DSLi, sólo hasta que la concentración es mayor a 0.01% ocurre una disociación entre las subunidades con grupos oxidorreductores.

Aunado a las observaciones en los geles de segunda dimensión y de inmunorréplicas, los datos de estequiometrías obtenidos mediante

los barridos densitométricos, comprueban la formación de un subcomplejo entre la proteína fierro-azufre y el citocromo c₁.

Hasta la concentración de 0.1% de DSLi se puede encontrar el pico correspondiente a la subunidad VIII por el peso molecular cercano -9.23 kDa.- (ver Apéndice de Barridos Densitométricos). La estequiometría encontrada es de 2.8, lo que puede indicar que otras subunidades están asociadas a ella o que el azul de Coomassie se une anómalamente. También es notoria la ausencia de las subunidades pequeñas a bajas concentraciones del detergente, lo cual indica que se encuentran unidas a otros polipéptidos. Por ello en la gráfica de barridos densitométricos se observa una línea casi recta en esa zona, además de que la estequiometría de las subunidades grandes es mayor a 1 por lo que se concluye, también en éste caso, que las subunidades del bc₁ presentan una migración anómala, formando subcomplejos. La subunidad VI constituye una de las primeras en separarse del complejo bajo la acción del detergente DLSi, sin embargo para las otras técnicas, esto no ocurre. En el caso de la columna de hidroxapatita la separación es tardía y sólo se consigue cuando se utiliza 0.01M de fosfato de potasio, que se intercambia por el subcomplejo que forma con el citocromo b y la subunidad IX, esto nos puede dar idea de su cercanía con este citocromo, ya que es necesaria una separación posterior de este subcomplejo. En cambio, en la técnica de Rieske (1979) no se señala su posición, sin embargo se puede especular que se encuentra formando un subcomplejo con las subunidades estructurales.

La malla de acrilamida utilizada (10% de acrilamida) permite discriminar a los subcomplejos formados por su tamaño, en el caso de las técnicas de separación analizadas en los antecedentes, lás

columnas de separación empleadas fueron del tipo de hidroxilapatita y fenil sefarosa las cuales resuelven por afinidad no específica y no por su peso molecular, esto tampoco sucede con la técnica de Rieske (1979) donde el criterio de separación es por solubilidad.

El modelo topológico que se muestra en la figura 7b (González-Halphen, 1988, 1990) utilizado para esquematizar la separación de las subunidades del complejo III por acción del DSLi permite establecer una secuencia en la disociación de las subunidades que se inicia con las ubicadas en la periferia del complejo (aquellas con carácter netamente hidrofílico) y que no se encuentran directamente en contacto con la membrana interna mitocondrial. Al aumentar la cantidad de DSLi empleada en el amortiguador catódico, se solubilizan las subunidades con dominios hidrofóbicos, pero se sigue manteniendo la unión entre aquellas subunidades que poseen grupos oxidorreductores (ver modelos de separación en las Figs. 20 a y b).

Uno de los aspectos que no se abordó en esta tesis fue el de conocer si aún después de disociado el complejo, a las concentraciones en las que se observó que se conservaba la unión de las tres subunidades con grupos oxidorreductores era posible obtener un subcomplejo activo, extrayéndolo del gel por electroelusión y observar si transportaba electrones haciendo un ensayo de actividad redox, por ejemplo, al incorporarlo en liposomas y agregarle hidroquinol y citocromo c soluble. Esto sería de gran utilidad ya que confirmaría que sólo con estas tres subunidades se puede tener un complejo activo y que el resto de ellas son estructurales meramente, sin embargo, como se mencionó en la introducción, (ver descripción de las subunidades) algunas de ellas tienen un papel en la biogénesis

del complejo o en la inserción del mismo en la membrana interna mitocondrial, algunas de ellas con la función de anclarla en la membrana o de "señal" para dirigir al resto del bc, durante su ensamble. Cabe hacer notar que esto no es estrictamente cierto para todas las subunidades, ya que algunas de ellas intervienen en el transporte de electrones, ya sea logrando un cambio conformacional en el complejo para que se realice la interacción del citocromo c, con el citocromo c soluble, como es el caso de las subunidades VIII y X, próximas al c, (Kim y King, 1983), o como la subunidad VII, a la cual se propone que se une la molécula de ubiquinol (Yu y col, 1990) o la de Saccharomyces cerevisiae que se ha visto que se relaciona con el acoplamiento del dímero de la enzima (Trumpower, 1990). Las subunidades estructurales I y II también poseen una función pues son necesarias para reconstituir la actividad del complejo en el hongo Neurospora crassa (Linke y Weiss, 1986).

La permanencia de la unión entre las subunidades con grupos redox a bajas temperaturas puede ser indicio de la conservación de éste segmento, como se puede ver en el caso de organismos como bacterias, en donde el complejo bc, está constituido únicamente por las tres subunidades catalíticamente funcionales con grupos redox, como el en caso de Paracoccus denitrificans (Yang y Trumpower, 1986) (ver figura 7a y b). Al realizar análisis evolutivos se pueden hacer comparaciones con organismos entre el anteriormente señalado y otros con mayor número de subunidades o con otros que posean menos de las once subunidades reportadas para bovino.

Otra de las posibilidades de estudio sería el conocer las características del complejo en miopatías mitocondriales (Kennaway, 1988), a partir de biopsias y en condiciones seminativas, para saber

si se mantienen unidas las tres subunidades con grupos redox, pudiendo ser funcionales y saber si el problema es por falta de aquellas subunidades que intervienen durante la biogénesis del complejo.

En conclusión, la técnica de geles de poliacrilamida-DSL_i pueden ser de gran utilidad ya que mantiene al complejo III en condiciones seminativas y permite conservar algunas interacciones subunidad-subunidad y proteína-grupo prostético redox. La acción del DSL_i sobre el complejo bc₁, a bajas temperaturas, permite que mantenga una estructura seminativa. A bajas concentraciones de éste detergente en el amortiguador negativo, se puede conseguir una forma "semi-nativa" cosa que no ocurriría a temperatura ambiente al utilizar DSS) que mantiene las uniones entre las subunidades del bc₁, así, es posible que al aumentar las concentraciones del DSL_i, se puedan separar las subunidades hidrofílicas, externas al complejo hasta llegar al corazón del bc₁, (el citocromo b) conservando hasta las concentraciones más altas de DSL_i las uniones entre subunidades con grupos redox.

LITERATURA CITADA

Andrews, A.T. (1986). *Electrophoresis. Theory, Techniques, and Biochemical and Clinical Applications*. Claredon Press. 2a. Ed. Oxford. G.B. 452 p.p.

Alberts, B, Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (1985). *Biología Molecular de la Célula*.p. Omega, Barcelona. pp. 517-585.

Alwine J.C., Kemp, D.J. y Stark, G.R. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 74, 5350

Bass, E.T. y Bricker, T.M. (1988). *Anal. Biochem.* 171. 330- 338.

Brogie, R.M., Hunter, C.N., Delepelair, P. Niederman, R. A., Chua, N-H., Clayton, R.K. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77(1), 87-91.

Burnette, W. N. (1981). *Anal. Biochem* 112, 195.

Capaldi, R.A., Malatesta, F. y Darley-USmar, V.M. (1983). *Biochem. Biophys. Acta* 726, 135-148.

Cárabez, A. y F. Sandoval. (1990). *ICYT: Información Científica y Tecnológica.* 12, 33-36.

Cooper, T.G. (1977). *The Tools of Biochemistry*. John Wiley & Sons. Nueva. York. p.p.194-233.

Cramer, W.A., Black, M.T., Widger, W.R. y Girvin, M.E. (1987). *Structure and Function of Photosynthetic Cytochrome b-c₁ and b₆ Complexes*. en: *The Light Reactions* Barber, J. (ed.) Elsevier Science Publishers B.V. p.p 447-493.

Cramer, W.A., Furbacher, P.N. Szczepaniak, A. y Tae, G-S. (1991). *Curr. Top. Bioenerg.* 16, 179-222.

Crivellone, M.D., Wu, M. y Tzagoloff, A. (1988). *J. Biol. Chem.* 263(28), 14323-14333.

Delepelair, P. y Chua, N-H. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76 (1), 111-115.

Dunbar, B.S. (1988). *Two-Dimensional Electrophoresis and Immunological Techniques*. Plenum Press, 2a impresión. N. Y. 372p.p.

- Gatti, D.L. y Tzagoloff, A. (1990). *J. Biol. Chem* **265** (35), 21468-21475.
- Gogol, P., Luken, U. y Capaldi, R.A. (1987). *FEBS. Lett.* **219**, 274-278.
- Gornall, A.G., Bardawill, C.J. y David, M.M. (1949). *J. Biol. Chem.* **177**, 751-766.
- González-Halphen, D. y Gómez-Lojero, C. (1982). *Boletín de Educación Bioquímica.* **1**, 4-20.
- González-Halphen, D. Lindorfer, A. y Capaldi, R.A. (1988). *Biochemistry.* **27**, 7021-7031.
- González-Halphen, D. (1990). *Ciencia.* **41**, 133-152.
- González-Halphen, D., Vázquez-Acevedo, M. y García-Ponce, B. (1991). *J. Biol. Chem.* **226** (6), 3870-3876.
- Gupte, S.S. y Hackenbrock, C.R. (1988). *J. Biol. Chem* **263** (11) 5241-5247.
- Gupte, S.S. y Hackenbrock, C.R. (1988). *J. Biol. Chem.* **263** (11), 5248-5253.
- Hames, D.V. (1983). *An Introduction to Polyacrylamide Gel Electrophoresis.* En: *Gel Electrophoresis of Proteins.* Hames, B.D. y Rickwood, D. (Eds.). IRL Press. Oxford, G.B. 290 p.p.
- Hauska, G., Hurt, E., Gabellini, N. y Lockau, W. (1983). *Biochim. Biophys. Acta.* **726**, 97-133.
- Hauska, G., Nitschke, W. y Herrman, R.G. (1988). *J. Bioenerg. Biomem.* **20**(2), 221-228.
- Hawkes, R., Niday, E. y Gordon, J. (1982). *Anal. Biochem.* **119**, 142-147.
- Helenius, A., McCaslin, D.R., Fries, E. y Tanford, C. (1979). *Methods Enzymol.* **56**, 734-749.
- Helenius, A. y Simons, K. (1975). *Biochim. Biophys. Acta.* **415**, 29-79.
- Jones, G.D. Wilson, M.T. y Darley-Usmar, V.M. (1981). *Biochem. J.* **172**, 259-263.
- Karp, G. (1987). *Biología Celular.* McGraw Hill. México, D.F. p.p. 329-370.
- Katan, M.B., Yan Harten-Loosbroek, N. y Groot, G.S.P. (1976). *Eur. J. Biochem.* **70**, 409-417.

- Keilin, D. (1925). *Proc. Roy. Soc. B. London.* **28**, 312-324.
- Kennaway, N.G. (1988). *J. Bioenerg. Biomem.* **20**(3), 325-351.
- Kim, Ch. y King, T.E. (1983). *J. Biol. Chem.* **258** (22), 13543-13551.
- König, B.W., Osheroff, N., Wilms, J., Muijers, A.O., Dekker, H.L. y Margoliash, E. (1980). *FEBS. Lett.* **111**, 395-398.
- Rubo, K y Takagi, T. (1986). *Anal. Biochem.* **156**, 11-16.
- Lehninger, A.L. (1985). *Bioquímica. Las bases Moleculares de la Estructura y Función Celular.* Omega. Barcelona. p.p. 397- 484, 519-551.
- Lichtner, R. y Wolf, H.U. (1979). *Biochem. J.* **181**, 759-761.
- Lin, L.F.H., Clejan, L. y Beattie, D.S. (1978). *Eur. J. Biochem.* **41**, 63-67.
- Link, T. A., Shägger, H. y Von Jagow, G. (1987?) *Structural Analysis of the bc₁ Complex from Beef Heart Mitochondria by the Sided Hydropathy Plot and by Comparison with other bc Complexes.* en: *Cytochrome Systems: Molecular Biology and Bioenergetics.* (Papa S., Chance, B. y Ernest, L. Eds.) Plenum Pub. Co. in Press. Nva. York.
- Linke, P. y Weiss, H. (1986). *Methods. Enzymol* **126**, 201-210.
- Ljungdahl, P.O., Pennoyer, J.D., Robertson, D.E. y Trumppower, B.L. (1987). *Biochim. Biophys. Acta.* **921**, 227-241.
- Löw, H. y Vallin, I. (1963). *Biochem. Biophys. Acta.* **69**, 361-374.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Lewis Farr, L. y Randall, R.J. (1951). *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Markwell, M.A. K., Hass, S.M. Bieber, L.L. y Tolbert, N.E. (1978). *Anal. Biochem.* **87**, 206-210.
- Mitchell, P. (1961). *Nature.* **191**, 144-148.
- Mitchell, P. (1975). *FEBS. Letters.* **56**, 1-6.
- Mitchell, P. (1979). *Science.* **206**, 1148-1159.
- Noll, H. y Stutz, E. (1968). *Methods. Enzymol.* **12**, 129-155.
- Oakley, B.R., Kirsh, D.R. y Morris, N.R. (1990). *Anal. Biochem.* **105**, 361-363.
- Ohmori, D., Tanaka, Y., Yamakura, F. y Suzuki, K. (1985). *Electrophoresis.* **6**, 351-352.

- Ohnishi, T. (1989). *Curr. Top. Bioenerg.* **15** 37-65.
- Reynolds, J. A. y C. Tanford. (1970). *J. Biol. Chem.* **245** (19), 5161-5165.
- Reynolds, J. A. y C. Tanford. (1970). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **66** (3), 1002-1007.
- Rieske, J.S. (1967). *Methods. Enzymol.* **10**, 239-329.
- Rieske, J.S. (1979). *Biochim. Biophys. Acta.* **456**, 195-247.
- Salamme, F.R. (1977). *Ann. Rev. Biochem.* **46**, 299-329.
- Shögger, H., Link, T.A., Engel, W.D. y von Jagow, G. (1986). *Methods. Enzymol.* **126**, 224-237.
- Shimomura, Y., Nishikimi, M. y Ozawa, T. (1984). *J. Biol. Chem.* **259** (22), 14059-14063.
- Shimomura, Y., Nishikimi, M., Ozawa, T. (1985). *J. Biol. Chem.* **260** (28), 15075-15080.
- Shimomura, Y., Nishikimi, M. y Ozawa, T. (1986). *Anal. Biochem.* **153**, 126-131.
- Sinclair, J. y Rickwood, D. (1983) *Two Dimensional Gel Electrophoresis. eni Gel Electrophoresis of Proteins.* Hames, B.D. y Rickwood, D. (Eds.). IRL Press. Oxford, G. B. 290 p.p.
- Suzuki, H. y Terada, T. (1988). *Biochem. J.* **181**, 759-761.
- Swank, R.T. y Munkres, K.D. (1971). *Anal. Biochem.* **75**, 168-176.
- Thomas, P.E., Ryan, D. y Levin, W. (1976). *Anal. Biochem.* **75**, 168-176.
- Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76** (9), 4350-4354.
- Trumpower, B. L. y Edwards, C.A. (1979). *J. Biol. Chem.* **69**, 129-155.
- Trumpower, B. L. (1981). *J. Bioenerg. Biomem.* **11**, (1/2) p.p. 1-24.
- Trumpower, B. L. (1990). *J. Biol. Chem.* **265** (20), 11409-11412.
- Trumpower, B. L. (1990). *Microbiological Reviews.* **54**, (2) 101-129.
- Von Jagow, G. y Link, T.A. (1986). *Methods Enzymol.* **126**, 253-271.

Weber, K. y Osborn, M. (1969). *J. Biol. Chem.* 244 (16), 4406-4412.

Weiss, H. y Ziganke, B. (1974). *Eur. J. Biochem.* 41, 63-67.

Weiss, H., Hovmoller, S. y Leonard, K. (1986). *Methods Enzymol.* 126, 191-201.

Weiss, H. y Leonard, K. (1987) Structure and function of Mitochondrial Ubiquinol: Cytochrome c Reductase and NADH: Ubiquinone Reductase. *Chemica Scripta.* 27B, 73-81. En: Rynstrom, J. (1987). *Membrane Proteins: Structure, Function, Assembly. Proceedings of the Sixty-sixth Nobel Symposium held at Alfred Nobel's Bjorkborn, Karskoga Sweden, 1-5 September, 1987.* Cambridge University Press. N.Y. 250 p.p.

Wray, W., Boulikas, T. Wray, V.P. y Hancock, R. (1981). *Anal. Biochem.* 118, 197-203.

Yang, X. y Trumpower, B.L. (1986). *J. Biol. Chem.* 261 (26), 12282-12289.

Yu, C-A., Usui, S., Li, L-B. y Yu, L. (1990). Comparative Study of Quinone Binding Proteins in Mitochondrial Cytochrome b-c₁ Complex and Chloroplast Cytochrome b₆-f Complex. En: *Highlights in Ubiquinone Research* Lenaz, G. Barnabei, O., Rabbi, A., Battino, M. (Eds). Ed. Taylor & Francis. p.p.46-51.

Yu, W-H., Zou, Y-P., Yu, L. y Yu, C-A. (1991). *Biochemistry.* 30, 2303-2306.

A P E N D I C E I

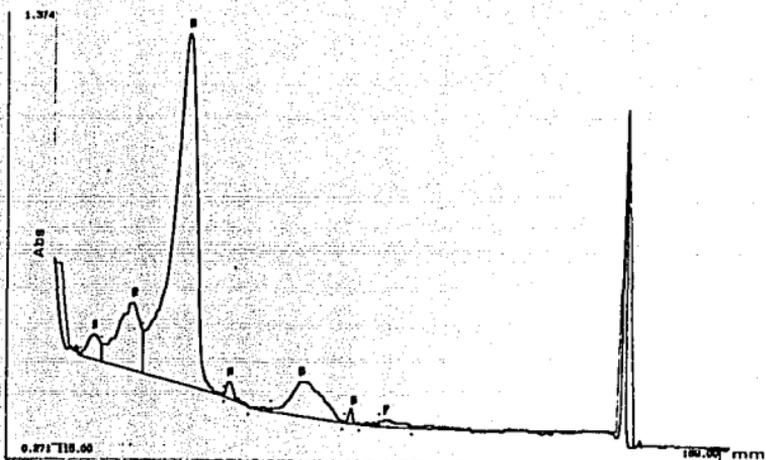
BARRIDOS

DENSITOMETRICOS

En este apéndice se presentan los barridos densitométricos de los geles de primera dimensión realizados (0.005% a 0.1% de DSLi en el amortiguador catódico). En la gráfica, el eje de las ordenadas contiene los datos de densidad óptica y el de las abscisas la migración de cada banda en mm.

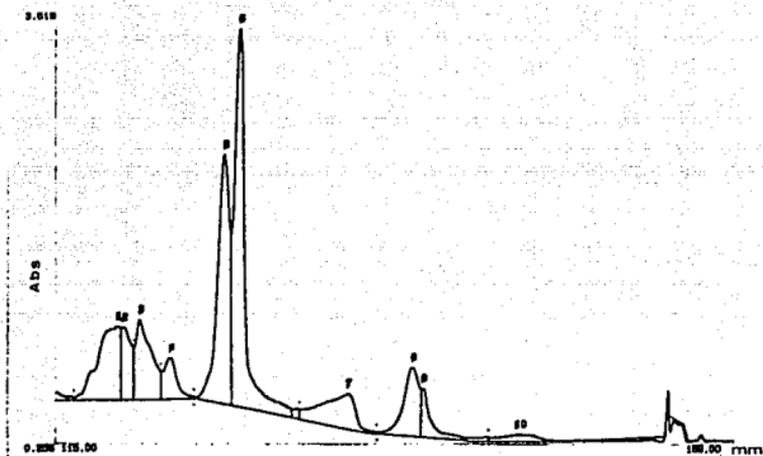
Las tablas que los acompañan contienen los datos de: distancia migrada por cada banda apartir del punto fijado por el aparato; altura y área del pico (mm); por ciento de área relativa; y peso molecular (P. M.) en daltones obtenidos por el programa GelScan XL para cada uno de los geles de primera dimensión con DSLi. Estos últimos fueron calculados de acuerdo con los marcadores establecidos en cada caso, los cuáles aparecen en la primera columna, en la mayoría de ellos se utilizaron las subunidades I y II (o su promedio) y la subunidad VI, en algunos casos (los geles con mayor concentración de detergente, se incluyeron las subunidades IV y V).

En cada uno de los barridos densitométricos se indica la concentración utilizada en el amortiguador catódico.



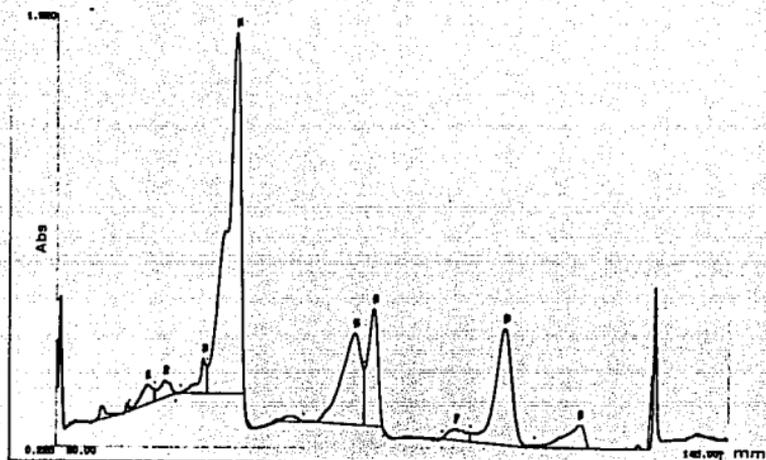
0005%

No	Component name	Locn min	Height AU	Area AU*min	Rel ar %	Mol weight daltons
1		113.36	0.060	0.06720	2.6	136000.00
2		121.44	0.169	0.35028	13.7	87700.00
3	I y II	125.64	0.882	1.82144	71.4	47900.00
4		129.00	0.040	0.03072	1.2	29600.00
5	VI	134.52	0.036	0.25540	10.0	13400.00
6		141.32	0.014	0.02732	1.1	5040.00



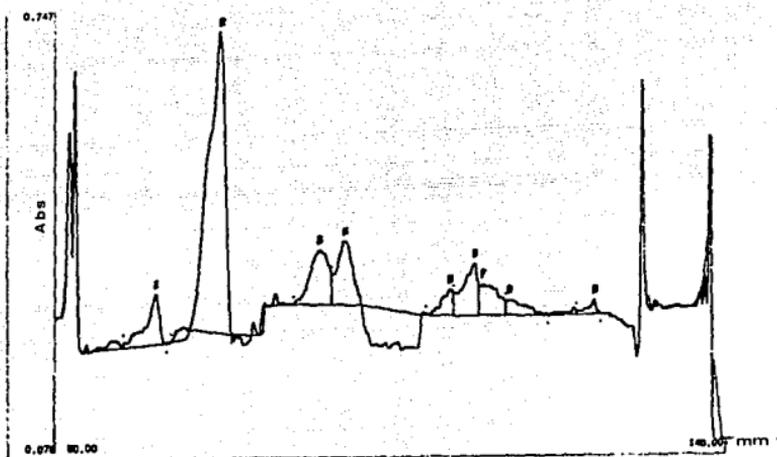
00075x

No	Component name	Locn min	Height AU	Area AU*min	Rel ar %	Mol weight DALTONS
1		119.84	0.573	1.13876	11.6	107000.00
2		120.32	0.562	0.82040	5.1	103000.00
3		121.60	0.621	0.93700	9.1	92500.00
4		124.04	0.319	0.40092	3.9	75100.00
5	core1	128.40	1.921	2.15040	20.9	51800.00
6	core2	129.60	2.913	2.95036	28.7	46700.00
7	FeS	138.20	0.274	0.82508	8.0	22400.00
8		143.16	0.532	0.76668	7.5	14700.00
9		144.00	0.372	0.35696	3.5	13600.00
10		151.44	0.051	0.18460	1.8	7250.00



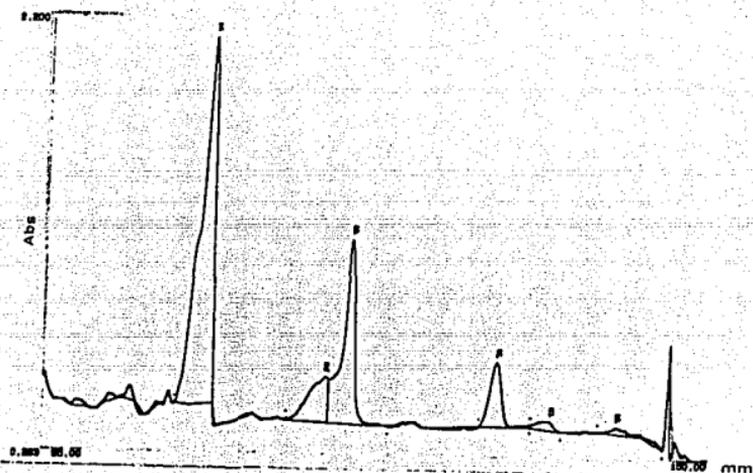
001*

No	Component name	Locn mm	Height AU	Area AU*mm	Rel ar %	Mol weight daltons
1		97.28	0.074	0.08340	2.0	57500.00
2		98.68	0.067	0.07332	1.7	53100.00
3	Cl y II	101.84	0.135	0.14471	3.5	14988.00
4	FeS	114.36	0.356	0.66756	15.7	21190.00
5		115.92	0.456	0.45360	10.7	19200.00
6		122.76	0.043	0.07300	1.7	12900.00
7	VI	126.80	0.453	0.68256	16.1	10100.00
8		132.80	0.090	0.18260	4.3	7140.00
9						



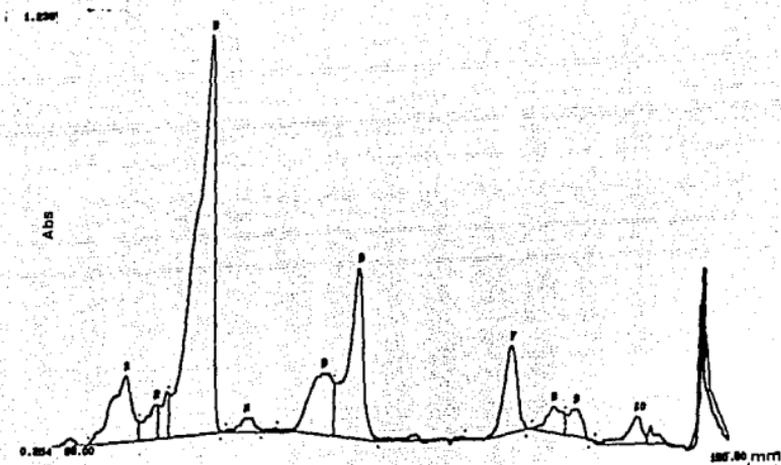
0.05%

No	Component name	Locn min	Height AU	Area AU*min	Rel. ar %	Mol weight daltons
1		98.04	0.077	0.10104	7.1	64600.00
2	I y II	103.24	0.461	0.73360	51.6	46800.00
3	Cl	111.12	0.082	0.14324	10.1	28700.00
4	FeS	113.16	0.096	0.14400	10.1	25300.00
5		121.76	0.039	0.04052	2.9	14800.00
6	VI	123.76	0.079	0.11356	8.0	13100.00
7		124.48	0.047	0.08688	6.1	12500.00
8		126.64	0.022	0.04188	2.9	10900.00
9		133.44	0.021	0.01588	1.1	7210.00



0.075%

No	Component name	Locn mm	Height AU	Area AU*mm	Rel ar %	Mol weight DALTONS
1	I y II	108.32	1.597	2.07728	54.7	47600.00
2		117.64	0.197	0.35588	9.4	28500.00
3	FeS	119.80	0.501	0.91793	24.7	25300.00
4	VI	131.60	0.278	0.35632	9.4	13200.00
5		141.24	0.028	0.06900	1.8	7830.00



0.1 x

No	Component name	Locn mm	Height AU	Area AU*mm	Rel ar %	Mol weight daltons
1		102.00	0.147	0.28328	8.8	65600.00
2		104.24	0.076	0.08292	2.6	58300.00
3	γ II	109.40	0.886	1.47448	45.9	46800.00
4		111.48	0.030	0.04432	1.4	39300.00
5	Cl	117.48	0.136	0.29672	9.2	29000.00
6	FeS	120.28	0.377	0.54384	16.9	25000.00
7	VI	132.48	0.193	0.22612	7.0	13100.00
8		136.00	0.057	0.09080	2.8	10900.00
9		137.80	0.059	0.08352	2.6	7940.00
10		142.52	0.058	0.08480	2.6	7750.00

A P E N D I C E II

E L E C T R O F O R E S I S

ELECTROFORESIS

La palabra electroforesis se utiliza para designar a la migración de una partícula cargada bajo la influencia de un campo eléctrico, a través de un medio, ya sea líquido o sólido. Si la velocidad de migración es constante, la carga efectiva en la partícula y el gradiente del potencial eléctrico formado por los electrodos serán los que dirigirán a la misma. Este fenómeno queda balanceado por la fricción de resistencia del medio (Andrews, 1986; Cooper, 1977; Dunbar, 1988).

El pH influye en la movilidad de las proteínas ya que llevan una carga neta a cualquier pH, excepto en su punto isoeléctrico, que está determinado por la cantidad de aminoácidos ácidos (aspárticos y glutámicos) y básicos (lisina, histidina y arginina). Su grado de migración en un campo eléctrico dependerá de la relación "densidad de carga-masa", al aumentar la carga, la molécula migrará más rápido (Dunbar, 1988).

Teóricamente, en una mezcla de proteínas, éstas se separarán en una zona definida, por acción del campo eléctrico aplicado, pero al estar en solución, la separación es mínima debido al fenómeno de difusión (Andrews, 1986). Además el calor y las corrientes de convección ocasionarían la desnaturalización de las proteínas. Sin embargo, estos inconvenientes se anulan con un medio de soporte en el cual se pueden fijar las proteínas para su análisis, como hojas de papel, acetato de celulosa, etc. Los geles de sílica, agarosa y poliacrilamida también previenen la convección, minimizan la difusión

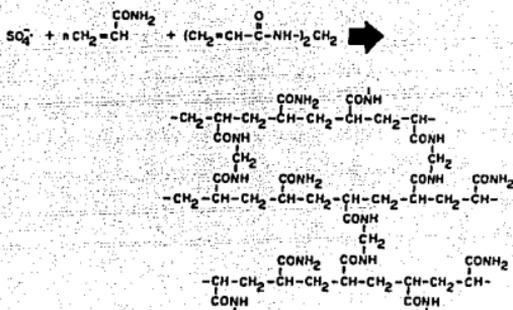


FIGURA AE1: La polimerización de acrilamida en presencia del entrecruzador bis, para formar la malla de separación que constituye los geles de poliacrilamida. Tomado de T. G. Cooper, 1977.

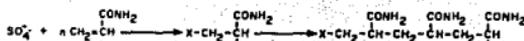


FIGURA AE2: la reacción de polimerización de acrilamida.

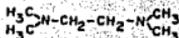


FIGURA AE3: TEMED (N,N,N',N'- tetrametiletilendiamina) empleado para la síntesis de acrilamida

y pueden participar activamente en la separación interactuando con las partículas migrantes (Andrews, 1986).

Los geles pueden considerarse como medios porosos, donde el tamaño de poro y de la proteína llegan a igualarse, seleccionando a esta última tanto por su tamaño como por su carga. Estos geles pueden distinguir entre dos proteínas de diferente tamaño pero de igual carga, lo que no ocurre en la difusión libre.

La movilidad de partículas en un medio sólido puede complicarse por el efecto de la electro-endosmosis (EEO). Por ejemplo en el papel, donde se presentan grupos carboxilos, o en agarosa, donde hay grupos ácidos (sulfónicos); éstos grupos pueden ionizarse en amortiguadores neutros y ser atraídos al ánodo, causando una migración anómala de las proteínas.

Los geles de poliacrilamida poseen varias ventajas sobre los demás:

- El medio de soporte rompe las corrientes de convección y difusión manteniendo las proteínas en zonas definidas.
- Es un medio químicamente inerte durante el proceso de separación.
- Sus propiedades son uniformes, ya que al ser elaborado por monómeros sintéticos la malla formada es reproducible.
- Es estable en un intervalo amplio de pH, temperatura, fuerza iónica, etc. Además, es transparente.
- El tamaño de poro puede ser cercano al de las moléculas proteínicas, por lo que se puede obtener un amplio espectro de poros cambiando las concentraciones de acrilamida.

FORMACION Y ESTRUCTURA DEL GEL

La formación del gel resulta de la polimerización vinílica de los monómeros de:



en cadenas de poliacrilamida entrecruzadas por un monómero bifuncional denominado: N,N'- metilen-bis-acrilamida (bis acrilamida o simplemente bis):



formando una red tridimensional (Fig. AE1).

La iniciación de polimerización de monómeros se debe a la formación de radicales libres por el persulfato de amonio:



que dan lugar a la formación de polímeros de acrilamida (Fig. AE2); el proceso de polimerización es catalizado además por dos reactivos: TEMED (Fig. AE3) y el persulfato de amonio. El primero se encarga de propagar la reacción de radicales libres que inicia el persulfato para la polimerización. Se necesita que el TEMED esté en forma básica, por lo que a pH's bajos se puede prevenir la polimerización. También el oxígeno inhibe la polimerización, aunque si las soluciones se deaerean es posible evitar esto. Tanto la acrilamida como la bis-acrilamida y el TEMED son neurotóxicos, por lo que deben manejarse con cuidado.

La concentración de acrilamida determina la longitud promedio de la cadena y la concentración de bis-acrilamida lo largo del

entrecruzamiento formado. Esto define las propiedades de densidad, elasticidad, fuerza mecánica y tamaño de poro en el gel. El reactivo bis-acrilamida es el mejor entrecruzador de los que se conocen ya que forma geles estables. Para la relación que se hace de acrilamida y bis-acrilamida se utiliza la siguiente nomenclatura:

T: Concentración del monómero de acrilamida +
bis-acrilamida en g/100 ml (% P/V).

C: % en peso de T debido al agente entrecruzador (bis-acrilamida).

Al aumentar la concentración de T el tamaño efectivo de poro decrece. Si utilizamos 2.5% de acrilamida el gel es fluido y se separan moléculas de peso molecular (P.M.) hasta de 1 millón de daltons. En cambio si se utiliza 30% o más de acrilamida, se separan polipéptidos hasta de 2,000 daltons de P.M.

Andrews (1986) cita las siguientes reglas para la combinación de acrilamida y bis-acrilamida:

- A una concentración fija de bis-acrilamida el tamaño de poro varía inversa y linealmente a la concentración total de T. Por lo tanto a cualquier valor de T y 5% de C el tamaño de poro es mínimo.

- Si T = 5% y C = 5% (bis-acrilamida), el tamaño de poro es de 20 nm. Si C = 30-50% (bis-acrilamida) el tamaño de poro es de 500-600 nm. Cuando aumenta la concentración del entrecruzador y disminuye la velocidad de la reacción, la matriz se vuelve menos homogénea.

- El tamaño promedio de la cadena de poli-acrilamida es de 0.5

nm.

- A mayor tamaño de poro, más turbio se observa el gel.
- La temperatura óptima de polimerización es de 25-30°C, temperaturas mayores de 50°C ocasionan cadenas más cortas y matrices poco elásticas. De 0-4°C, la cinética de polimerización es menor y los geles no son homogéneos, son más turbios y poco reproducibles.
- Para separar las proteínas de una mezcla es necesario entonces: tener en cuenta el pH, debido a que puede alterar la carga neta de las mismas así como su actividad biológica. Así mismo, las concentraciones de acrilamida y bis-acrilamida, para que la resolución de una mezcla de proteínas sea buena y la fuerza iónica, el gradiente de potencial, el tiempo de corrida, etc.

A baja fuerza iónica, dada por la concentración de iones en el amortiguador de corrida, la movilidad aumenta. La resistencia eléctrica disminuye a voltaje constante pero la disipación de calor aumenta, lo cual puede causar desnaturalización o pérdida de actividad enzimática. Si se emplea un sistema de enfriamiento, se corre el peligro de distorsionar las bandas por el gradiente de temperatura. Tanto el voltaje o la corriente deben ser constantes, al igual que la temperatura (Andres, 1986).

Un gel vertical en placa tiene mayores ventajas sobre los geles de tubo, ya que al poder hacerse varios pozos en el mismo gel, las condiciones son las mismas en todas las muestras. Al ser geles delgados, la tinción es más fácil. Pueden utilizarse voltajes altos en la electroforesis, ya que el calor se disipa fácilmente disminuyendo el tiempo de corrida y aumentando la resolución.

Las técnicas de electroforesis en geles de poli(acrilamida) (PAGE, siglas en inglés) también pueden llevarse a cabo en presencia

de detergentes los cuales son necesarios: para la solubilización de proteínas de membrana y para romper uniones lípido-lípido o proteína-proteína que involucran uniones hidrofóbicas.

El sistema con detergente más utilizado es el de poliacrilamida-DSS o EGPA-DSS (PAGE-SDS por sus siglas en inglés). Este detergente se une a razón de 1.4 g/g de proteína lo cual equivale a la mitad de residuos de aminoácidos en la cadena polipeptídica. La migración de las mismas se lleva a cabo por su radio y/o peso molecular, ya que la carga que le confiere a las proteínas en una mezcla es la misma (negativa). El DSS separa a las proteínas a temperatura ambiente, ya que a menos de 15°C se precipita. Proporciona a los polipéptidos una forma parecida a un bastón, lo cual quiere decir que los desnaturaliza, dejando únicamente su estructura primaria. (Reynolds y Tanford, 1970). Si se utiliza calor y exceso de DSS o tiol (β -mercaptoetanol o DTT - ditiotreitól-, los cuáles eliminan los puentes o uniones disulfuro) casi todos los polipéptidos incorporan DSS en relación constante a su peso para tener casi la misma densidad de carga (Andrews, 1986).

Para proteínas muy básicas, o proteínas membranales que se precipitan con DSS, existen algunos detergentes que las solubilizan bien. Las moléculas del detergente se unen en una relación constante de carga-masa confiriéndoles una forma hidrodinámica semejante, por lo que se pueden conseguir resultados semejantes a los de DSS. Ejemplos de estos detergentes son: el cloruro de N-cetilpiridino (CPC) y el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB).

En algunos casos, un factor importante es mantener la actividad enzimática o la actividad inmunológica de una proteína. Los detergentes no iónicos como el Tween-80 o el Tritón X-100 rompen

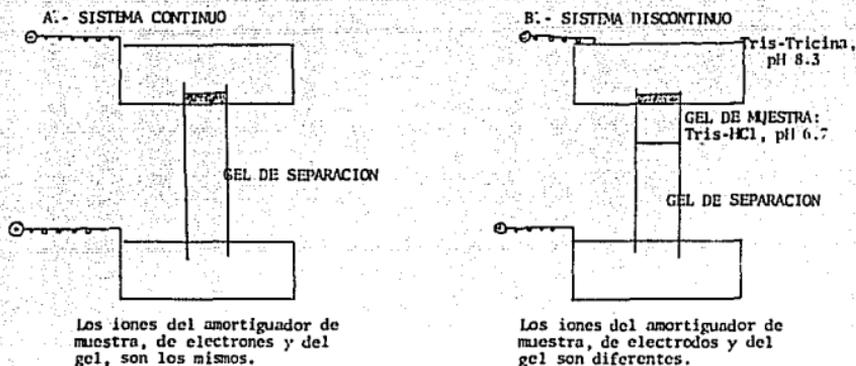


FIGURA A84: Diagrama que muestra los sistemas continuo (A) y discontinuo (B) de amortiguadores para realizar una electroforesis, en ambos casos, se señala el tipo de iones que intervienen en el proceso, para el sistema discontinuo la muestra se empaqueta previamente en el gel de muestra y se resuelve en el gel de separación.

agregados proteínicos conservando su actividad. Con ellos, se pueden separar proteínas de igual masa pero diferente carga, sin embargo no permiten determinar pesos moleculares (Andrews, 1986). También puede utilizarse urea 6-8 M (agente caotrópico) para garantizar la disociación de muestras que se agreguen o precipiten durante la electroforesis.

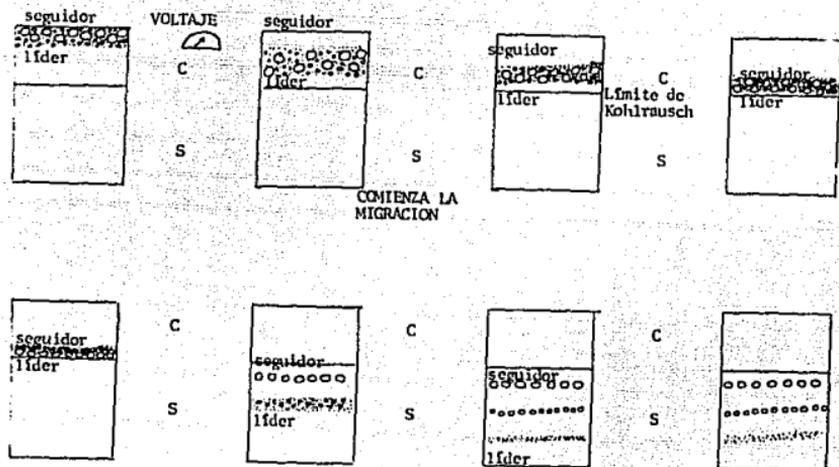
Existen diferentes sistemas para correr los geles de poliacrilamida, el más sencillo es el denominado continuo, (Andrews, 1986; Dunbar, 1988) el cual utiliza los mismos iones en los amortiguadores de corrida, a pH constante. La muestra se coloca directamente en el gel de separación el cual es de tamaño de poro pequeño, separando a los componentes de la mezcla (Fig. AE4 A').

El sistema discontinuo de amortiguadores (Andrews, 1986; Dunbar, 1988) emplea diferentes iones en los amortiguadores de corrida, o bien pH y diferente composición de los mismos. En este caso se utiliza un gel de muestra de tamaño de poro mayor que el de separación. Al migrar la muestra ésta se va a concentrar aumentando la resolución de las mismas. En este tipo de geles, se utilizan dos iones diferentes, uno de ellos (ión líder) debe tener alta movilidad electroforética con la misma carga de la muestra. Para geles de sistemas aniónicos, el ión más utilizado es el cloruro. El otro ión, es el "seguidor" el cual es un ácido débil o un aminoácido de un pK mayor, en una unidad de pH, al del gel de separación con lo cual las moléculas estarán cargadas, teniendo mayor movilidad que la muestra (en este caso puede utilizarse glicina o tricina. (Fig. AE4 B')). La finalidad de utilizar estos dos iones es que al aplicar el voltaje se produzca una migración diferencial, donde el ión líder migrará delante del ión seguidor debido a un aumento en el gradiente de

voltaje entre los dos iones, lo cual formará el límite de Kohlraush que se muestra en la figura AE5. Las proteínas migran entre los dos iones o el frente (colorante utilizado para ver la migración de proteínas) entre las zonas de mayor y menor voltaje. Al quedar un límite pequeño entre los dos iones, las proteínas se concentran en una banda delgada. Así, llegan a un límite establecido por el gel de muestra y el de separación, en este último cambia el tamaño de poro y el pH. Al pasar a este gel, los iones seguidores incrementan su grado de disociación, pasan a las proteínas y migran debajo de los iones seguidores. De aquí en adelante, comienza la separación de las proteínas pero ahora a un pH constante y voltaje uniforme, por su tamaño, forma y diferencia de carga. (Ver Fig. AE5).

La tinción de geles para revelar las proteínas separadas, puede hacerse con azul de Coomassie, el cual forma puentes electrostáticos con grupos amino y no covalentes con las regiones no polares de las proteínas. Otro tipo de tinción es con plata, la cual tiene una sensibilidad 100 veces mayor que la obtenida con el azul de Coomassie. El mecanismo de reacción no se conoce muy bien; al parecer inicialmente los iones de la plata se unen a zonas proteínicas y luego actúan como sitios de nucleación para el depósito de mayores cantidades de este metal. Puede ser posible que el color sea reflejo de el tamaño del grano de plata o de un grado de reducción de los mismos, más que de la composición de la proteína. El glutaraldehído es el fijador más usado para proteínas básicas o péptidos pequeños para la tinción con plata.

Una de las técnicas de detección e identificación de bandas polipeptídicas utilizada se denomina barrido densitométrico, en él



C = gel concentrador o de muestra.
S = gel de separación.

FIGURA A25: Flujo de iones líder y seguidor durante la formación de un campo eléctrico al correr un gel de poliacrilamida con el sistema discontinuo de amortiguadores. Se puede distinguir la formación de una banda con la mezcla de proteínas en el gel concentrador para luego migrar y separar conforme a su peso molecular, las diferentes proteínas en bandas conspicuas. También se muestra la formación de la banda de Kohlrausch que es donde se encuentra el colorante que forma el frente de corrida.

cual los geles (teñidos o no) son leídos como bandas de diferente absorbancia a una longitud de onda. En estos casos se obtiene una gráfica con picos y valles que indican la mayor o menor absorbancia de cada banda. Para realizar los cálculos se toma el área bajo la curva de cada pico, esto es, la altura del pico por el ancho de la mitad de la altura. También puede medirse la altura del pico, que depende de la cantidad de material presente y de la distancia migrada en el gel.

La EGPA-DSS se utiliza también para ver heterogeneidad molecular en:

- variantes genéticas de proteínas y glicoproteínas,
- isoenzimas,
- isómeros conformacionales,
- para demostrar pureza en condiciones desnaturalizantes en los siguientes casos:
 - a.- agregación o disociación de monómeros, dímeros, etc.
 - b.- que aparezca más de un estado conformacional de la proteína.
 - c.- puentes disulfuro que no se rompieron u oxidación parcial de grupos sulfhidrilo.

Geles de Segunda Dimensión:

Se les conoce también como "huellas digitales", Sinclair y Rickwood (1983) señalan : "El arte de correr geles de segunda

dimensión sólo puede aprenderse por la experiencia obtenida en el laboratorio, la secuencia de operaciones dependerá en la técnica exacta de segunda dimensión utilizada...".

Los geles bidimensionales pueden utilizarse en el estudio de estructura y modificación de proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos, etc. También para caracterizar tejidos, fluidos biológicos, extractos de tejidos y órganos, etc. En estudios de taxonomía o forenses, ésta técnica puede identificar variaciones genéticas relacionadas con etapas de diferenciación celular y estudios de crecimiento, para examinar estados patológicos o diagnosticar enfermedades. Finalmente, pueden llegar a la identificación de entre 50 y 60 componentes diferentes, ser de alta o baja resolución y realizarse en condiciones desnaturalizantes o no desnaturalizantes (Andrews, 1986; Sinclair y Rickwood, 1983)

Como consideraciones generales, es necesario utilizar dos formas de discriminación en cada una de las dimensiones (por ejemplo, separar por diferencias de tamaño y carga, a mayores concentraciones de T en EGPA-DSS, mayores diferencias en los pesos moleculares). Si se utiliza el mismo principio de separación en los dos geles, entonces se obtendrá un arreglo diagonal de puntos semejantes al patrón obtenido en la primera dimensión. La resolución obtenida en la primera dimensión será determinante en la calidad obtenida en la segunda técnica. En general, se suele efectuar la técnica de enfoque isoeléctrico en la primera dimensión y de poliacrilamida-DSS en la segunda.

Los geles de primera dimensión pueden sumergirse si se considera necesario, en el amortiguador de muestra del gel de la segunda dimensión para que no causen un aumento en la conductividad.

Si se utilizan geles en placa, entonces el gel de la primera dimensión debe sellarse con agarosa al 1% para que las proteínas no difundan. Es importante que el gel de la primera dimensión esté derecho y que no queden burbujas de aire entre ambos geles. Se deben poner pozos de muestra (uno o dos) en las orillas del gel de segunda dimensión los cuales serán útiles para calibrar el gel con marcadores de peso molecular o con la misma muestra de primera dimensión, las cuales deben llevar un colorante, para que sirva de frente al gel, marcando el fin de la corrida.

Una vez terminada la electroforesis, los geles pueden tefirse con los mismos métodos utilizados en la primera dimensión.

Inmunotransferencia:

Se utiliza para transferir zonas de proteína de geles a hojas de derivados de papel de nitrocelulosa o a una matriz membranal a la que se unen e inmovilizan. Es más fácil maniobrar con una lámina delgada, ya que el acceso a las macromoléculas es mejor cuando no existe un gradiente de iones, se utiliza poca cantidad de muestra, el tiempo de tinción es menor y puede guardarse durante más tiempo que un gel ya que las proteínas no difunden (Anreus, 1986; Dunbar, 1988).

Entre las matrices de inmovilización la más utilizada es la de

nitrocelulosa (NC) con varios tamaños de poro: 0.45 μm , 0.22 μm , etc.; el menor tamaño de poro se puede utilizar para moléculas con poca afinidad a la nitrocelulosa. Se cree que es por medio de interacciones hidrofóbicas de las proteínas y la nitrocelulosa como se establece la unión, pues si se agrega un detergente no iónico como es el Tritón X-100, las proteínas pueden eluirse de la matriz.

Existen otras resinas como el diazobenzilxilometil o DBM, donde la unión a la matriz se realiza primariamente por interacción electrostática, entre proteínas negativas y los grupos diazonio positivos, seguida una reacción lenta por derivados azo, lo cual lleva a que se formen uniones covalentes entre la proteína y la matriz, y queden inmobilizadas de forma definitiva. Ambas se utilizan para transferencia electroforética. Otras resinas como el diaminoetil (DEAE) o el acetato de celulosa se pueden utilizar aunque los patrones de bandas recuperadas no son estables.

Se han creado varios tipos de transferencia de proteínas a matrices inmovilizadoras, éstas pueden ser por difusión simple, flujo de solvente o por campo eléctrico. El primer tipo fue introducido por Southern en 1975, como iniciador del concepto de transferencia de macromoléculas (DNA) a una matriz de nitrocelulosa, por flujo de solvente del gel a la matriz. En este caso, no se utiliza campo eléctrico para que el ácido nucléico migre a la matriz sino que es propiciada por la presión ejercida sobre las placas de vidrio entre las que está el gel y cubriéndolo con dos hojas de la matriz. Hacia 1977, Alwine y colaboradores introdujeron la utilización de la matriz DBM con flujo de solvente para transferir macromoléculas (RNA) y lo denominaron "Northern Blot" para continuar el estilo del primero, llamado "Southern Blot".

El siguiente tipo de inmunotransferencia descrito por Towbin y col en 1979 y Burnette en 1981, el "Western Blot" realiza la transferencia de proteínas separadas en un gel de EGPA-DSS a la matriz de nitrocelulosa por acción de un campo eléctrico. Reinhard y Malamud (1982) transfirieron bidireccionalmente por flujo de solvente proteínas separadas por enfoque isoeléctrico a la matriz de nitocelulosa. A este tipo de transferencia se le denominó "Eastern Blot".

La transferencia electroforética (en inglés "electroblotting", también conocida como "Western Blot") descrita por Towbin y col en 1979, indica que no deben existir burbujas entre el gel y el papel, ya que reducen la eficiencia de transferencia y deforma el patrón de bandas. En el amortiguador de transferencia se debe incluir metanol, ya que incrementa la capacidad de unión de la proteína a la nitocelulosa, aunque reduce la eficiencia de elución del gel. Esto último se puede evitar poniendo un amortiguador con fuerza iónica baja y la distorsión de las bandas puede evitarse dejando el gel una hora en el amortiguador de transferencia.

Para identificar los componentes tranferidos a la matriz se pueden teñir con cualquier método utilizado para geles, por ejemplo: amido negro, fijado con una solución de ácido acético y metanol, por menos de 5 min. También pueden hacerse tinciones con bromuro de etidio para ácidos nucleicos o con plata para proteínas, además de utilizar tinta china, Ponceau, etc.

Otro tipo de detección posible es utilizar anticuerpos específicos dirigidos contra las proteínas a identificar, seguidos de un segundo anticuerpo dirigido contra las IgG del primer suero. Este último puede revelarse con marca fluorescente (isotiocianato de

fluresceína) iluminado con rayos U.V., por autoradiografía o por actividad enzimática (peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina) de marcas unidas al anticuerpo secundario contra el primer anticuerpo (puede ser contra IgG de conejo). Towbin (1979) señala que 100 pg de proteína pueden detectarse con el método enzimático. Para este método se utiliza gelatina al 3% o albúmina de bovino en amortiguador TBS (ver la sección de materiales y métodos) para saturar el exceso de sitios de unión inespecífica para el anticuerpo de la proteína a teñir. También se puede utilizar gelatina para bloquear sitios duales de unión.

Al utilizar nitrocelulosa las proteínas pueden recuperarse fácilmente, utilizando detergentes como Tritón X-100 y DSS, así como agentes desnaturalizantes como 8M de urea, 3M NaSCN ó ácidos (pH 2-3).

Es necesario tomar en cuenta varios factores para poder transferir proteínas a nitrocelulosa:

a) **Peso Molecular:** las proteínas más pequeñas se transfieren más rápido (aunque en inmunotransferencias secuenciales las primeras láminas tendrán más de las moléculas pequeñas tendiendo éstas a saturar la capacidad de unión local y pasar a las siguientes capas.

b) **Tipo de Gel:** puede impedir que salgan las moléculas del gel, a mayor porcentaje de T, más lentamente saldrán las moléculas (esto es importante en geles de gradiente).

c) **Punto Isoeléctrico y pH:** si éstos factores son iguales para el amortiguador de transferencia y la molécula a transferir, esta última no se moverá del gel.

Para geles de EGPA-DSS, el beneficio es que se puede recuperar la actividad enzimática al remover el detergente de la proteína en la matriz de nitrocelulosa, lavando o por electroelución en el aparato de transferencia sin amortiguador de DSS.

La utilidad de las inmunotransferencias radica en que puede detectarse fácilmente interacciones ligando-proteína (DNA- proteína, RNA-proteína, unión proteína-heparina, interacciones proteína-proteína, etc.).

Lo anterior constituye una visión panorámica de las técnicas electroforéticas así como de sus posibles combinaciones, sin embargo, no es el objetivo primordial de ésta tesis el hacer una revisión exhaustiva de ellas, quedando así algunas de las técnicas sin descripción detallada, tal es el caso del enfoque isoelectrico, donde las proteínas migran en el gel hasta que llegan a su punto isoelectrico característico; la identificación por P.M. se lleva a cabo por medio de geles de segunda dimensión con DSS.

Es posible realizar la separación de proteínas en cantidades del orden de micromolas, con la llamada microelectroforesis. Otro tipo de separación por medio de electroforesis de muestras no purificadas se denomina electroforesis preparativa. Así mismo, se pueden separar muestras de ADN por medio de geles de agarosa, ya que el tamaño de poro es mayor.

Existen también pruebas electroforéticas que ayudan a saber si un anticuerpo es específico o no para un determinado antígeno o probarlo con una mezcla de sueros, por difusión o por campo eléctrico. De las técnicas antes mencionadas es posible encontrar modificaciones y combinaciones de las mismas.