



0306212
Leje.
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

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

LA INTERACCION DE LA PROTEINA FIERRO-AZUFRE
CON EL COMPLEJO III MITOCONDRIAL
DE CORAZON DE BOVINO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
**MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA
BASICA (BIOQUIMICA)**
P R E S E N T A :
BIOLOGO SERAFIN RAMIREZ-ZAMORA

MEXICO, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

JUNIO 1994



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.

**El presente trabajo se realizó en el Departamento de Bioenergética
del Instituto de Fisiología Celular de la
Universidad Nacional Autónoma de México
bajo la dirección del Dr. Diego González Halphen**

DEDICATORIAS:

A la **Memoria de Estela Zamora de Ramírez** porque a ella le debo gran parte de todo lo que soy, con toda mi Admiración, Respeto y Amor.

A **Serafín Ramírez Calderón**, por su Paciencia, Apoyo y Consejos.

A **Carlos Alfonso y Pilar** por su Gran Apoyo

A mis familiares **José, Eva, Adriana, José Eduardo, Martha y David, Evita, Ivan y Joselyn**, por los grandes y gratos momentos que hemos pasado.

A la **Memoria de la Dra. Aurora Brunner Liebshard** Investigadora del Departamento de Microbiología del Instituto de Fisiología Celular de la U.N.A.M. porque sin su ayuda tal vez no existiría este trabajo.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, máxima casa de estudios de este país, por haberme formado tanto en lo Académico como en lo Personal.

A mi gran **Alma Mater la Facultad de Ciencias de la U.N.A.M.** por todo lo que me brindó y enseñó cuando recorrí sus aulas.

A los **Verdaderos Maestros** que he tenido a lo largo de mi Formación Académica porque han influido **Positivamente** en mí.

A los Malos Maestros que han pasado, porque me enseñaron como **No se Debe de Actuar con las Personas tanto a nivel Académico como Personal.**

A los que primero fueron alumnos del curso de laboratorio de Bioquímica I de la Facultad de Química de la U.N.A.M. y a los que no también y que ahora son Grandes Amigos porque juntos hemos aprendido tanto en lo *Académico* como en lo *Personal*, además por los buenos momentos que hemos disfrutado, ellos son *Olga María, Selene y Esteban, Mamu, Greta, Lillana, Fabiola, José Luis y Marcela, Beatriz, Dulce, Perla, Dulce, Eduardo y Liliana, Erika, Ulises, Patricia, María Eugenia, Cetzilia, Lorena, Adellna, Ana María, Yolanda, Adriana, Cinthya, Rosario, Alejandra, Blanca, Lariza, Adriana, Ana Lorena, Itzlar Desireé, Martha, Ivonne, Anabel Verónica, Uwe, Raúl, Karla, ...*

A mis amigos de siempre *Edgar, Joel y Laura, Ricardo y Ana Rita, Gerardo, Joaquín, Claudia María, Loena, Fernando, Claudia, Adriana, Pedro, Héctor, Epl, Jorge Jardón, Sergio y Alejandra...*

A mis amigos del Instituto de Fisiología Celular *Rocío, Ember, Adrian, Rita, Blanca, Juan, Cuauhtémoc, Andrés, Alejandro Daniel, Lourdes, Jorge Luis Valente, Silvia, Bertha, Ernesto, Marcela, Gaby, ...*

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Diego González Halphen por las facilidades brindadas en su laboratorio para la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Armando Gómez-Puyou del *Departamento de Bioenergética del Instituto de Fisiología Celular de la U.N.A.M.* por las facilidades que me brindó en su laboratorio cuando necesite trabajar en él.

Al Dr. Salvador Uribe Carvajal del *Departamento de Microbiología del Instituto de Fisiología Celular de la U.N.A.M.* por su ayuda para la elaboración de los barridos densitométricos presentados en este trabajo.

A la Maestra en Ciencias Lourdes Flores Delgadillo del *Laboratorio de Contaminación de Suelos del Departamento de Edafología del Instituto de Geología de la U.N.A.M.* por su excelente disposición y gran ayuda para la obtención de los valores a partir de las determinaciones de contenido de hierro no hémico por espectroscopía de absorción atómica para la proteína hierro-azufre, que se presentan en este trabajo.

Al Médico Cirujano Rodolfo Paredes Díaz de la *Unidad de Microscopía Electrónica del Instituto de Fisiología Celular de la U.N.A.M.* por su gran ayuda para la elaboración de las figuras que se presentan en este trabajo.

Al Sr. Hilario Zamudio Jiménez, por su gran disposición e inapreciable ayuda en la elaboración de este trabajo.

A los Ingenieros en Computación Juan Manuel Barbosa Castillo y Rodrigo Montúfar Chaveznava de la *Unidad de Computo del Instituto de Fisiología Celular de la U.N.A.M.* por su excelente disposición y gran ayuda para resolver los problemas que se presentaron durante la elaboración de este trabajo.

A los Srs. Raúl B. Zarate Zarza y Javier Gallegos Infante así como a la Srta. María Elena Trejo Roldán de la *Biblioteca del Instituto de Fisiología Celular de la U.N.A.M.* por su paciencia con los préstamos bibliotecarios y ayuda en la elaboración de el manuscrito de este trabajo.

Al Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez del *Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Nutrición "Salvador Zubirán" de la S.S.A.* por la gran ayuda prestada para la elaboración del manuscrito de este trabajo.

A la **Dirección General de Asuntos del Personal Académico** de la U.N.A.M. así como al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, por la beca otorgada para realizar los estudios de Maestría en Investigación Biomédica Básica.

A la **Dirección General de Asuntos del Personal Académico** de la U.N.A.M. por el **donativo IN-206789** otorgado al Dr. Diego González Halphen como apoyo para la elaboración de este trabajo.

A las sritas. **Virginia Godínez Hernández, María Elena Gutiérrez Robles y Guadalupe Ramírez Zenteno** por su gran ayuda y excelente disposición durante mi estancia en este lugar.

A los **Drs. J. Adolfo García Sáinz y Ruy Pérez Montfort**, por sus comentarios y sugerencias a lo largo de este trabajo en las reuniones tutoriales.

Miembros del Jurado:

Dr. Edmundo Chávez Cosío
Dr. Antonio Peña Díaz
Dr. Diego González Halphen
Dr. Ruy Pérez Montfort
Dr. Rolando Hernández Muñoz

Mexico, D.F.

Junio de 1994

RESUMEN

I

I INTRODUCCION

I.I	La Cadena Respiratoria	1
I.II	El Complejo bc, Mitocondrial	5
I.III	Biogénesis del Complejo bc,	9
I.IV	El Ciclo Q	17
I.V	Evidencias Experimentales del Ciclo Q	20
I.VI	Inhibidores Específicos del Complejo bc,	22
I.VII	Estudios Cristalográficos del Complejo bc,	23
I.VIII	El Citocromo b	25
I.IX	La Proteína hierro-azufre	27
I.X	Reactivos Fotoactivables	32
I.XI	Antecedentes	38
I.XII	Objetivo	41

II METODOLOGIA

II.I	Obtención de Mitocondrias	42
II.II	Purificación del Complejo bc, Mitocondrial	42
II.III	Ensayos Espectrofotométricos del Complejo bc,	46
II.IV	Ensayos de Reconstitución	47
II.V	Purificación de la Proteína hierro-azufre	48
II.VI	Determinación de Proteínas	50
II.VII	Determinación de Hierro no Hémico	50
II.VIII	Reacción de Entrecruzamiento	52
II.IX	Electroforesis	56
II.X	Inmunorrélicas tipo Western	57

III RESULTADOS

III.I	Purificación del Complejo bc,	60
III.II	Ensayos Espectrofotométricos	67
III.III	Ensayos de Reconstitución	69
III.IV	Purificación de la Proteína hierro-azufre	73
III.V	Determinación de Hierro no Hémico	81
III.VI	Reacción de Entrecruzamiento	85

IV DISCUSION

IV.I	Purificación del Complejo bc ₁	94
IV.II	Ensayos Espectrofotométricos	95
IV.III	Ensayos de Reconstitución	96
IV.IV	Purificación de la Proteína hierro-azufre	97
IV.V	Reacción de Entrecruzamiento	99

V CONCLUSIONES	108
-----------------------	------------

VI PERSPECTIVAS	109
------------------------	------------

VII APENDICE I	112
-----------------------	------------

VIII APENDICE II	115
-------------------------	------------

RESUMEN

La respiración se realiza en la membrana interna mitocondrial, durante este proceso se lleva a cabo la oxidación de sustratos provenientes del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, como son el succinato y el NADH, así como la transferencia de electrones a través de los complejos que conforman la cadena respiratoria y que se denominan:

- * NADH ubiquinona óxido-reductasa o complejo I
- * succinato ubiquinona óxido-reductasa o complejo II
- * ubiquinol citocromo c óxido-reductasa o complejo III
- * citocromo c oxidasa o complejo IV

Acoplado a este proceso, se da la formación de un gradiente electroquímico de protones en la membrana interna mitocondrial, cuya energía es utilizada por la ATP-sintetasa para llevar a cabo la formación de ATP¹.

Uno de los objetivos del laboratorio, es determinar la relación estructura-función del ubiquinol citocromo c óxido-reductasa o complejo bc₁ (complejo III) que está constituido por 11 subunidades, tres de las cuales, citocromo b, citocromo c, y proteína hierro-azufre, presentan grupos prostéticos óxido-reductores². Por lo que el objetivo del presente trabajo fué **el identificar el sitio de unión de la proteína hierro-azufre al resto del complejo bc₁**. El enfoque experimental utilizado, se basó en el hecho de que la proteína hierro-azufre puede disociarse del complejo y volverse a reasociar. La proteína purificada, se modificó con un reactivo de entrecruzamiento bifuncional que es fotosensible a luz ultravioleta de onda corta (254 nm), se incorporó al complejo y se realizó la fotoactivación del complejo. Los resultados de estos experimentos se visualizaron por medio de geles en poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio, seguido de inmunorreplicas tipo Western o de autorradiografías según se requiriera. Bajo las condiciones experimentales en la que se realizaron estos experimentos no fué posible visualizar un producto de entrecruzamiento covalente entre la proteína hierro-azufre y el resto del complejo bc₁, posiblemente por el hecho de que la proteína modificada tendiera a agregarse, lo que explicaría la similitud de patrones encontrados en los lotes control y experimentales.

¹ Hatell, Y. 1985. Ann. Rev. Biochem. 54:1015-69.

Hatell, Y., Haavik, A.G. y D.E. Griffiths. 1961. Biochem. Biophys. Res. Comm. 4:441-46 y 447-53.

² Shägger, H., Link, Th.A., Engel, W.D. y von Jagow, G. 1986. Methods Enzymol. 126:224-37.
González-Halphen, D., Lindorfer, M.A. y Capaldi, R.A. 1988. Biochem. 27:7021-31.

A pesar de estos resultados, este trabajo sentó las bases para la utilización del reactivo de entrecruzamiento bifuncional sulfosuccinimidil 2-(ρ -azidosalicilamido) etil-1,3' ditiopropionato (SASD). También se modificaron y mejoraron las técnicas descritas por Rieske y Per O. Ljungdahl y colaboradores³ para la purificación del complejo bc₁, mitocondrial, asimismo, se modificó y mejoró la técnica descrita por Shimomura y colaboradores⁴ para la purificación de la proteína hierro-azufre, obteniéndose en ambos casos preparaciones con un alto grado de pureza como lo confirmaron los geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio y las inmunorréplicas tipo Western.

Finalmente, a futuro se pudieran realizar experimentos en los cuales se utilicen agentes reductores después de haber realizado la reacción de entrecruzamiento entre las proteínas hierro-azufre y la subunidad (es) "X" del complejo bc₁, para liberar la porción arilazido marcada con yodo 125 (dado que el reactivo presenta un enlace disulfuro en su parte media) y tratar de visualizar la subunidad (es) que presentan marca radioactiva por medio de autorradiografías, en lugar de buscar un producto formado por el complejo proteína hierro-azufre-ASD-¹²⁵I-proteína "X". También se pudiera adicionar el reactivo marcado con yodo 125 directamente a una preparación de complejo bc₁ puro, en presencia de algún detergente para disociar las subunidades del complejo y ver si se forma o no algún producto de entrecruzamiento. Otra posibilidad sería llevar a cabo reconstituciones heterólogas con la proteína hierro-azufre de bovino acoplada al reactivo SASD-¹²⁵I con complejos bc₁ carentes de esta subunidad, como por ejemplo, un bc₁ bacteriano, un bc₁ de papa, un complejo b₆f de células de cloroplastos o un bc₁ de otro organismo eucarionte como podría ser la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y ver si ocurre o no la formación de un producto (os) de entrecruzamiento.

-
- ³ Rieske, J.S. 1967. *Methods Enzymol.* 10:229-39.
Ljungdahl, P.O., Pennoyer, J.D., Robertson, D.E. y Trumppower, B.L. 1987. *Biochim. Biophys. Acta.* 891:227-41.
- ⁴ Shimomura, Y., Nishikimi, M. y Ozawa, T. 1984. *J. Biol. Chem.* 259(25):14059-63.

I INTRODUCCION

I.1 La Cadena Respiratoria:

La respiración se lleva a cabo en la membrana interna de las mitocondrias; durante este proceso se realiza la oxidación de sustratos provenientes del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, como son el succinato y el NADH, así como la transferencia de electrones a través de sus componentes hasta el último aceptor, que es el oxígeno, acoplado a este proceso, se forma un gradiente electroquímico de protones en la membrana interna mitocondrial, cuya energía es utilizada por la ATP-sintetasa para llevar a cabo la formación del ATP¹ (ver figura 1).

Dentro de los constituyentes de la cadena transportadora de electrones tenemos:

- * grupos hemo (a, b, c₁ y c)
- * centros hierro-azufre (Fe-S)
- * mononucleótidos de flavina (FMN)
- * flavín-adenín-dinucleótidos (FAD) y
- * átomos de cobre (Cu a y Cu a₂)

los cuales se encuentran asociados a estructuras proteicas formadas por varios polipéptidos parcialmente embebidos en la membrana interna mitocondrial.

¹ Hatefi, Y. 1985. Ann. Rev. Biochem. 54:1015-69.

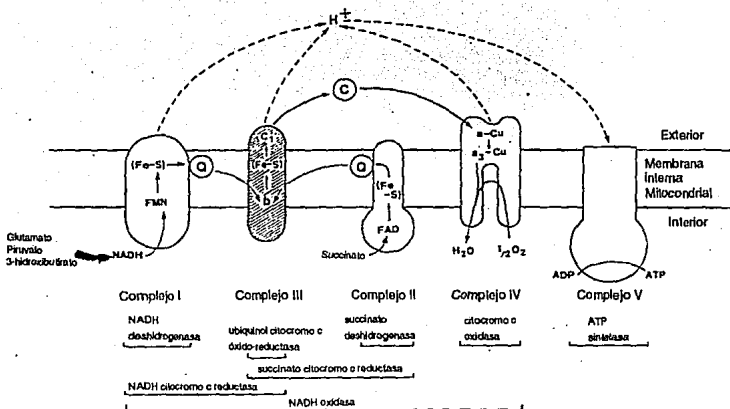


Figura 1. Representación esquemática de la cadena respiratoria mitocondrial.
 Q= Ubiquinona
 C= Citocromo c soluble

De acuerdo con la función que realizan estos complejos se han denominado como:²

- * NADH ubiquinona óxido-reductasa (complejo I)
- * succinato ubiquinona óxido-reductasa (complejo II)
- * ubiquinol citocromo c óxido-reductasa (complejo III) y
- * citocromo c oxidasa (complejo IV)

en ocasiones, y dependiendo del autor, a la ATP-sintetasa se le ha denominado complejo V³. A su vez, en tres de estos complejos se lleva a cabo el bombeo de protones descrito anteriormente, siendo estos sitios conocidos como:

- * sitio I, constituido por flavoproteínas y una proteína hierro-azufre (complejo I)
- * sitio II, formado por los componentes del complejo III y
- * sitio III, compuesto por los citocromos a y a₃ (complejo IV) (ver figura 1)

Dado que la membrana interna mitocondrial está constituida por aproximadamente 80% de lípidos y 20% de proteínas, presenta un estado semifluido y los componentes que catalizan el transporte de electrones y la síntesis del ATP se encuentran difundiendo independientemente en la membrana. El transporte de electrones probablemente se lleva a cabo por medio de colisiones múltiples de los componentes redox:

- * los 4 complejos respiratorios
- * la ubiquinona y

² Hatéfi, Y., Haavik, A.G. y D.E. Griffiths. 1961. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 4:441-46 y 447-53.

³ Hatéfi, Y., Haavik, A.G., Fowler, L.R. y D.E. Griffiths. 1962. *J. Biol. Chem.* 237:1681-85.
González-Halphen, D. 1990. *Ciencia*, 41:133-52.

* el citocromo c soluble

siendo los 2 últimos los que se presentan en mayor concentración y los que difunden más rápido. A continuación se enlistan las principales características de los componentes de la fosforilación oxidativa de la membrana interna mitocondrial⁴:

Componentes	Peso molecular del monómero (daltones)	Conc. nmol/ mg prot.	Subunidades de origen nuclear	Subunidades de origen mitocondrial	Grupos prostéticos
Complejo I	700,000	0.06-0.13	25	7	FMN, Fe-S
Complejo II	200,000	0.19	5	0	FAD, hemo b ₅₆₀ , Fe-S
Complejo III	250,000	0.25-0.53	10	1	hemo c ₁ , hemo b ₅₆₂ , hemo b ₅₆₈ , Fe-S
Complejo IV	208,000	0.6-1.00	10	3	hemos aa ₃ , Cu a, Cu a ₃
ATP sintasa	550,000	0.52-0.54	14	2	adenín nucleotidos, Mg ²⁺
Ubiquinona	860	6-8	---	---	---
Citocromo c	12,000	0.8-1.02	1	---	hemo c

⁴ Datos tomados de González-Halphen, D. 1990. Ciencia. 41:133-52.

1.11 El Complejo bc₁ Mitocondrial:

El complejo bc₁ es una proteína oligomérica membranal, la cual transfiere electrones a partir de un quinol, de relativamente bajo potencial, hasta un citocromo de tipo c en el caso de organismos animales ó a una plastocianina en el caso de los vegetales, y deposita 4 protones en el lado electropositivo de la membrana por cada par de electrones transferidos a 2 moléculas de citocromo c soluble.

Este complejo ha sido aislado a partir de una gran variedad de organismos tanto procariontes como eucariontes, observándose una gran variación en cuanto al número de subunidades que lo componen. Así tenemos que los organismos procariontes, como *Rhodobacter sphaeroides* y *Rhodobacter capsulatus* presentan 4 subunidades⁵ *Paracoccus denitrificans* presenta 3 subunidades⁶ y *Rhodospirillum rubrum* 3 subunidades⁷, en tanto que organismos eucariontes como *Saccharomyces cerevisiae* tiene 9 subunidades⁸, *Neurospora crassa* 9 subunidades⁹, las plantas superiores como la papa 10 subunidades¹⁰ y el complejo obtenido a partir de mitocondrias de corazón de bovino 11 subunidades¹¹. Hasta ahora no hay una explicación que satisfaga completamente el por qué de esta diferencia en el número

⁵ Ljungdhal, P.O., J.D. Pennoyer, D.E. Robertson y B.L. Trumpower. 1987. Biochim. Biophys. Acta. 891:227-41.

⁶ Trumpower, B.L. 1991. J. Bioenerg. Biomembs. 23(2):241-55.

⁷ Majewski, Ch. y Trebst, A. 1990. Mol. Gen. Genet. 224:373-82

⁸ Ljungdhal, P.O., J.D. Peyonner, D.E. Robertson y B.L. Trumpower. 1987. Biochim. Biophys. Acta. 891:227-41.

⁹ Teinlze, M., M. Slaughter, H. Weiss y W. Neupert. 1982. J. Biol. Chem. 257:10364-71.

¹⁰ Berry, E.A., Huang, L. y De Rose, V.J. 1991. J. Biol. Chem. 266(15):9064-77.

¹¹ Shagger, H., Link, Th.A., Engel, W.D. y von Jagow, G. 1986. Methods Enzymol. 126:224-37.
González-Halphen, D., Lindorfer, M.A. y Capaldí, R.A. 1988. Biochem. 27:7021-31.

de subunidades, aunque probablemente pueda deberse a la biogénesis del complejo en los diferentes organismos (ver más adelante). Es importante hacer notar que tanto en los organismos procariontes como en los organismos eucariontes se encuentran presentes los componentes esenciales de todo complejo bc₁, como son:

- * un citocromo tipo b
- * un citocromo tipo c₁ y
- * un centro hierro-azufre

Cabe hacer mención aquí que se han encontrado en los cloroplastos de plantas superiores y en cianobacterias otros complejos homólogos al bc₁, que se denominan complejos b₆f¹².

En la figura 2 se muestran los esquemas para los complejos bc₁ de *Paracoccus denitrificans* (arriba) y para *Saccharomyces cerevisiae* (abajo)¹³ en tanto que en la figura 3 se muestra el esquema topológico del complejo bc₁ de corazón de bovino¹⁴.

¹² Hausaka, G., Hurt, E., Gabellini, N. y Lockav, W. 1983. *Biochim. Biophys. Acta.* 762:97-133.
¹³ Trumpower, B.L. 1990. *Microbiol. Rev.* 54(2):101-29.
¹⁴ González-Halphen, D. 1990. *Ciencia.* 41:133-52.

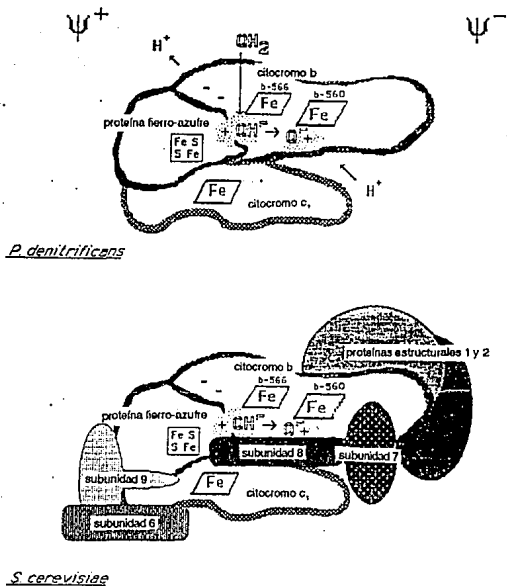


Figura 2. Posible arreglo topológico para las subunidades de los complejos *bc*₁ de procariontes (arriba) y eucariontes (abajo)²

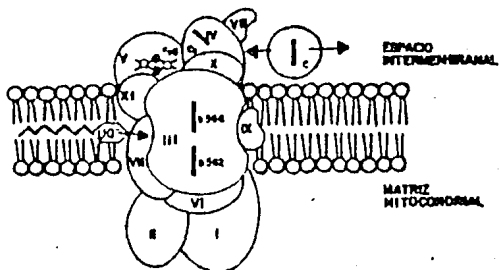


Figura 3. Esquema del posible arreglo topológico de los componentes del complejo bc₁ mitocondrial de bovino³

³ González-Halphen, D. 1990. *Ciencia*. 41:133-52

I,III Biogénesis del Complejo bc₁:

Actualmente se sabe que de las 11 subunidades que comprenden al complejo bc₁, sólo el citocromo b o subunidad III está codificada por el genoma mitocondrial, mientras que las 10 subunidades restantes son codificadas por el núcleo y sintetizadas en el citoplasma celular, debiendo ser importadas al interior de la mitocondria¹⁴. Para ello, estas subunidades presentan una secuencia adicional cuando están en su forma inmadura; estas secuencias codifican para lo que se ha denominado como *péptidos de tránsito*, porque van a dirigir a las subunidades hacia la membrana interna mitocondrial donde se integraran al complejo bc, que se esta sintetizando *de novo*.

Estos péptidos de tránsito, se caracterizan por presentar residuos de aminoácidos cargados positivamente y algunos están enriquecidos en serina y treonina, siendo capaces de formar hélices anfipáticas¹⁵. Estas secuencias de tránsito son eliminadas en forma postraduccional en una o dos etapas, gracias a la acción de una serie de metaloproteasas localizadas en la matriz o en la membrana interna mitocondrial. La forma en que las subunidades son transportadas, insertadas y procesadas en la membrana interna de la mitocondria no siempre es la misma. Para el caso de las subunidades I y II (subunidades estructurales), la subunidad IV (citocromo c₁) y la subunidad V (proteína hierro-azufre), se ha propuesto un modelo¹⁶ en el cual el precursor va a ser translocado al interior de la mitocondria por medio de la

¹⁵ Roise, D. y Shatz, G. 1988. J. Biol. Chem. 263:4509-11.
Roise, D., Theiler, F., Horvath, S.J., Tomich, J.M., Richears, J.H., Allison, D.S. y Shatz, G. 1988. EMBO J. 7:649-53.

¹⁶ Hartl, F.V. Schmidt, B., Wachter, E., Weiss, H. y Neupert, W. 1986. Cell. 47:939-51.

formación de sitios de contacto entre las membranas mitocondriales. Seguido de éste hay un primer corte o procesamiento del péptido de tránsito que comprende a los 8 primeros residuos de aminoácidos. En el caso de la proteína fierro-azufre se forma un producto intermediario que es redirigido de la matriz hacia la membrana interna, donde se lleva a cabo un segundo corte o procesamiento final en los aminoácidos restantes, dando lugar a la forma madura de la subunidad, la cual se ensambla finalmente en el complejo maduro.

También se han realizado otros estudios¹⁷ para las subunidades, VII, VIII y IX, que al parecer carecen de una secuencia de tránsito como tal y su procesamiento postraduccional para llegar a la membrana interna mitocondrial se lleva a cabo por medio de receptores membranales, que se conocen como:

* MOM 19

* MOM 72

* Proteína de la membrana externa mitocondrial ó proteína del sitio de importe

* MOM 38

* p 32 (proteína de la membrana interna de levadura)

(MOM se refiere a membrana externa mitocondrial).

El procesamiento postraduccional de estas 3 subunidades se realiza en un residuo de metionina localizado en el extremo amino-terminal, seguido de lo cual son reconocidas y llevadas hasta la membrana interna mitocondrial para su inserción al complejo. Así mismo, se han hecho estudios en *Saccharomyces cerevisiae*¹⁸ y

¹⁷ Pfanner, N. y Neupert, W. Ann. Rev. Biochem. 59:331-53.

¹⁸ Crivellone, M.D., Wu, M. y Tzagoloff, A. 1988. J. Biol. Chem. 263:10364-71.

*Neurospora crassa*¹⁹ para tratar de entender el procesamiento e incorporación de estas proteínas en la mitocondria. Los resultados han mostrado que las subunidades I, II, VI y IV (citocromo c.) interactúan unas con otras en la membrana, formando una estructura central dada por el apocitocromo b (sintetizado en el genoma mitocondrial), seguido de lo cual se integran los grupos prostéticos hemo para formar el citocromo b, la subunidad V (la proteína hierro-azufre) y las subunidades de bajo peso molecular, VIII,...,XI, son las últimas en incorporarse al complejo.

También es interesante hacer notar que en el caso de *Neurospora crassa*¹⁹ el procesamiento de las subunidades I, IV, V y VII, depende del potencial que presente la membrana mitocondrial. En la figura 4, se muestra un esquema de la síntesis y ensamblaje del complejo bc₁ mitocondrial²⁰.

Para el caso de la síntesis y procesamiento de las subunidades que componen al complejo bc₁, en procariontes, las subunidades son sintetizadas también como precursores y presentan una secuencia adicional similar a los péptidos de tránsito de las subunidades mitocondriales. Por ejemplo, para el procesamiento de la proteína hierro-azufre en *Rhodobacter sphaeroides*²¹ esta proteína es sintetizada en los ribosomas del citoplasma bacteriano y translocada a través de la membrana fotosintética hacia su superficie externa donde una vez que ha penetrado la porción amino terminal, se lleva a cabo el procesamiento de la secuencia de tránsito

¹⁹ Teintze, M., Slaughter, M., Wiess, H. y Neupert, W. 1982. J. Biol. Chem. 257:10364-71.

²⁰ González-Halphen, D. 1990. Ciencia. 41:133-52.

²¹ Hartl, F.U., Schmidt, B., Wachter, E., Weiss, H. y Neupert, W. 1986. Cell. 47:939-51.

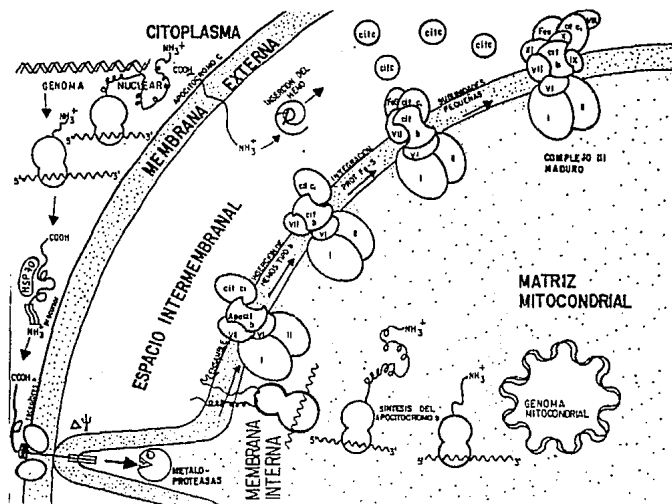


Figura 4. Esquema de la síntesis y ensamblaje del complejo bc₁ mitocondrial (HSP70, se refiere al componente citoplasmático perteneciente a la familia de las proteínas de impacto térmico⁴)

para dar lugar a la forma madura de la proteína hierro-azufre, seguido de lo cual es incorporada al complejo bc_1 (ver figura 5)²¹.

Como se comentó anteriormente, hasta ahora no hay una explicación que satisfaga completamente sobre la diferencia en cuanto al número de subunidades entre los complejos bc_1 de organismos procariontes y eucariontes, y una posible explicación pudiera deberse a la biogénesis particular del complejo bc_1 , dado que en eucariontes tenemos que hay entre 9 y 11 subunidades, de las cuales sólo la subunidad III o citocromo b está codificada por el genoma mitocondrial. Las demás subunidades son sintetizadas en el citoplasma celular, que luego son transportadas hasta la membrana interna mitocondrial. Las subunidades estructurales I y II (core I y II), al parecer juegan un papel importantísimo en el procesamiento de las demás subunidades, dado que su secuencia tiene una gran similitud con las proteínas que aumentan el procesamiento de las formas precursoras (PEP) de las subunidades restantes, así como con las peptidasas de la matriz mitocondrial (MPP), que también intervienen en el proceso de maduración de las subunidades.²² Esto es importante, porque además de estas funciones, las subunidades estructurales I y II son esenciales en el ensamblaje y modulación del complejo bc_1 ^{23 y 24}.

²² Gencic, S., Scågger, H. y von Jagow, G. 1991. Eur. J. Biochem. 199:123-31.

²³ Grivell, L.A. 1989. Eur. J. Biochem. 182:477-93.

²⁴ Linke, P. y Weiss, H. 1986. Methods Enzymol. 126:201-10.

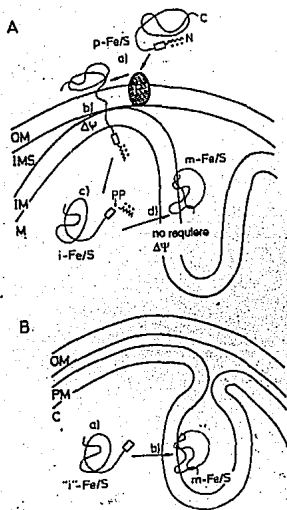


Figura 5. Esquema del transporte hipotético y la vía de ensamblaje de la proteína hierro-azufre en los complejos bc, mitocondrial (A) y bacteriano (B)⁵

⁵

Los organismos procariontes no presentan proteínas estructurales I y II, lo cual puede deberse al hecho de que los precursores del citocromo b, del citocromo c₁ y de la proteína hierro-azufre, son sintetizados en el citoplasma bacteriano y únicamente tienen que cruzar la membrana plasmática, en lugar de las 2 membranas mitocondriales de los organismos eucariontes²¹. Las subunidades estructurales I y II no se requieren en este proceso, como lo ilustra un estudio reciente²⁵, en el cual se expresa el gene que codifica para la proteína hierro-azufre de *Rhodobacter sphaeroides* en *Escherichia coli*, encontrando que aún en ausencia de las otras 2 subunidades (el citocromo b y el citocromo c₁) esta subunidad es capaz de unirse a la membrana.

Aquí es interesante hacer mención a un par de trabajos recientes²⁶. En el primero de ellos, se confirmó un hallazgo por demás interesante en cuanto a la estructura del complejo bc₁, que consiste en lo siguiente: los autores realizaron la secuenciación del gen que codifica para la subunidad V ó proteína hierro-azufre completa, es decir la secuencia incluyendo la secuencia del péptido de tránsito, y encontraron que la secuencia que corresponde al péptido de tránsito es idéntica a la secuencia de la subunidad IX (de bajo peso molecular) del complejo bc₁ de mitocondrias de bovino. Esto sugiere que una vez que se ha procesado y liberado la secuencia del péptido de tránsito, esta se convierte en la subunidad IX del complejo, manteniendo la metionina del extremo amino-terminal la cual es N-acetilada.

²⁵ Van Doren, R.S., Chang-Hyon, Y. Crofts, A.R. y Gennis, R.B. 1993. *Biochem.* 32:628-36.

²⁶ Brandt, U., Yu, L., Yu, Ch-A. y Trumpower, B.L. 1993. *J. Biol. Chem.* 268(12):8387-90.
Phillips, J.D., Graham, L.A. y Trumpower, B.L. 1993. *J. Biol. Chem.* 268(16):11727-36.

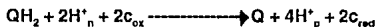
También se encontró que el extremo carboxilo terminal de la subunidad IX es muy similar al sitio de la secuencia donde comienza la forma madura de la proteína hierro-azufre. Esto implica que el procesamiento de la forma precursora de la proteína hierro-azufre debe ocurrir en un sólo paso y no en dos²⁷. Sin embargo, el punto importante de este trabajo es el hecho de que la subunidad IX del complejo bc, es prácticamente idéntica a la secuencia que codifica para el péptido de tránsito de la proteína hierro-azufre en su forma inmadura, aunque se desconoce alguna otra función de la subunidad IX dentro del complejo. En un segundo trabajo²⁶ los autores encuentran que la subunidad IX en el complejo bc₁ de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* tiene un papel importante dentro del complejo, ya que en ausencia de esta subunidad, el complejo es inactivo, observándose una disminución en la concentración del citocromo b, similar a la que se da cuando no se incorpora la proteína hierro-azufre al complejo. Al parecer, la ausencia de la subunidad IX altera la conformación de la proteína hierro-azufre, de tal forma que ésta es más lábil y no hay una inserción correcta del grupo prostético Fe₂-S₂ en la proteína; además, la interacción de esta proteína con el citocromo b se ve afectada, como lo refleja la disminución en la actividad del complejo. En este trabajo se puede ver que la ausencia de una de las subunidades de bajo peso molecular tiene un papel importante en cuanto a la estructura y funcionalidad del complejo se refiere, quedando abierta la pregunta ¿cuál sería el papel que juegan las demás subunidades en el complejo bc, en los organismos eucariontes?

27

Hartl, F.V., Schmidt, B., Wachter, E., Weiss, H. y Neupert, W. 1986. Cell. 47:939-51.

I.IV El Ciclo Q:

El ciclo Q, es un mecanismo que ha sido propuesto para explicar cómo se lleva a cabo la transferencia de electrones a través de los grupos prostéticos del complejo bc₁ mitocondrial²⁸. Como se había mencionado anteriormente, el complejo bc₁ transfiere 2 electrones a partir del ubiquinol (QH₂) a 2 moléculas de citocromo c; durante este proceso también se depositan 4 protones en el lado positivo de la membrana y se da la captura de 2 protones más desde el lado negativo de la membrana por cada par de electrones transferido, lo que se resume en la siguiente ecuación:



donde "n y p" designan los sitios negativo y positivo de la membrana y "ox y red" se refieren a los estados oxidado y reducido del citocromo c soluble.

En la figura 6 se muestra un esquema de la transferencia de electrones a través de los constituyentes redox del complejo²⁶. En un primer paso (1), el ubiquinol (QH₂) es oxidado en el lado positivo de la membrana en una reacción concertada en la cual un electrón es transferido a la proteína hierro-azufre (FeS) con la formación de un anión ubisemiquinona (Q_p⁻) el cual reduce inmediatamente al hemo b₅₆₆. Esta oxidación deposita 2 protones en el lado positivo de la membrana, siendo uno liberado con la oxidación del ubiquinol (QH₂) para formar la ubisemiquinona y el segundo dando lugar al anión ubisemiquinona (Q_p⁻).

²⁸ Trumpower, B.L. 1990. J. Biol. Chem. 265(20):11409-12.

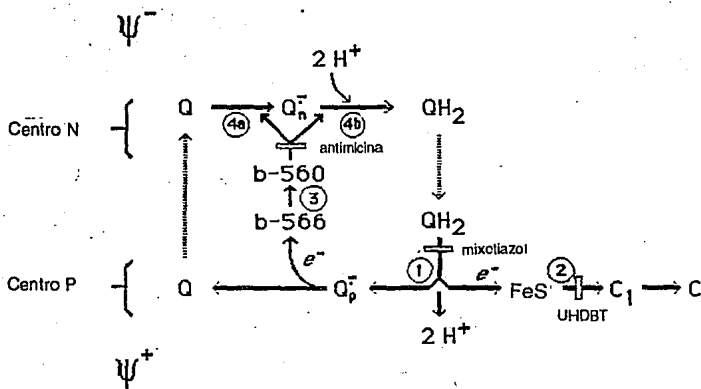


Figura 6. Esquema del mecanismo del ciclo Q para la transferencia de electrones y la translocación de protones en el complejo bc₁ mitocondrial⁶

⁶ Trumpower, B.L. 1990. J. Biol. Chem. 265(20):11409-12

De los 2 electrones del ubiquinol que divergen en el lado positivo, uno es transferido a la proteína hierro-azufre, y de ahí al citocromo c_1 en el paso 2 y después al citocromo c soluble. El segundo electrón se transfiere a partir del anión ubisemiquinona (Q_p^-) hacia el hemo b_{568} , se recicla a través del complejo bc_1 y es transferido desde el hemo b_{568} de bajo potencial hacia el hemo b_{560} de alto potencial.

Posteriormente el hemo b_{560} reduce a la ubiquinona (Q) para formar el anión ubisemiquinona (Q_n^-) en el lado negativo de la membrana (ver figura 4 paso 4A), seguido de lo cual, una segunda molécula de ubiquinol (QH_2) es oxidada por la proteína hierro-azufre y ésta a su vez, transfiere un electrón al citocromo c , el cual lo transfiere a una segunda molécula de citocromo c soluble, formándose nuevamente el anión ubisemiquinona (Q_p^-) y depositándose otros 2 protones en el lado positivo de la membrana. Seguidamente, el anión ubisemiquinona (Q_p^-) reacciona en la vía antes descrita, transfiriendo un electrón al hemo b_{568} y este al hemo b_{560} , el cual reduce al anión ubisemiquinona (Q_n^-) previamente formado, para dar lugar a una molécula de ubiquinol (QH_2) en el lado negativo, consumiendo 2 protones del lado negativo de la membrana y completándose así el ciclo Q (ver figura 6 paso 4B).

I.V Evidencias Experimentales del Ciclo Q:

Una característica única del ciclo Q es que hay 2 vías para que el citocromo b sea reducido por el anión ubisemiquinona (Q_p^-) en el lado positivo, como se describe en el paso 1 de la figura 4. Esta es la ruta termodinámicamente favorecida para la reducción del citocromo b y la única que funciona cuando el bc₁ realiza su función catalítica. Alternativamente, bajo condiciones de estado estacionario, el ubiquinol (QH_2) o el anión ubisemiquinona (Q_n^-) pueden reducir al citocromo b_{560} por medio de una reacción inversa de los pasos 4B y 4A en el lado negativo (figura 6), si la ruta que es termodinámicamente favorecida a través del lado positivo es bloqueada.

Se han llevado a cabo estudios²⁹ para demostrar que las 2 aseveraciones anteriores se cumplen, utilizando inhibidores específicos como son el mixotiazol y la estigmatelina, los cuales bloquean la reducción del citocromo b por una vía distinta a la antimicina a través del lado positivo de la membrana. Si se añade mixotiazol, este bloquea la reducción del citocromo c, en el paso 1 (ver figura 4) pero no bloquea la reducción del citocromo b porque ésta se realiza por medio de una reacción inversa de los pasos 4B y 4A en el lado negativo (ver figura 6). Si se añaden ambos inhibidores, mixotiazol y antimicina, el mixotiazol bloquea la reducción tanto del citocromo c, como del citocromo b. Estos experimentos en los cuales se añaden 2 inhibidores se han denominado de *doble muerte*, ya que la presencia de 2 inhibidores provoca la reducción permanente de los hemos b_{566} y b_{560} .

²⁹ von Jagow, G., Ljungdahl, P.O., Graf, P., Ohnishi, T. y Trumpower, B.L. 1984. J Biol. Chem. 259:6318-26.

von Jagow, G. y Ohnishi, T. 1985. FEBS Lett. 185:311-15.

También se han llevado a cabo experimentos en los cuales se han utilizado análogos de la ubiquinona; tal es el caso del inhibidor UHDBT (5-n-undecil-6-hidroxi-4,7-dioxobenzoxitiazol), que se une preferencialmente a la proteína hierro-azufre reducida o a una interfase entre el citocromo b y la proteína hierro-azufre³⁰. Esto provoca que haya un incremento en el potencial de la proteína hierro-azufre aproximadamente a 90 mV e impide que se dé la transferencia de electrones de la proteína hierro-azufre hacia el citocromo c₁.

Otro enfoque experimental para demostrar las dos vías por las cuales se puede reducir el citocromo b es el que se realizó en presencia y ausencia de la proteína hierro-azufre³¹ más antimicina. En este caso los autores observaron que al quitar la proteína hierro-azufre del complejo bc, se bloqueaba la reducción del citocromo c₁ pero no la reducción del citocromo b, mientras que al agregar antimicina al complejo bc, carente de la proteína hierro-azufre, se observó un bloqueo en la reducción de ambos citocromos b y c₁. Al reconstituir la proteína hierro-azufre en el complejo bc, carente de esta subunidad, se observó que se daba nuevamente la reducción de ambos citocromos b y c₁. Esto se explica por el hecho de que la proteína hierro-azufre es necesaria para que se lleve a cabo la reducción del citocromo c₁ a través del paso 1 de la figura 4, mientras que la reducción del citocromo b se realiza por medio de una

³⁰ Bowyer, J.R., Edwards, C.A., Ohnishi, T. y Trumpower, B.L. 1982. J. Biol. Chem. 257:8321-30.
³¹ Trumpower, B.L. y Edwards, C.A. 1979. J. Biol. Chem. 254:8697-8706.
Trumpower, B.L. 1976. Biochem. Biophys. Res. Commun. 70:73-79.

vía que es independiente de la proteína hierro-azufre, es decir, la reacción inversa de los pasos 4B y 4A (ver figura 6), la cual es inhibida por la antimicina.

I.VI Inhibidores Específicos del Complejo bc₁:

El mecanismo por el cual se lleva a cabo la transferencia de electrones en el ciclo Q puede verse interrumpido por la acción de una variedad de inhibidores que actúan a diferentes niveles del ciclo. Estos agentes químicos han sido agrupados en tres categorías de acuerdo a su sitio de inhibición³²:

* **Grupo I:** Constituido por varios β -metacrilatos que se unen en el sitio Q_o (lado positivo de la membrana mitocondrial), bloqueando 2 reacciones al mismo tiempo, la transferencia de electrones del ubiquinol (QH₂) hacia la proteína hierro-azufre así como la transferencia de electrones en el hemo tipo b de bajo potencial (hemo b₅₆₆). En este grupo tenemos al mixotiazol, las estrobirulinas A, B, y C y a las odemansinas A y B.

* **Grupo II:** En este grupo se encuentran los análogos de las hidroxiquinonas, los cuales se unen también en el sitio Q_o (lado positivo de la membrana mitocondrial), bloqueando la transferencia de electrones desde la proteína hierro-azufre hacia el citocromo c₁ y también la transferencia de electrones en el hemo tipo b de bajo potencial (hemo b₅₆₆). Dentro de este grupo de inhibidores encontramos a las estigmatelinas A y B, el UDBTH y el UHNQ (undecilhidroxinaftoquinona).

32

von Jagow, G. y Link, Th. A. 1986. Methods Enzymol. 126:253-71.

* **Grupo III:** Dentro de este grupo tenemos a la antimicina, la funiculosina y ciertos análogos de quinona, que se unen en el sitio Q_i (lado negativo de la membrana mitocondrial), y bloquean la transferencia de electrones desde el hemo de alto potencial (hemo b₅₆₀) hacia la ubiquinona en el lado negativo de la membrana interna mitocondrial. En la figura 7 se muestra un esquema de los sitios en los cuales tienen su acción los 3 grupos de inhibidores.

I.VII Estudios Cristalográficos del Complejo bc₁:

El complejo bc₁ mitocondrial, ha sido cristalizado recientemente y de manera independiente por 3 grupos distintos³³, teniéndose hasta ahora solamente datos preliminares sobre los patrones de difracción de rayos-X. También existen datos acerca de la actividad de los complejos cristalizados resolubilizados que indican que los valores de actividad de estos complejos comparados con los de los complejos nativos son muy similares. Sin embargo, aún faltan más estudios para poder llegar a determinar a un nivel atómico la topología del complejo bc₁.

³³ Yue, W-H., Zou, Y-P., Yu, L. y Yu, Ch-A. 1991. *Biochem.* 30:2303-06.
Kubota, T., Kawamoto, M., Fukuyama, K., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S. y Matsubara, H. 1991. *J. Mol. Biol.* 221:379-82.
Berry, E.A., Huang, L., Earnest, T.N. y Jap, B.K. 1992. *J. Mol. Biol.* 224:1161-66.

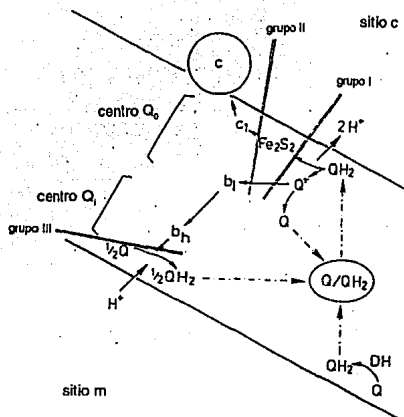


Figura 7. Esquema de los sitios de acción de los 3 grupos de inhibidores del complejo bc_1 .⁷

I.VIII El Citocromo b:

El citocromo b ó subunidad III del complejo bc, es una proteína membranal constituida por 380 a 400 residuos de aminoácidos, con un peso molecular entre 38 y 48 kDa. A diferencia de las demás subunidades que conforman al complejo bc, el citocromo b es codificado por un gen que se encuentra en el genoma mitocondrial en organismos eucariontes. También se ha descrito que en el genoma de los cloroplastos se encuentra un gen que codifica para un citocromo que es homólogo al citocromo b y que se denomina b_c y forma parte del complejo b₆f en los organismos vegetales y en las cianobacterias³⁴. El citocromo b a sido objeto de diversos estudios entre los cuales están el uso de sondas hidrofóbicas³⁵, la fusión de genes en bacterias³⁶, así como cálculos de hidropatía³⁷. Estos estudios han demostrado que el citocromo b presenta 9 hélices- α de las cuales 8 cruzan la membrana interna mitocondrial, en tanto que la hélice denominada IV presenta la característica de que es anfifílica y se ha propuesto que está localizada en la región externa de la membrana interna mitocondrial en el caso de organismos eucariontes³⁸ y en el espacio periplásmico en el caso de *Rhodobacter sphaeroides*³⁹, (ver figura 8).

³⁴ Hausaka, G., Hurt, E., Gabellini, N. y Lockav, W. 1983. *Biochim. Biophys. Acta.* 762:97-133.

Trumpower, B.L. 1990. *Microbiol. Rev.* 54(2):101-29.

³⁵ Gutweniger, H., Bisson, R. y Montecucco, C. 1981. *J. Biol. Chem.* 256:11132-36.

González-Halphen, D., Lindorfer, M.A. y Capaldi, R.A. 1988. *Biochem.* 27:7021-30

³⁶ Yu, Ch-A., Van Doren, S.R., Crofts, A.R. y Gennis, R.B. 1991. *J. Biol. Chem.* 266:10967-73.

³⁷ Sarasto, M. 1984. *FEBS Lett.* 166:367-72.

Link, T.A. Schagger, H. y von Jagow, G. 1986. *FEBS Lett.* 204:9-15.

Rao, J.K. y Argos, P. 1986. *Biochim. Biophys. Acta.* 869:197-205.

³⁸ Rao, J.K. y Argos, P. 1986. *Biochim. Biophys. Acta.* 869:197-205.

Crofts, A., Robinson, H., Andrews, K., Van Doren, S. y Berry, E. 1987. En Papa, S., Chance, B. y Ernster, L. (eds) *Cytochrome systems.* 617-24.

Brasseur, R. 1988. *J. Biol. Chem.* 263:12564-70.

Trumpower, B.L. 1990. *J. Biol. Chem.* 265:11409-12.

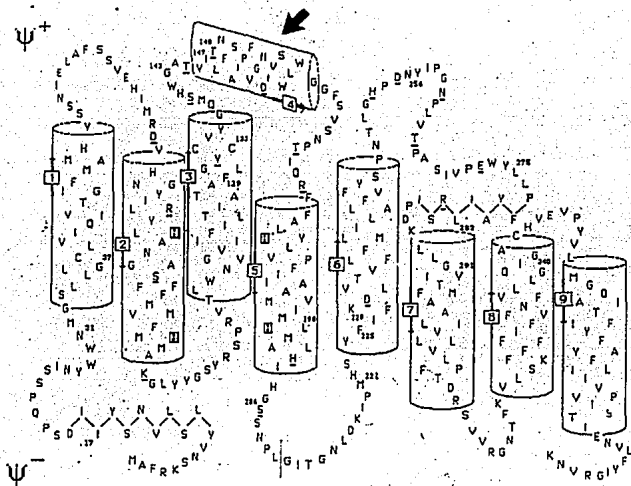


Figura 8. Modelo para la predicción de la estructura secundaria del citocromo b de *Saccharomyces cerevisiae*⁸ (la hélice IV es señalada por una flecha)

Para el caso del citocromo b_6 de cloroplastos y cianobacterias, se ha propuesto que presenta 5 cruces transmembranales⁴⁰.

Tanto el citocromo b como el citocromo b_6 , presentan 2 grupos hémicos estabilizados por 4 residuos de histidina, que se encuentran altamente conservados en todos los citocromos. Estos residuos están ubicados en las hélices II y IV formando una estructura transmembranal similar a un barril ó una especie de cilindro constituido por las hélices II, III, IV y V⁴¹ (ver figura 9).

1.1X La Proteína fierro-azufre:

La proteína fierro-azufre o subunidad V del complejo bc, está constituida por aproximadamente 196 aminoácidos y presenta un peso molecular de 21,536 Da para la apoproteína y de 21,708 Da para la holoproteína (en presencia del centro Fe_2-S_2)⁴².

Esta subunidad, junto con las subunidades estructurales I y II (core I y II) es de las más hidrofílicas del complejo, como lo demuestra el hecho de que es fácilmente purificada en forma reversible del complejo, es decir, se puede separar y volver a recostituir⁴³. Esta proteína es importante dentro del complejo bc, porque junto con el citocromo b (subunidad III) y el citocromo c_1 (subunidad IV), constituyen la vía a través de la cual se lleva a cabo el transporte de electrones desde el ubiquinol

-
- ³⁹ Yun, Ch., Van Doren, S.R., Crofts, A.R. y Gennis, R.B. 1991. J. Biol. Chem. 266:10967-73.
⁴⁰ Widger, W.R., Crammer, W.A., Hermann, R.G. y Trebst, A. 1984. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:674-78.
⁴¹ Link, T.A., Schägger, H. y von Jagow, G. 1986. FEBS Lett. 204:9-15.
⁴² Schägger, H., Borchart, U., Machleidt, W., Link, T.A. y von Jagow, G. 1987. FEBS Lett. 219(1):161-68.
⁴³ Trumppower, B.L. y Edwards, C.A. 1979. J. Biol. Chem. 254(17):8697-8702.
 Engel, W.D., Michalski, Ch. y von Jagow, G. 1983. Eur. J. Biochem. 132:395-402.
 Shimomura, Y., Nishikimi, M. y Ozawa, T. 1984. J. Biol. Chem. 259:14059-63.

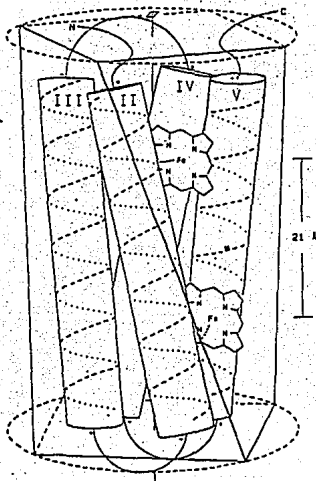


Figura 9. Modelo de barril para el citocromo b formado por las hélices II-V⁹

hasta el citocromo c soluble (ver figura 10). La proteína hierro-azufre también es necesaria para que se ensamblen correctamente tanto el citocromo b como las subunidades de bajo peso molecular, como lo demuestran los estudios realizados con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*⁴⁴. En este trabajo los autores encontraron que al construir una cepa que no expresaba el gen que codifica para la proteína hierro-azufre, el complejo bc₁ carente de esta subunidad no presentaba actividad de oxido-reductasa aún cuando se utilizaran análogos de ubiquinona como sustrato, también se observó que el citocromo b y las subunidades de bajo peso molecular disminuían su concentración hasta en un 50% con respecto a las mismas subunidades en cepas de levaduras normales ó silvestres.

También se han llevado a cabo estudios de mutagénesis dirigida en el gen que codifica a la proteína hierro-azufre en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*⁴⁵, encontrándose que cuando las mutaciones son cercanas al sitio donde se encuentra el centro Fe₂-S₂ (157S, 175S y 203S donde S = serina) disminuye la actividad de oxido-reducción del complejo bc₁, lo cual es congruente con el hecho de que existe un alto grado de conservación en los residuos de aminoácidos cercanos a esta región.

Los autores también observaron que al carecer el complejo de la proteína hierro-azufre (por no expresarse el gen que codifica para ésta) hay una disminución en la concentración de los citocromos b y c₁, lo que implica que la proteína hierro-azufre

⁴⁴ Japa, S. y Beattie, D.S. 1989. Arch. Biochem. Biophys. 268(2):716-20.
⁴⁵ Ljungdhal, P.O., Beckmann, J.D. y Trumpower, B.L. 1989. J. Biol. Chem. 264(7):3723-31.
Graham, L.A. y Trumpower, B.L. 1991. J. Biol. Chem. 266(33):22485-92.

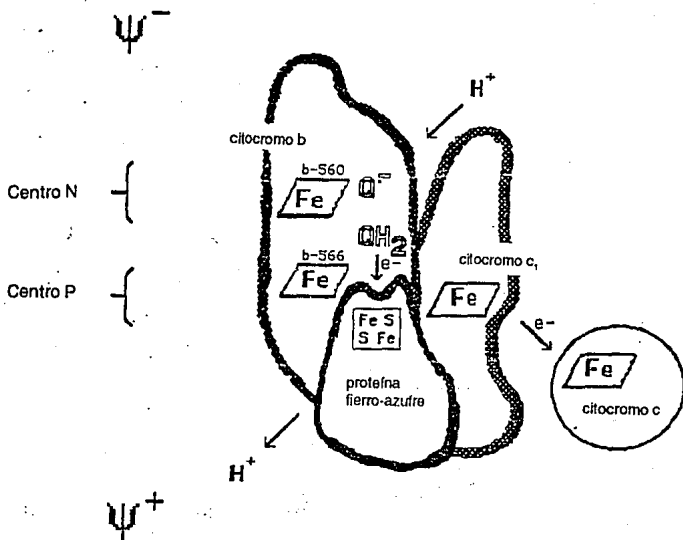


Figura 10. Esquema de las subunidades del complejo bc₁, mitocondrial que presentan grupos prostéticos oxido-reductores¹⁰

es necesaria para el ensamblaje y estabilidad de estas subunidades. También se observó que al realizar mutaciones en los residuos de aminoácidos que comprenden a las cisteínas 159, 164, 178 y 180 (pasando a ser serinas) y los residuos de histidina 161 y 181 (que pasan a ser argininas), no había actividad de óxido-reductasa por parte del complejo porque la proteína hierro-azufre carecía del grupo prostético Fe_2-S_2 . Estos 4 residuos de cisteína y los 2 de histidina están altamente conservados y son los sitios de unión del centro Fe_2-S_2 . Es interesante hacer notar que aún cuando se cambiaron los 6 residuos antes mencionados, este cambio no afectó el procesamiento postraduccional de la proteína hierro-azufre ni su inserción en el complejo bc₁, lo que sugiere dos cosas, la primera es que las proteasas encargadas de llevar a cabo el procesamiento de la forma inmadura a la forma madura así como la inserción en el complejo bc₁ de la proteína hierro-azufre, no distinguen si está presente ó no el grupo prostético de la proteína. La otra opción es que la inserción del grupo prostético se lleva a cabo después de que la proteína ha sido correctamente insertada en el complejo.

Para determinar la ubicación de la proteína hierro-azufre en el complejo bc₁, se han llevado a cabo estudios topológicos en los cuales se han utilizado análogos de lípidos fotoactivables, estudios de digestión con proteasas y experimentos de entrecruzamiento⁴⁶, que apoyan la hipótesis de que la proteína hierro-azufre se

⁴⁶ Gutweniger, H., Bisson, R. y Montecucco, C. 1981. *J. Biol. Chem.* 256(21):11132-36.
González-Halphen, D., Lindorfer, M.A. y Capaldi, R. 1988. *Biochem.* 27:7021-31.
Li, Y., De Vries, S., Leonard, K. y Weiss, H. 1981. *FEBS Lett.* 135(2):277-80.
González-Halphen, D., Vázquez-Acevedo, M. y García-Ponce, B. 1991. *J. Biol. Chem.* 266(6):3870-76.
Henrika, W. y Berden, J.A. 1990. *Eur. J. Biochem.* 192:761-65.

encuentra localizada en la superficie externa de la membrana interna mitocondrial interactuando posiblemente con el citocromo b como se ilustra en la figura 11.

I.X Reactivos Fotoactivables:

El uso de reactivos de entrecruzamiento ha sido de gran utilidad para elucidar las interacciones de moléculas biológicas; sin embargo, su aparición en el ámbito científico no es tan reciente⁴⁷. Los primeros estudios de entrecruzamiento para proteínas membranales, se llevaron a cabo en membranas de eritrocitos⁴⁸, aunque estos estudios no aportaron resultados muy claros acerca de la topología de las proteínas membranales. No fue sino hasta que se empezó a utilizar la electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio, cuando se empezaron a analizar mejor los productos de entrecruzamiento⁴⁹.

Posteriormente se realizó una serie de estudios topológicos, entre los que tenemos el uso de reactivos como el diazobencensulfonato, que reacciona preferentemente con componentes de la superficie membranar⁵⁰. Se encontró una alta asimetría en los constituyentes de la membrana interna mitocondrial, dado que los estudios se realizaron tanto en mitocondrias completas como en partículas mitocondriales invertidas. También se han llevado a cabo experimentos en los cuales

-
- ⁴⁷ Zahn, H. 1955. *Angew. Chem.* 67:561-72.
Zahn, H. 1955. *Makromol. Chem.* 18:201-16.
Zahn, H. y Melenhofer, J. 1958. *Makromol. Chem.* 72:126-52.
Wold, F. 1961. *J. Biol. Chem.* 236:106-11.
Wold, F. 1961. *Biochim. Biophys. Acta.* 54:604-06.
- ⁴⁸ Berg, H.C., Diamond, J.M. y Marfey, P.S. 1965. *Science.* 150:164-67.
- ⁴⁹ Dutton, A., Adams, M. y Singer, S.J. 1966. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 23:730-39.
- ⁴⁹ Davies, G.E. y Stark, G.R. 1970. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 66:651-66.
Stak, T.L. 1972. *J. Mol. Biol.* 66:295-305.
- ⁵⁰ Tinberg, H.M., Melnick, R.L., Maguire, J. y Packer, L. 1974. *Biochim. Biophys. Acta.* 345:118-28.

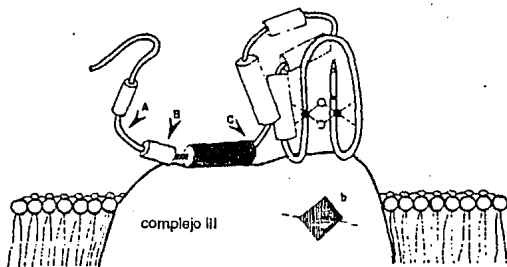


Figura 11. Representación esquemática del posible arreglo de la proteína hierro-azufre en el complejo bc, mitocondrial¹¹
la zona oscura corresponde al polipéptido del residuo de lisina 33 al de lisina 52

¹¹

González-Halphon, D., Vazquez-Acevedo, M. y García-Ponce, B. 1991. J. Biol. Chem. 266(6):3870-76

se han utilizado carbodiimidias como el 1-etil-3-[3-(dimetilamino)propil]carbodiimida, que inhibe la reacción entre la citocromo oxidasa y el citocromo c soluble. De esta manera se ha determinado que el citocromo c soluble reacciona con la subunidad II de la citocromo oxidasa⁵¹, y que el citocromo c soluble interactúa con el citocromo b₅ de hígado de bovino⁵².

Otra clase de reactivos sumamente útiles para analizar interacciones de moléculas diferentes, son los llamados reactivos de entrecruzamiento fotoactivables, los cuales una vez que son irradiados con la longitud de onda adecuada, forman un nitreno, el cual es un grupo altamente reactivo y que funciona como un grupo de marcaje covalente. En la siguiente página se enlistan los principales grupos funcionales con los cuales reaccionan preferentemente los grupos nitreno activos⁵³.

⁵¹Millet, F., Darley-Umar, V. y Capaldi, R. 1982. *Biochem.* 21:3857-62.⁵²Mauk, M.R. y Mauk, A.G. 1989. *Eur. J. Biochem.* 186:473-86.⁵³Bayley, H. y Staros, J.V. en *Azides and Nitrenes Reactivity and Utility*. 1984. Academic Press Inc. Cap. 9. 434-90.

Grupo funcional	Residuo de Aminoácido en el que se encuentra el grupo funcional:
C-C	Todos
C=C	Ninguno
C-H	Todos
Ariilo	Phe, Tyr, Trp e His
N-H	Lys, His y N-terminal
Guanidinio	Arg
O-H	Ser, Thr y Tyr
S-H	Cys
S-S	Cys-Cys
S-CH ₃	Met
COOH	Asp, Glu y COOH-terminal
CONHR	Asn, Gln y enlace peptídico
COOR	metil aspartato y metil glutamato
PO ₂ H	fosfoserina, fosfotreonina y fosfotirosina

Con este tipo de reactivos se han llevado a cabo estudios para identificar componentes proteicos de membranas de eritrocitos⁵⁴, obteniéndose resultados que confirman y además complementan los previamente publicados⁵⁵.

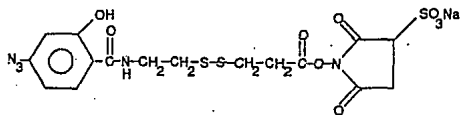
Para este tipo de estudios también se ha utilizado un reactivo relativamente reciente, comercializado por la compañía Pierce que se denomina sulfosuccinimidil 2-(p-azidosalicilamido)etil-1,3'-ditiopropionato, cuya estructura se muestra en la figura 12.

⁵⁴ Staros, J.V. y Richards, F.M. 1974. *Biochem.* 13(13):2720-26.

⁵⁵ Fairbanks, G., Steck, T.L. y Wallach, D.F.H. 1971. *Biochem.* 10:2606-

Grupo Fotoactivable

ester NHS



SASD

Figura 12. Esquema del reactivo de entrecruzamiento
2-(p-azidosalicilamido)etil-1,3' ditiopropanato (SASD)¹²

Este reactivo presenta las siguientes características:

- * peso molecular = 541.51
- * tamaño de 18.9 Å
- * es soluble en agua
- * presenta un enlace disulfuro en su parte media
- * es heterobifuncional y
- * se puede marcar radiactivamente con Yodo¹²⁵

Con este reactivo se han llevado a cabo estudios para determinar la interacción de las lectinas con su receptor celular en membranas de eritrocitos⁵⁶ así como la interacción de las fitohemaglutininas y su receptor celular en membranas de linfocitos⁵⁷.

Este reactivo también ha sido utilizado para estudiar la interacción de lipopolisacáridos de *Escherichia coli* con albúmina de humano y de bovino⁵⁸, así como para identificar el receptor celular de la interleucina-3 acoplada a este reactivo⁵⁹.

También se ha utilizado para identificar el receptor celular en neutrófilos del péptido N-formil-Met-Leu-Phe-Lys⁶⁰.

Más recientemente se han llevado a cabo estudios topológicos para determinar la relación que existe entre los componentes del complejo del citocromo b₆f en

⁵⁶ Ji, T.H. y Ji, I. 1982. Anal. Biochem. 121:286-89.

⁵⁷ Shephard, E.G., de Beer, F.C., von Holt, C. y Haggood, J.P. 1988. Anal. Biochem. 168:306-13.

⁵⁸ Wollenweber, H-W. y Morrison, D.C. 1985. J. Biol. Chem. 260(28):15068-74.

⁵⁹ Sorensen, P., Farber, N.M. y Krystal, G. 1986. J. Biol. Chem. 261(20):9094-97.

⁶⁰ Allen R.A., Tolley, J.O. y Jesilits, A.J. 1986. Biochim. Biophys. Acta. 882:271-80.

membranas de tilacoides de células de espinaca⁶¹. Nosotros escogimos utilizar este reactivo para estudiar la interacción que existe entre la subunidad V o proteína hierro-azufre del complejo bc₁ mitocondrial con el resto de las demás subunidades de este complejo (ver más adelante).

I.XI Antecedentes:

Como se mencionó anteriormente, la proteína hierro-azufre ha sido objeto de diversos estudios encaminados a determinar su posición e interacción con las demás subunidades dentro del complejo bc₁ mitocondrial. En estos estudios, se han realizado digestiones proteolíticas, estudios de marcaje que involucran reactivos de entrecruzamiento como las carbodiimidas⁶² y derivados de lípidos fotoactivables a diferentes niveles dentro de la membrana interna mitocondrial (ver figura 13). Los resultados apoyan el modelo propuesto por González-Halphen y colaboradores (1991), en el cual la proteína hierro-azufre está localizada en la superficie externa de la membrana interna mitocondrial (ver figura 11) y al parecer estaría en contacto o interactuando con la subunidad III o citocromo b del complejo bc₁. En dicho trabajo⁶² los autores encontraron que al realizar digestiones proteolíticas limitadas con tripsina de una preparación del complejo bc₁ intacto o de la proteína hierro-azufre purificada a

⁶¹ Shallan, M.A.-A.M., Radau, B., Salnikow, J. y Vater, J. 1991. *Biochim. Biophys. Acta.* 1057:64-68.
⁶² Li, Y., De Vries, S., Leonard, K. y Weiss, H. 1981. *FEBS Lett.* 135(2):277-80.
Gutweniger, H., Bisson, R. y Montecucco, C. 1981. *J. Biol. Chem.* 256(21):11132-36.
González-Halphen, D., Lindorfer, M.A. y Capaldi, R. 1988. *Biochem.* 27:7021-31.
Hemrika, W. y Berden, J.A. 1990. *Eur. J. Biochem.* 192:761-65.
González-Halphen, D., Vázquez-Acevedo, M. y García-Ponca, B. 1991. *J. Biol. Chem.* 266(6):3870-76.

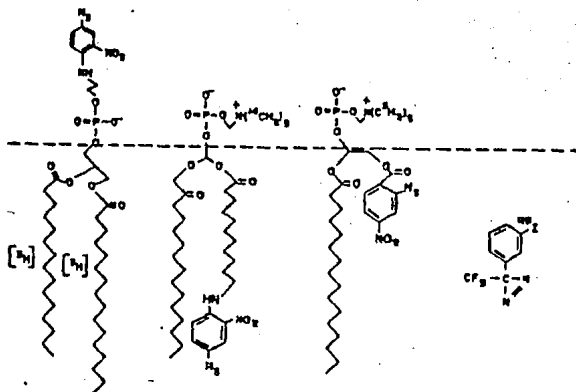


Figura 13. Sondas hidrofóbicas utilizadas para marcar al complejo bc₁ mitocondrial
de izquierda a derecha: arilazidofosfatidiletanolamina, arilazidofosfatidilcolina y TID-¹²⁵I¹³

partir de este complejo, esta subunidad daba lugar a tres fragmentos diferentes denominados V^o, Vⁱ y Vⁱⁱ de acuerdo a los tiempos de digestión (ver figura 11).

Al llevar a cabo experimentos de reconstitución con la proteína fierro-azufre intacta, el fragmento Vⁱ (que es la proteína fierro-azufre sin la porción de 20 residuos de aminoácidos que comprende a los resíduos desde la Lys³³ hasta la Lys⁵²) y un complejo bc_i carente de esta subunidad, se observó que la proteína fierro-azufre intacta recuperaba la actividad de óxido-reducción del complejo, en tanto que en el mismo tipo de experimentos, pero con el fragmento Vⁱⁱ, se notó que no se recuperaba la actividad de óxido-reducción del complejo; además, al agregar el fragmento de 20 residuos de aminoácidos que comprende desde la Lys³³ a la Lys⁵², este fragmento inhibía la unión de una proteína fierro-azufre intacta con un complejo bc_i carente de esta subunidad. Con base en estos resultados, se propuso que la proteína fierro-azufre interactúa con el complejo bc_i por medio de interacciones hidrofóbicas a través de la región que comprende los 20 residuos de aminoácidos (desde el resíduo de Lys³³ a la Lys⁵²) posiblemente con la hélice- α denominada IV del citocromo b que se encuentra orientada hacia la superficie externa de la membrana interna mitocondrial y que como se había comentado anteriormente (ver punto I.VIII) presenta la característica de ser anfíplica. De lo anterior se concluyó que la proteína fierro-azufre no es una proteína de membrana con un cruce transmembranal clásico (ver figura 11).

I.XII Objetivo:

El objetivo del presente trabajo, basado en los resultados experimentales antes mencionados, comprende ***la identificación del sitio de unión de la proteína fierro-azufre al resto del complejo bc₁.***

Por los antecedentes anteriormente expuestos, nuestra hipótesis de trabajo es ***que la proteína fierro-azufre se une directamente al citocromo b y posiblemente interactúa también con las subunidades IV (citocromo c₁) y IX.***

Nuestro enfoque experimental se basa en el hecho de que la proteína fierro-azufre puede disociarse del complejo y volverse a reasociar. Al modificar con el reactivo bifuncional a la proteína purificada, se pretendía encontrar los sitios específicos con los cuales interactúa al reconstituirse de nuevo al complejo y al realizar la fotoactivación; de esta manera se evita la utilización de agentes entrecruzadores que modifican a todas las subunidades presentes en el complejo. El enfoque experimental emula la modificación de un ligando, el cual es puesto en contacto con su receptor, formándose un producto de entrecruzamiento covalente al irradiar con luz ultravioleta.

II METODOLOGIA

II.1 Obtención de las Mitocondrias:

Las mitocondrias utilizadas en este trabajo se obtuvieron de acuerdo con el método reportado por Löw y Vallin¹, el cual en términos generales consiste en lo siguiente:

Primero, se limpian y cortan los corazones de bovino dejando solamente el músculo, seguido de lo cual, se pesan fracciones de aproximadamente 400 gr de carne, se muelen y se resuspenden en un amortiguador que contiene sacarosa 250 mM, Tris 5 mM y EDTA-K 2 mM (pH 7.4). Se ajusta el pH a 8.0 con Tris saturado y se licua la mezcla durante 5 segundos con intervalos de 5 segundos (45 segundos en total). Una vez hecho esto, se vuelve a ajustar el pH a 8.0 y se procede a purificar las mitocondrias por medio de centrifugaciones graduales de baja (1,288 x g durante 10 min) y alta (13,290 x g durante 10 min) velocidad, en presencia de un segundo amortiguador que contiene sacarosa 250 mM y Tris 5 mM (pH 7.4). Una vez obtenidas las mitocondrias se guardan en el Revco a -70°C hasta su uso.

II.1.1 Purificación del Complejo bc₁ Mitocondrial:

El complejo bc₁, se purificó de acuerdo con 3 métodos distintos:

* Rleske, J.S.²

* Lungdahl, P.O. y colaboradores³ y

¹ Löw, H. y Vallin, I. 1963. *Biochem. Biophys. Acta.* 69:361-74.

² Rleske, J.S. 1967. *Methods Enzymol.* 10:229-39.

³ Lungdahl, P.O., Pennoyer, J.D., Robertson, D.E. y Trumpower, B.L. 1987. *Biochim. Biophys. Acta.* 891:227-41.

* El método desarrollado en el presente trabajo

Cada método consiste en general en lo siguiente:

* Rleske, J.S.

En este método, el complejo bc, se obtiene mediante 3 pasos secuenciales:

1) *Preparación de la fracción S1:*

Primeramente se determinan tanto el volumen como la concentración de proteína total de las mitocondrias por medio del método del biuret, después de lo cual se realizan precipitaciones, en presencia del detergente iónico desoxicolato de sodio y de cloruro de potasio, y centrifugaciones intermedias de alta velocidad (150,000 x g durante 16 min), seguido de lo cual se obtiene una pastilla que se denomina S1 y que se guarda en el Revco a -70°C hasta que se vuelve a utilizar.

2) *Preparación del complejo bc, crudo:*

Este paso se inicia a partir de la fracción S1 e inicialmente hay que determinar el volumen y la concentración de proteína de la fracción S1 por medio del método del biuret, después se hace una serie de precipitaciones graduales en presencia del detergente iónico desoxicolato de sodio y de acetato de amonio, así como una serie de centrifugaciones intermedias de alta velocidad (150,000 x g durante 16 min), hasta que se obtiene una fracción que se denomina complejo bc, crudo, que recibe este nombre porque está contaminado con la succinato deshidrogenasa o complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial. El complejo bc, crudo obtenido, se guarda en el Revco a -70°C hasta que se va a utilizar.

3) *Preparación del complejo bc, puro:*

En este paso final se utiliza la fracción del complejo bc, crudo obtenida en el paso anterior, se determinan nuevamente el volumen y la concentración de proteína del complejo bc, crudo y se vuelven a llevar a cabo una serie de precipitaciones graduales en presencia del detergente iónico colato de potasio y de sulfato de amonio, así como una serie de centrifugaciones intermedias de alta velocidad (150,000 x g durante 10 min). De esta manera se obtiene un complejo bc, puro que se guarda en el Revco a -70°C hasta que se va a utilizar.

**Lungdahl, P.O.*

Este método para la purificación del complejo bc, a diferencia del anterior, no requiere de tantos pasos. Inicialmente, se determina el volumen y contenido de proteína total en mitocondrias por medio del método del biuret, estas se resuspenden a una concentración de 30 mg/ml, se les ajusta el pH a 8.0 y se hace una primera centrifugación a alta velocidad (100,000 x g durante 90 min), después de lo cual se determina nuevamente el volumen y el contenido de proteína del botón por medio del método del biuret, seguidamente se agrega el detergente no iónico lauril maltósido a una concentración de 1 mg/mg de proteína estando ésta a una concentración final de 10 mg/ml. Se hace una segunda centrifugación de alta velocidad (100,000 x g durante 90 min), y al sobrenadante se le agrega NaCl 100 mM, se incuba durante 1 hora con agitación y se aplica la muestra a una columna de DEAE Biogel-A previamente equilibrada con Tris-HCl 50 mM, sulfato de magnesio 1 mM y lauril maltósido

0.1mg/ml en presencia de cloruro de sodio 100 mM (pH 8.0). Una vez lavada la columna con el mismo amortiguador, se eluye la muestra con un gradiente de 100 a 300 mM de cloruro de sodio y se analiza espectrofotométricamente a 415 nm; la fracción que corresponde al bc, se carga en una segunda columna de DEAE-Sefarosa CL-4B, previamente equilibrada con el mismo amortiguador; se lava la columna y se eluye un complejo bc, puro, que se guarda en el Revco a -70°C.

** Método desarrollado en el presente trabajo*

Este método es una modificación al reportado por Rieske, en el cual se siguen los 2 primeros pasos, la obtención de la fracción S1 y la del complejo bc, crudo, así como la utilización del detergente no iónico lauril maltósido y la columna de DEAE Biogel-A. Se empieza con la fracción cruda del complejo bc, la cual se resuspende a 10 mg/ml con Tris-HCl 50 mM, y sulfato de magnesio 1 mM (pH 8.0); seguido de esto se incuba 1 hora con agitación a 4°C en presencia del detergente no iónico lauril maltósido en una proporción de 0.3 mg/mg de proteína. Se diluye 1:2 con el amortiguador de la columna que contiene Tris-HCl 50 mM, sulfato de magnesio 1 mM y lauril maltósido 0.1 mg/ml (pH 8.0) y se dializa contra 10 volúmenes del mismo amortiguador en ausencia de lauril maltósido durante 2 horas con un cambio de amortiguador a la hora, después de esto, se centrifuga a 60,000 x g durante 10 min y el sobrenadante se carga en una columna de DEAE Biogel-A previamente equilibrada con el amortiguador antes mencionado. Después se eluye la columna con un gradiente de 0 a 150 mM de NaCl para obtener la succinato deshidrogenasa; se lava con un volumen de 150 mM de NaCl y después se eluye con otro gradiente

de 150 a 400 mM de NaCl, con el cual se obtiene una preparación de complejo bc_1 puro carente de contaminantes por parte de la succinato deshidrogenasa ó complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial, la cual se concentra y se guarda en el Revco a -70°C .

II,III Ensayos Espectrofotométricos del Complejo bc_1 :

Las muestras obtenidas se analizaron en un espectrofotómetro Shimadzu UV (160U) de la siguiente manera:

En una celda de cuarzo de 1 ml se colocaron 900 ó 950 μl de amortiguador de fosfatos de potasio 25 mM, EDTA de potasio 0.025 mM y Tween 20 0.1% (pH 7.2) así como 50 ó 100 μl , tanto del complejo bc_1 total ó del complejo bc_1 carente de la proteína fierro-azufre. A continuación, se agregó ferricianuro de potasio 1 M (0.5 mM concentración final), para hacer la línea base, haciéndose un barrido espectrofotométrico de 450 a 600 nm, seguido de lo cual se agregó ascorbato 1 M pH 7.0 (5 mM concentración final) y se hizo el primer espectro (reducción del citocromo c_1). Con la muestra anterior se hizo una segunda línea base en el mismo rango anterior y posteriormente se agregó ditionita en polvo y se hizo el segundo espectro (reducción del citocromo b). La concentración molar de ambos citocromos se determinó utilizando los coeficientes de extinción molar reportados por Degli Esposti y colaboradores⁴ de 17.5 y $25 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ respectivamente.

⁴ Degli Esposti, M., Al Tzai., G. Palmer y G. Lenaz. 1986. Eur. J. Biochem. 160:547-55.

II.IV Ensayos de Reconstitución:

Se llevaron a cabo experimentos de medición del transporte de electrones para el complejo bc, carente de la proteína hierro-azufre, complejo bc, reconstituido con esta subunidad, así como para el complejo bc, intacto. Estos experimentos se hicieron en un espectrofotómetro de doble rayo SLM-Aminco DW 2a UV/Vis, en el modo dual (50-540 nm) de la siguiente manera:

Se incubaron durante 30 min a 30°C 200 pmolas del complejo bc, carente de la proteína hierro-azufre, con cantidades crecientes de esta subunidad, de 200 a 800 pmolas de proteína, en presencia de 275 µg de lípidos (asolectina/cardiopina), más amortiguador de fosfatos de potasio 25 mM y EDTA de potasio 0.025 mM (pH 7.2) en un volumen final de 150 µl. Pasado este tiempo, tanto el complejo bc, carente de la proteína hierro-azufre, como el complejo bc, total, se colocaron por separado en celdas de cuarzo de 2 ml y se agregó Tween 20 al 0.2%, 50 µg de lípidos, citocromo c soluble 30 µM y ubiquinona (DBH) 15 µM para disparar la reacción, y se aforó a 2 ml con amortiguador de fosfatos de potasio 25 mM, conteniendo EDTA de potasio 0.025 mM (pH 7.2).

II.V Purificación de la Proteína fierro-azufre:

La proteína fierro-azufre ó subunidad V del complejo bc, mitocondrial ha sido purificada por 3 métodos distintos:

- * Trumpower y Edwards⁵
- * Engel y colaboradores⁶ y
- * Shimomura y colaboradores⁷

El inconveniente de los dos primeros métodos, es que se utilizan agentes caotrópicos como el clorhidrato de guanidina (2 M) y Urea (2 M) respectivamente, por lo que al llevar a cabo los experimentos de reconstitución del complejo bc, carente de la proteína fierro-azufre con la proteína que purificaron, los autores observaron que las actividades de los complejos reconstituídos no eran muy altas, comparadas con las actividades de los complejos nativos, posiblemente debido a un efecto desnaturalizante por parte de los agentes caotrópicos que se utilizaron en estos trabajos. El tercer método que fué el que utilizamos nosotros en una parte de este trabajo, es más apropiado para purificar la proteína fierro-azufre porque a diferencia de los 2 anteriores, no utiliza agentes caotrópicos para su purificación, sino que se basa en el uso de una columna hidrofóbica de fenil Sefarosa CL-4B que se equilibra con un amortiguador que contiene Tris- HCl 25 mM, desoxicolato de sodio 0.25%, EDTA-Na 1 mM, ditiotreitól 1 mM y glicerol al 20% (pH 8.0), en la cual se carga el complejo bc, purificado por el método de Rieske; se lava la columna y se eluye la proteína

⁵ Trumpower, B.L. y Edwards, C.A. 1979. J. Biol. Chem. 254(17):8697-8706.

⁶ Engel, W.D., Michalski, C. y von Jagow, G. 1983. Eur. J. Biochem.132:395-402.

⁷ Shimomura, Y., Nishikimi, M. y Ozawa, T. 1984. J. Biol. Chem. 259(25):14059-63.

hierro-azufre con Tris-HCl 25 mM, desoxicolato de sodio 1%, ditiotreitól 1 mM y glicerol 20% (pH 8.0), seguido de lo cual se eluye el complejo bc, carente de esta subunidad con Tris-HCl 25 mM, Tween 20 3%, ditiotreitól 1 mM y glicerol 20% (pH7.5). Finalmente se lava la columna con Tris-HCl 25 mM y dodecil sulfato de sodio 2% (pH7.5), para terminar de eluir la proteína que aún pueda quedar unida a la columna. El inconveniente que tiene esta técnica es que la proteína hierro-azufre obtenida no está totalmente pura, ya que presenta contaminación por parte de las subunidades estructurales de alto peso molecular I y II del complejo bc, por lo que los autores utilizan una segunda columna de filtración de Sefacril S-200 para eliminar los contaminantes, obteniéndose una fracción enriquecida en la proteína hierro-azufre, pero con muy bajos rendimientos.

En el laboratorio modificamos esta última metodología para la purificación de la proteína hierro-azufre, a partir de una preparación del complejo bc, obtenida por el método desarrollado en el laboratorio (ver Metodología) y que es un prerequisite indispensable para la ulterior purificación de la proteína hierro-azufre.

Nuestra modificación nos permite utilizar únicamente la columna hidrofóbica de fenil Sefarosa CL-4B para obtener una preparación pura de esta proteína en un solo paso, y consiste en lo siguiente:

- 1) Se disminuyó la concentración del detergente desoxicolato de sodio 10 veces, de 0.25% que utilizan Shimomura y colaboradores a 0.025% y**

2) Se disminuyó también la concentración del mismo detergente, pero ahora en el amortiguador para eluir la proteína fierro-azufre, de 1% que reportan Shimomura y colaboradores a 0.1%, haciéndose un lavado extra con este amortiguador.

Por lo demás, se siguen los mismos pasos para la purificación de la proteína fierro-azufre y del complejo bc, carente de esta subunidad.

II.VI Determinación de proteínas:

Las proteínas obtenidas y usadas en este trabajo, fueron cuantificadas por los métodos del biuret⁸ y de Lowry modificado por Markwell y colaboradores⁹ (ver apéndice I).

II.VII Determinación de Hierro no Hémico:

Se hicieron determinaciones de hierro no hémico para la proteína fierro-azufre por dos métodos distintos. En el primero de ellos se siguió el método descrito por Brumby y Massey¹⁰ que en general consiste en lo siguiente:

Primeramente se hace una curva patrón de ferredoxina en un intervalo de 0 a 30 nmolas de hierro; a continuación tanto las muestras de la curva patrón como las problemas se aforan a 100 μ l con agua bidestilada y se agregan 100 μ l de una solución de ditionita de sodio 0.2%, mantenida con burbujeo de nitrógeno todo el tiempo.

⁸ Gornall, A.G., Bardawill, C.J. y David, M.M. 1949. J. Biol. Chem. 177:751-66.

⁹ Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Lewis, F.L. y Randall, R.J. 1951. J. Biol. Chem. 193:265-75.
Markwell, M.A.K., Hass, S.M., Bieber, L.L. y Tolbert, N.E. 1978. Anal. Biochem. 87:206-10.

¹⁰ Brumby, P. E. y Massey, V. 1967. Methods Enzymol. 10:463-74.

Seguido de esto, se añaden 700 μl de etanol al 95%, después de lo cual, se agregan 50 μl de una solución de batofenantrolina al 0.2% disuelta en etanol al 95% y finalmente se adicionan 50 μl de acetato de sodio 1 M. Se agitan las muestras y se incuban durante 5 min a 38°C, para permitir el desarrollo del color; se centrifugan durante 5 min y se leen las muestras en un espectrofotómetro a 535 nm.

El segundo método se llevo a cabo en el laboratorio de *Contaminación de Suelos del Departamento de Edafología del Instituto de Geología de la U.N.A.M. con la gran ayuda de la Maestra en Ciencias Lourdes Flores Delgadillo*, en un espectrofotómetro de Absorción Atómica Perkin-Elmer 372.

Para esto, primeramente se calibra el espectrofotómetro con 2 soluciones de hierro con una concentración de 2.5 y 5.0 partes por millón (ppm) respectivamente; a continuación se lee una curva patrón de hierro con una concentración entre 0 a 5 ppm y a continuación se leen las muestras problema. Tanto las soluciones para calibrar el espectrofotómetro, como la curva patrón de hierro y las muestras problemas pasan a través de una flama de aire-acetileno (2,700°C), seguido de lo cual se determinan los valores de absorbencia de hierro atómico, sin importar si está reducido u oxidado, a una longitud de 248 nm, utilizando una lámpara de Cu-Ni-He. Finalmente la concentración de hierro en las muestras problema se determina interpolando su absorbencia en la curva patrón.

II.VIII Reacción de Entrecruzamiento:

Para realizar los experimentos de entrecruzamiento, utilizamos sulfosuccinimidil 2-(p-azidosalicilamido)etil-1,3'-ditiopropionato (ver figura 8), que de aquí en adelante designaré como SASD. El protocolo que se siguió para llevar a cabo estos experimentos es el descrito en el folleto de Pierce que acompaña al reactivo, y que en general consiste en lo siguiente:

II.VIII.I Preparación de la solución madre de SASD:

Se disuelven 3 mg de SASD en 50 μ l de dimetilsulfóxido; esta solución se puede guardar en el Revco a -70°C hasta su uso (hasta por 3 meses). Todo se lleva a cabo en la oscuridad.

II.VIII.II Preparación de la solución de trabajo:

Se hace una dilución 1:20 de la solución madre de SASD, con amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M (pH=7.4).

Se toman 10 μ l de la solución anterior y se les agrega 90 μ l de amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M (pH=7.4), y se agita. Esto se hace para que al final el reactivo quede a 55 nmolas en 100 μ l del amortiguador anterior. Todo se lleva a cabo en la oscuridad.

II.VIII.III Marcar el reactivo SASD con yodo 125:

Para marcar el reactivo SASD con yodo 125 (^{125}I), primeramente hay que preparar el IODO-GEN (Pierce). Para esto, hay que disolver 2 mg de este reactivo en 200 μl de cloroformo, seguido de esto se pipetea 100 μl de esta solución en un tubo de vidrio, se evapora el cloroformo con nitrógeno, se tapa el vial y se guarda en el congelador (en un desecador).

Una vez hecho lo anterior, se procede a marcar el reactivo SASD de la siguiente manera: Se agrega la solución de trabajo (punto II.VIII.II) al tubo en el que se encuentra el Iodo-Gen y se agregan 40 μCi de yoduro de sodio 125 ($\text{Na-}^{125}\text{I}$) y 18.5 nmolas de yoduro de potasio en 10 μl de amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M (pH 7.4). Se deja que se lleve a cabo la reacción durante 30 segundos y se detiene ésta, removiendo la solución del tubo. De esta manera reactivo SASD queda marcado con ^{125}I . Todo se lleva a cabo en la oscuridad.

II.VIII.IV Experimento de entrecruzamiento con el reactivo SASD:

Se utilizan 16 nmolas de la proteína problema (que para estos experimentos fueron tanto el citocromo c soluble de corazón de caballo como la proteína fierro-azufre purificada por nosotros en este trabajo), en amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M (pH 8.4) en presencia de 0.5% de Tween 20, para evitar que precipite la proteína fierro-azufre. A estas 16 nmolas, se les agrega la solución de trabajo (100 μl) en 300 μl

de amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M (pH 8.4); se deja incubar por 30 min a temperatura ambiente con agitación suave. El exceso de reactivo se elimina filtrando el complejo ASD-proteína a través de una columna de Excelulosa GF-5 previamente equilibrada con 10 volúmenes de columna con un amortiguador de fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0.15 M y Tween 20 al 0.5% (pH 7.4), y eluida con el mismo amortiguador. Todo lo anterior se lleva a cabo en la oscuridad.

Seguido de esto, se determina el pico de elución que corresponde al complejo ASD-proteína, por medio de un micro-Lowry que se hace en una placa para la técnica de ELISA en la que se colocan las siguientes cantidades:

- * 80 μ l de agua bidestilada (blanco)
- * 40 μ l de agua
- * 40 μ l del complejo ASD-proteína
- * 200 μ l de la solución C de Lowry (ver apéndice I) dejándose incubar por 10 min a temperatura ambiente con agitación suave
- * 20 μ l de la solución D de Lowry dejando incubar por 30 min a temperatura ambiente con agitación suave. Pasado este tiempo, se lee la placa en un lector de ELISAS (Bio Rad 2550) con un filtro de 600 nm.

Una vez determinado el pico de elución del complejo ASD-proteína, se realiza el entrecruzamiento del complejo, en este caso ASD-proteína hierro-azufre, con el complejo bc, carente de esta subunidad, para lo cual se colocan cantidades crecientes

del complejo ASD-proteína hierro-azufre con el complejo bc, carente de esta subunidad en las condiciones de reconstitución reportadas por Shimomura y colaboradores¹¹, en las cuales se emplean los siguientes reactivos:

- * complejo bc, carente de la proteína hierro-azufre, 300 pmolas
- * complejo ASD-proteína hierro-azufre en cantidades de 0, 300, 600 y 900 pmolas
- * amortiguador de fosfato de potasio 25 mM, EDTA de potasio 0.025 mM y Tween 20 al 0.01% (pH7.5)
- * los lípidos cardiolipina (20% w/w) y asolectina (80% w/w)

todo esto se pone en un volumen máximo de 200 μ l, por separado se tienen las muestras control (sin iluminar con luz ultravioleta), y las problema que se iluminan con una luz ultravioleta. Estas muestras se incuban durante 30 min a 30°C para que se lleve a cabo la reacción de reconstitución, después se iluminan las muestras problema con luz ultravioleta de onda corta (254 nm) durante 10 min a una distancia de 10 cm con una lámpara de luz ultravioleta (Spectroline).

Finalmente se cargan las muestras, tanto las no iluminadas (control) como las iluminadas (problema) en un gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio, y en ausencia de β -mercaptoetanol, para tratar de visualizar e identificar los posibles productos del entrecruzamiento.

¹¹ Shimomura, Y., Nishikimi, M. y Ozawa, T. 1984, J. Biol. Chem. 259(25):14059-63.

II.X Electroforesis:

Las muestras para su análisis, se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio, en ausencia de β -mercaptoetanol de acuerdo con el método reportado por Shägger y colaboradores¹².

Las características y condiciones en las que se corrieron los geles son las siguientes:

	gel de separación (16%)	gel concentrador (4%)
* Acrilamida-bisacrilamida (30%-0.938%)	16 ml	1.6 ml
* Amortiguador (Tris 3 M, HCl 1 M y Dodecil sulfato de sodio 0.3%)	10 ml	3.0 ml
* Glicerol (79.5% v/v)	4 ml	-----
* Agua	-----	-----
* Persulfato de amonio	100 μ l	100 μ l
* TEMED	10 μ l	10 μ l

Los amortiguadores requeridos para correr los geles son:

* Amortiguador del cátodo (-) arriba:

Tris	0.1 M
Tricina	0.1 M
dodecil sulfato de sodio	0.1%

* Amortiguador del ánodo (+) abajo:

Tris-HCl (pH 8.9)	0.2 M
----------------------	-------

Los geles se corrieron durante 17 horas aproximadamente a voltaje constante, primeramente se deja que entren las muestras al gel concentrador durante 1 hora a 30

¹² Shägger, H., Link, T.A., Engel, W.D. y von Jagow, G. 1986. Methods Enzymol. 126:224-37.

mV; pasado este tiempo se incrementa el voltaje a 80 mV y se deja correr las 17 horas.

Una vez terminada la corrida, se saca el gel y se pone a fijar durante 1 hora en una solución que contiene:

- * metanol 50%
- * ácido acético 10%

Después de terminar de fijar el gel, éste se pone a teñir con la siguiente solución:

- * azul de Coomassie 0.1%
- * ácido acético 10%

Una vez teñido el gel, se pone a desteñir con la siguiente solución:

- * ácido acético 10%

II.X Inmuno réplicas tipo Western:

Se realizaron inmuno réplicas tipo Western¹³ tanto para comprobar la pureza de la proteína hierro-azufre purificada por nuestro método, utilizando para ello anticuerpos convencionales dirigidos contra esta subunidad y contra las subunidades estructurales de alto peso molecular I y II, así como para buscar posibles productos de entrecruzamiento utilizando también anticuerpos de conejo dirigidos contra la proteína hierro-azufre. Ambos anticuerpos los purificó en este laboratorio la QBP Miriam Vázquez Acevedo.

¹³ Hawkes, R., Niday, E. y Gordon, J. 1982. Anal. Biochem. 119:142-47.
Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. 1979. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76(9):4350-54.
González-Halphen, D., Lindorfer, M.A. y Capaldi, R. 1988. Biochem. 27:7021-31.

Una vez que terminó de correr el gel con las muestras problema, se procedió a incubar éste durante 1 hora con amortiguador de transferencia que contiene Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% y dodecil sulfato de sodio 0.1%. Pasado este tiempo, se transfirió el gel a una membrana de nitrocelulosa durante 4 horas a corriente constante a 250 mA. Una vez terminada la transferencia, se bloqueó la membrana de nitrocelulosa con un solución de gelatina al 3% disuelta en Tris-HCl 20 mM y cloruro de sodio 0.5 M (pH 7.5) durante 4 horas ó toda la noche con agitación; seguido de esto, se lavó la membrana de nitrocelulosa 2 veces, 5 min cada vez, con Tris-HCl 20 mM y cloruro de sodio 0.5 M (pH 7.5). Posteriormente se agregó gelatina al 1% disuelta en Tris-HCl 20 mM, cloruro de sodio 0.5 M y Tween 20 al 0.05% (pH 7.5), a continuación se agregaron los anticuerpos de conejo dirigidos contra las subunidades de alto peso molecular I y II, así como contra la proteína fierro-azufre.

La mezcla se dejó incubar durante 4 horas o toda la noche con agitación suave, una vez transcurrida la incubación con el primer anticuerpo, se lavó la membrana de nitrocelulosa con el amortiguador anterior dos veces durante 5 min cada una y a continuación se añadió nuevamente gelatina al 1% disuelta en el mismo amortiguador, seguido de lo cual se agregó el segundo anticuerpo, que está acoplado a fosfatasa alcalina, y se dejó incubar durante 4 horas o toda la noche con agitación suave.

Finalmente se visualizaron las proteínas transferidas y reconocidas por los anticuerpos utilizados, haciendo primeramente dos lavados de 5 min cada uno con el amortiguador antes mencionado, seguido de lo cual se añadió una solución de

bicarbonato de sodio 0.1 M y cloruro de magnesio 1.0 M (pH 8.9). A continuación se agregó una solución de 5-bromo-4cloro-3-indoil fosfato de toluidina y otra de azul de tetrazolio para que se llevara a cabo la reacción de la fosfatasa alcalina, en cuanto se visualizaron las bandas, se tiró rápidamente la solución anterior y se lavó con abundante agua bidestilada.

III RESULTADOS

III.1 Purificación del Complejo bc₁

Como se menciona en la Metodología, el complejo bc₁ se purificó de acuerdo con 3 métodos diferentes:

- * Rieske¹
- * Ljungdahl P.O. y colaboradores² y
- * Método Modificado

se obtuvieron los siguientes resultados:

Cuando se llevó a cabo la purificación del complejo bc₁ de acuerdo con el método descrito por *Rieske* (ver Metodología), obtuvimos una preparación acorde a lo previamente reportado. El complejo obtenido al ser sometido a una electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio, presentó 11 bandas características, como se aprecia en la figura 14, y que presenta contaminantes por parte de las subunidades de alto peso molecular del complejo II ó succinato deshidrogenasa (sdh). Al purificar el complejo bc₁ de acuerdo con la técnica descrita por *Ljungdahl y colaboradores* (ver Metodología) se obtiene una preparación más pura del complejo, ya que con los gradientes de cloruro de sodio de 0-150 y de 150-400 mM, se obtiene primeramente una fracción que corresponde a la succinato deshidrogenasa y con el segundo gradiente se obtiene la fracción correspondiente al

¹ Rieske, J.S. 1967. *Methods Enzymol.* 10:229-39.

² Ljungdahl, P.O., Pennoyer, J.D., Robertson, D.E. y Trumppower, B.L. 1987. *Biochim. Biophys. Acta.* 891:227-41.

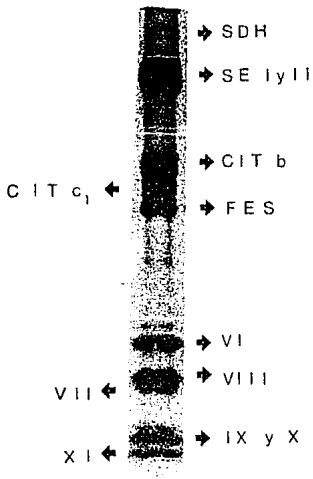


Figura 14. Patrón electroforético para el complejo bc₁ mitocondrial purificado de acuerdo con el método de Rieske

10 µg de complejo bc₁ en el carril

SDH: succinato deshidrogenasa

complejo bc, como se muestra en el perfil de elución de la columna de DEAE Biogel-A (ver figura 15), En la figura 16, se muestran los patrones electroforéticos para la succinato deshidrogenasa (sdh) y para el complejo bc, con sus 11 bandas características (bc,); este último, si se compara con el complejo bc, obtenido por el método descrito por *Rieske* (ver figura 14) presenta menos contaminantes de alto peso molecular. En la figura 17 se muestra el patrón electroforético para un complejo bc, obtenido acorde con la técnica descrita por *Ljungdahl y colaboradores* utilizando el detergente lauril maltósido de Sigma (ver Discusión).

Ahora, al hacer la purificación del complejo bc, de acuerdo con el *Método Modificado* (ver Metodología) es decir, partiendo de la fracción del complejo bc, crudo obtenida de acuerdo con el método descrito por *Rieske*, con el tratamiento con el detergente no iónico lauril maltósido, se obtuvo una preparación del complejo bc, que presentó un alto grado de pureza así como sus 11 bandas características, como se observa en la figura 18. Esta metodología nos permitió obtener una preparación de la proteína hierro-azufre con un alto grado de pureza.

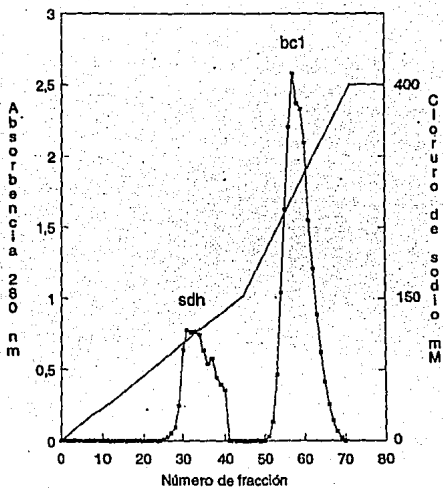


Figura 15. Perfil de elución para la succinato deshidrogenasa (sdh) y el complejo bc₁ (bc1) de la columna de DEAE Biogel-A con un gradiente de cloruro de sodio de 0-150 y 150-400 mM respectivamente

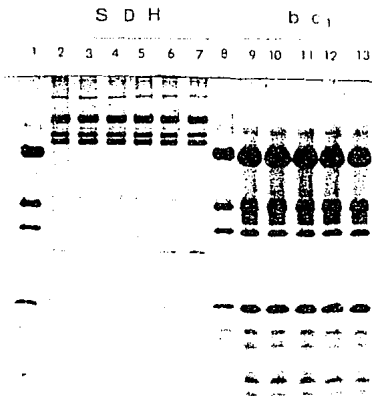


Figura 16. Patrón electroforético para la succinato deshidrogenasa (SDH) y el complejo bc₁ mitocondrial (bc₁) eluidos de la columna de DEAE Biogel-A

10 μ g de complejo bc₁ como control en los carriles 1 y 8

10 μ g de succinato deshidrogenasa en los carriles 2-7

10 μ g de complejo bc₁

* eluidos de la columna de DEAE Biogel-A

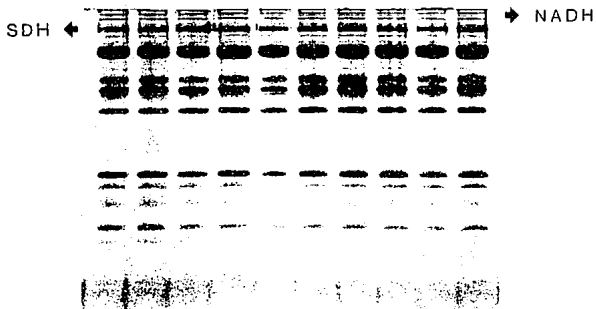


Figura 17. Patrón electroforético para el complejo bc, mitocondrial obtenido por el método descrito por Ljungdahl y colaboradores

10 μ g de complejo bc, por carril
SDH: succinato deshidrogenasa
NADH: NADH deshidrogenasa

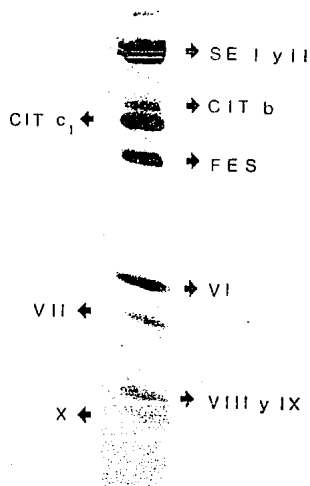


Figura 18. Patrón electroforético para el complejo bc₁ purificado de acuerdo con Nuestro Método

10 μ g de complejo bc₁ en el carril

III.11 Ensayos Espectrofotométricos:

Estos ensayos se hicieron para determinar tanto la concentración molar de los citocromos b y c₁, así como para estimar la estequiometría de ambos citocromos antes y después de purificar la proteína fierro-azufre. Los ensayos se realizaron en un espectrofotómetro en un intervalo de 600-450 nm.

En la figura 19 se muestran los trazos típicos de los espectros diferenciales obtenidos para las preparaciones del complejo bc₁ purificado por la técnica descrita por *Rieske, Ljungdahl y colaboradores* y por *Nuestro Método*. Se enlistan a continuación los valores de concentración molar para los citocromos b y c₁, así como los valores de estequiometría para ambos citocromos antes de purificar la proteína fierro-azufre:

Complejo bc ₁	Hemo tipo b	Hemo tipo c ₁	Estequiometría (b/c ₁)
Rieske	186.4 μM	98.0 μM	1.9:1
Ljungdahl	100.8 μM	52.6 μM	1.9:1
Nosotros	130.3 μM	65.3 μM	1.9:1

Para el caso del complejo bc₁ carente de la proteína fierro-azufre en los 3 casos anteriores, al hacer los espectros diferenciales, se obtienen trazos similares a los de la figura 19, solo que la estequiometría de los citocromos b y c₁ varía como se muestra a continuación:

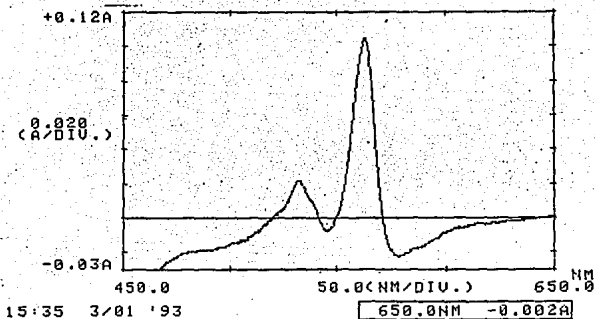
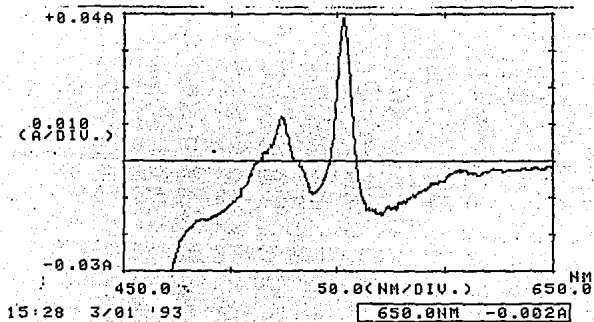


Figura 19. Patrones típicos obtenidos para los espectros diferenciales de los citocromos c₁ (arriba) y b (abajo)

pico máximo de absorción para el citocromo c₁ = 553 nm

pico máximo de absorción para el citocromo b = 562 nm

Complejo bc, carente de proteína fierro-azufre	Hemo tipo b	Hemo tipo c ₁	Estequiometría (b/c ₁)
Rieske	54.40 μ M	43.42 μ M	1.2:1
Ljungdahl	59.20 μ M	46.80 μ M	1.2:1
Nosotros	124.0 μ M	89.14 μ M	1.4:1

III.III Ensayos de Reconstitución:

Como se menciona en la Metodología, se llevaron a cabo ensayos de reconstitución de actividad enzimática para el complejo bc, carente de la proteína fierro-azufre purificado por el método de *Rieske, Ljungdahl y colaboradores y por el Método Modificado*. En la figura 20 se muestran los trazos típicos obtenidos para estas muestras en un espectrofotómetro de doble longitud de onda a 550-540 nm.

También se llevaron a cabo ensayos de actividad enzimática para el bc, nativo purificado por los 3 métodos antes mencionados; en la figura 21 se muestran los trazos típicos obtenidos y a continuación se enlistan los valores obtenidos para cada caso:

Complejo bc, nativo	μ molas cit c red/min/mg prot	μ molas cit c red/min/mg prot en presencia de Antimicina
Rieske	7.21	0.11
Ljungdahl	11.24	0.08
Nosotros	9.95	0.09

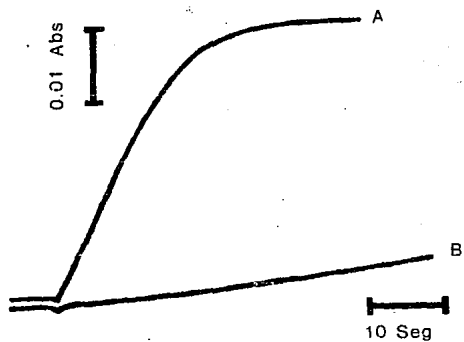


Figura 20. Patrón de actividad enzimática obtenido para el complejo bc, carente de la proteína hierro-azufre después de la reacción de reconstitución, en ausencia (A) y en presencia (B) de antimicina

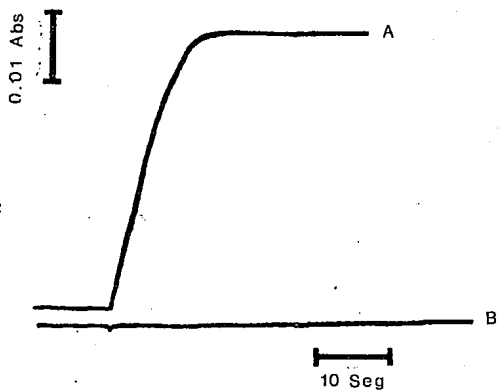


Figura 21. Patrón de actividad enzimática obtenido para el complejo bc, nativo, en ausencia (A) y presencia (B) de antimicina

A continuación se enlistan los valores de actividad enzimática para el complejo bc, carente de la proteína hierro-azufre reconstituido, obtenido de acuerdo a los 3 métodos utilizados:

Complejo bc, carente de la proteína hierro-azufre reconstituido¹	μmolas decit c red/min/mg prot	μmolas decit c red/min/mg prot en presencia de Antimicina
Rieske	2.12	0.11
Ljungdahi	3.54	0.32
Nosotros	3.33	0.21

¹ Para estos ensayos, se incubaron durante 30 min a 30 °C 200 pmolas del complejo bc, carente de la proteína hierro-azufre, con cantidades crecientes de esta subunidad, de 200 a 800 pmolas de proteína, en presencia de 275 μg de lípidos (asolectina/cardioplipina), más amortiguador de fosfatos de potasio 25 mM y EDTA de potasio 0.025 mM (pH 7.2) en un volumen final de 150 μl.

III,IV Purificación de la Proteína hierro-azufre:

La proteína hierro-azufre, ha sido purificada de acuerdo con tres métodos diferentes:

- * Trumpower y Edwards³
- * Engel y colaboradores⁴
- * Shimomura y colaboradores⁵

Como se menciona en la Metodología, los dos primeros métodos, tienen el inconveniente de que se utilizaron agentes caotrópicos para la purificación de la proteína hierro-azufre como lo son el clorhidrato de guanidina (2 M) y la urea (2 M) respectivamente. Estos agentes tienen un efecto desnaturalizante en la proteína hierro-azufre, como lo indican los resultados obtenidos por estos grupos al realizar experimentos de reconstitución, en los cuales las actividades obtenidas para el complejo bc₁ carente de la proteína hierro-azufre eran inferiores a las actividades del complejo nativo. El tercer método, que se utilizó en una parte de este trabajo, es más apropiado para purificar la proteína hierro-azufre, porque no se utilizan agentes caotrópicos, sino que se emplea una columna hidrofóbica de fenil-Sefarosa CL-4B para purificar primeramente la proteína hierro-azufre, seguido de lo cual se purifica al complejo bc₁ carente de esta subunidad de la misma columna y finalmente se eluye el resto de proteína que queda unida a la columna (ver Metodología).

³ Trumpower, B.L. y Edwards, C.A. 1979. J. Biol. Chem. 254(17):8697-8706.

⁴ Engel, W.D., Michalski, C. y von Jagow, G. 1983. Eur. J. Biochem. 132:395-402.

⁵ Shimomura, Y., Nishikimi, M. y Ozawa, T. 1984. J. Biol. Chem. 259(25):14059-63.

Sin embargo, seguir la técnica descrita por *Shimomura y colaboradores* para purificar a la proteína hierro-azufre, tiene el inconveniente de que la preparación resultante presenta contaminación por parte de las subunidades estructurales de alto peso molecular I y II. Si esta purificación se realiza llevando a cabo *Nuestras Modificaciones* a la técnica de *Shimomura y colaboradores*, la preparación que se obtiene no presenta contaminantes por parte de estas subunidades.

En la figura 22 se muestra el perfil de elución para la proteína hierro-azufre con el detergente desoxicolato de sodio al 1% (1 % DOC), el complejo bc, carente de esta subunidad, con el detergente Tween 20 al 3% (3% TWEEN) y el resto de proteína que queda unido a la columna hidrofóbica de fenil-Sefarosa CL-4B con el detergente dodecil sulfato de sodio al 2% (2% SDS). Los círculos abiertos corresponden a la absorbencia a 280 nm para la proteína hierro-azufre y los círculos cerrados corresponden a la absorbencia a 415 nm para el complejo bc, carente de esta proteína, así como para el resto de proteína que queda unida a la columna. En la parte A, está el perfil de elución para las fracciones obtenidas de acuerdo a la técnica descrita por *Shimomura y colaboradores*, en tanto que en la parte B, está el perfil de elución para las fracciones obtenidas de acuerdo con *Nuestras Modificaciones*. Es interesante notar que la fracción que corresponde a la proteína hierro-azufre (círculos abiertos, 1% DOC) para el caso del método de *Shimomura y colaboradores* (parte A) presenta un pico de absorción mayor si se compara con el pico de absorción obtenido para la misma muestra obtenida por *Nuestras Modificaciones* (parte B). Esta diferencia se debe a que la proteína obtenida por el método de *Shimomura y colaboradores*

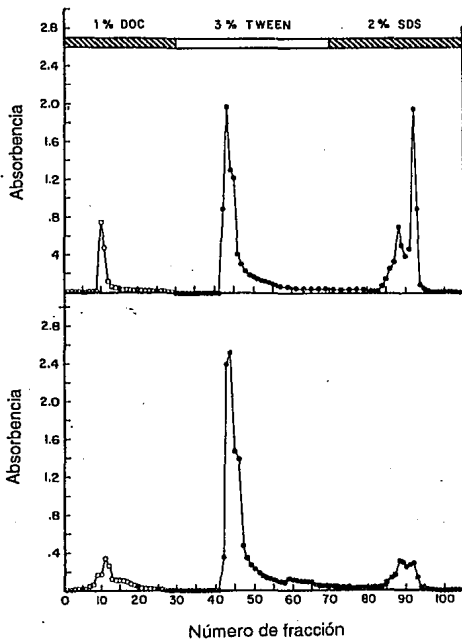


Figura 22. Perfil de elución para la proteína hierro-azufre y el complejo bc₁ carente de esta subunidad, purificados por el método de Shimomura y colaboradores (A) y por Nuestro Método (B)

presenta contaminaciones por parte de las subunidades estructurales de alto peso molecular I y II del complejo bc₁. Con respecto a la fracción correspondiente al complejo bc₁ carente de la proteína hierro-azufre (círculos cerrados, 3% TWEEN), en el caso de *Shimomura y colaboradores* (parte A) el pico de absorción máximo tiene un valor menor al que presenta la misma muestra en el caso de *Nuestras Modificaciones* (parte B), posiblemente porque en nuestro caso hay un mayor rendimiento de esta fracción y finalmente para el caso de la proteína que queda unida a la columna (círculos cerrados, 2% SDS), en el caso de *Shimomura y colaboradores* (parte A) el pico de absorción es mayor que el obtenido para la misma fracción en nuestro caso (parte B); ésto se puede deber al hecho de que *Nuestras Modificaciones* (parte B) nos permiten eluir una mayor cantidad de proteína en la fracción que correspondió al complejo bc₁ carente de la proteína hierro-azufre comparado con el método de *Shimomura y colaboradores* (parte A).

Aquí es importante hacer notar el hecho de que la proteína hierro-azufre purificada por el método de *Shimomura y colaboradores* a partir de un complejo bc₁ purificado de acuerdo con la técnica descrita por *Rieske*, nos da una fracción que presenta contaminaciones por parte de las subunidades de alto peso molecular, como se puede apreciar en la figura 23.

Cuando se llevó a cabo la purificación de la proteína hierro-azufre con *Nuestras Modificaciones*, es decir; combinando parte de la técnica reportada por *Rieske* seguida del tratamiento con el detergente no iónico lauril maltósido de acuerdo con el método reportado por *Ljungdahl y colaboradores*, obtuvimos una preparación para la

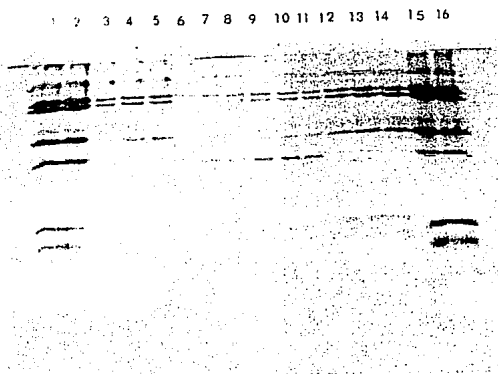


Figura 23. Patrón electroforético para la proteína hierro-azufre (FeS) aislada a partir de un complejo bc, obtenido por el método de Rieske

10 μ g de complejo bc, como control en los carriles 1, 2, 15 y 16

2, 4, 6, ..., 12 μ g de proteína hierro-azufre en los carriles 6-11

10 μ g de complejo bc, carente de la proteína hierro-azufre en los carriles 3, 4, 5, 12, 13 y 14. En estos carriles, se observa una parte de la proteína hierro-azufre que queda unida al complejo después de su purificación

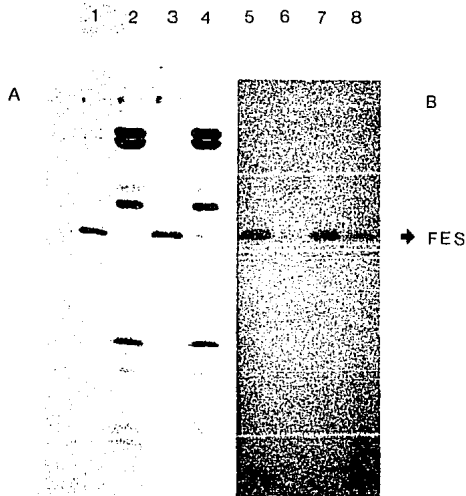


Figura 24. (A) Patrón electroforético para la proteína hierro-azufre (FeS) purificada por Nuestro Método 5 μ g en el carril 3 y por el método de Shimomura y colaboradores 5 μ g en el carril 1 10 μ g de complejo bc_1 carente de la proteína hierro-azufre en los carriles 2 y 4 de acuerdo al método de Rieske y a Nuestro Método respectivamente (B) Inmuno-réplica tipo Western obtenida con anticuerpos policlonales dirigidos contra la proteína hierro-azufre

proteína hierro-azufre que presenta un alto grado de pureza, como se observa en la figura 24 A, donde se comparan las fracciones obtenidas por la técnica de *Shimomura y colaboradores* y la *Nuestra*. La diferencia más notable es la ausencia de las proteínas estructurales de alto peso molecular I y II en la preparación de la proteína hierro-azufre siguiendo el *Método Modificado*, en contraste con la presencia de dichas subunidades en la preparación de *Shimomura y colaboradores*. En la figura 24 B del mismo gel decorado con un anticuerpo policlonal dirigido contra la proteína hierro-azufre se puede observar que en *Nuestro Método*, el complejo bc₁, carente de la proteína hierro-azufre, retiene una mayor cantidad de esta subunidad, en comparación a la técnica de *Shimomura y colaboradores*, en la cual se elimina casi totalmente.

En la figura 25 se muestra el patrón electroforético obtenido para la preparación de la proteína hierro-azufre obtenida de acuerdo con la técnica de *Shimomura y colaboradores* y con *Nuestro Método*. Como se puede observar, tenemos un patrón similar para ambas preparaciones al de la figura 24 A, mientras que en la figura 25 B se muestra la inmunorréplica del mismo gel, decorado ahora con un anticuerpo policlonal dirigido contra las subunidades de alto peso molecular I y II, observándose que para la preparación de la proteína hierro-azufre obtenida por el *método de Shimomura* hay reacción por parte del anticuerpo en tanto que no hay reacción con la preparación obtenida por *Nuestro Método*. Con este experimento se hace más evidente la ausencia de las proteínas estructurales de alto peso molecular I y II en

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

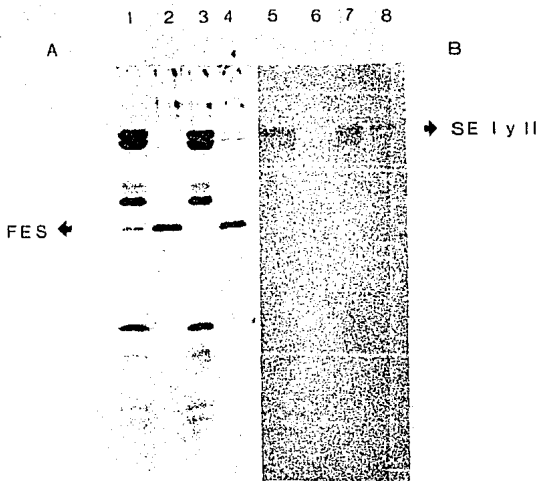


Figura 25. (A) Patrón electroforético para la proteína fierro-azufre purificada por Nuestro Método $5\mu\text{g}$ en el carril 2 y por el método de Shimomura y colaboradores $5\mu\text{g}$ en el carril 4 $10\mu\text{g}$ de complejo bc, carente de la proteína fierro-azufre en los carriles 1 y 3 acorde a Nuestro Método y al de Rieske respectivamente (B) Inmuno-réplica tipo Western obtenida con anticuerpos policlonales con actividad contra las subunidades estructurales de alto peso molecular (SE I y II)

nuestra preparación de la proteína fierro-azufre, la cual no presenta reacción con los anticuerpos.

III.V Determinación de Hierro no Hémico:

Como se menciona en la metodología, se hicieron determinaciones de hierro no hémico para la proteína fierro-azufre por 2 métodos distintos. En el primero de ellos, se siguió la técnica descrita por Brumby y Massey⁶ (ver Metodología); en la figura 26 se muestra la curva patrón de ferredoxina a partir de la cual se obtuvo la concentración de hierro no hémico para la proteína fierro-azufre por interpolación de los valores de absorbencia de la muestra problema, a continuación se enlistan los valores de hierro no hémico obtenidos con *Nuestra Preparación* y con las preparación obtenida por *Shimomura y colaboradores* así como el valor para el porcentaje de purificación, basado en la estimación teórica de ng fierro/mg de proteína para una proteína 100% pura:

proteína fierro-azufre	ng fierro/mg proteína	% pureza
Shimomura ¹	76	79.16
Nosotros	95.5	100

¹ Datos tomados de Shimomura, Y., Nishikimi, M. y Ozawa, T. 1984. J. Biol. Chem. 259(25):14059-63.

El segundo método, se realizó en el *Laboratorio de Contaminación de Suelos del Departamento de Edafología del Instituto de Geología de la U.N.A.M. con la*

⁶ Brumby, P.E. y Massey, V. 1967. Methods Enzymol. 10:463-74.

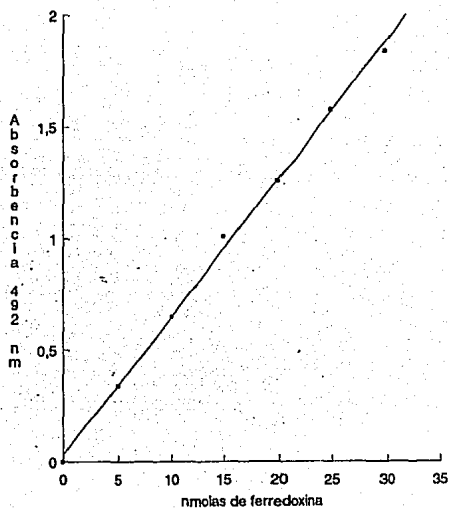


Figura 26. Curva patrón para determinar hierro no hémico en la proteína hierro-azufre por el método de Brumby y Massey

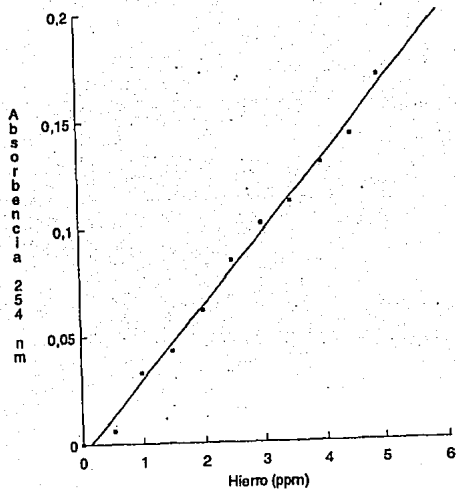


Figura 27. Curva patrón para determinar hierro no hémico en la proteína hierro-azufre en el Espectrofotómetro de Absorción Atómica

gran ayuda de la Maestra en Ciencias Lourdes Flores Delgadillo, utilizando para ello un espectrofotómetro de Absorción Atómica Perkin-Elmer 372. En la figura 27 se muestra la curva patrón utilizada en este caso, para determinar por interpolación de los valores de absorción de la muestra problema la concentración de hierro no hémico en primeramente en partes por millón (ppm) y después en **µg de hierro no hémico**. Los valores obtenidos en este caso para la proteína hierro-azufre por el espectrofotómetro de absorción atómica se enlistan a continuación junto con los valores obtenidos para la concentración de proteína por el método de Lowry:

Proteína hierro-azufre	Lowry (µg/µl)	E.A.A ¹ : (µg/µl)	% pureza
Shimomura	1.37	0.74	54.02
Nosotros	1.87	1.8	96.31

E.A.A. = Espectrofotometría de Absorción Atómica

El método de espectroscopía de absorción atómica presenta la gran ventaja metodológica de utilizar menores cantidades de la proteína purificada.

III.VI Reacción de Entrecruzamiento:

Se llevaron a cabo los experimentos de entrecruzamiento utilizando el reactivo heterobifuncional fotoactivable 2-(ρ -azidosalicilamido)etil-1,3'-ditiopropionato que a partir de este momento designaré como SASD (ver Metodología). Estos experimentos se hicieron con el reactivo SASD sin marca radioactiva, así como con el reactivo marcado con yodo 125 (SASD-I¹²⁵), tanto para buscar posibles productos de entrecruzamiento del citocromo c soluble acoplado al reactivo SASD, con la citocromo oxidasa, purificada en este laboratorio por la QBP Miriam Vázquez Acevedo, así como para la proteína hierro-azufre acoplada al reactivo SASD con un complejo bc, carente de esta subunidad. Estos experimentos se realizaron en las condiciones descritas en la Metodología y se buscaron los posibles productos de entrecruzamiento para cada caso, corriendo las muestras en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio y en ausencia de β -mercaptoetanol, y haciendo inmunorréplicas tipo Western y autorradiografías, según se requiriera.

La razón fundamental para llevar a cabo un experimento de fotoafinidad entre el citocromo c soluble y la citocromo c oxidasa fué establecer las condiciones óptimas para obtener un producto de entrecruzamiento, ya que se contaba con abundantes cantidades de estas 2 proteínas.

En la figura 28, se muestra el patrón electroforético para el citocromo c soluble acoplado al reactivo SASD (cit c-ASD), en presencia de la citocromo oxidasa después

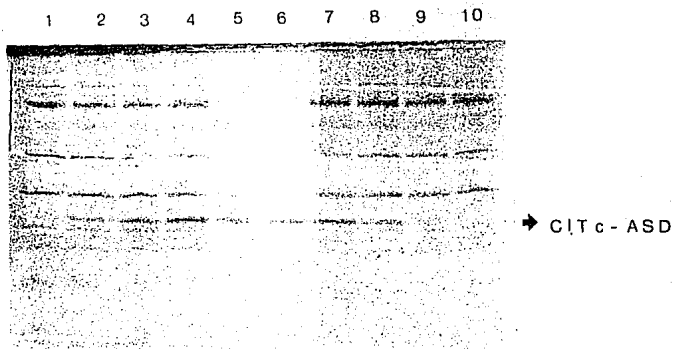


Figura 28. Patrón electroforético para el citocromo c soluble acoplado al reactivo SASD

0, 300, 600 y 900 pmolas de cit c sol-ASD en los carriles 1-4 irradiadas con luz ultravioleta de onda corta (254 nm)
900, 600, 300 y 0 pmolas de cit c sol-ASD en los carriles 7-10 sin irradiar con luz ultravioleta (controles)
300 pmolas de citocromo oxidasa en los carriles 1-4 y 7-10
900 pmolas de cit c sol-ASD en los carriles 5 y 6

de que se llevó a cabo la reacción de reconstitución de ambas muestras (ver Metodología), y como se observa en la figura no hay una diferencia aparente entre las muestras que se irradiaron y las muestras control, por lo que suponemos que no se llevó a cabo la formación de un producto de entrecruzamiento entre el citocromo c soluble y la citocromo oxidasa en estas condiciones.

En la figura 29 se muestra la autorradiografía obtenida para buscar un posible producto de entrecruzamiento entre el citocromo c soluble acoplado al reactivo SASD marcado con yodo 125 (cit c-ASD-I¹²⁵) y la citocromo oxidasa. Como se observa en ambos casos, tampoco existe una diferencia que nos indique la formación de un posible producto de entrecruzamiento entre el citocromo c soluble y la citocromo oxidasa, dado que el patrón en los carriles 1 a 3 (con irradiación con luz ultravioleta) es muy similar y/o igual al patrón que se obtiene para los carriles 4 a 6 (sin irradiación con luz ultravioleta).

En la figura 30 A y B, se muestra el patrón electroforético obtenido para buscar el posible producto de entrecruzamiento entre la proteína hierro-azufre acoplada al reactivo SASD, después de que se hizo la reacción de reconstitución con un complejo bc, carente de esta subunidad.

En la figura 31 C y D se muestran las inmunorrélicas tipo Western del gel anterior decorado con un anticuerpo policlonal dirigido contra la proteína hierro-azufre.

Como puede observarse no hay una diferencia significativa entre las muestras sin irradiar y las irradiadas con luz ultravioleta, por lo que al parecer no hubo la

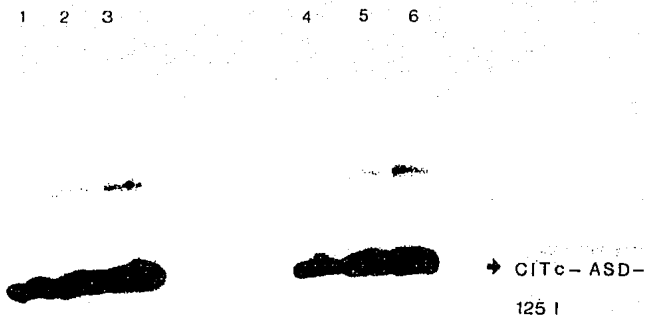


Figura 29. Autorradiografía para el citocromo c soluble acoplado al reactivo SASD-¹²⁵I (cit c sol-ASD-¹²⁵I)

300, 600 y 900 pmolas de cit c sol-ASD-¹²⁵I en presencia de 300 pmolas de citocromo oxidasa irradiadas con luz ultravioleta de onda corta (254 nm) en los carriles 1-3

Carriles 4-7 Igual a los carriles 1-3 pero sin irradiar

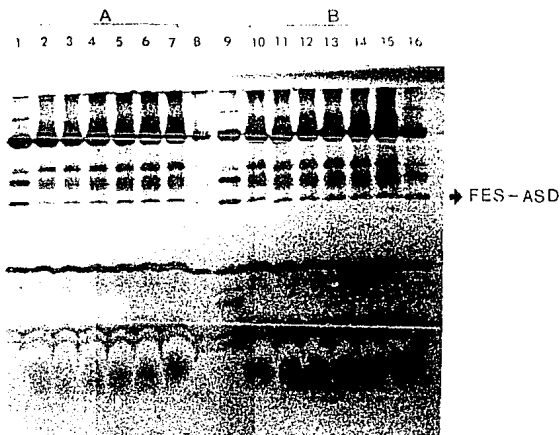


Figura 30. Patrón electroforético para la proteína hierro-azufre acoplada al reactivo SASD (FeS-ASD), irradiadas con luz ultravioleta de onda corta (254 nm) (A) y sin irradiar con luz ultravioleta (B)

10 μ g de complejo bc, nativo en los carriles 1, 9 y 16

300, 600 y 900 pmolas de FeS-ASD por duplicado con 300 pmolas de bc, carente de FeS en los carriles 2-7

900, 600 y 300 pmolas de FeS-ASD por duplicado con 300 pmolas de bc, carente de FeS en los carriles 10-15

10 μ g de bc, carente de FeS en el carril 8

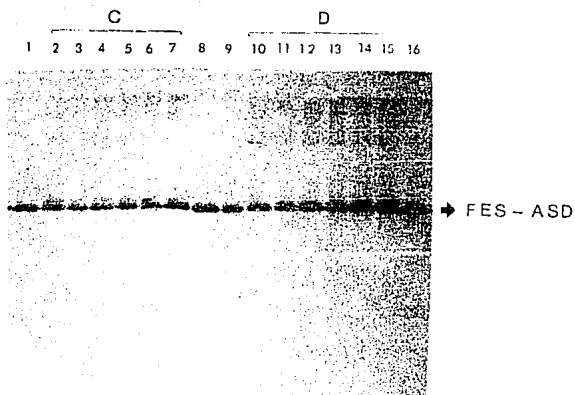


Figura 31. Inmuno-réplica tipo Western obtenida con un anticuerpo policlonal dirigido contra la proteína hierro-azufre (FeS) para el gel de la figura 30, muestras irradiadas con luz ultravioleta de onda corta (254 nm) parte D muestras sin irradiar con luz ultravioleta parte C

10 μ g de bc, nativo en los carriles 1, 8 y 16

300, 600 y 900 pmolas de FeS-ASD por duplicado con 300 pmolas de bc, carente de FeS en los carriles 2-7

900, 600 y 300 pmolas de FeS-ASD por duplicado con 300 pmolas de bc, carente de FeS en los carriles 10-15

10 μ g de bc, carente de FeS en el carril 9

formación de un producto de entrecruzamiento entre la proteína fierro-azufre acoplada al reactivo SASD y un complejo bc, carente de esta subunidad.

En la figura 32 se muestra el patrón obtenido para la autorradiografía que corresponde a la reacción de entrecruzamiento entre la proteína fierro-azufre acoplada al reactivo SASD marcado con yodo 125 ($\text{FeS-ASD-}^{125}\text{I}$) y un complejo bc, carente de esta subunidad. No existe una diferencia aparente entre los controles y las muestras irradiadas que nos indique la formación de un posible producto de entrecruzamiento.

Finalmente, en la figura 33 se muestra también el patrón de la autorradiografía, obtenido para la proteína fierro-azufre acoplada al reactivo SASD marcado con yodo 125 en presencia de 300 pmolas de un complejo bc, carente de esta subunidad, observándose en los carriles 1 a 3 (irradiados), que en la parte superior de la autorradiografía, que corresponde al borde del gel, tenemos que conforme se incrementa la concentración de la proteína fierro-azufre acoplada al reactivo SASD marcado con yodo 125 se incrementa la radioactividad en esa zona, si comparamos los carriles 1 a 3 (irradiados) con los carriles 4 a 6 que corresponden a las muestras sin irradiar con luz ultravioleta. Aunque tal vez el incremento de radioactividad en los carriles 1 a 3 (irradiados), pudiera sugerir la posible formación de un producto de entrecruzamiento, éstos no se resuelven en el gel. Concluimos que dichos productos pueden deberse a agregación de la propia proteína fierro-azufre.

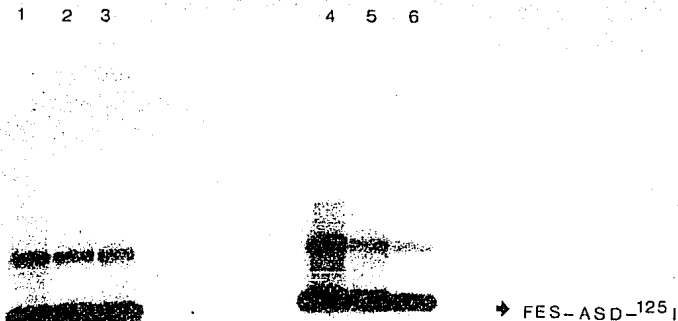


Figura 32. Autorradiografía para la proteína hierro-azufre acoplada al reactivo SASD- ^{125}I (FeS-ASD- ^{125}I) en presencia de 300 pmolas del complejo bc, carente de la FeS

900, 600 y 300 pmolas de FeS-ASD- ^{125}I sin irradiar con luz ultravioleta en los carriles 1-3

900, 600 y 300 pmolas de FeS-ASD- ^{125}I irradiadas con luz ultravioleta de onda corta (254 nm) en los carriles 4-6

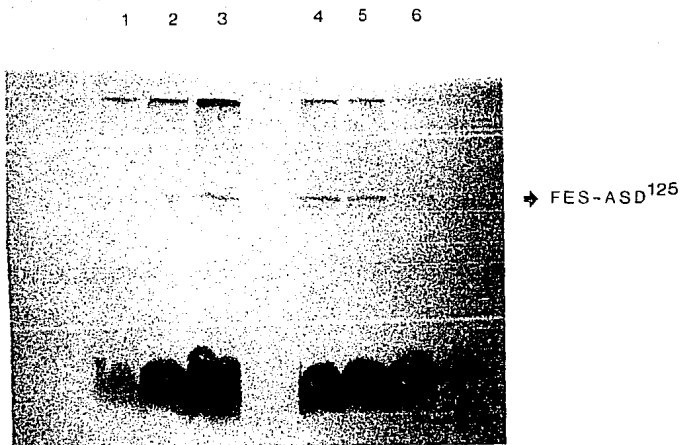


Figura 33. Autorradiografía para la proteína hierro-azufre acoplada al reactivo SASD-¹²⁵I (FeS-ASD-¹²⁵I) en presencia de 300 pmolas del complejo bc, carente de FeS

300, 600 y 900 pmolas de FeS-ASD-¹²⁵I irradiadas con luz ultravioleta en onda corta (254 nm) en los carriles 1-3

900, 600 y 300 pmolas de FeS-ASD-¹²⁵I sin irradiar con luz ultravioleta

IV DISCUSION

IV.1 Purificación del Complejo bc₁

Como se ha mencionado anteriormente, Metodología y Resultados, el complejo bc₁ se purificó por 3 métodos distintos:

- * Rieske¹
- * Ljungdahl P.O. y colaboradores² y
- * Nuestro Método

El método diseñado en el presente trabajo combina las dos técnicas previamente reportadas. Después de obtener una preparación de complejo bc₁ parcialmente purificado por el método de *Rieske*, se lleva a cabo una resolubilización con bajas concentraciones del detergente lauril maltósido, seguido de una cromatografía de intercambio iónico. Dicha técnica permite obtener una preparación de complejo bc₁ de muy alta pureza, carente de contaminaciones por parte del complejo II (succinato deshidrogenasa). La obtención de un complejo bc₁ de alta pureza es un prerequisite indispensable para la obtención de una proteína hierro-azufre tipo Rieske de una sola banda polipeptídica.

¹ Rieske, J.S. 1967. *Methods Enzymol.* 10:229-39.

² Ljungdahl, P.O., Pennoyer, J.D., Robertson, D.E. y Trumpower, B.L. 1987. *Biochim. Biophys. Acta.* 891:227-41.

IV.II Ensayos Espectrofotométricos:

Como se menciona en el punto III.II de los Resultados, se hizo este tipo de ensayos para determinar la concentración molar de los citocromos b y c₁, así como para estimar la estequiometría de ambos citocromos en cada método de purificación, *Rieske*, *Ljungdahl* y *colaboradores* y *Nuestro Método*, antes y después de purificar la proteína hierro-azufre. Y como se aprecia en las tablas del punto III.II, en el complejo bc₁ intacto la estequiometría de ambos citocromos es de 1.9:1, lo cual está de acuerdo con el valor de 2:1, puesto que hay 2 hemos tipo b (b₅₆₀ y b₅₈₀) por cada hemo tipo c₁. Al parecer no importa el método por el que se haya purificado el complejo bc₁, no hay una diferencia importante en cuanto a la integridad estructural del complejo, a juzgar con este criterio espectroscópico

Después de purificar la proteína hierro-azufre a partir de cada preparación obtenida, la estequiometría de los citocromos b y c₁ disminuye su valor a 1.2:1 para los complejos bc₁ previamente purificados por los métodos de *Rieske* y *Ljungdahl* y *colaboradores*, en tanto que para la preparación obtenida por *Nuestro Método* el valor es de 1.4:1. Aunque al parecer no hay una diferencia significativa entre ambos resultados, podemos decir que *Nuestro Método* preserva un poco más la integridad estructural del complejo bc₁ carente de la proteína hierro-azufre, en relación a los otros dos métodos.

IV.III Ensayos de Reconstitución:

Como se menciona en el punto III.III de los Resultados, se llevaron a cabo ensayos para medir la actividad enzimática del complejo bc₁ carente de la proteína hierro-azufre después de que se llevó a cabo la reacción de reconstitución con esta subunidad. Como se aprecia en la primera tabla del punto III.III de los Resultados, no existe una gran diferencia entre los valores obtenidos para las **μmolas de citocromo c reducido por minuto por mg de proteína** en el caso de las preparaciones del complejo bc₁ carente de la proteína hierro-azufre obtenidas por el método de *Rieske, Ljungdahl y colaboradores* y por *Nuestro Método*, aunque sí es importante señalar que las 3 preparaciones, después de la reconstitución, son susceptibles al inhibidor antimicina, el cual es específico del complejo bc₁.

Al medir la actividad específica del complejo bc₁ nativo obtenido por cada método, se encontró que las mejores actividades son las obtenidas con las preparaciones del complejo bc₁ obtenidas por el método de *Ljungdahl y colaboradores* y por *Nuestro Método*, siendo éstas de **11.24 y 9.95 μmolas de citocromo c reducido por minuto por mg de proteína** respectivamente, comparados con el valor de **7.21 μmolas de citocromo c reducido por minuto por mg de proteína** para la preparación obtenida por el método de *Rieske*. Esta diferencia se puede deber a que, como mencionan *Ljungdahl y colaboradores*, el detergente lauril maltósido utilizado en los 2 primeros métodos, parece preservar mejor la estructura del complejo bc₁ que los detergentes y las sales utilizadas en el método de *Rieske*.

IV.IV Purificación de la Proteína hierro-azufre:

Se llevó a cabo la purificación de esta proteína por 3 métodos distintos:

- * Trumpower y Edwards³
- * Engel y colaboradores⁴ y
- * Shimomura y colaboradores⁵

siendo los 2 primeros métodos inadecuados porque utilizan agentes caotrópicos, como son el clorhidrato de guanidina (2 M) y la urea (2 M) respectivamente, que al parecer provocan la desnaturalización de esta subunidad, como lo demuestran los resultados de ambos grupos.

El tercer método es el más adecuado para purificar a la proteína hierro-azufre porque no utiliza agentes caotrópicos. Sin embargo, tiene el inconveniente de que la preparación que se obtiene está contaminada con las subunidades estructurales de alto peso molecular I y II, por lo que es necesario utilizar una segunda columna de filtración molecular de Sefacril S-200 para eliminarlas. En este paso disminuye considerablemente el rendimiento de la proteína hierro-azufre. En el laboratorio modificamos esta última metodología de purificación. En primer lugar, no requerimos de la segunda columna utilizada por el grupo de *Shimomura y colaboradores* y en segundo lugar, obtenemos una preparación de la proteína hierro-azufre con un alto grado de pureza.

³ Trumpower, B.L. y Edwards, C.A. 1979. J. Biol. Chem. 254(17):8697-8706.

⁴ Engel, W.D., Michalski, C. y von Jagow, G. 1983. Eur. J. Biochem. 132:395-402.

⁵ Shimomura, Y., Nishikimi, M. y Ozawa, T. 1984. J. Biol. Chem. 259(25):14059-63.

Dos resultados experimentales hacen evidente la pureza de la proteína fierro-azufre de acuerdo al método desarrollado en el laboratorio, por una parte, la presencia de una sola banda en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio y la falta de reacción de la preparación con anticuerpos anti subunidades I y II en inmunorréplicas tipo Western. Por otro lado, los valores encontrados de contenido de hierro en la preparación, los cuales se acercan a los valores teóricos para una proteína fierro-azufre 100% pura. Estos criterios indican que la metodología instrumentada permite obtener una preparación de proteína fierro-azufre de alta pureza, un requisito indispensable para poder realizar los experimentos de entrecruzamiento.

IV.V Reacción de Entrecruzamiento:

Como se menciona en la Introducción, el uso de reactivos de entrecruzamiento para determinar interacciones entre diferentes moléculas, no es nuevo en el ámbito bioquímico. Los primeros trabajos de entrecruzamiento que se realizaron, estaban encaminados a obtener información acerca de la topología de las proteínas membranales de eritrocitos⁶. Por otro lado, se han llevado a cabo experimentos en los cuales se han utilizado carbodiimidas como el 1-etil-3-[3-(dimetilamino)propil] carbodiimida, con el cual se ha determinado que el citocromo c soluble reacciona con la subunidad II de la citocromo oxidasa⁷ y que el citocromo c soluble interactúa con el citocromo b₅ de hígado de bovino.⁸ También se han llevado a cabo experimentos de marcaje del citocromo c soluble con reactivos que presentan grupos arilazido⁹, encontrándose que el citocromo c se une covalentemente con el citocromo c₁.

Con respecto a las subunidades del complejo bc₁ mitocondrial, se han llevado a cabo estudios en los que también se ha utilizado la 1-etil-3-[3-(dimetilamino)-propil] carbodiimida, con la cual se han podido obtener productos de entrecruzamiento entre las subunidades VIII y IV¹⁰, lo que sugiere que la subunidad VIII tiene un papel importante en la interacción entre el citocromo c₁ y el citocromo c soluble. Así mismo, con esta carbodiimida, se han logrado obtener productos de entrecruzamiento entre las subunidades I+II, II+VI, III+VI, IV+V, V+X, y VI+VII, observándose que el sitio de unión

⁶ Berg, H.C., Diamond, J.M. y Marfey, P.S. 1965. *Science*. 150:164-67.

Dutton, A., Adams, M. y Singer, S.J. 1966. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 23:730-39.

⁷ Millet, F., Darley-Ussmar, V. y Capaldi, R. 1982. *Biochem.* 21:3857-62.

⁸ Mauk, M.R. y Mauk, A.G. 1989. *Eur. J. Biochem.* 186:473-86.

⁹ Broger, C., Nalecz, M. y Azzi, A. 1980. *Biochim. Biophys. Acta.* 592:519-527.

¹⁰ Gutweniger, H., Grassl, C. y Bisson, R. 1983. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 116:272-83.

para el citocromo c, involucra a las subunidades IV, VIII y X del complejo bc₁ mitocondrial de bovino¹¹. También con el uso de análogos de lípidos fotoactivables¹² se han hecho estudios topológicos de las subunidades del complejo bc₁. El inconveniente de estos reactivos es que por lo general son homofuncionales y reaccionan solamente en una determinada condición. Por lo tanto decidimos utilizar el reactivo de entrecruzamiento heterobifuncional sulfosuccinimidil 2-(p-azidosalicilamido) etil-1,3'-ditiopropionato (SASD), con el que se han llevado a cabo diferentes estudios entre los que se encuentran, la determinación de la interacción entre lecitinas y su receptor celular en membranas de eritrocitos¹³ así como la interacción de fitohemaglutininas y su receptor celular en membranas de linfocitos¹⁴. Este reactivo también ha sido utilizado para estudiar la interacción entre lipopolisacáridos de *Escherichia coli* con albúmina de humano y de bovino¹⁵, así como para identificar el receptor celular de la interleucina-3 acoplada a este reactivo¹⁶. También se ha utilizado para identificar el receptor celular en neutrófilos del péptido N-formil-Met-Leu-Phe-Lys¹⁷. Más recientemente se han llevado a cabo estudios topológicos para determinar la relación que existe entre los componentes del complejo del citocromo b₆f en membranas de tilacoides de células de espinaca¹⁸.

¹¹ González-Halphen, D., Lindorfer, M.A. y Capaldi, R. 1988. *Biochem.* 27:7021-31.

¹² Gutweniger, H., Bisson, R. y Montecucco, C. 1981. *J. Biol. Chem.* 256:11132-36.

¹³ Ji, T.H. y Ji, I. 1982. *Anal. Biochem.* 121:286-89.

¹⁴ Shephard, E.G., de Beer, F.C., von Holt, C. y Hapgood, J.P. 1988. *Anal. Biochem.* 168:306-13.

¹⁵ Wollenweber, H-W. y Morrison, D.C. 1985. *J. Biol. Chem.* 260(28):15068-74.

¹⁶ Sorensen, P., Farber, N.M. y Krystal, G. 1986. *J. Biol. Chem.* 261(20):9094-97.

¹⁷ Allen, R.A., Tolley, J.O. y Jesitis, A.J. 1986. *Biochim. Biophys. Acta.* 882:271-80.

¹⁸ Shallan, M.A.-A.M., Radau, B., Salnikow, J. y Vater, J. 1991. *Biochim. Biophys. Acta.* 1057:64-68.

Dados los resultados anteriores, decidimos utilizar este reactivo para conocer con que otras subunidades del complejo bc₁ interactúa la proteína hierro-azufre; el enfoque utilizado se basó en disociar esta proteína del complejo, acoplarla al reactivo SASD y volverla a incorporar al complejo. Lo anterior solamente se puede realizar con un reactivo heterobifuncional como es el SASD.

Tomando como antecedentes otros trabajos¹¹ y ¹² supusimos que podríamos encontrar productos de entrecruzamiento entre las subunidades V+X, V+III, V+IV y V+XI, dado que estos polipéptidos parecen estar orientados hacia el espacio intermembranal (ver figura 3). Tomando en cuenta los estudios de EPR de Ohnishi y colaboradores¹⁹ se observa que hay una gran cercanía entre el centro Fe₂-S₂ de la proteína hierro-azufre y el hemo tipo b₅₆₆ de la subunidad III, ubicándose ambas subunidades en el sitio P de la membrana (espacio intermembranal). Con base en lo anterior, supusimos que el principal producto de entrecruzamiento se debería de dar entre las subunidades V+III, por su topología y porque forman parte de la vía a través de la cual se lleva a cabo la transferencia de electrones dentro del complejo bc₁.

Los experimentos de entrecruzamiento se llevaron a cabo utilizando para ello el reactivo SASD acoplado a la proteína hierro-azufre en ausencia y presencia de yodo 125 (¹²⁵I). Con respecto a estos experimentos, como se menciona en los Resultados tenemos que bajo las condiciones en que se llevaron a cabo, **no fué posible visualizar y/o encontrar un producto de**

¹⁹ Ohnishi, T., Schägger, H., Melnhardt, S.W., LoBrutto, R., Link, Th. A. y von Jagow, G. 1989. J. Biol. Chem. 264(2):735-44.

entrecruzamiento ya sea entre el citocromo c soluble acoplado al reactivo SASD con la citocromo oxidasa n^o entre la proteína hierro-azufre y el complejo bc, carente de esta subunidad.

Nuestras condiciones experimentales pueden no haber sido las óptimas para que ocurriera la reconstitución de la proteína hierro-azufre acoplada al reactivo SASD, o bien que este reactivo pudo haber modificado a la proteína hierro-azufre en algún (os) resíduo (s) esencial (es) para que se lleve a cabo la interacción entre esta subunidad y el resto del complejo. Si nuestra hipótesis de trabajo era correcta, el candidato con el cual podría interactuar la proteína hierro-azufre debería ser la hélice IV del citocromo b, que como se muestra en la figura 8 (ver Introducción) es anfífilica y está orientada hacia el lado externo de la membrana interna mitocondrial. Al respecto, existen 3 trabajos en los cuales se llevaron a cabo 35 mutaciones puntuales en el gen que codifica para la proteína hierro-azufre de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*²⁰. Estas mutaciones comprenden una gran parte de la proteína, desde la porción del amino terminal hasta la porción carboxilo terminal. Una serie de mutaciones, en las cisteínas e histidinas altamente conservadas, impide la asociación del centro hierro-azufre. Otra serie de mutantes, en particular las de Lis 31, 44 y 51 y Arg 35 y 53 que se encuentran en la porción anfífilica de la proteína, podrían desestabilizar la interacción de esta proteína y el resto del complejo. La unión del reactivo SASD a la proteína hierro-azufre

²⁰ Ljungdahl, P.O., Beckmann, J.D. y Trumpower, B.L. 1989. J. Biol. Chem. 264(7):3723-31.
Graham, L.A. y Trumpower, B.L. 1991. J. Biol. Chem. 266(33):22485-92.
Graham, L.A., Brandt, U., Sargent, J.S. y Trumpower, B.L. 1992. J. Bioenerg. Biomemb. 25(3):245-57.

podiera provocar algún tipo de modificación en residuos de lisina o arginina que desestabilizaran la interacción entre la proteína fierro-azufre y el resto del complejo. Dado que la porción de la hidrosuccinimida del reactivo reacciona preferentemente con residuos de lisina y arginina, existen 25 sitios posibles distribuidos a lo largo de la secuencia de la proteína fierro-azufre²¹. También hay que considerar el hecho de que la proteína fierro-azufre cuando se encuentra pura tiende a agregarse, lo cual pudiera explicar la similitud de los patrones obtenidos entre las muestras irradiadas y no irradiadas.

Con respecto a la ubicación de la proteína fierro-azufre en el complejo bc₁, existen 2 modelos propuestos:

El primero de ellos se basa en los resultados de los estudios realizados por diferentes grupos, en los cuales se han utilizado análogos de lípidos fotoactivables, pruebas de digestión con proteasas y experimentos de entrecruzamiento²², que sugieren que la proteína fierro-azufre se encuentra ubicada en el lado externo (citoplasmático) de la membrana interna mitocondrial y que muy posiblemente interactúa con el resto del complejo bc₁, a través de la porción hidrofóbica de 20 residuos de aminoácidos que comprenden a los residuos 33 a 52. La importancia de

²¹ Schägger, H., Borchart, U., Machleidt, W., Link, T.A. y von Jagow, G. 1987. FEBS Lett. 219(1):161-68.

²² Gulweniger, H., Bisson, R. y Montecucco, C. 1981. J. Biol. Chem. 256(21):11132-36.
González-Halphen, D., Lindorfer, M.A. y Capaldi, R. 1988. Biochem. 27:7021-31.
Li, Y., De Vries, S., Leonard, K. y Welss, H. 1981. FEBS Lett. 135(2):277-80.
Cocco, T., Lorusso, M., Sardanelli, A.M., Minuto, M., Ronchi, S., Tedeschi, G. y Papa, S. 1991. Eur. J. Biochem. 195:731-34.
González-Halphen, D., Vázquez-Acevedo, M. y García-Ponce, B. 1991. J. Biol. Chem. 266(6):3870-76.

esta porción de 20 residuos de aminoácidos ha sido demostrada utilizando un polipéptido sintético el cual compete eficazmente con la proteína hierro-azufre intacta cuando se realizan experimentos de reconstitución con un complejo bc, carente de esta subunidad²². Otras evidencias que apoyan este modelo se basan en el hecho de que se ha logrado disociar relativamente fácil esta subunidad a partir del complejo bc, por diferentes métodos de purificación²³, así como el hecho de que también se ha podido disociar esta subunidad en un 80%, al lavar membranas mitocondriales de *Neurospora crassa* con soluciones alcalinas (100 mM de carbonato de sodio)²⁴.

Este último criterio no es muy válido porque en condiciones similares se ha logrado remover al citocromo b₆, que es una proteína hidrofóbica transmembranal, de membranas tilacoidales de cloroplastos²⁵.

En el segundo modelo, se propone que la proteína hierro-azufre interactúa con el resto del complejo bc, como una proteína que presenta un cruce transmembranal clásico, como lo demuestran los trabajos de marcaje y proteólisis²⁶ en los cuales se realiza un estudio topográfico del complejo de la succinato-citocromo c reductasa en partículas submitocondriales, marcando estas con yodo 125 y encontrándose que la proteína hierro-azufre se marca tanto en la porción de la matriz como en la región citoplasmática de la membrana mitocondrial. En el segundo trabajo, los autores realizan también un estudio topológico, pero ahora lo hacen con las

-
- ²³ Trumpower, B.L. y Edwards, C.A. 1979. J. Biol. Chem. 254(17):8697-8706.
Engel, W.D., Michalski, C. y von Jagow, G. 1983. Eur. J. Biochem. 132:395-402.
²⁴ Shimomura, Y., Nishikimi, M. y Ozawa, T. 1984. J. Biol. Chem. 259(25):14059-63.
Hartl, F.-U., Schmidt, B., Wachter, E., Weiss, H. y Neupert, W. 1986. Cell. 47:939-51.
²⁵ Szczepaniak, A. y Cramer, W.A. 1991. EMBO J. 10:2757-64.
²⁶ D'Souza, M.P. y Wilson, D.F. 1982. J. Biol. Chem. 257(19):11760-66.
Ortiz, W. y Malkin, R. 1985. Biochim. Biophys. Acta. 808:164-70.

subunidades del complejo b_6f , utilizando para ello el marcaje con el reactivo trinitrobenzensulfonato marcado radioactivamente con carbono 14 (TNBS- ^{14}C) y la digestión enzimática con pronasa K, encontrando que la proteína hierro-azufre tiene un posible arreglo transmembranal, dado que no reacciona con el reactivo TNBS- ^{14}C pero es digerida por la acción de la pronasa K.

Por otro lado, Harnisch y colaboradores²⁷ determinaron la estructura primaria para la proteína hierro-azufre de *Neurospora* a partir de la secuenciación del gen y de la utilización de un ADN complementario de esta subunidad, llegando con base en sus resultados, a la construcción de un modelo que presenta un cruce transmembranal, considerando que la secuencia del gen presenta una región altamente hidrofóbica que comprende 25 residuos de aminoácidos, (ver figura 34 A). Finalmente en el trabajo publicado recientemente por Van Doren y colaboradores²⁸, los autores utilizan como modelo experimental al complejo bc_1 de la bacteria fotosintética *Rhodobacter sphaeroides*. En este trabajo se encontró que la proteína hierro-azufre se une a las membranas de *Escherichia coli* y de *Rhodobacter sphaeroides* en **ausencia** de los citocromos b y c, y que el ensamblaje del centro Fe_2-S_2 se lleva a cabo también en **ausencia** de ambos citocromos. Además, los autores observaron que al realizar un corte proteolítico de la porción con la cual se ancla la proteína hierro-azufre a la membrana, se libera un producto que es altamente soluble en agua. Por lo anterior Van Doren y colaboradores sugieren que la proteína hierro-azufre se une a la

²⁷ Harnisch, U., Weiss, H. y Sebald, W. 1985. Eur. J. Biochem. 149:95-99.

²⁸ Van Doren, S.R., Yun, Ch-H., Crofts, A.R. y Gennis, R.B. 1993. Biochem. 32:628-36.

membrana a través de una hélice transmembranal hidrofóbica localizada en el extremo amino terminal.

Además, es interesante hacer notar el hecho de que la porción hidrofóbica de la proteína hierro-azufre está altamente conservada en varias especies, como lo demuestran los datos recopilados por Van Doren y colaboradores, siendo esto importante dado que un patrón similar de residuos de aminoácidos altamente conservados se han encontrado en varias hélices transmembranales del centro de reacción fotosintético²⁹, donde las regiones más conservadas de las hélices están involucradas en las interacciones con proteínas, en tanto que las menos conservadas lo están con la bicapa de lípidos.

Considerando lo anteriormente expuesto, es muy difícil estar a favor de los dos diferentes modelos (figura 34), dado que para ambos existen bastantes y muy buenas evidencias experimentales. Consideramos que el modelo experimental propuesto en el presente trabajo donde se utiliza el reactivo de entrecruzamiento heterobifuncional SASD, a pesar de no haber proporcionado resultados concluyentes, es un enfoque interesante para resolver el problema de la topología de la proteína hierro-azufre.

²⁹ Komiyama, H., Yeates, T.O., Rees, D.C., Allen, J.P. y Feher, G. 1988. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:9012-16.

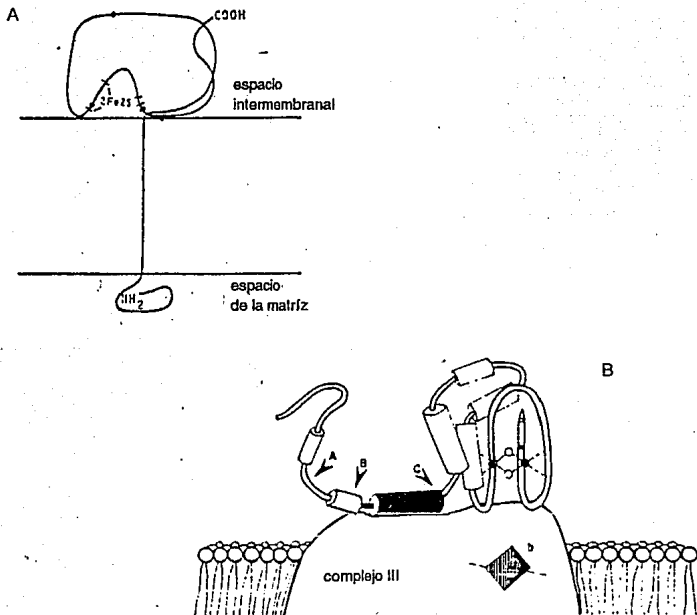


Figura 34. Modelos propuestos para la posible ubicación de la proteína hierro-azufre en el complejo bc₁ mitocondrial. (A) con un cruce transmembranal y (B) sin un cruce transmembranal clásico¹⁴

¹⁴

(A) Hamish, U., Weiss, H. y Sebald, W. 1985. Eur. J. Biochem. 149:95-99

(B) González-Halphen, D., Vázquez-Acevedo, M. y García-Ponce, B. 1992. J. Biol. Chem. 266(6):3870-76

V CONCLUSIONES

- * Se estandarizaron las condiciones óptimas para la utilización del reactivo de entrecruzamiento heterobifuncional sulfosuccinimidil 2-(ρ -azidosalicilamido) etil-1,3'-ditiopropionato (SASD).
- * Se modificaron y mejoraron las técnicas descritas por Rieske y Per O. Ljungdahl y colaboradores¹ para la purificación del complejo bc₁ mitocondrial, obteniéndose con Nuestro Método, una preparación con un alto grado de pureza.
- * También se modificó y mejoró la técnica descrita por Y. Shimomura y colaboradores² para la purificación de la proteína hierro-azufre. Obteniéndose también una preparación para esta proteína que presenta un alto grado de pureza, como lo hicieron evidente los geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio, las inmunorréplicas tipo Western y la cuantificación de hierro en la proteína.
- * Se demostró la modificación fotoquímica de la proteína hierro-azufre purificada, por el reactivo yodado SASD.
- * Se demostró la modificación fotoquímica del reactivo SASD en presencia de luz ultravioleta.
- * En las condiciones experimentales exploradas, no se encontró un producto de entrecruzamiento covalente entre la proteína hierro-azufre y alguna subunidad del complejo bc₁. **Pensamos esto se debe esencialmente a un fenómeno de agregación de la proteína hierro-azufre modificada.**

¹ Rieske, J.S. 1967. *Methods Enzymol.* 10:229-39.
Ljungdahl, P.O., Pennoyer, J.D., Robertson, D.E. y Trumpower, B.L. 1987. *Biochim. Biophys. Acta.* 891:227-41.

² Shimomura, Y., Nishikimi, M. y Ozawa, T. 1984. *J. Biol. Chem.* 259(25):14059-63.

VI PERSPECTIVAS.

Las perspectivas para este y otros trabajos relacionados con la estructura y/o la topología de las subunidades del complejo bc, mitocondrial se han visto limitados considerablemente a partir de que se realizó la cristalización de este complejo por 3 grupos diferentes¹. A pesar de ello, este trabajo sentó las bases para la utilización del reactivo de entrecruzamiento heterobifuncional SASD como una herramienta alternativa para abordar el problema referente a la ubicación y relación de la proteína hierro-azufre ó subunidad V, con las demás subunidades del complejo bc, mitocondrial de bovino.

A futuro se pueden llevar a cabo experimentos en los cuales se utilicen agentes reductores después de haber realizado la reacción de entrecruzamiento entre las proteínas deseadas, en este caso la proteína hierro-azufre y la subunidad (es) "X" del complejo bc, para liberar la porción arilizado marcada con ¹²⁵I y tratar de visualizar la subunidad (es) que presenten marca con el ¹²⁵I, (que serían muy posiblemente con las que se formara el producto de entrecruzamiento), por medio de autorradiografías, en lugar de buscar un producto formado por el complejo proteína hierro-azufre-ASD-¹²⁵I-proteína "X".

¹ Yue, W-H., Zou, Y-P., Yu, L. y Yu, Ch-A. 1991. *Biochem.* 30:2303-06.
Kubota, T., Kawamoto, M., Fukuyama, K., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S. y Matsubara, H. 1991. *J. Mol. Biol.* 221:379-82.
Berry, E.A., Huang, L., Earnest, T.N. y Jap, B.K. 1992. *J. Mol. Biol.* 224:1161-66.

Otra cosa que se pudiera intentar, sería adicionar el reactivo SASD-¹²⁵I a una preparación de complejo bc₁ puro en el amortiguador de acoplamiento (fosfato de sodio 0.1 M pH 8.4) en presencia de algún detergente (Triton X-100, desoxicolato de sodio, etc) para disociar a las subunidades del complejo, seguido de esto se irradiaría la solución con luz ultravioleta de onda corta (256 nm) para a continuación determinar si se realizó o no la formación de algún producto de entrecruzamiento entre la proteína fierro-azufre y alguna subunidad (es) del complejo bc₁, por medio de electroforésis en presencia del agente reductor β-mercaptoetanol seguida de autorradiografías.

También sería interesante tratar de realizar reconstituciones heterólogas, como las realizadas por González-Pedrajo y colaboradores², sólo que en este caso se pudiera utilizar primeramente la proteína fierro-azufre del complejo bc₁ de bovino con un complejo bc₁ bacteriano carente de esta subunidad y de llevarse a cabo la reconstitución, se pudiera intentar utilizar a la proteína fierro-azufre acoplada al reactivo SASD-¹²⁵I para tratar de ver con qué otra subunidad del complejo bc₁ bacteriano interactúa esta proteína. Considerando que las subunidades que presentan a los grupos prostéticos óxido-reductores presentan una alta similitud y conservación en sus residuos de aminoácidos, citocromo b, citocromo c, y proteína fierro-azufre, se pudiera intentar llevar a cabo reconstituciones heterólogas con complejos b₆f o bc₁, carentes de esta subunidad que pudieran ser de células de cloroplasto, papa o

² González-Pedrajo, Bertha María Josefina. 1993. Purificación y Caracterización del complejo bc₁ de la Bacteria Fotosintética *Rhodospira rubra*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. U.N.A.M.

de otros organismos eucariontes como lo es la levadura *Saccharomyces cerevisiae* con la proteína fierro-azufre de bovino.

VII APENDICE I

Determinación de proteínas:

Las proteínas obtenidas y usadas en este trabajo, fueron cuantificadas por los siguientes métodos:

* Método del biuret¹

Esta técnica se utilizó para determinar la concentración de proteína total en las mitocondrias para la purificación del complejo bc, y se basa en la reacción de cobre en una solución alcalina con las uniones peptídicas y los residuos de tirosina. Los reactivos que se utilizan son:

* sulfato cúprico	1.5 gr
* tartrato de sodio y potasio	6.0 gr

estos reactivos se disuelven en 500 ml de agua tibia (previamente hervida) añadiéndose 300 ml de sosa al 10%, finalmente se afora a 1 litro con agua tibia.

Se utiliza una curva patrón de seroalbúmina de bovino con una concentración de 10 mg/ml. La curva se hace de 0 a 200 mg (con intervalos de 20), se afora a 800 μ l y se adicionan 200 μ l de desoxicolato de potasio al 10% y 2 ml de reactivo de biuret.

Se deja incubar durante 30 min a temperatura ambiente y se lee en un espectrofotómetro (Shimadzu UV160U) a 540 nm.

¹ Gornall, A.G., Bardawill, C.J. y David, M.M. 1949. J. Biol. Chem. 177:751-66.

*** Método de Lowry²**

Este método, modificado por Markwell y colaboradores, se utilizó para determinar la concentración de las proteínas utilizadas en este trabajo, a diferencia del método del biuret esta técnica es 10 veces más sensible.

Las soluciones utilizadas en esta técnica son:

*** Solución A**

carbonato de sodio	2.00%
hidróxido de sodio	0.40%
tartrato de sodio y potasio	1.16%
dodecil sulfato de sodio	1.00%

*** Solución B**

sulfato de cobre	4.00%
------------------	-------

Al igual que en la técnica del biuret, en este método también se elabora una curva patrón con seroalbúmina de bovino a una concentración de 1 mg/ml, el intervalo de la curva es de 0 a 100 mg (con intervalos de 10). A partir de las soluciones anteriores (A y B), se preparan las soluciones finales que se van a utilizar, de la siguiente manera:

² Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Lewis, F.L. y Randall, R.J. 1951. J. Biol. Chem. 193:265-75. Markwell, M.A.K., Hass, S.M., Bieber, L.L. y Tolbert, N.E. 1978. Anal. Biochem. 87:206-10.

*** Solución C**

Se mezclan

100 volúmenes de la solución A y

1 volumen de la solución B

*** Solución D**

Se mezclan

1 volumen del reactivo de Folin y

1 volumen de agua bidestilada

Tanto las muestras como la curva patrón, se llevan a un volumen final de 1 ml con agua bidestilada, se agregan 3 ml de la solución C y se deja incubar durante 10 min a temperatura ambiente. Después, se añaden 300 μ l de la solución D a cada tubo, y se deja incubar durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, se lee en un espectrofotómetro (Shimadzu UV160U) a 540 nm.

VIII APENDICE II

En esta sección se describen los experimentos que se hicieron, encaminados a comprobar la sensibilidad y el funcionamiento del reactivo de entrecruzamiento heterobifuncional sulfosuccinimidil 2-(p-azidosalicilamido)etil-1,3'-ditiopropionato que en el trabajo se denominó SASD.

Para estar seguros de que este reactivo era sensible a la irradiación con luz ultravioleta, se irradio el reactivo bajo 4 condiciones distintas:

- | | |
|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| * Luz Roja de Seguridad | tiempo: 0,30,60 y 90 segundos
2,3,5,10,20 y 60 minutos |
| * Luz Solar | tiempo: 0,30 y 60 minutos |
| * Luz ultravioleta de onda larga
(366 nm) | tiempo: 0,30,60 y 90 segundos
2,3,5,10,20 y 60 minutos |
| * Luz ultravioleta de onda corta
(254 nm) | tiempo: 0,30,60 y 90 segundos
2,3,5,10,20 y 60 minutos |

de acuerdo con el trabajo de Horst-Werner y Morrison¹, haciendo registros de la variación en la absorbancia del reactivo SASD con respecto al tiempo de irradiación en un Espectrofotómetro Beckman DU-50 en un intervalo de 330 a 230 nm. Estos registros se hicieron en el laboratorio del *Dr. Salvador Uribe Carvajal, en el Departamento de Microbiología del Instituto de Fisiología Celular de la U.N.A.M.*, obteniéndose los siguientes resultados:

Al irradiar el reactivo con luz roja de seguridad se observa en la figura 35 que no hay variación en la absorbancia del reactivo con respecto a los tiempos de irradiación que se utilizaron, esto nos indica que no hubo modificación del reactivo SASD por

¹ Horst-Werner, Wollenweber y David C. Morrison. 1985. J. Biol. Chem. 260(28):15068-74.

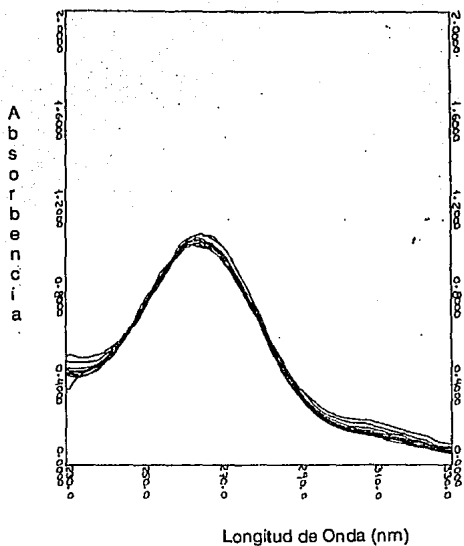


Figura 35. Barrido espectrofotométrico del reactivo SASD después de irradiarlo con luz roja de seguridad

tiempo	0 seg
	30
	60
	90
	2 min
	3
	5
	10
	20
	60

parte de la luz roja de seguridad que fué la iluminación que se utilizó durante la realización de los experimentos de entrecruzamiento.

Cuando se irradió el reactivo con la luz solar, se observa en la figura 36 que en los tres tiempos de irradiación utilizados se alcanza un grado de modificación del reactivo SASD similar al obtenido por la irradiación del reactivo con la luz ultravioleta de onda larga como se puede observar en la figura 37. Como se aprecia en la figura 38 el mayor grado de modificación del reactivo SASD, se obtiene al irradiar este con la luz ultravioleta de onda corta (254 nm). Se aprecian mejor estos resultados, al graficar la variación en la absorbancia del reactivo SASD con respecto a los tiempos de irradiación utilizados en cada caso como se observa en la figura 39 en la cual tenemos que no hay variación en la absorbancia al utilizar la luz roja de seguridad, mientras que con la luz del sol así como con la luz ultravioleta de onda larga (366 nm) se tienen patrones similares de disminución de la absorbancia, mientras que con la luz ultravioleta de onda corta se obtiene la mayor disminución de absorbancia para el reactivo SASD. Si se hace una gráfica en la cual relacionamos el porcentaje de modificación del reactivo SASD con respecto al tiempo de irradiación utilizado en cada caso, tenemos un comportamiento inverso como se muestra en la figura 40, es decir, con la luz roja no hay una modificación aparente del reactivo SASD, mientras que para la irradiación con la luz del sol y con la luz ultravioleta de onda larga (366 nm) se obtiene aproximadamente un 75% de modificación del reactivo, en tanto que el mayor porcentaje de modificación del reactivo (aproximadamente el 100%) se obtiene

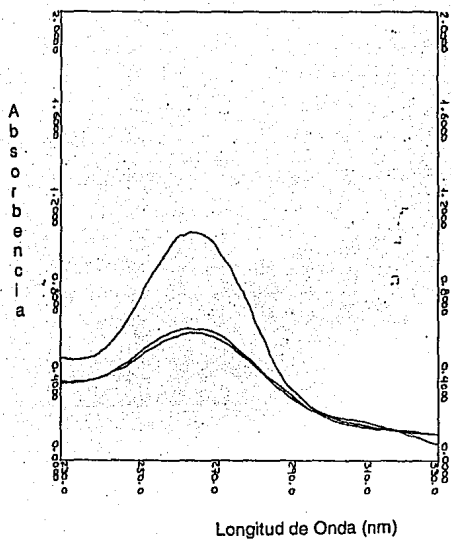


Figura 36. Barrido espectrofotométrico del reactivo SASD después de irradiarlo con luz solar

tiempo	0 min
	30
	60

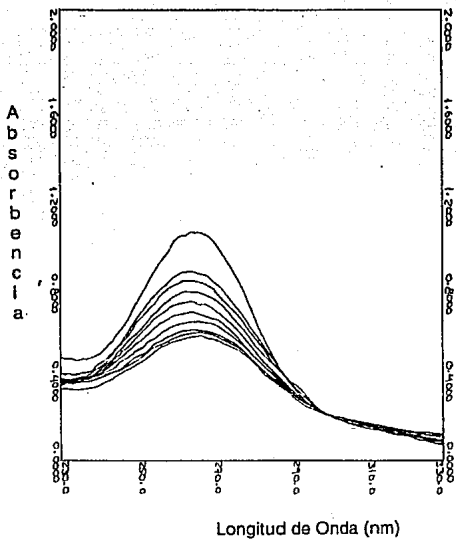


Figura 37. Barrido espectrofotométrico para el reactivo SASD después de irradiarlo con luz ultravioleta de onda larga (366 nm)

tiempo 0 seg
 30
 60
 90
 2 min
 3
 5
 10
 20
 60

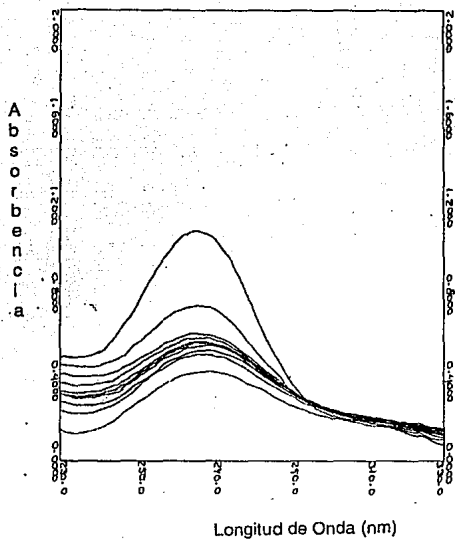


Figura 38. Barrido espectrofotométrico para el reactivo SASD después de irradiarlo con luz ultravioleta de onda corta (254 nm)

tiempo	0 seg
	30
	60
	90
	2 min
	3
	5
	10
	20
	60

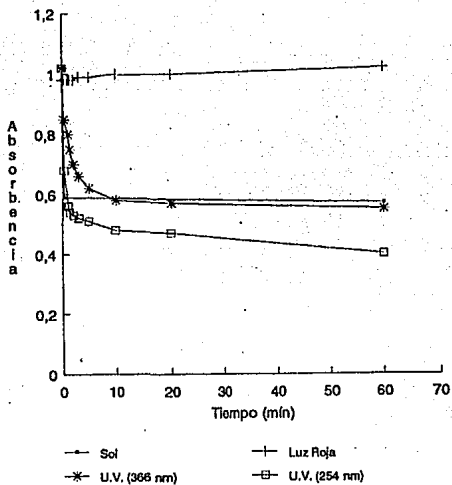


Figura.39. Curvas obtenidas para la variación en la absorbancia con respecto a los tiempos de irradiación en las 4 condiciones utilizadas

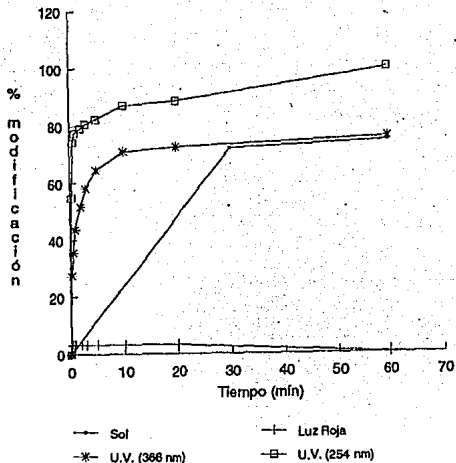


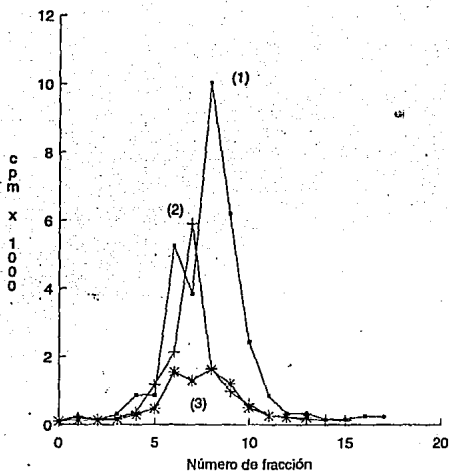
Figura 40. Curvas obtenidas para el porcentaje de modificación del reactivo SASD con respecto al tiempo de irradiación para las 4 condiciones utilizadas

con la luz ultravioleta de onda corta (254 nm). Por lo tanto, en los experimentos de entrecruzamiento se utilizó esta longitud de onda para activar al reactivo SASD acoplado ya sea a la proteína hierro-azufre ó al citocromo c soluble. El citocromo c también se utilizó para encontrar las condiciones adecuadas para acoplar el reactivo SASD a la proteína y para ello se utilizó al reactivo marcado con yodo 125 (SASD-¹²⁵I) con 6 amortiguadores distintos²:

- (1) fosfato de sodio 0.1 M pH 8.4
- (2) fosfato de sodio 0.1 M en presencia de Tween 20 al 0.02% pH 8.4
- (3) borato de sodio 0.1 M en presencia de Tween 20 al 0.02% pH 8.4
- (4) bicarbonato de sodio 0.1 M en presencia de Tween 20 al 0.02% pH 9.0
- (5) fosfato de sodio 0.1 M en presencia de Tween 20 al 0.02% pH 9.0 y
- (6) fosfato de sodio 0.1 M pH 9.0

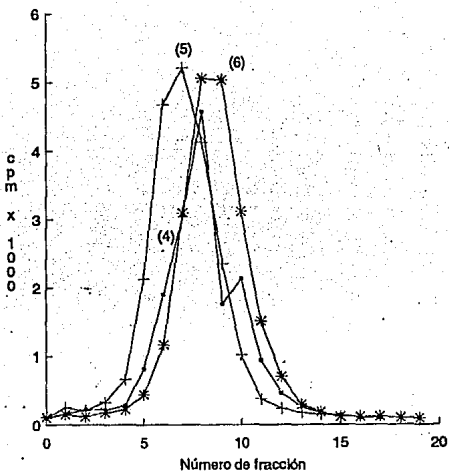
En las figuras 41 y 42 se muestran los gráficos obtenidos para las 6 condiciones anteriores. Al comparar ambas figuras, tenemos que la mayor incorporación de radioactividad al citocromo c soluble, lo tenemos en los 3 primeros amortiguadores en un pH de 8.4; mientras que para los amortiguadores con pH de 9.0 la incorporación es menor. Además de los 3 primeros amortiguadores, la mayor incorporación de radioactividad la tenemos con el amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M pH 8.4 por lo que este amortiguador fué el que utilizamos en los experimentos de entrecruzamiento.

² Manual de Pierce, que acompaña al reactivo SASD.
Horst-Werner, W. y Morrison, D.C. 1985. J. Biol. Chem. 260(28):15068-71.
Shephard, E.G., de Beer, F.C., von Holt, C. y Hapgood, J.P. 1988. Anal. Biochem. 168:306-13.
Allen, R.A., Tolley, J.O. y Jesitis, A.J. 1986. Biochim. Biophys. Acta. 882:271-80.



- 1) fosfato de sodio
- 2) fosfato de sodio/tween
- 3) borato de sodio/tween

Figura 41. Gráfico de la incorporación del reactivo SASD-¹²⁵I al citocromo c soluble en diferentes amortiguadores y un pH de 8.4



- 4) bicarbonato de sodio/tween
5) fosfato de sodio/tween
6) fosfato de sodio

Figura 42. Gráfico de la incorporación del reactivo SASD-¹²⁵I al citocromo c soluble en diferentes amortiguadores y un pH de 9.0

Finalmente las muestras obtenidas en las 6 condiciones anteriormente descritas, se sometieron a una electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio, después de lo cual se cortaron las bandas correspondientes al complejo cit c-ASD-¹²⁵I y se determinó la incorporación de radiactividad al citocromo c en cada condición experimental, obteniéndose las cpm para el yodo 125 por pmola de citocromo c soluble que se enlistan a continuación:

1) fosfato de sodio 0.1 M pH 8.4	92.6 cpm/pmola
2) fosfato de sodio 0.1 M pH 8.4 Tween 20 0.02%	62.9 cpm/pmola
3) borato de sodio 0.1 M pH 8.4 Tween 20 0.02%	18.9 cpm/pmola
4) bicarbonato de sodio 0.1 M pH 9.0 Tween 20 0.02%	44.8 cpm/pmola
5) fosfato de sodio 0.1 M pH 9.0 Tween 20 0.02%	65.0 cpm/pmola
6) fosfato de sodio 0.1 M pH 9.0	63.3 cpm/pmola

Como se observa el mayor número de cpm incorporadas al citocromo c soluble se obtienen nuevamente con el amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M pH 8.4, por lo que estas fueron las condiciones que se utilizaron para la incorporación del SASD-¹²⁵I a la proteína fierro-azufre.