

UCH-FC
Doc-B
829
C.1

ESTUDIO DE LA DESHIDROGENASA
SUCCINICA DE VEGETALES

Tesis
Entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Doctor en Ciencias con Mención en Biología

Facultad de Ciencias

por
Enrique Guillermo Oestreicher Abarzúa
Mayo, 1977

Profesor Patrocinante: Dr. Thomas P. Singer

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

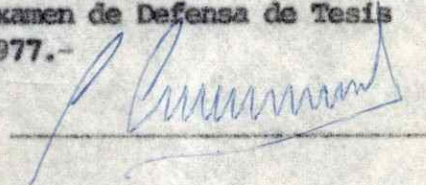
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Comisión de Doctorado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el Candidato

GUILLEMO OESTREICHER ABAZUA

Ha sido aprobada por el Comité Informante de Tesis como requisito de tesis para el Grado de Doctor en Ciencias con Mención en Biología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 21 de Junio de 1977.-

Dr. Luis Corcuera
Comisión Informante de Tesis



Dr. Bruce Cassels
Comisión Informante de Tesis



Dr. Lionel Gil
Comisión Informante de Tesis



Dr. Jaime Eyzaguirre
Comisión Informante de Tesis



Dr. Federico Leighton
Comisión Informante de Tesis



Dr. Thomas Singer
Patrocinante de Tesis



AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis agradecimientos más sinceros a las siguientes personas, cuya contribución ha sido de gran valor durante el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Nelson Carvajal, por su valioso aporte en la discusión y revisión final de este escrito.

A la Dra. Carmen González, por la generosa ayuda material entregada para la confección de esta tesis.

A la Dra. Edna B. Kearney, por su constante apoyo crítico y moral durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Schlomo Grossman, a la Sra. Jovita Goldenberg, y, en general, a todos los miembros de la División de Biología Molecular del Veterans Administration Hospital, San Francisco, California, por las facilidades otorgadas en la realización de la parte experimental de este trabajo, y la amistad brindada durante mi estadía en ese centro.

Al Prof. Dr. Thomas P. Singer, por su diligente dirección, su aporte constante de ideas en esta investigación y sus enseñanzas y críticas, muchas veces no bien entendidas, que han enriquecido mi formación científica en forma decisiva.

INDICE DE MATERIAS

	Pág.
LISTA DE TABLAS	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
ABREVIATURAS	xvi
RESUMEN	xvii
ABSTRACT	xx
INTRODUCCION	
I. PRESENTACION DEL PROBLEMA	1
II. REVISION HISTORICA	5
MATERIALES Y METODOS	
I. MATERIALES	
A. Reactivos	16
B. Proteínas	17
C. Microorganismos	17
D. Material cromatográfico	17
II. METODOS	
A. Aislamiento de mitocondrias	
1. Mitocondrias de colifor	18
2. Mitocondrias de poroto mung	19
B. Control de la calidad de las <u>prepa</u> raciones mitocondriales	19

	Pág.
C. Sonicación de las mitocondrias	20
D. Cultivo de células de levadura	20
E. Preparación de medios de cultivo libres de riboflavina	22
F. Obtención de las levaduras	22
G. Aislamiento de partículas submito- condriales de levadura	23
H. Cultivo de <u>Azotobacter vinelandii</u>	23
I. Aislamiento de la flavoxodina de <u>Azotobacter</u>	24
J. Obtención de la apoflavodoxina	25
K. Determinación de histidilFMN	
1. Determinación de histidilFMN en mitocondrias de vegetales	25
2. Determinación de histidilFMN en partículas submitocondriales de levadura	27
L. Determinación fluorimétrica de oxalo- acetato	27
M. Determinación del consumo de oxígeno	28
N. Determinación de actividades enzimá - ticas	
1. Determinación de la citocromooxida- sa	28
2. Determinación de la NADH oxidasa	28
3. Determinación de la succinoxidasa	29
4. Determinación de la NADH deshidro- genasa	29
5. Determinación de la deshidrogenasa succínica	29

	Pág.
O. Determinación de proteínas	30
P. Electroforesis de alto voltaje	30
Q. Ruptura reductiva del enlace covalen te flavina-histidina de la deshidro- genasa succínica de levaduras	30

RESULTADOS

I. PROPIEDADES Y CARACTERISTICAS DE LA DESHIDRO <u>GENASA SUCCINICA DE DICOTILEDONEAS</u>	
A. Determinación de la actividad enzimática	32
B. Activación por succinato	
1. Cinética de activación	38
2. Energía de activación	42
C. Determinación del número de recambio	42
II. REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE LA DESHIDROGE- NASA SUCCINICA DE DICOTILEDONEAS	
A. Grado de activación de la enzima	47
B. Activación por $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$	
1. Activación por $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ en mitocondrias sonicadas de porotó mung	52
2. Activación por $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ en mitocondrias sonicadas de coliflor	56
C. Activación por NADH y sustratos NAD-depen- dientes	
1. Activación por NADH en mitocondrias sonicadas	59
2. Activación por NADH y sustratos NAD- dependientes en mitocondrias intac- tas	62

	Pág.
D. Activación por ATP y ADP	
1. Activación por ATP y ADP en mitocon drias de poroto mung	68
2. Activación por ATP y ADP en mitocon drias de coliflor	71
E. Activación por ITP e IDP	75
F. Activación por aniones inorgánicos y pH ácido	
1. Cinética de activación	78
2. Relación entre activación de la des hidrogenasa succínica y contenido de oxaloacetato en mitocondrias de coli flor	81
G. Efecto del 2,4-dinitrofenol en la acti- vidad enzimática de la deshidrogenasa succínica	86
III. SUSTITUCION DEL GRUPO PROSTETICO DE LA DESHI- DROGENASA SUCCINICA POR ANALOGOS FLAVINICOS	
A. Enfoque experimental	88
B. Crecimiento de la cepa mutante HK 645 en presencia de diferentes flavinas	
1. Crecimiento aeróbico	92
2. Crecimiento anaeróbico	92
C. Análisis del contenido flavínico intra celular	97
D. Determinación de la actividad de la des hidrogenasa succínica y del contenido de 8 α -histidilflavina en levaduras cul tivadas con diferentes flavinas	100
E. Caracterización enzimática parcial de la cadena respiratoria de levaduras cultivadas en presencia de las diferen- tes flavinas.....	103

	Pág.
F. Efecto del pH en la fluorescencia de las 8 α -histidilflavinas	106
G. Espectro de excitación de la fluorescencia de los péptidos flavínicos	109
H. Solubilización y purificación parcial de la deshidrogenasa succínica de <u>Saccharomyces cerevisiae</u>	112
I. Inhibición de la deshidrogenasa succínica por tenoiltrifluoracetona.....	119
J. Deshidrogenasa succínica de levaduras de la cepa mutante HK 645 cultivadas en presencia de 7-metilriboflavina	
1. Número de recambio	124
2. Purificación de los péptidos flavínicos	127
3. Análisis cromatográfico de los péptidos flavínicos	130
4. Liberación de la flavina unida covalentemente a los péptidos	130
5. Identificación de la flavina unida covalentemente	136

DISCUSION

I. CARACTERISTICAS GENERALES DE LA ENZIMA DE DICOTILEDONEAS	
A. Determinación de la actividad enzimática..	139
B. Activación por succinato	142
C. Número de recambio	145

	Pág.
II. REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE LA DESHIDRO-	
GENASA SUCCINICA DE DICOTILEDONEAS	
A. Comparación de las propiedades regulato- rias de la deshidrogenasa succínica de coliflor y de poroto mung	146
B. Activación por $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$	147
C. Activación por ATP y ADP	150
D. Posible significación metabólica de la regulación de la deshidrogenasa succí- nica	152
III. SUSTITUCION DEL GRUPO PROSTETICO DE LA DES-	
HIDROGENASA SUCCINICA POR ANALOGOS FLAVINI-	
COS	
A. Metodica experimental empleada	156
B. Solubilización y purificación parcial de la deshidrogenasa succínica de leva - duras y aislamiento de los péptidos fla- vínicos resultantes de su hidrólisis	158
C. Unión de la flavina a la apoenzima	161
BIBLIOGRAFIA	165
APENDICE	174

LISTA DE TABLAS

Tabla		Pág.
I	Determinación del número de recambio de la deshidrogenasa succínica de mitocondrias de coliflor	49
II	Estado de activación de la deshidrogenasa succínica en mitocondrias intactas, soni - cadas y sometidas a ciclos de congelación y descongelación	51
III	Activación de la deshidrogenasa succínica de mitocondrias de coliflor por NADH y por malato más piruvato	66
IV	Activación de la deshidrogenasa succínica por bromuro y liberación del oxaloacetato ligado firmemente	85
V	Incorporación de flavinas en la deshidro - genasa succínica durante el crecimiento aeróbico de la levadura mutante HK 645	102
VI	Comparación de algunas actividades enzi - máticas de la cadena respiratoria de le - vaduras cultivadas con riboflavina, 7-me - tilriboflavina y 8-metilriboflavina	105
VII	Solubilización y purificación parcial de la deshidrogenasa succínica de levaduras....	118
VIII	Número de recambio de preparaciones par - ticuladas y solubles de la deshidrogenasa succínica de levaduras	123

Tabla		Pág.
IX	Número de recambio de la deshidrogenasa succínica de levaduras de la cepa HK 645 cultivadas con riboflavina y 7-metilriboflavina	126
X	Unión a la apoflavodoxina de los péptidos flavínicos obtenidos por digestión proteolítica de varias flavoenzimas.....	180
XI	Constantes de disociación de diferentes complejos apoflavodoxina-flavina sustituida en posición 8 α	185

LISTA DE FIGURAS

			Pág.
Fig.	1	Variación de la actividad enzimática de la deshidrogenasa succínica de coliflor en función de la concentración de PMS	34
Fig.	2	Curva de progreso de la activación de la deshidrogenasa succínica de coliflor por succinato 0,1 M a 29°	40
Fig.	3	Cinética de activación por succinato ...	44
Fig.	4	Gráfico de Arrhenius para la activación de la deshidrogenasa succínica en mitocondrias sonicadas de coliflor ..	46
Fig.	5	Activación de la deshidrogenasa succínica en mitocondrias sonicadas de poroto mung por CoQ_{10} reducida	54
Fig.	6	Activación por $\text{CoQ}_{10} \text{H}_2$ en mitocondrias sonicadas de coliflor	58
Fig.	7	Activación por NADH en mitocondrias sonicadas de poroto mung y de coliflor..	61
Fig.	8	Activación de la deshidrogenasa succínica en mitocondrias de coliflor por NADH 1 mM y por malato 20 mM más piruvato 20 mM	64
Fig.	9	Activación de la deshidrogenasa succínica por ATP y ADP en mitocondrias de poroto mung	70

	Pág.
Fig. 10 Efecto del ATP y ADP en la actividad de la deshidrogenasa succínica de <u>co</u> liflor	73
Fig. 11 Activación de la deshidrogenasa succínica por IDP en mitocondrias sonicadas de coliflor	77
Fig. 12 Curva de progreso de la activación de la deshidrogenasa succínica a pH á - cido, en presencia y ausencia de bromuro 0,1 M, en mitocondrias sonicadas de coliflor	80
Fig. 13 Cinética de activación de la deshi - drogenasa succínica a pH ácido, en presencia y ausencia de bromuro 0,1 M, en mitocondrias sonicadas de coli - flor	83
Fig. 14 Procedimiento experimental para iden - tificar la flavina del grupo prosté - tico de la deshidrogenasa succínica de levaduras.....	89
Fig. 15 Estructura de la riboflavina, 7-metil - riboflavina y 8-metilriboflavina	91
Fig. 16 Crecimiento aeróbico de la cepa mu - tante HK 645 de levadura	94
Fig. 17 Crecimiento anaeróbico de la cepa mu - tante HK 645 de levadura	96
Fig. 18 Análisis del contenido flavínico in - tracelular de levaduras cultivadas en presencia de riboflavina, 7-metilribo - flavina y 8-metilriboflavina	99

Fig. 19	Efecto del pH sobre la fluorescencia de péptidos flavínicos de la cepa HK 645 cultivada aeróbicamente con riboflavina, 7-metilriboflavina y 8-metilriboflavina	108
Fig. 20	Espectro de excitación de la fluorescencia de 7-metilriboflavina, 8-metilriboflavina y de los péptidos flavínicos provenientes de células de la cepa HK 645 cultivadas con esos análogos	111
Fig. 21	Filtración molecular en columna de Sephadex G-200 de la fracción precipitada entre 31,5 y 50,5% de saturación con sulfato de amonio	116
Fig. 22	Efecto inhibitorio del TTF sobre la deshidrogenasa succínica de preparaciones de ETP de levadura	121
Fig. 23	Esquema de la purificación de los péptidos flavínicos resultantes de la digestión proteolítica de la deshidrogenasa succínica	128
Fig. 24	Análisis cromatográfico de los péptidos flavínicos purificados mediante el uso de la apoflavodoxina	132
Fig. 25	Espectro de fluorescencia de los péptidos flavínicos antes y después de la reducción con Zn	135
Fig. 26	Identificación de la 7-metilriboflavina después de la reducción con Zn de los péptidos flavínicos	138

Fig. 27	Estructura probable del grupo prostético de la deshidrogenasa succínica sintetizada en presencia de riboflavina, 7-metilriboflavina y 8-metilriboflavina	164
Fig. 28	Filtración molecular en columna de Sephadex G-50 de digeridos proteolíticos de la deshidrogenasa succínica de corazón de vacuno, tratados con apoflavodoxina	177
Fig. 29	Titulación fluorimétrica de la apoflavodoxina con flavinas sustituidas en la posición 8 α	182
Fig. 30	Espectro de absorción de los complejos 8 α -(N-3)-histidilFMN-apoflavodoxina y péptido flavínico de la monoaminooxidasa-apoflavodoxina, en diversos estados de oxidación	188

ABREVIATURAS

ADP	=	adenosindifosfato
AMP	=	adenosinmonofosfato
ATP	=	adenosintrifosfato
CoQ ₁₀	=	forma oxidada de la coenzima Q ₁₀
CoQ ₁₀ H ₂	=	forma reducida de la coenzima Q ₁₀
DCIP	=	2,6-diclorofenolindofenol
DNF	=	2,4-dinitrofenol
DTT	=	ditiotreitol
ETP	=	partícula transportadora de electrones
FAD	=	flavinadenindinucleótido
FMN	=	flavinmononucleótido
GTP	=	guanosintrifosfato
HEPES	=	ácido N-2-hidroxietyl-N-2-etanosulfónico
IDP	=	inosindifosfato
ITP	=	inosintrifosfato
MES	=	ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
NADH	=	forma reducida del nicotinamidadenindinucleótido
NEM	=	N-otilmaleiimida
PMS	=	fenacinmetosulfato
Tris	=	tris-(hidroximetil)-aminometano
TTF	=	4,4,4-trifluor-1(2-tienil)-1,3-butanodiona

RESUMEN

En esta tesis se analizó la enzima deshidrogenasa succínica (succinato: aceptor oxidorreductasa E.C. 1.3.99.1) de vegetales, con respecto a ciertas características generales de la enzima particulada, a los mecanismos que regulan su actividad y a la sustitución de su grupo prostético por análogos de él. Los dos primeros aspectos se estudiaron en mitocondrias aisladas de dos especies de dicotiledóneas: Brassica oleracea L (coliflor) y Phaseolus aureus L variedad Jumbo (poroto. mung). El tercer punto se analizó en células de Saccharomyces cerevisiae (levadura de panadería).

Para determinar la actividad enzimática de la deshidrogenasa succínica de las mitocondrias de las dos dicotiledóneas, se adoptó el método espectrofotométrico del fenacimetosulfato. El aislamiento y ruptura sónica de estas mitocondrias se modificó con el objeto de lograr un máximo rendimiento y estabilidad de la enzima. La deshidrogenasa succínica de ambas especies vegetales se encuentra principalmente en el estado desactivado, pero su incubación con succinato produce una activación total de ella. Este proceso de activación se caracteriza por una energía de activación de aproximadamente 30.000 cal/mol, que es prácticamente la misma que

la determinada en tejidos animales. Al igual que en estos tejidos, la enzima contiene la flavina unida covalentemente (8 α -histidilFAD) y el número de recambio es 19.400 min⁻¹, a pH 7,5 y 38°.

Se investigó el efecto de varios agentes en el grado de activación de la enzima en mitocondrias intactas y sonicadas de coliflor y poroto mung. Los resultados obtenidos indican que la coenzima Q₁₀, el IDP, el ITP, el pH ácido y ciertos aniones, activan la enzima en igual forma que en mitocondrias de mamíferos. Sin embargo, existen diferencias en el comportamiento de la enzima en relación al efecto del ATP, ADP, NADH, sustratos NAD-dependientes y del 2,4-dinitrofenol. En mitocondrias de mamíferos, el ATP activa la deshidrogenasa, mientras que el ADP no presenta efecto activador y el efecto del ATP se manifiesta sólo en mitocondrias intactas. En cambio, tanto en mitocondrias intactas como dañadas de coliflor y poroto mung, tanto el ATP como el ADP activan la enzima. En mitocondrias sonicadas, al igual que en partículas submitocondriales de mamíferos, el NADH produce una activación completa de la enzima. Sin embargo, en mitocondrias intactas y sonicadas de coliflor, la activación por NADH es incompleta, así como lo es la activación por sustratos NAD-dependientes y por la combinación de éstos y NADH. A diferencia de lo que sucede en mitocondrias de mamíferos, en mitocondrias de coliflor y de poroto mung la deshidrogenasa succínica no se desactiva por las condiciones oxidativas producidas por el desacoplamiento de la

fosforilación oxidativa mediante el 2,4-dinitrofenol.

La sustitución del grupo prostético de la deshidrogenasa succínica se realizó en levaduras de la cepa HK 645, una cepa que requiere la presencia de flavinas para su crecimiento. Esta propiedad permitió cultivar esta cepa con diferentes análogos de riboflavina, tales como la 7-metilriboflavina y la 8-metilriboflavina y lograr la incorporación de ellos a la enzima, dando origen a una flavoproteína activa. La identificación de la flavina del grupo prostético se realizó con la enzima obtenida en presencia de 7-metilriboflavina, mediante un procedimiento consistente en la solubilización y purificación de la flavoproteína, el aislamiento de los péptidos flavínicos resultantes de la digestión proteolítica de ella y la ruptura del enlace covalente flavina-proteína. La flavina libre resultante de este tratamiento fue la 7-metilriboflavina. Esto demuestra la sustitución total de la riboflavina por el análogo en el grupo prostético de la enzima.

ABSTRACT

Plant succinate dehydrogenase (succinate: acceptor oxidoreductase E.C. 1.3.99.1) was studied in relation to the general characteristics of the particulated form of the enzyme, the mechanisms that regulate its activity and the substitution of its prosthetic group. The first two aspects were investigated in mitochondria isolated from two plant species: Brassica oleracea L. (cauliflower) and Phaseolus aureus L. variety Jumbo (mung bean). The third point was analyzed in Saccharomyces cerevisiae (baker's yeast).

The determination of the enzymatic activity of succinate dehydrogenase in mitochondria from both higher plant species, was performed by an adaptation of the spectrophotometric phenazine methosulfate assay. Procedures in the literature for isolation and **sonic** disruption of mitochondria from these sources were modified to assure maximal yield and stability of the enzyme. Succinate dehydrogenase in mung bean and cauliflower mitochondria exists mainly in a deactivated state but incubation of it with succinate leads to its full activation. The energy of activation for the conversion of the deactivated to activated form of the enzyme under the influence of substrate is about 30,000 cal/mol. As

in animal tissues, the enzyme appears to contain covalently bound flavin (8α -histidylFAD) and the turnover number is $19,400 \text{ min}^{-1}$ at pH 7,5 and 38° .

The effect of various agents on the activation of succinate dehydrogenase in cauliflower and mung bean mitochondria and in sonicated particles was investigated. Reduced coenzyme Q_{10} , IDP, ITP, acid pH and anions activate the plant enzyme in the same manner as in mammalian mitochondria. Significant differences were detected in the behavior of plant and animal preparations in the effects of ATP, ADP, NADH, NAD-linked substrated and of 2,4-dinitrophenol. In mammalian mitochondria ATP activates the enzyme, whereas ADP does not, and the ATP effect is shown only in intact mitochondria. In mung bean and cauliflower mitochondria, as in sonicated and frozen-thawed preparations, both ATP and ADP activate the enzyme. In sonicated mung bean mitochondria NADH causes complete activation, as in mammalian submitochondrial particles, but in intact and in sonicated cauliflower mitochondria, activation by NADH is incomplete. Moreover, neither NAD-linked substrates nor a combination of these with NADH can fully activate the enzyme in cauliflower mitochondria. In contrast to mammalian mitochondria, succinate dehydrogenase is not deactivated in cauliflower or mung bean mitochondria under the oxidized conditions brought about by uncoupling of oxidative phosphorylation by 2,4-dinitrophenol.

The substitution of the prosthetic group of succinate dehydrogenase was performed in the yeast mutant HK 645, a riboflavinless mutant. This characteristics allowed the growth of the mutant in the presence of different riboflavin analogs, such as 7-methylriboflavin and 8-methylriboflavin and the incorporation of them into the enzyme, giving rise to an active succinate dehydrogenase. The identification of the flavin which form part of the prosthetic group of the enzyme obtained in the presence of 7-methylriboflavin was achieved by a procedure involving solubilization and purification of the flavoprotein, isolation of the flavin peptides resulting from the proteolytic digestion of it and cleavage of the covalent flavin-protein bond. The free flavin resulting from such treatment was 7-methylriboflavin. These data are consistent with a complete substitution of the analog for riboflavin in the prosthetic group of the enzyme.

INTRODUCCION

I PRESENTACION DEL PROBLEMA

A pesar de que hace muchos años se aislaron y caracterizaron las flavoproteínas más importantes de la cadena respiratoria de mitocondrias de mamíferos, sólo recientemente ha comenzado la caracterización de las flavoproteínas de mitocondrias de vegetales superiores (1). Hasta la fecha sólo se ha publicado un intento de purificación de una de estas flavoproteínas, la deshidrogenasa succínica de Phaseolus vulgaris L (2). Este atraso puede atribuirse en gran parte a problemas relacionados con la preparación de mitocondrias de vegetales superiores, debido a la presencia en las células vegetales de una pared celular muy resistente y de grandes vacuolas acídicas, así como a su bajo contenido de mitocondrias. Todos estos factores complican enormemente el procedimiento preparativo, ya que se requieren grandes cantidades de material vegetal y de medio de aislamiento, además de un largo período de preparación.

Una de las flavoproteínas más estudiadas y mejor caracterizada es la deshidrogenasa succínica de mamíferos y otras especies no vegetales. Se trata de una flavoenzima cuyas propiedades reflejan las

necesidades metabólicas de la célula (3). En células aeróbicas, esta enzima está diseñada para favorecer la oxidación de succinato a fumarato, con la concomitante conservación de la energía. Esta enzima aeróbica es regulable (4-6), siempre se encuentra unida a membranas (3), y en todos los casos estudiados contiene FAD unido covalentemente a un residuo de histidina de la apoproteína (7-12). En células anaeróbicas, en cambio, donde el fumarato generalmente actúa como un oxidante terminal reemplazando al oxígeno, el proceso favorecido por la acción enzimática es la reducción de fumarato a succinato, proporcionando de esta manera un mecanismo para la reoxidación del NADH generado en la glicólisis o fermentación (3). En la enzima anaeróbica, el FAD está unido no covalentemente a la apoproteína y la enzima, al parecer, no estaría sometida al mismo tipo de regulación que afecta a la enzima de organismos aeróbicos (13, 14). Por último, en organismos anaeróbicos facultativos, al parecer existirían ambos tipos de enzima (15).

El objetivo de esta tesis fue analizar la enzima deshidrogenasa succínica (succinato: aceptor oxidorreductasa E.C. 1.3.99.1) en vegetales, poniendo especial énfasis en las propiedades y características generales de la enzima particulada, en los mecanismos de regulación de su actividad y en la sustitución de su grupo prostético por análogos de él.

Los dos primeros puntos mencionados anteriormente, se estudiaron en mitocondrias y partículas submitocondriales aisladas de dos especies de dicotiledóneas: coliflor (Brassica oleracea L) y poroto mung (Phaseolus aureus L variedad Jumbo). El punto restante, vale decir el reemplazo del grupo prostético de la flavoproteína por análogos de él, se realizó en un vegetal unicelular, la levadura (Saccharomyces cerevisiae), debido a que constituye un sistema experimental mucho más sencillo que las dicotiledóneas para llevar a cabo un estudio de esa naturaleza, ya que en general en organismos pluricelulares, los procesos biosintéticos son lentos, dependientes del funcionamiento de los tejidos, órganos y sistemas que forman dicho organismo y están sometidos a múltiples mecanismos de regulación, mucho de los cuales pueden escapar a un control experimental, por muy riguroso que éste sea.

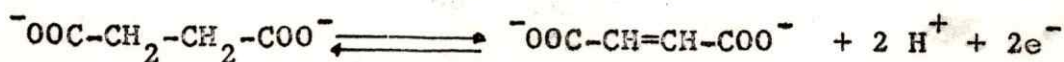
Se eligió la deshidrogenasa succínica, dada la reconocida importancia de esta flavoproteína en la generación de energía a nivel mitocondrial, así como en la adaptación de los organismos a diferentes condiciones de suministro de O_2 (3). Además, como se mencionó anteriormente, la deshidrogenasa succínica de mamíferos está bastante bien caracterizada, lo cual permite establecer una comparación entre las especies moleculares presentes en organismos aeróbicos tan separados evolutivamente como los mamíferos y las dicotiledóneas, en cuanto a sus propiedades catalíticas generales y a los mecanismos que operan en la

regulación de su actividad. Por último, la sustitución del grupo prostético de la deshidrogenasa succínica por análogos de él permite analizar sistemáticamente el mecanismo de catálisis de esta enzima, ya que es posible obtener distintas especies de esta flavoproteína, cada una de ellas con modificaciones bien determinadas y en posiciones claves del residuo de flavina.

El desarrollo histórico de nuestro conocimiento acerca de esta flavoenzima, los materiales y métodos experimentales empleados en la realización de este estudio, los resultados obtenidos y su significación se presentan en las páginas siguientes.

II REVISION HISTORICA

La deshidrogenasa succínica, la enzima que cataliza la oxidación reversible de succinato a fumarato de acuerdo a la ecuación,



fue descubierta en 1909 por T. Thunberg (16), en el curso de la búsqueda de compuestos capaces de ser deshidrogenados por preparaciones celulares en presencia de azul de metileno. Los resultados de Thunberg fueron corroborados un año más tarde por observaciones independientes de Batelli y Stern (17).

La importancia metabólica de la deshidrogenasa succínica en relación a su participación en la oxidación terminal de hidratos de carbono, lípidos y aminoácidos, sólo fue reconocida después de la publicación de los experimentos de Szent-Györgyi, referentes al rol catalítico de los ácidos dicarboxílicos de cuatro átomos de carbono en la respiración celular (18).

Muchos de los estudios que han servido para forjar el conocimiento actual de las propiedades y mecanismos de acción de esta enzima se lograron con preparaciones enzimáticas de composición muy compleja y empleando métodos indirectos de ensayo. Entre estos estudios pioneros cabe mencionar los siguientes:

- a) El descubrimiento por Quastel y col. (19 - 21) de la inhibición competitiva de la enzima por malonato. Esta inhibición ha sido de extraordinario valor en el estudio de las oxidaciones biológicas, llegando a ser catalogada por Krebs (22) como una inhibición ideal para estudios de metabolismo intermediario.
- b) La inhibición de la enzima por oxaloacetato, descrita por Das (23) y a la que actualmente se le atribuye gran importancia en la regulación de la actividad de esta deshidrogenasa.
- c) Experimentos de Hopkins y col. (24, 25) que en 1938 revelaron la presencia de grupos SH en la deshidrogenasa succínica y la protección por sustratos e inhibidores competitivos de la inactivación producida por agentes que modifican estos residuos. Estos fueron los primeros estudios publicados acerca de la protección de una enzima por su sustrato.

El conocimiento de las características principales del sistema de transporte de electrones, por medio del cual se realiza la oxidación in vivo de succinato, se debe a las brillantes investigaciones de Keilin y Hartree (26 - 30). Estos investigadores establecieron que en tejidos animales la oxidación de succinato a fumarato se efectúa a través del citocromo c y la citocromooxidasa. Además, concluyeron que, incluso en preparaciones de carácter particulado, libres de células, esta cadena de enzimas actúa como un sistema organizado,

de naturaleza multienzimática, cuya actividad depende no sólo de la integridad de cada componente, sino que también de la integridad de la relación espacial existente entre ellos. La cadena enzimática completa recibió en entonces el nombre de "oxidasa succínica", mientras que el término "deshidrogenasa succínica" se reservó para denominar a la enzima primaria que acepta los electrones del succinato.

Los métodos de ensayo utilizados para determinar la actividad de la deshidrogenasa succínica, analizados retrospectivamente, pueden ser los causantes, en gran medida, de muchos de los problemas encontrados para lograr la separación de esta enzima del resto de los componentes de la cadena transportadora de electrones. Estos métodos de ensayo utilizan, ya sea aceptores de electrones que requieren la presencia y participación de varios componentes de la cadena oxidasa succínica y que por lo tanto no reaccionan con la deshidrogenasa misma, o bien utilizan aceptores que reaccionan directamente con la enzima, pero lo hacen muy lentamente. Entre los primeros se pueden considerar los métodos de ensayo que emplean azul de metileno (16, 26, 31, 32), colorantes de indofenol y tetrazolio (33 - 35), azul brillante de cresilo (36) y citocromo c (33). Entre los que utilizan aceptores que reaccionan directamente con la enzima, se puede mencionar aquellos que usan ferricianuro (37, 38), cuya reactividad con la deshidrogenasa succínica varía considerablemente

de acuerdo a la fuente de enzima, grado de pureza de la misma y naturaleza de las proteínas contaminantes (39 - 41).

La primera solubilización de la deshidrogenasa succínica, aunque con un rendimiento muy bajo, fue lograda por Hogeboom (42) en 1946, quien extrajo la enzima a partir de un polvo acetónico de mitocondrias de hígado de mamífero. Algunos años más tarde, Morton (43) logró una extracción más completa de la enzima mediante el tratamiento de "preparaciones de Keilin-Hartree" de músculo cardíaco con n-butanol.

El descubrimiento de métodos satisfactorios para la solubilización y ensayo de la deshidrogenasa succínica fue un hecho fortuito. En efecto, Singer y Kearney (44,45), estudiando el metabolismo de L-cisteinil sulfinato en mitocondrias de mamíferos y en Proteus vulgaris, encontraron que preparaciones solubles de esas fuentes, al ser suplementadas con fenacina metasulfato, catalizaban la oxidación de este aminoácido, acoplado a la de un sustrato de estructura desconocida, dando como productos piruvato, aspartato y sulfito o sulfato. El sustrato desconocido fue aislado de extractos de levadura e identificado como ácido succínico (44). Estos autores comprobaron, además, que en presencia de fenacina metasulfato, no así en presencia de azul de metileno, los extractos solubles catalizaban la oxidación, en una etapa; de succinato a fumarato. A partir de estos resultados,

Singer y Kearney (44, 45) concluyeron que los extractos contenían deshidrogenasa succínica y que el fenacimeto-sulfato, pero no el azul de metileno, era capaz de actuar como aceptor de electrones de la enzima soluble.

El aislamiento y purificación de la deshidrogenasa succínica de mitocondria de corazón de bovino se logró en 1954 (46), mediante un procedimiento consistente en la extracción alcalina de polvos acetónicos de mitocondrias, varias precipitaciones con sulfato de amonio, adsorción en geles de fosfato de calcio y ultracentrifugación diferencial. Este procedimiento se modificó posteriormente, incluyéndose dos etapas de purificación mediante sulfato de protamina, lo cual permitió obtener preparaciones prácticamente homogéneas, de acuerdo a criterios electroforéticos y de ultracentrifugación (7, 47).

En 1955, Wang y col. (48) describieron el aislamiento de una preparación enzimática altamente purificada, a partir de partículas del tipo Keilin-Hartree obtenidas de corazón de cerdo. El método empleado por estos autores consistió en una combinación del método de extracción con n-butanol descrito por Morton (43) y una adaptación del método de purificación de Singer y Kearney (46), dando como resultado preparaciones parcialmente inactivas debido, probablemente, a las muchas manipulaciones a las que se somete la enzima durante el proceso de purificación. Estos métodos de purificación fueron modificados por Bernath y Singer (49), quienes diseñaron

un método rápido y mucho más conveniente, que evita la inactivación de la enzima y da como resultado una preparación con un adecuado grado de pureza.

El método más reciente de solubilización y purificación de esta flavoproteína fue descrito en 1971 por Davis y Hatefi (50). Este método consiste en la extracción de partículas succinato-coenzima Q reductasa (complejo II) con un agente caotrópico (NaClO_4), seguido de fraccionamiento con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La enzima obtenida mediante este procedimiento es homogénea de acuerdo a varios criterios, tiene un peso molecular aproximado de 100.000 y está formada por dos subunidades cuyos pesos moleculares son iguales a 70.000 y 27.000.

La primera indicación acerca de la participación de flavinas en la actividad de la deshidrogenasa succínica se debe a Axelrod y colaboradores (51). Estos autores comprobaron que existía una relación entre la deficiencia en riboflavina de diversos tejidos y la disminución en la actividad de la deshidrogenasa succínica de esos mismos tejidos. Años más tarde, Green y col. (33) observaron que en preparaciones de cadena respiratoria, sólo una parte del contenido de flavinas se liberaba en forma soluble después de un tratamiento con ácido, mientras que el resto de las flavinas sólo se liberaba después de una digestión proteolítica de dichas preparaciones. Kearney (52, 53) y Wang (48) demostraron independientemente que la flavina insoluble en ácido correspondía a la flavina de la deshidrogenasa succínica y los productos de la digestión proteolítica, a péptidos flavínicos a partir de

las cuales se purificó un hexapéptido que contenía la flavina (FAD) unida covalentemente (52).

La estructura del grupo prostético de la deshidrogenasa succínica sólo se resolvió en 1969 cuando Walker y col. (54), mediante estudios de ENDOR (doble resonancia nuclear y electrónica), demostraron que el residuo flavínico se une a la cadena peptídica mediante el grupo metilo de la posición 8α del núcleo isoaloxazínico. Poco después se demostró que la flavina se encuentra unida al nitrógeno de la posición 3 de un residuo de histidina de la apoproteína (12, 55) y se determinó, además, la secuencia de aminoácidos alrededor de este residuo (56).

Los otros componentes no proteicos de la deshidrogenasa succínica, hierro no hemínico y azufre lábil, se descubrieron a mediados de la década de 1950, en el curso del aislamiento de esta flavoproteína (33,57,58). Se ha comprobado que, tanto preparaciones particuladas de la enzima (complejo II)(59), como la enzima soluble y homogénea preparada por Davis y Hatefi (50), contienen 8 átomos gramo de hierro no hemínico y azufre lábil por mol de flavina unida covalentemente. Beinert y Sands (60,61), mediante el uso de EPR (resonancia electrónica paramagnética), comprobaron que los residuos de hierro-azufre de la deshidrogenasa succínica presentan señales características, que al igual que las de la flavina, aparecen al reducir la enzima con sustratos, hidrosulfito u otro agente reductor artificial. Mediante la misma metodología experimental se comprobó que, durante la catálisis enzimática, la reducción de los residuos de hierro-azufre no se produce en

forma simultánea con la reducción de la flavina. Sin embargo, todavía no se sabe la cantidad de residuos de hierro-azufre que participan en el transporte de electrones, del total de ocho (62, 63).

Una de las características básicas de la deshidrogenasa succínica de células aeróbicas es la regulación de su actividad enzimática. Este fenómeno ha sido demostrado tanto en preparaciones solubles y altamente purificadas de la enzima, como en mitocondrias y partículas submitocondriales de variados tejidos (64 - 67). Las primeras investigaciones en este tema datan de 1955. En ese año, Kearney y col. (68) publicaron resultados que indicaban que preparaciones purificadas y solubles de la enzima eran activadas por el ión fosfato. Dos años más tarde se postuló que este tipo de activación se debía, probablemente, a una interacción del fosfato con el sitio de unión del sustrato, ya que tanto los sustratos como los inhibidores competitivos de la deshidrogenasa eran también capaces de activarla (64). Este proceso de activación de la deshidrogenasa succínica se caracteriza por una energía de activación muy alta (33.000-35.000 cal/mol) y un gran cambio de entropía, lo que sugiere la producción de un cambio conformacional que tendría como consecuencia la conversión de la enzima de una forma inactiva (o de baja actividad) a una de alta actividad (64, 65). La reversibilidad de este proceso fue demostrada por Kimura y col. (69), al comprobar que la eliminación del agente activante se traducía en el retorno de la enzima al estado inactivo.

La significación regulatoria de los procesos de activación de esta flavoenzima se aclaró mucho

más tarde, cuando se descubrió que además del sustrato, un número importante de sustancias de significación fisiológica, tales como la coenzima Q reducida y el ATP, también podían activar a la enzima y que mientras la concentración de succinato se mantiene aproximadamente constante en los diversos estados metabólicos de la mitocondria, la concentración de $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ y ATP se modifica marcadamente. En consecuencia, en condiciones fisiológicas, la activación de la enzima puede considerarse como un importante mecanismo de control (5, 6, 65, 70, 71).

Debido a la importancia de este tema y al hecho de constituir parte importante de esta tesis, es conveniente analizar en forma separada y en mayor detalle los aspectos más salientes de la regulación de esta enzima.

Además de la activación por sustrato, las preparaciones particuladas de deshidrogenasa succínica son activadas también por $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ o por cualquier sustrato capaz de reducir la CoQ_{10} endógena (tales como NADH, -glicerofosfato y sustratos NAD-dependientes) (6, 65). Este tipo de activación se manifiesta también en mitocondrias intactas, al variar la razón de oxidoreducción $\text{CoQ}_{10}/\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ de acuerdo al estado metabólico de la mitocondria. Así, por ejemplo, se ha comprobado que esta razón aumenta marcadamente al producirse la transición desde el estado 4 al estado 3 (72). De acuerdo con esto, la actividad de la deshidrogenasa succínica es alta en el estado 4, disminuyendo a medida que se produce la transición hasta el estado 3, de modo que cuando la mitocondria alcanza este último estado, la enzima se encuentra en su forma

inactiva. Un efecto similar se ha observado mediante el uso de desacoplantes (6), ya que producen una rápida oxidación de la $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ en mitocondrias firmemente acopladas (72).

Un tercer mecanismo de activación de la enzima, restringido a mitocondrias intactas, es la activación por ATP (6). Este fenómeno se produce a concentraciones de ATP tan bajas como $6 \mu\text{M}$ y no es mediado por el sistema de fosforilación, ya que es resistente a oligomicina y 2,4-dinitrofenol.

Además de los tres tipos de activación mencionados, tanto en partículas submitocondriales como en preparaciones solubles altamente purificadas, el IDP y el ITP, pero no una serie de otros nucleótidos ensayados, incluyendo AMP cíclico, son capaces de producir la activación de la enzima (4, 65). Por último, ciertos aniones inorgánicos, tales como Br^- , Cl^- , ClO_4^- , $\text{SO}_4^{=}$, etc., a concentraciones relativamente altas, también pueden activar la enzima (73, 74).

La activación por aniones inorgánicos, a pesar de no tener mucha significación fisiológica, ha sido de gran utilidad para analizar la participación del oxaloacetato en los procesos de activación-desactivación que regulan la actividad de la deshidrogenasa succínica. Se ha encontrado que tanto preparaciones solubles como particuladas de la enzima contienen oxaloacetato firmemente ligado a la forma desactivada de la enzima. La estequiometría de esta unión varía de acuerdo a la naturaleza de la preparación enzimática y es así como en

preparaciones particuladas de la deshidrogenasa, el oxaloacetato ligado se encuentra en una razón equimolar con la flavina unida covalentemente, mientras que en preparaciones solubles la razón es 1:2 con respecto a la flavina de la enzima. Las preparaciones totalmente activadas de la deshidrogenasa succínica no contienen oxaloacetato (74 - 76). A pesar de que las energías de activación para los procesos de activación de la enzima y liberación del oxaloacetato ligado son iguales, las velocidades de activación y disociación son marcadamente diferentes, lo que sugiere que la activación no es sólo una consecuencia de la disociación del oxaloacetato, sino que ambos fenómenos serían consecuencia del cambio de conformación sufrido por la deshidrogenasa al pasar desde la forma desactivada a la activada (77). Esta interpretación es apoyada por el hecho que la enzima totalmente activada, libre de oxaloacetato, puede ser desactivada a pH alcalina y reactivada a pH neutro, de modo que no todos los mecanismos de activación de esta flavoenzima implicarían disociación del oxaloacetato (78).

MATERIALES Y METODOS

I. MATERIALES

A. REACTIVOS

La oligomicina y los ácidos N-2-hidroxi-*etil*piperazina-N'-2-etanosulfónico, 2(N-morfolino)etanosulfónico, L(-)málico, oxaloacético y pirúvico, se adquirieron en Calbiochem; la antimicina A, en Kyowa Fermentation Ind. Co., Tokio, Japón; ATP, ADP, ITP e IDP, fueron productos de Pabst Laboratories; bactopectona, bacto-triptona y extractos de levadura, se adquirieron en Difco Laboratories; la riboflavina, de Merck and Co. Inc.; el 2-tenoil-trifluoroacetona, de Columbia Organic Chemicals; el 7-*etil*-8-metil-10-(1'-D-ribitol)isoxaloxazina y 7-metil-8-*etil*-10-(1'-D-ribitol)isoxaloxazina¹, fueron una donación del Dr. John P. Lambooy, de la Universidad de Maryland. Todos los otros reactivos bioquímicos empleados en la realización de esta tesis fueron productos de Sigma Chem. Co.

¹ Estos dos compuestos serán denominados: 7-metilriboflavina y 8-metilriboflavina respectivamente.

B. PROTEINAS

La albúmina de suero de bovino, la nucleótido pirofosfatasa y el sulfato de protamina, se adquirieron en Sigma Chemical Co. La deshidrogenasa mágica se obtuvo de Miles-Seravac, mientras que la tripsina y la quimotripsina, de Worthington Biochemical Corporation.

C. MICROORGANISMOS

Las cepas de Saccharomyces cerevisiae que se emplearon fueron las siguientes: a) cepa Red Star, levadura comercial de panadería, donada por Universal Food, Oakland, California; y b) cepa HK 645, mutante deficiente en la síntesis de riboflavina (79), obsequiada por el Prof. Dr. F. Lingens, de la Universidad de Hohenheim, Stuttgart, Alemania. La cepa OP de Azotobacter vinelandii que se empleó, fue gentilmente donada por el Prof. Dr. D. Yoch, de la Universidad de California, Berkeley.

D. MATERIAL CROMATOGRÁFICO

Las placas de celulosa para cromatografía en capa delgada se adquirieron en Eastman Kodak; Sephadex G-50 y G-200 de Pharmacia Fine Chemicals; DEAE - celulosa microgranular (DE-52) y florisil fueron productos Whatman.

II. METODOS

A. AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS

1. Mitocondrias de coliflor

Las mitocondrias de coliflor (Brassica oleracea L) se prepararon de acuerdo al siguiente procedimiento, basado en el método descrito por Lance (80). La capa superficial (3 ó 4 mm) de las inflorescencias de 4 a 6 coliflores, se homogeneizó durante 1 minuto en un homogeneizador Waring Blendor, mantenido a 60 voltios mediante un regulador externo de voltaje, en un medio (300 ml/200 g de peso húmedo) compuesto por amortiguador HEPES 0,2 M, sacarosa 0,5 M, EDTA 1 mM, albúmina de suero de bovino 0,75 mg/ml y cisteína 4 mM; el pH de esta solución se ajustó a 7,5 a 20°. El homogeneizado se filtró a través de 4 capas de gasa y el extracto se centrifugó durante 15 min a 1.000 g, con el objeto de eliminar los restos celulares. El sobrenadante se centrifugó a 20.000 g durante 20 min y el sedimento mitocondrial resultante se lavó por resuspensión, en un medio (30 ml/200 g de peso húmedo de tejido vegetal) de composición similar al descrito más arriba, pero que no contenía cisteína. La suspensión mitocondrial se centrifugó a 20.000 g durante 20 min y el sedimento resultante se resuspendió en 2 ml (por cada 200 g de material de partida) de una solución compuesta de manitol 0,3 M y cisteína 1 mM, pH 7,5. La inclusión de cisteína en esta etapa es esencial para preservar la actividad de la deshidrogenasa succínica. Todas las

operaciones descritas se realizaron entre 0 y 4°.

Las coliflores se obtuvieron en mercados locales (San Francisco, California), tan frescas como fue posible y se usaron dentro de las 24 horas. Se comprobó que las coliflores obtenidas durante los meses de verano presentaban baja actividad de la deshidrogenasa succínica y que la enzima de tal material era difícil de desactivar. Por estas razones, todo el trabajo que se presenta en esta tesis fue realizado con coliflores obtenidas durante el período frío del año.

2. Mitocondrias de poroto mung

El cultivo y la cosecha de los brotes de poroto mung (Phaseolus aureus L variedad Jumbo), así como el aislamiento de las mitocondrias, se realizó de acuerdo a los procedimientos descritos por Ikuma y Bonner (81).

B. CONTROL DE LA CALIDAD DE LAS PREPARACIONES MITOCONDRIALES

La calidad de las mitocondrias obtenidas de ambas especies vegetales se controló mediante la determinación de los cuocientes de fosforilación y de control respiratorio, en presencia de diversos sustratos. Para las mitocondrias de poroto mung se obtuvo valores para el cuociente de control respiratorio entre 3,5 y 4,0 , entre 4,5 y 5,2 y entre 3,4 y 4,0 , al emplear succinato, malato y NADH respectivamente como sustratos. En el caso

de las mitocondrias de coliflor, los resultados fueron más variables, obteniéndose con succinato como sustrato, valores del cuociente del control respiratorio entre 1,95 y 3,2, los cuales concuerdan con los valores obtenidos por Lance (80).

C. SONICACION DE LAS MITOCONDRIAS

Las mitocondrias se sonicaron por dos períodos de 15 seg cada uno, mediante un sonicador Branson modelo S 75, a 5 amperes, utilizando un microaplicador de sonido. La temperatura de la suspensión mitocondrial se mantuvo a 3° durante la sonicación, mediante un baño de hielo con sal. En el caso de las mitocondrias de coliflor, la suspensión mitocondrial se diluyó antes de la sonicación con dos volúmenes de una solución que contenía manitol 0,3 M y cisteína 1 mM, pH 7,5, para dar una concentración de proteínas entre 8 y 10 mg/ml. Las mitocondrias de poroto mung se diluyeron con dos volúmenes de una solución compuesta por: manitol 0,3 M, EDTA 0,1 M y seroalbúmina de bovino al 0,1% (p/v). El pH de la suspensión mitocondrial se ajustó a 7,2 a 0°. La concentración de proteínas fue aproximadamente igual a 6 mg/ml.

D. CULTIVOS DE CELULAS DE LEVADURA

Los cultivos aeróbicos, en gran escala, de las células de levadura, se realizaron en un

fermentador New Brunswick modelo 614, equipado con 6 incubadoras cilíndricas con capacidad para 12,5 litros cada una. La incubación se efectuó bajo aireación forzada (12 litros de aire/min), a una temperatura de 30° y con agitación constante (400 rpm). Para experimentos en pequeña escala, el cultivo de las levaduras se realizó en matraces Erlenmeyer, utilizando 1 a 2 litros de medio de cultivo. El medio de cultivo empleado contenía: extracto de levadura al 1% (p/v), bactopectona al 1% (p/v), glucosa al 0,8% (p/v), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 0,12% (p/v), KH_2PO_4 al 1% (p/v) y riboflavina o compuestos análogos, según se describe para cada experimento en particular en RESULTADOS. La formación de espuma durante la incubación se evitó mediante la adición al medio de cultivo de silicona SAG 471 (Unión Carbide).

Los cultivos anaeróbicos de levaduras se realizaron haciendo burbujear N_2 durante la incubación en un medio de cultivo de igual composición al descrito para el crecimiento aeróbico, pero suplementado con 20 mg/litro de ergosterol (disuelto en 5 ml de Tween 80 y 5 ml de etanol).

El crecimiento de los cultivos se inició mediante la adición de un volumen de un inóculo equivalente al 5% del volumen del medio de cultivo.

E. PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO LIBRES DE RIBOFLAVINA

En experimentos en los que se reemplazó la riboflavina por otra flavina, para promover el crecimiento de la cepa mutante, fue necesario eliminar la riboflavina presente en el extracto de levadura utilizado en la preparación del medio de cultivo. El procedimiento seguido con este objeto fue el siguiente: 500 g de extracto de levadura se suspendieron en agua destilada (volumen final igual a 1 litro) y se sometieron a tres extracciones con 2 litros de alcohol bencílico cada vez. La separación de las fases después de cada extracción se logró mediante centrifugación a 2.000 g por 10 min, a temperatura ambiente. Con el objeto de eliminar las trazas de alcohol bencílico, la fase acuosa resultante de la última extracción fue a su vez extraída con 2 litros de cloroformo, el cual se eliminó de la fase acuosa resultante de este tratamiento mediante evaporación a temperatura ambiente, bajo una corriente de N_2 . Cuando este extracto de levadura, libre de riboflavina, se empleó en un medio de cultivo, se suplementó con 1 mg/l de biotina.

F. OBTENCION DE LAS LEVADURAS

Las levaduras se colectaron al comienzo de la fase estacionaria, mediante centrifugación a 2.000 g por 3 min, a 3° y se lavaron 4 veces con 15 volúmenes de agua destilada helada. Con el objeto de obtener una masa comprimida de células, la centrifugación del

último lavado se realizó a 10.000 g por 20 min, o bien, las levaduras se colectaron por filtración al vacío, en embudo Buchner, utilizando papel Whatman N° 1 como medio de filtración.

G. AISLAMIENTO DE PARTICULAS SUBMITOCONDRIALES DE LEVA - DURA

Para los experimentos en pequeña es -
cala (2g a 10g de peso húmedo de levadura), las partícu -
las submitocondriales se aislaron empleando un agitador
de Nossal, de acuerdo a la técnica descrita por Hebb y col.
(82), o bien, mediante la técnica descrita por Copley y
col. para la preparación de ETPc de Candida utilis (83).
Para los experimentos en gran escala (1 kg o más de peso
húmedo de levadura), las partículas submitocondriales se
aislaron de acuerdo al método descrito por Mahler y col.
(84).

H. CULTIVOS DE AZOTOBACTER VINELANDII

Los cultivos en medio líquido de
Azotobacter vinelandii cepa OP se mantuvieron, crecieron
y cosecharon de acuerdo al método descrito por Bulen (85),
salvo que la incubación, la aireación forzada y la agita -
ción se realizaron en un fermentador New Brunswick modelo
614, en las mismas condiciones descritas para los cultivos
aeróbicos y en gran escala de levaduras. Esta modificación
al método de Bulen (85) permite una mayor aireación del

cultivo y, por lo tanto, un mejor suministro de nitrógeno, con lo cual aumenta el crecimiento bacteriano.

I. AISLAMIENTO DE LA FLAVODOZINA DE AZOTOBACTER

Para la purificación de la flavodoxina de Azotobacter (conocida también como la flavoproteína de Shetna), las células se rompieron de acuerdo al procedimiento siguiente: la masa húmeda de células (150 g) se suspendió en 600 ml de amortiguador fosfato de potasio 25 mM, pH 7,0 y se sometió a sonicación con un rompedor celular ultrasónico Sonifier, modelo W 185 de Heat Systems-Ultrasonic, a 80 watt de potencia y usando volúmenes de la suspensión bacteriana no mayores a 45 ml. La sonicación se realizó por 2 períodos de 1,5 min y por 1 período de 1 min, manteniéndose la temperatura de la suspensión a 3° mediante enfriamiento externo de la muestra en un baño de hielo con sal. El porcentaje de ruptura celular, determinado por conteo de células bajo microscopio, fue de aproximadamente un 85%.

A partir de estos extractos celulares, la flavodoxina se purificó siguiendo el procedimiento descrito por Hinkson y Bulen (86). Las propiedades espectrales de la flavoproteína purificada, tanto en su forma oxidada como semiquinónica, fueron idénticas a las descritas por estos autores (86).

J. OBTENCION DE LA APOFLAVODOXINA

La disociación del FMN de la flavodoxina se logró mediante el tratamiento de la holoproteína con ácido tricloroacético, de acuerdo al procedimiento descrito por Edmondson y Tollin (87). La concentración de la apo - flavodoxina se determinó por absorbancia a 280 nm, utilizando el coeficiente de extinción molar de $3,2 \times 10^{-4}$ cm^2/mol determinado por D'Anna y Tollin (88).

K. DETERMINACION DE HISTIDILFMN

1. Determinación del contenido de histidilFMN en mitocondrias de vegetales

La determinación del contenido de histidilFMN en las mitocondrias de las dos especies de vegetales superiores utilizadas, se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Singer y col. (89), empleando un fluorímetro Farrand modelo A-2. Las mitocondrias de vegetales, al ser tratadas con acetona-HCl, de acuerdo al método descrito por estos autores, tienen tendencia a formar precipitados "gomosos", lo que hace muy difícil la extracción de las flavinas unidas no covalentemente mediante los lavados con ácido tricloroacético. Con el objeto de obviar estas dificultades, las mitocondrias sometidas a sonicación, previamente diluídas con un volumen igual de agua destilada, se calentaron por 3 min a 100° y después de enfriar en hielo, se precipitaron con 0,1 volumen de ácido tricloroacético al 55% (p/v). Después de una breve centrifugación se

descartó la solución sobrenadante que contenía las flavinas unidas no covalentemente y el precipitado se resuspendió en ácido tricloroacético al 1% (p/v). Cada precipitación con ácido fue seguida por una centrifugación a 5.000 g por 10 min, repitiéndose el proceso hasta que la solución sobrenadante no contuviera material fluorescente (6 a 8 lavados). El residuo resultante del tratamiento con TCA se lavó, en seguida, con una mezcla acetona-ácido (6 ml de acetona + 0,16 ml de HCl 6 N, por cada ml de suspensión mitocondrial) y después de centrifugar, el sedimento se lavó dos veces más con TCA al 1% en la forma descrita anteriormente. El sedimento libre de flavinas extraíbles por ácido se trató con 0,1 mg/mg de proteínas de, tanto tripsina como quimotripsina (disueltas en base Tris 0,1 M, a una concentración de 10 mg/ml) y se incubó con agitación ocasional a 38° durante 44 horas. Finalmente, el sedimento se trató con 0,1 volumen de TCA al 55% por 12 horas a 38°, con el objeto de hidrolizar la forma dinucleotídica de la flavina, a la forma mononucleotídica.

Generalmente, la solución resultante de la digestión proteolítica de mitocondrias de dicotiledóneas contiene una cantidad apreciable de material fluorescente no flavínico (no reducible por hidrosulfito de sodio), el cual interfiere con el análisis fluorimétrico del histidilFMN, cuando se utilizan los filtros rutinarios para la determinación de riboflavina. Con el objeto de minimizar esta fluorescencia espúrea, se reemplazaron dichos filtros por filtros de interferencia Farrand (450 nm como filtro primario y 540 nm como filtro secundario).

2. Determinación de HistidilFMN en partículas submitocondriales de levadura

La determinación del histidilFMN en partículas submitocondriales de levadura no presenta los problemas señalados en el caso de mitocondrias de vegetales superiores, por lo que esta determinación se efectuó de acuerdo a la técnica original descrita por Singer y col. (89), pero usando un espectrofluorímetro Hitachi-Perkin Elmer en lugar del fluorímetro Farrand, dada la mayor sensibilidad y versatilidad del espectrofluorímetro.

L. DETERMINACION FLUORIMETRICA DE OXALOACETATO

La determinación fluorimétrica de oxaloacetato en extractos perclóricos de mitocondrias sonizadas de coliflor se realizó con deshidrogenasa málica y NADH en el espectrofluorímetro Hitachi-Perkin Elmer MPF-3, según la técnica descrita por Williamson y Corkey (90).

Debido que el oxaloacetato firmemente ligado a la deshidrogenasa succínica no reacciona con la deshidrogenasa málica (98), es posible diferenciar el oxaloacetato libre del ligado a proteínas mediante la eliminación del primero de ellos, ya sea por repetidos lavados por centrifugación, o por incubación con NADH y deshidrogenasa málica. Posteriormente, el oxaloacetato ligado a proteínas se libera con ácido perclórico y se determina en el extracto perclórico neutralizado con KOH y clarificado por centrifugación, mediante la adición de aproximadamente 3 unidades de deshidrogenasa málica y 0,2 ml de NADH 50 μ M, en

un volumen total de 1,5 ml.

M. DETERMINACION DEL CONSUMO DE OXIGENO

La determinación del consumo de oxígeno (QO_2) de las levaduras se realizó polarográficamente a 30° , empleando un oxígrafo Gilson equipado con un electrodo de Clark, en un medio de reacción compuesto de amortiguador fosfato de potasio 38 mM y glucosa 40 mM, pH 7,0.

N. DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

1. Determinación de la citocromooxidasa

La actividad de la citocromooxidasa (EC 1.9.3.1) se determinó polarográficamente a 30° , utilizando el equipo descrito para la determinación del consumo de oxígeno. El medio de reacción contenía, en un volumen final de 2 ml: amortiguador fosfato de potasio 20 mM pH 7,2, ascorbato de potasio 20 mM, enzima y citocromo c. El ascorbato y la enzima se agregaron en ese orden para iniciar la reacción (91). La concentración de citocromo c se varió desde 0,2 a 1,5 mg por 2 ml y la actividad enzimática se calculó mediante gráficos de dobles recíprocos a concentración infinita de citocromo c.

2. Determinación de NADH oxidasa

La actividad NADH oxidasa se determinó polarográficamente a 30° . El medio de reacción contenía, en un volumen de 2 ml: amortiguador fosfato de potasio

40 mM pH 7,5, NADH 0,1 mM y 0,6 mg de citocromo c.

3. Determinación de la succinoxidasa

La actividad succinoxidasa de partículas submitocondriales de levaduras se determinó polarográficamente a 30°. Antes del ensayo, se activó la deshidrogenasa succínica de la preparación mediante incubación por 8 min a 30° con succinato 40 mM en amortiguador fosfato de potasio 50 mM, pH 7,5, en condiciones anaeróbicas en tubos Thunberg. Una vez finalizada la activación, se agregó a la mezcla de ensayo una pequeña alícuota de la preparación activada y se midió el consumo de oxígeno. La mezcla de ensayo contenía en un volumen final de 2 ml: amortiguador fosfato de potasio 40 mM pH 7,5, succinato 50 mM y 0,5 mg de citocromo c (91).

4. Determinación de la NADH deshidrogenasa

La actividad de la NADH deshidrogenasa (EC 1.6.99.3) se determinó utilizando ferricianuro de potasio como aceptor de los electrones, de acuerdo a la técnica descrita por Singer (92).

5. Determinación de la deshidrogenasa succínica.

La determinación de la actividad enzimática de la deshidrogenasa succínica en vegetales superiores se describe en RESULTADOS. En preparaciones de levadura, esta determinación se realizó mediante el método espectrofotométrico descrito por Singer y col (91).

O. DETERMINACION DE PROTEINAS

La determinación de proteínas se realizó después de la precipitación con TCA al 10% (p/v), por el método del biuret (93) en coliflores y por el método de Lowry (93) en preparaciones de porotos mung y levaduras.

P. ELECTROFORESIS DE ALTO VOLTAJE

La electroforesis de alto voltaje se realizó sobre hojas de papel Whatman N° 1 (46 x 56 cm), a 50 V/cm, 25° y pH 1,6, utilizando ácido fórmico al 8% (v/v) como amortiguador.

Q. RUPTURA REDUCTIVA DEL ENLACE COVALENTE FLAVINA-HISTIDINA DE LA DESHIDROGENASA SUCCINICA DE LEVADURAS

La ruptura del enlace covalente flavina-histidina de la deshidrogenasa succínica se logró mediante la reducción del enlace con Zn metálico en medio ácido. El procedimiento seguido fue el siguiente: la muestra (45 nmoles de flavina) se disolvió en 0,4 ml de dimetilformamida y se trató con 480 μ moles de ioduro de metilo durante 30 horas a 22°, en un tubo cerrado. La dimetilformamida y el exceso de ioduro de metilo se eliminaron mediante evaporación al vacío y el residuo flavínico se disolvió en 0,3 ml de una mezcla 9:1 (v/v) de ácido acético glacial-ácido trifluoroacético. La solución se calentó a baño maría por 45 min, agregándose aproximadamente

1 mg de polvo de zinc metálico a los 0, 15 y 30 min. Después de enfriar la mezcla, el exceso de Zn y las sales de este metal se eliminaron mediante centrifugación, el residuo resultante se lavó con 0,1 ml de H₂O y las soluciones sobrenadantes se combinaron, llevándose a sequedad mediante evaporación al vacío. El material flavínico se convirtió posteriormente, de la forma mononucleotídica, a la forma desfosforilada mediante hidrólisis con 0,3 ml de HCl 6 N, a 93° durante 16 horas y bajo vacío. Después de eliminar el HCl, el residuo se disolvió en 0,2 ml de H₂O y se sometió a electroforesis en las condiciones descritas en la sección P de este capítulo. El material fluorescente que permaneció en el origen se eluyó con H₂O y se cromatografió en una columna de florisil (0,6 x 8 cm), equilibrada y eluida según el procedimiento descrito por Kearney (52).

RESULTADOS

I PROPIEDADES Y CARACTERISTICAS DE LA DESHIDROGENASA SUC - CINICA DE DICOTILEDONEAS

A. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

Para determinar la actividad de la deshidrogenasa succínica de Phaseolus vulgaris, Hiatt (2) empleó el método manométrico del PMS y una adaptación de éste para la determinación espectrofotométrica de la actividad enzimática, en la cual, la reoxidación del PMS se acopló a la reducción del DCIP, usando concentraciones fijas de ambos aceptores de electrones. Ambos métodos adolecen de algunos defectos. En el primero de ellos, la reoxidación por el oxígeno molecular del PMS reducido puede ser limitante (94), mientras que en la determinación espectrofotométrica a concentración fija de PMS, la confiabilidad del método está limitada por el hecho que la K_m aparente para PMS puede modificarse durante la extracción, purificación y varios otros tratamientos de la enzima (92).

Por estas razones, fue necesario introducir modificaciones en el ensayo espectrofotométrico del PMS-DCIP (94). En la Figura 1 se presentan, en un gráfico de dobles recíprocos, los resultados obtenidos al medir la actividad enzimática de la deshidrogenasa succínica de

Figura 1. Variación de la actividad enzimática de la deshidrogenasa succínica de coliflor en función de la concentración de PMS.

Para cada ensayo se tomó una alícuota de 50 μ l de la preparación enzimática activada previamente con succinato. La absisa representa el valor recíproco del volumen (en ml) de PMS al 0,33% (p/v). La actividad de la deshidrogenasa succínica se expresa como el cambio de absorbancia a 600 nm/min \times 50 μ l.

1 / ACTIVIDAD DE LA
DESHIDROGENASA SUCCINICA

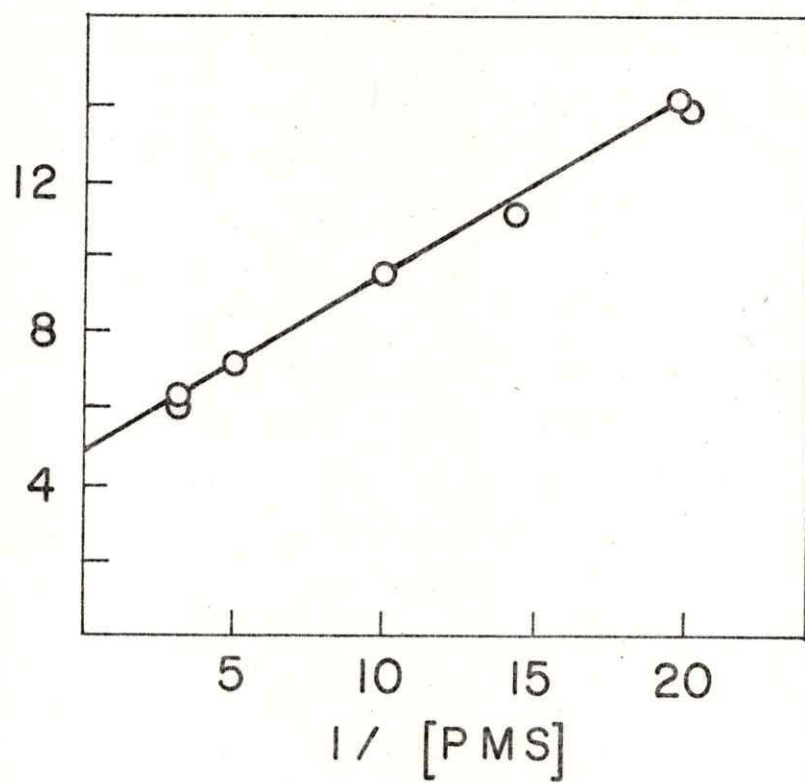


Figura 1

mitocondrias de coliflor, a distintas concentraciones de PMS. Tal como se puede apreciar en dicha Figura, la actividad de la enzima depende de la concentración del aceptor de electrones. Sin embargo, se pudo comprobar que en el proceso de activación de la enzima particulada, la K_m aparente para PMS no se modifica. Por este motivo, en los experimentos diseñados para analizar los mecanismos de activación de la deshidrogenasa, en la determinación de la actividad se empleó una concentración fija de PMS y que corresponde a la concentración más alta indicada en la Figura 1 (0,3 ml de PMS al 0,33% en 3 ml de mezcla de reacción).

Un problema de especial importancia en el ensayo de la deshidrogenasa succínica de coliflor y de poroto mung, lo constituye la barrera de permeabilidad para PMS que presentan las mitocondrias intactas de ambas especies vegetales. En mitocondrias de mamífero, esta barrera de permeabilidad puede ser superada mediante preincubación de las mitocondrias con Ca^{+2} o con fosfolipasa A de veneno de serpiente. Sin embargo, ninguno de estos procedimientos, por separado o en combinación, permiten la libre penetración del colorante en mitocondrias de coliflor o de poroto mung. En efecto, la actividad aparente de la enzima no aumenta después de preincubar dichas mitocondrias por 10 min a 30° , con Ca^{+2} 0,75 mM y 10 ug de veneno de Naja naja. En cambio, se obtuvo un aumento significativo de la actividad aparente de la enzima al soneter la preparación de mitocondrias a dos ciclos de sonicación de 15 seg cada uno, en las condiciones descritas en

METODOS. La actividad medida en estas condiciones no aumentó por sonicación o ciclos de congelamiento-descongelamiento adicionales.

La enzima de Brassica oleracea L es muy inestable en ausencia de grupos tioles, de tal modo que se produce una inactivación apreciable, incluso durante el período de 8 min de activación a 30° que precede al ensayo de la actividad enzimática, a menos que se adicione cisteína u otro tiol. Por esta razón, las preparaciones mitocondriales de coliflor se suspendieron en cisteína 1 mM. Sin embargo, la adición de cisteína complica la determinación de la actividad enzimática de la deshidrogenasa succínica, ya que produce la reducción no enzimática, tanto del PMS como del DCIP, lo que se traduce en blancos muy altos. Con el objeto de minimizar esta interferencia, previamente al período de 3 min de equilibrio de temperatura que precede al ensayo enzimático, se agregó 0,01 ml de NEM 0,03 M a la mezcla de reacción. Esto permite el tiempo suficiente para la combinación de la cisteína con el agente alquilante, pero no para producir una inhibición detectable de la actividad de la deshidrogenasa succínica.

En la práctica, los ensayos se realizaron de acuerdo a la metodología que se describe a continuación. Se preparó una serie de cubetas de espectrofotómetro, para permitir la variación de la concentración de PMS y, por lo tanto, la determinación de la velocidad máxima para este aceptor de electrones. Cada cubeta contenía, en un volumen final de 3 ml, amortiguador HEPES 34 mM pH 7,5, KCN 1 mM, enzima, NEM 0,1 mM y H₂O. Las cubetas se

cubrieron y se preincubaron en un baño termorregulado por 3 min a la temperatura del ensayo (30° en trabajo rutinario con la enzima totalmente activada y 15° en estudios de activación). Después de este período de equilibrio de la temperatura, las cubetas se transfirieron a la celda de un espectrofotómetro con inscriptor, termorregulada a la temperatura del ensayo y, en rápida sucesión se agregó 0,3 ml de succinato 0,2 M, 0,1 ml de DCIP al 0,05% (p/v) y cantidades variables de PMS y se registró la disminución de la absorbancia a 600 nm. La actividad de la deshidrogenasa succínica se calculó utilizando un coeficiente de extinción milimolar para el DCIP igual a 19,1 (94).

Con el objeto de prevenir la activación de la deshidrogenasa durante el período de equilibrio de la temperatura, la reacción se inició mediante la adición de succinato. Es necesario hacer notar que cuando se trata de muestras completamente activadas, el succinato puede ser agregado antes. En cada serie de experimentos, es necesario hacer un "blanco" para corregir la reducción espúrea del DCIP, lo cual se logra realizando el ensayo en idénticas condiciones, pero en ausencia de succinato. La velocidad resultante se sustrae del valor experimental para cada concentración de PMS.

Tal como se indica en la Figura 1, la cantidad de PMS que se utilizó para la determinación de la actividad enzimática a velocidad máxima, se varió entre 0,04 ml y 0,3 ml de PMS al 0,33% (p/v) en 3 ml de mezcla de reacción y los resultados se calcularon mediante gráficos de dobles recíprocos. Sin embargo, tal como

se mencionó anteriormente, en estudios de activación de la deshidrogenasa succínica, el uso de 0,3 ml de PMS al 0,33% (p/v) proporciona una medida satisfactoria de la actividad de la enzima. Las condiciones requeridas para alcanzar máxima activación de la enzima se analizan detalladamente en la siguiente sección.

B. ACTIVACION POR SUCCINATO

1. Cinética de activación

En sus estudios realizados con deshidrogenasa succínica solubilizada de mitocondrias de Phaseolus vulgaris, Hiatt (2) demostró que al incubar la enzima a 30° con succinato 9,1 M, se produce un aumento de un 100% en la actividad enzimática. Sin embargo, este investigador no determinó ni la cinética de activación ni la energía de activación para este proceso.

La Figura 2 representa la curva de progreso para la activación que produce el succinato a una concentración 0,1 M sobre la deshidrogenasa succínica de mitocondrias sonicadas de coliflor. Como puede apreciarse en esta Figura, al incubar la enzima con el sustrato por unos 10 min a 29° y en condiciones en que no se produce su transformación en productos (ausencia de los aceptores artificiales de electrones y adición de KCN), la actividad enzimática aumenta en más de un 300%.

Figura 2. Curva de progreso de la activación de la des - hidrogenasa succínica de coliflor por succinato 0,1 M a 29°.

Mitocondrias sonicadas de coliflor (0,6 ml, que contenían 4,9 mg de proteína) y 0,11 ml de amortiguador HEPES 0,2 M pH 7,5, se equilibraron a 29°. Posteriormente, se agregó 0,01 ml de KCN 0,1 M y 0,08 ml de succinato de sodio 1 M pH 7,5. A los tiempos indicados, se tomaron alícuotas de 40 μ l y se colocaron en cubetas mantenidas a 15°, que contenían la mezcla de ensayo, exceptuando el succinato y los colorantes. Después de 30 seg, se inició la reacción agregando 0,3 ml de succinato 0,2 M y los colorantes. La actividad se expresa como el cambio de absorbancia a 600 nm/min x alícuota de 40 μ l a 15°. La actividad específica de la preparación enzimática usada, medida con 0,3 ml de PMS al 0,33% (p/v) en un volumen de 3 ml, fue 0,062 μ moles de succinato oxidado/min x mg de proteína a 15°.

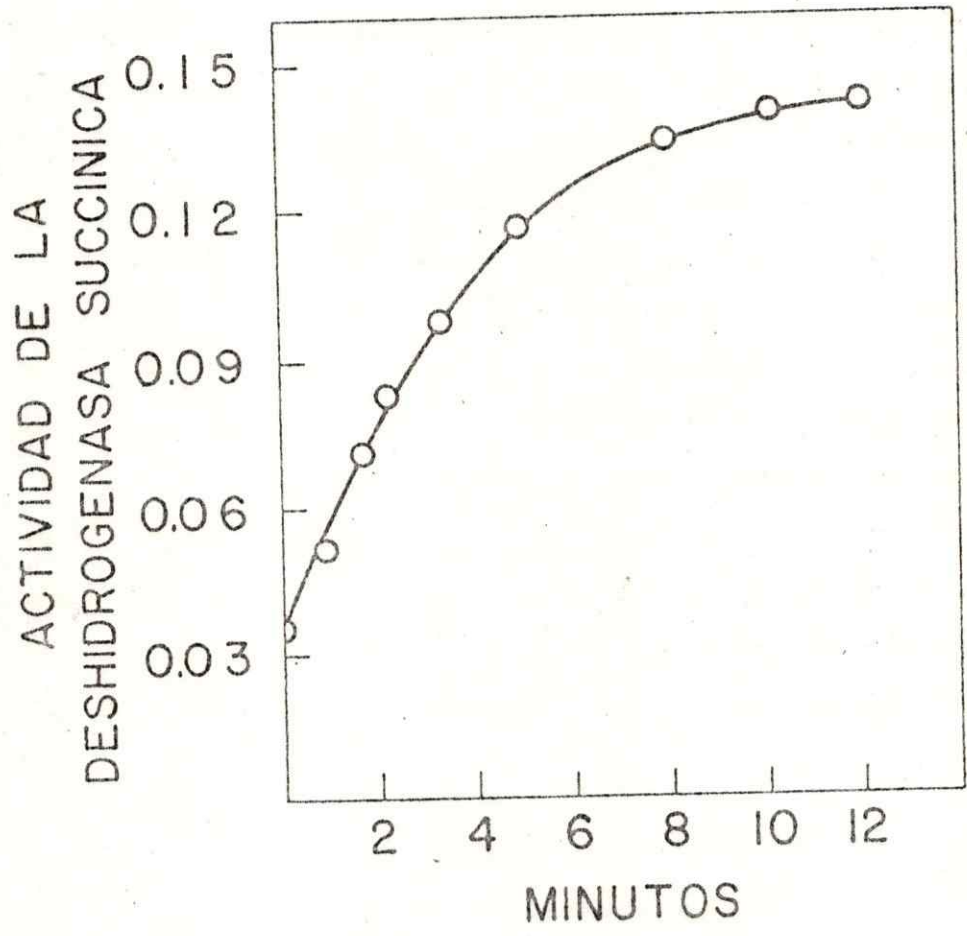


Figura 2

El tiempo requerido para lograr la activación completa de la deshidrogenasa por succinato, depende tanto de la concentración de partículas mitocondriales, como de la concentración de sustrato presente durante el proceso de activación. Así, por ejemplo, al analizar la activación en forma masiva (batch) por succinato 0,1 M, en las condiciones especificadas en la leyenda de la Figura 2, se comprobó que tanto en mitocondrias sonicadas de coliflor, como de poroto mung, la enzima alcanzaba una activación máxima después de 10 a 12 min de incubación a 30°, siempre y cuando la concentración de proteínas fuera menor a 8 mg/ml. A concentraciones mayores que 10 mg/ml fue necesario un período de activación de 15 min, mientras que a concentraciones catalíticas de enzima, tal como las usadas en el ensayo del PMS-DCIP, bastó una incubación por 8 min a 30° con succinato 20 mM para obtener la activación máxima de la enzima. La técnica empleada rutinariamente en este último caso, fue la incubación por 8 min a 30° de una mezcla de reacción completa menos los colorantes y NEM, cambio de la cubeta a un baño termoregulado a 15°, adición de NEM y después de un período de 3 min de equilibrio de la temperatura, transferencia de la cubeta a la celda de un espectrofotómetro mantenida a esa misma temperatura y, finalmente, adición del PMS y DCIP para iniciar la reacción enzimática. Las muestras tratadas de esta manera sirvieron para determinar el nivel máximo de activación y, además, como controles del grado de activación producido por otros activadores.

El proceso de activación de la deshidrogenasa succínica sigue una cinética de primer orden (Fig. 3). En estos experimentos, la concentración de enzima desactivada se calculó restando a la actividad máxima alcanzada por la enzima, la actividad medida a diferentes tiempos. El hecho de que este proceso de activación se caracterice por una cinética de primer orden, sugeriría la existencia de una relación 1:1 entre la enzima totalmente activada y su precursor no activado.

2. Energía de activación

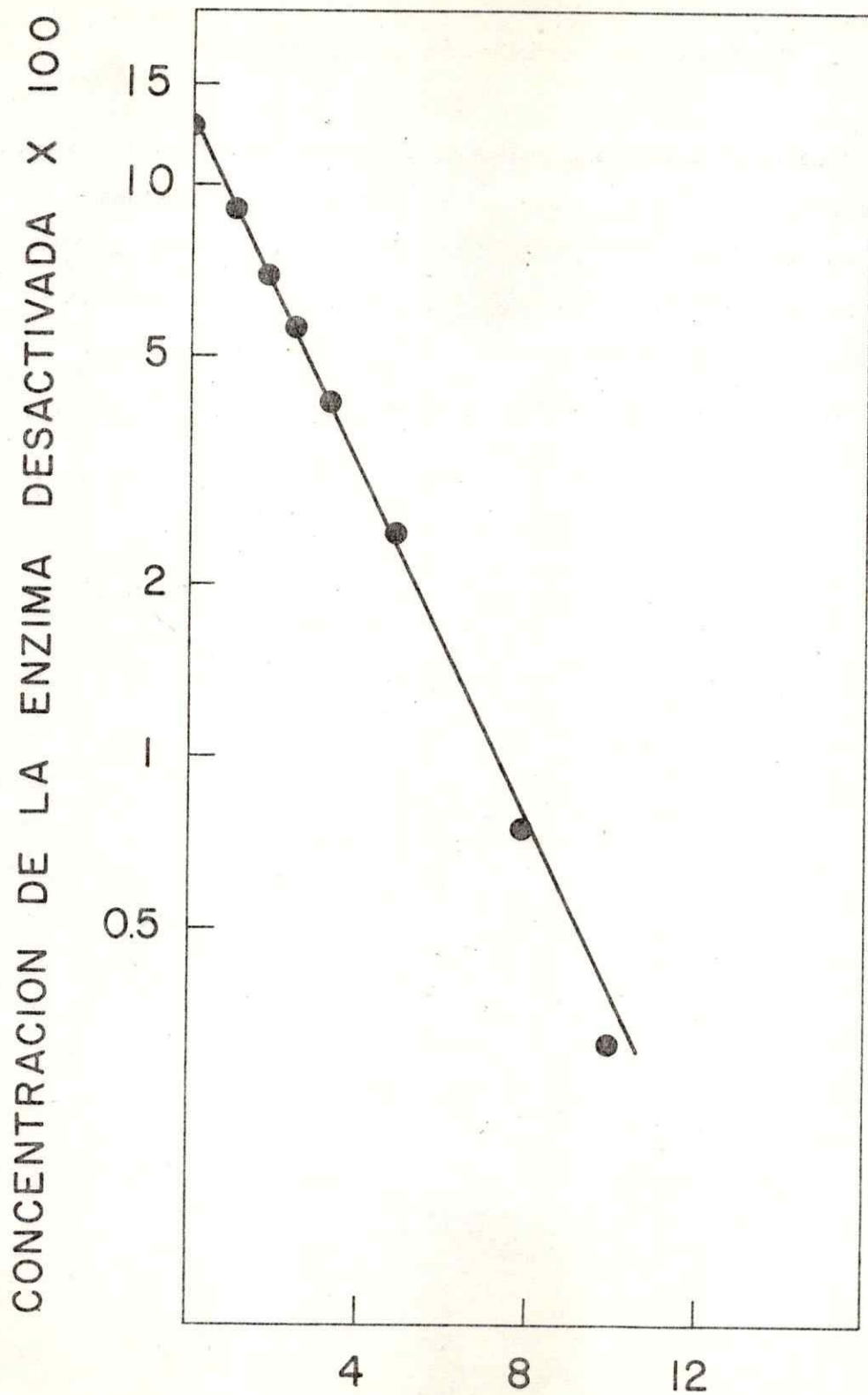
Como puede apreciarse en la Figura 4, la activación de la deshidrogenasa succínica por su sustrato es fuertemente dependiente de la temperatura. A partir de los datos presentados en esta Figura en forma de un gráfico de Arrhenius, se calculó una energía de activación para este proceso de 30.600 cal/mol. Este valor se aproxima bastante al determinado para la enzima de tejidos animales (64, 65).

B. DETERMINACION DEL NUMERO DE RECAMBIO

La disponibilidad de un método de ensayo confiable, así como de un procedimiento químico para determinar la concentración de la deshidrogenasa succínica, independiente de la pureza y del grado de activación de la enzima, permitió la determinación del número de recambio de esta enzima en preparaciones particuladas. Con el

Figura 3. Cinética de activación por succinato.

Las condiciones experimentales empleadas fueron las mismas descritas en la leyenda de la Figura 2. Tal como se señala en el texto, la concentración de la enzima desactivada se expresó como la diferencia entre la actividad de la enzima totalmente activada y la actividad de la enzima medida a los tiempos indicados.



MINUTOS

Figura 3

Figura 4. Gráfico de Arrhenius para la activación de la deshidrogenasa succínica en mitocondrias soni-
cadas de coliflor.

Las condiciones experimentales empleadas fueron las mismas descritas en la leyenda de la Figura 2. Las constantes de velocidad de primer orden para la activación por succinato 0,1 M (ordenadas), se calcularon a partir de gráficos semilogarítmicos del progreso de la activación a diferentes temperaturas. La abscisa representa el valor recíproco de la temperatura absoluta.

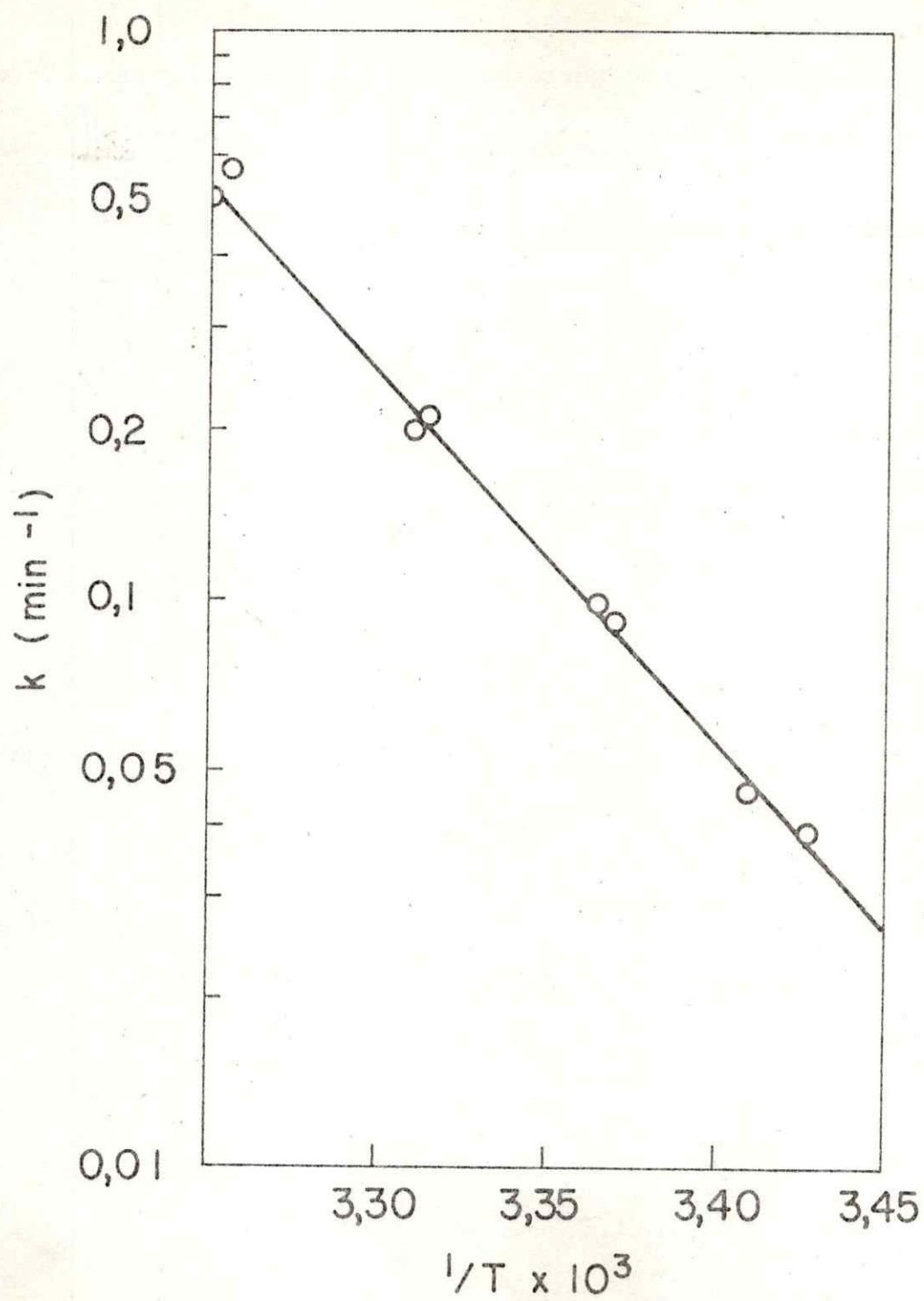


Figure 4

objeto de comparar los resultados con los obtenidos para la enzima de mamíferos, la determinación de la actividad enzimática se realizó a 38°. La Tabla I muestra que el número de recambio de dos preparaciones de deshidrogenasa succínica de coliflor, a pH 7,5, 38° y en condiciones de velocidad máxima con respecto a PMS, dió un promedio de $19.400 \pm 2.000 \text{ min}^{-1}$. Este valor es muy similar al de $18.000 \pm 1.000 \text{ min}^{-1}$ obtenido por otros investigadores para preparaciones particuladas de la enzima de corazón de vacuno (66, 95).

II REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE LA DESHIDROGENASA SUCCINICA DE DICOTILEDONEAS

A. GRADO DE ACTIVACION DE LA ENZIMA

En la Tabla II se resume los resultados obtenidos al analizar el grado de activación de la deshidrogenasa succínica en mitocondrias intactas, en muestras sometidas a sonicación y en preparaciones que se mantuvieron congeladas de un día para otro. En mitocondrias de poroto mung, aproximadamente el 60% de la enzima se encuentra en el estado activado, inmediatamente después del aislamiento de dichos organelos. Sin embargo, la sonicación de estas preparaciones determina un aumento en el grado de desactivación de la deshidrogenasa y al soneter las mitocondrias sonicadas a un ciclo de congelamiento y descongelamiento, el grado de desactivación aumenta aún más. En este último caso, sólo entre un 15% y un 20% de la enzima

Tabla I. Determinación del número de recambio de la deshidrogenasa succínica de mitocondrias de coliflor.

Se activaron mitocondrias sonicadas de coliflor con succinato 0,1 M por 12 min a 30°. Luego se enfriaron a 0° y se tomaron alícuotas, a las que se les midió inmediatamente la actividad de la deshidrogenasa succínica en la forma descrita en RESULTADOS (I A), excepto que la temperatura fue de 38°. El contenido de histidilflavina se determinó fluorimétricamente, de acuerdo a la técnica descrita en METODOS (K).

Tabla I

Experimento	Actividad específica ¹	Contenido de histidilflavina	Número de recambio ²
		nmoles/mg de proteína	
1	0,348	0,0200	17.400
2	0,397	0,0186	21.300
Promedio			19.400

¹ Micromoles de succinato oxidado/min x mg de proteína a 38°, pH 7,5, V_{máx} (PMS)

² Moles de succinato oxidado/min x mol de histidilflavina, 38°, pH 7,5, V_{máx} (PMS)

Tabla II Estado de activación de la deshidrogenasa suc
cínica en mitocondrias intactas, sonicadas y
sometidas a ciclos de congelación y desconge-
lación.

Las preparaciones se aislaron, sonicaron y ensayaron a 15° en la forma descrita en METODOS (A, C y N). Para el ensayo de la actividad enzimática de la deshidrogenasa succínica se utilizó la concentración más alta de PMS indicada en la Figura 1.

Tabla II

Preparacion	Actividad específica		(A)/(B)
	(A) Antes de la activación	(B) Después de la activación	
	µmoles de succinato oxida - do/min x mg de proteína		%
Mitocondrias de poroto mung			
Intactas	0,057	0,090	63
Sonicadas	0,022	0,106	21
Mitocondrias de poroto mung			
Intactas	0,054	0,094	58
Sonicadas	0,037	0,108	34
Congeladas - descongeladas	0,014	0,095	15
Mitocondrias de poroto mung			
Intactas	0,055	0,090	61
Sonicadas	0,050	0,169	30
Congeladas - descongeladas	0,020	0,147	15
Mitocondrias de coliflor			
Intactas	0,023	0,080	29
Sonicadas	0,024	0,095	25
Congeladas - descongeladas	0,026	0,097	27

se encuentra en forma activada. Por otra parte, en la mayoría de las preparaciones de mitocondrias de coliflor, un porcentaje menor al 20% de la enzima se encuentra en forma activada, pero los mismos tratamientos que produjeron de -sactivación de la enzima en mitocondrias de poroto mung, no produjeron una desactivación adicional de la deshidrogenasa succínica de coliflor.

B. ACTIVACION POR $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$

1. Activación por $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ en mitocondrias sonicadas de poroto mung

En partículas submitocondriales de tejidos animales, el NADH produce activación de la deshidrogenasa succínica. Sin embargo, esta activación es indirecta ya que el NADH aparentemente sólo reduce la CoQ_{10} endógena a $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$, la cual sería el verdadero agente activador. Así lo sugiere el hecho de que la extracción de la coenzima Q de dichas membranas se traduce en una pérdida de la activación por NADH, la cual se recupera al reincorporar la quinona a las membranas extraídas (65).

La Figura 5 representa la activación de la deshidrogenasa succínica por $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ en mitocondrias sonicadas de poroto mung. El experimento se realizó incubando las partículas a 29° con CoQ_{10} reducida químicamente, en condiciones anaeróbicas y en presencia de antimicina A con el objeto de minimizar la oxidación de la quinona reducida. A diferentes tiempos, se tomaron

Figura 5. Activación de la deshidrogenasa succínica en mitocondrias sonicadas de poroto mung por CoQ_{10} reducida.

Una solución 5 mM de CoQ_{10} en etanol se tituló anaeróbi- camente con NaBH_4 (2 mg/ml), siguiendo la reducción es - pectrofotométricamente a 275 nm. Una vez lograda la re - ducción completa de la quinona, la solución se acidificó con ácido acético 0,5 M con el objeto de destruir el ex - ceso de borohidruro. Se colocó una alícuota apropiada de la $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ en la rama lateral de un tubo Thunberg, junto con una solución compuesta de : manitol 0,3 M, se - roalbúmina de bovino al 0,1% (p/v), EDTA 0,1 M y amorti - guador HEPES 0,02 M, pH 7,5. El volumen total en la ra - ma lateral fue 0,3 ml. El compartimiento central del tubo contenía mitocondrias sonicadas (1,3 mg en A y 1,2 mg en B) y 3 μg de antimicina A, en 0,7 ml de la solución manitol-amortiguador recién descrita. Se preparó un tubo de éstos para cada uno de los puntos indicados en la Fi - gura. Los tubos se evacuaron repetidamente, se llenaron con N_2 y se equilibraron a 29°. Finalmente, el conteni - do de la rama lateral se vertió en el compartimiento cen - tral. A los tiempos indicados, cada tubo se enfrió rápi - damente e inmediatamente se tomó una alícuota de 50 μl para medir la actividad de la deshidrogenasa succínica a 15°. La actividad se expresa como el cambio de absorban - cia a 600 nm/min x 0,4 mg de proteína en A y por 0,36 mg

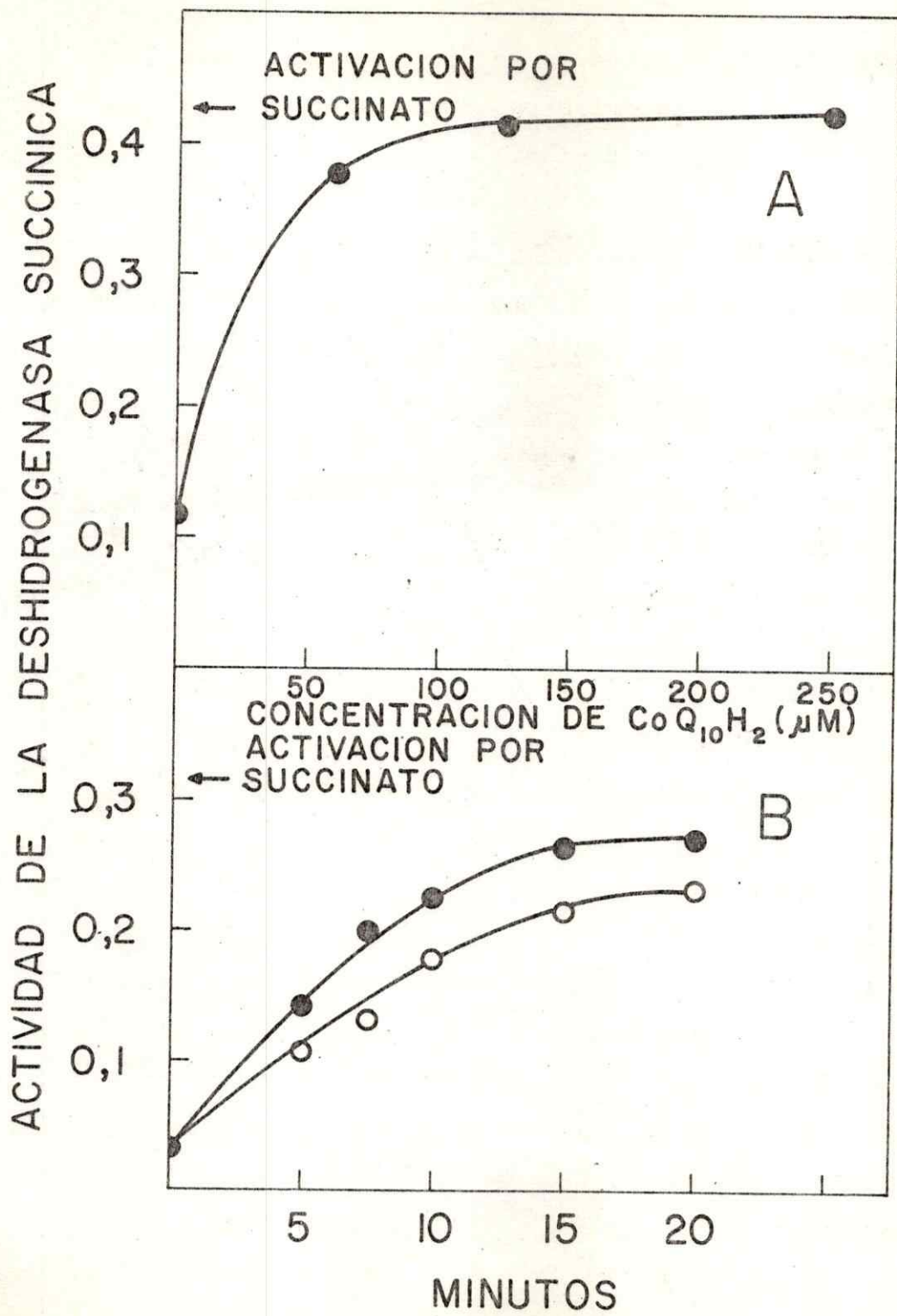


Figura 5

de proteína en B. La flecha horizontal indica la actividad de la enzima totalmente activada. A: nivel máximo de activación obtenido a diferentes concentraciones de $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$. La actividad específica de la preparación a 15° fue $0,14 \mu\text{moles de succinato oxidado/min x mg de proteína}$. B: curva de progreso de la activación en presencia de $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ $125 \mu\text{M}$ (●) y presencia de $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ $75 \mu\text{M}$ (○). La actividad específica a 15° fue $0,09 \mu\text{moles de succinato oxidado/min x mg de proteína}$.

alícuotas las cuales se enfriaron a 15° y se midió en seguida la actividad de la deshidrogenasa succínica mediante el método del PMS-DCIP, descrito anteriormente.

La Figura 5 A muestra la dependencia del proceso de activación por $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ con la concentración de la quinona reducida. Como puede apreciarse en esta Figura, a concentraciones de $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ entre 150 y 250 μM , la deshidrogenasa succínica alcanza la misma actividad que con succinato como activador.

La Figura 5 B representa las curvas de progreso para la activación de la deshidrogenasa succínica por diferentes concentraciones de ubiquinona reducida.

Experimentos similares realizados con mitocondrias sonicadas de coliflor (Fig. 6), mostraron una respuesta algo diferente a la $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$. En este caso, la activación máxima producida por la quinona reducida varió en diferentes preparaciones entre un 60 a un 75% con respecto al nivel de activación producido por el succinato y ese nivel de activación no varió al aumentar el tiempo de incubación (Fig. 6 A) o la concentración de $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ usada (Fig. 6 B). Como se verá más adelante, esta diferencia entre mitocondrias de poroto mung y de coliflor se manifiesta también cuando se emplea coenzima Q reducida endógenamente (mediante NADH o malato) para activar la deshidrogenasa succínica.

Figura 6. Activación por $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ en mitocondrias sonica -
das de coliflor.

A: Curva de progreso de la activación en presencia de
 $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ 250 μM ;

B: Efecto de la concentración de $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ en el nivel fi-
nal de activación alcanzado.

Las condiciones experimentales fueron las indicadas en la leyenda de la Figura 5, excepto que el medio de suspen -
sión para las partículas fue sacarosa 0,25 M, amortigua -
dor HEPES 0,02 M pH 7,5 y que la cantidad de antimicina
A agregada fue de 5 μg . La actividad se expresa como el
cambio de absorbancia a 600 nm/min x 0,14 mg de proteína
en A y por 0,16 mg de proteína en B. La cantidad de pro-
teína mitocondrial empleada en la incubación fue 1,4 mg
en A; 1,6 mg en B y sus actividades específicas a 15°
fueron 0,098 y 0,116 μmoles de succinato oxidado/min x mg
de proteína, respectivamente.

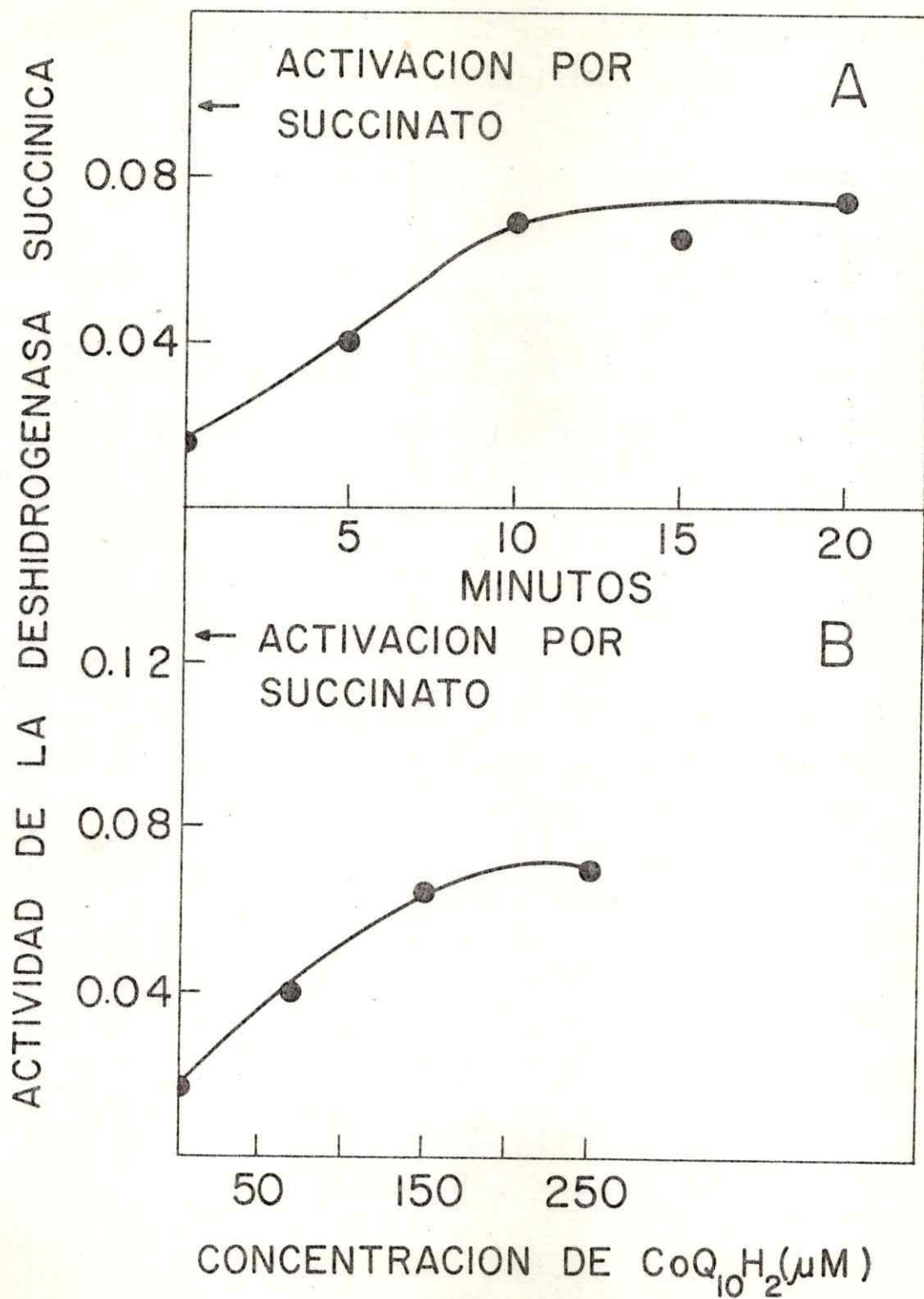


Figura 6

C.. ACTIVACION POR NADH Y SUSTRATOS NAD-DEPENDIENTES

1. Activación por NADH en mitocondrias sonicadas

La coenzima Q de la cadena respiratoria mitocondrial puede reducirse in situ por medio de cualquier compuesto capaz de entregar equivalentes reductores a nivel de los complejos I y II de la cadena transportadora de electrones. De acuerdo con esto, dichos compuestos deberían producir activación de la deshidrogenasa succínica, indirectamente al reducir la coenzima Q endógena.

La Figura 7 representa la activación de la deshidrogenasa succínica en mitocondrias sonicadas de poroto mung y de coliflor mediante NADH 1 mM, en presencia de antimicina A, adicionada con el objeto de minimizar la oxidación del NADH. Como se puede observar en dicha Figura, el NADH produjo una activación completa de la enzima en preparaciones de poroto mung, mientras que en mitocondrias sonicadas de coliflor, en condiciones experimentales comparables, sólo indujo una activación parcial de la deshidrogenasa. Con este tipo de preparación, la activación varió en diferentes experimentos entre un 40 a un 68% en comparación con la activación producida por succinato.

Figura 7. Activación por NADH en mitocondrias sonicadas de poroto mung y coliflor.

A: Mitocondrias sonicadas de poroto mung; B: Mitocondrias congeladas-descongeladas y sonicadas de coliflor.

Las condiciones experimentales para la curva A fueron las mismas descritas en la leyenda de la Figura 5 A y para la curva B, las de la leyenda de la Figura 6A, excepto que en la incubación de las mitocondrias de coliflor se usó 0,99 mg de proteína y que en ambos experimentos se reemplazó la $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ por NADH 1 mM. Aunque las actividades específicas de las dos preparaciones fueron algo diferentes (0,09 para poroto mung y 0,077 para coliflor), las actividades se normalizaron para permitir la comparación entre ambas preparaciones.

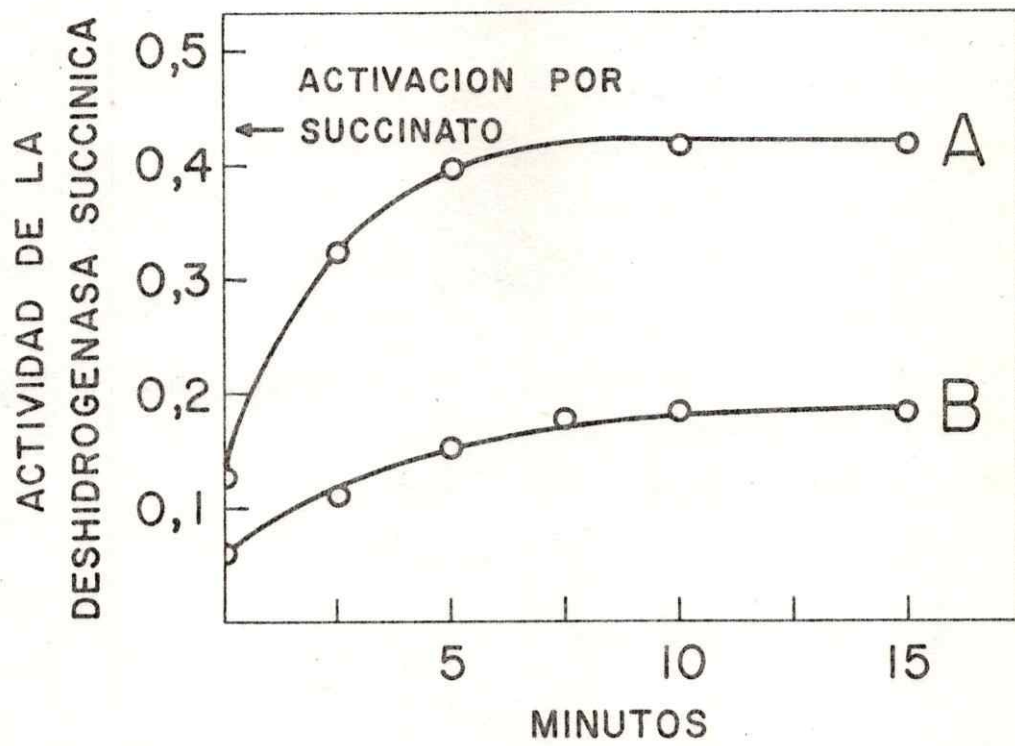


Figura 7

2. Activación por NADH y sustratos NAD-dependientes en mitocondrias intactas

La activación de la deshidrogenasa succínica por NADH se investigó también en mitocondrias intactas de coliflor. Tal como lo indican los resultados de la Figura 8 y la Tabla III, a pesar que el NADH no puede atravesar la membrana mitocondrial interna (96), la activación de la deshidrogenasa por este compuesto en mitocondrias intactas fue considerablemente mayor que en mitocondrias sonificadas de ese vegetal (Fig. 7). La Figura 8 y la Tabla III indican también que sustratos NAD-dependientes, tales como malato más piruvato, son capaces de inducir activación de la deshidrogenasa succínica en mitocondrias intactas. Sin embargo, el nivel de activación que alcanza la enzima es menor que el producido por el NADH. Otros sustratos NAD-dependientes, tales como L-malato, -cetoglutarato y L-glutamato en presencia de arsenito, produjeron grados de activación similares al producido por malato más piruvato.

El hecho que en mitocondrias de coliflor la deshidrogenasa succínica sea activada sólo parcialmente por NADH y sustratos NAD-dependientes en todas las condiciones analizadas, sugirió la posibilidad que una combinación de los dos tipos de "efectores" ensayados separadamente pudiera inducir una activación completa de la enzima. Tal como indica la Figura 8, la activación

Figura 8. Activación de la deshidrogenasa succínica en mitocondrias de coliflor por NADH 1 mM y por malato 20 mM más piruvato 20 mM.

En una serie de tubos de Thunberg se colocó 0,34 mg de proteína de mitocondrias de coliflor y 6 ug de antimicina A en un volumen final de 0,5 ml de una solución compuesta por sacarosa 0,25 M, amortiguador HEPES 0,02 M pH 7,5. Las ramas laterales de los tubos contenían 0,5 μ moles de NADH ó 10 μ moles tanto de piruvato como de malato, o ambos, según se indica en las curvas. Después de ser evacuados repetidamente y llenados con N_2 , los tubos se equilibraron a 29°, se mezclaron sus contenidos y se incubaron a esa temperatura. A los tiempos indicados se separó un tubo de cada serie e inmediatamente se tomó una alícuota de 40 μ l para medir la actividad de la deshidrogenasa succínica a 15°. La actividad enzimática se expresa como el cambio de absorbancia a 600 nm/min x 0,17 mg de proteína mitocondrial.

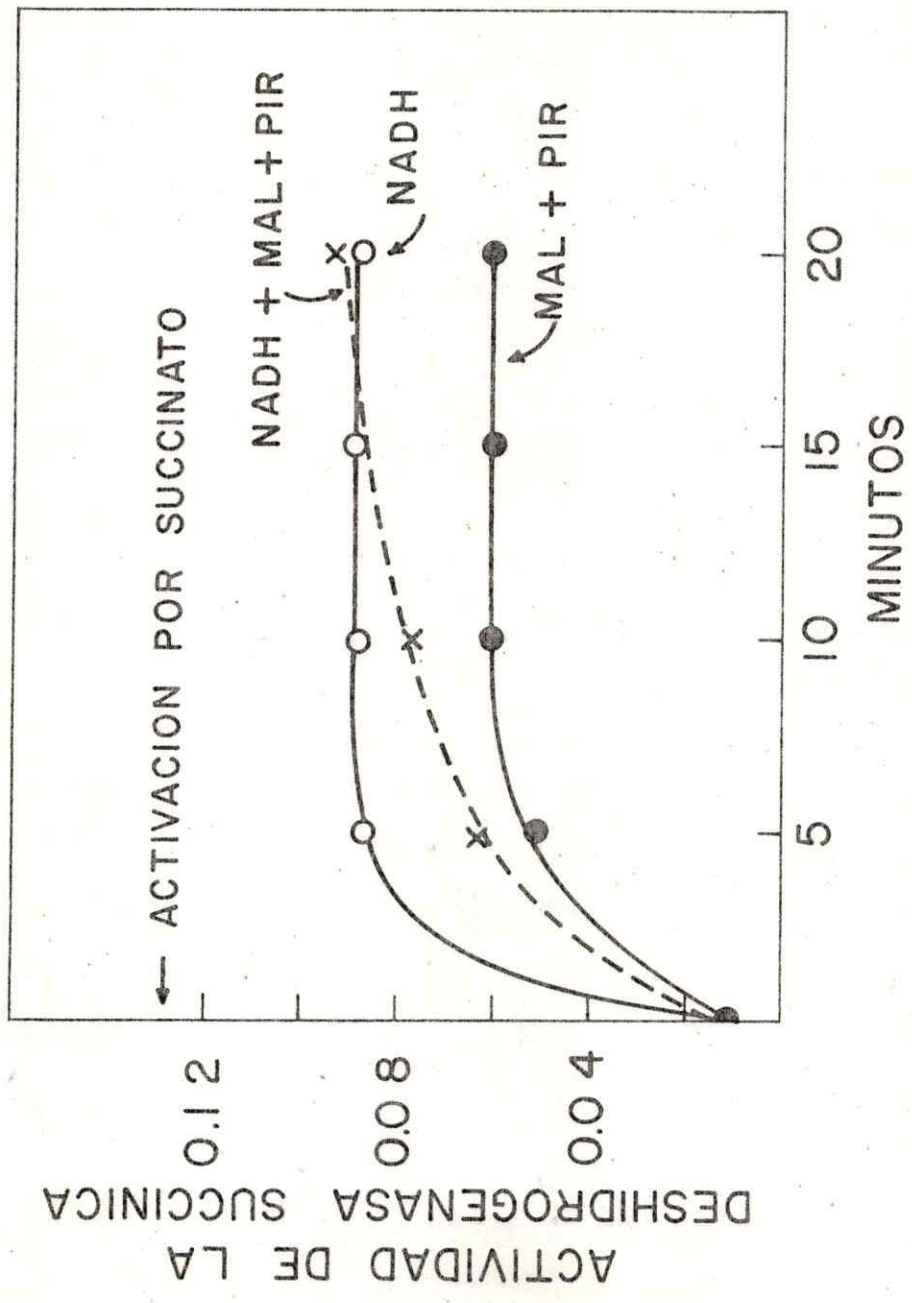


Figura 8

Tabla III. Activación de la deshidrogenasa succínica de mitocondrias de coliflor por NADH y por malato más piruvato.

Las mitocondrias (3,4 a 5 mg de proteína en los diferentes experimentos), suspendidas en un volumen final de 0,5 ml de sacarosa 0,25 M, amortiguador HEPES 0,02 M, pH 7,5, se colocaron en el compartimiento principal de tubos de Thunberg, en presencia de 6 μ g de antimicina A. La rama lateral de los tubos contenía 0,05 μ moles de NADH ó 10 μ moles tanto de L-malato, como de piruvato. Después de tres ciclos de evacuación y llenado con N₂ donde se indica, los tubos se incubaron a 29,2°. A intervalos de 2,5 min, los tubos se retiraron y enfriaron en hielo y se tomaron alícuotas de 40 μ l, a las cuales se les determinó inmediatamente la actividad de la deshidrogenasa succínica a 15°. La incubación continuó hasta que el grado de activación se hizo constante. El porcentaje de activación se calculó tomando como 100% el nivel máximo de activación producido por la activación mediante succinato.

Tabla III

Condiciones	Activación por malato + <u>piru</u> vato	NADH	% Activación por NADH/por malato + <u>pi</u> ruvato	% Activación por NADH antes de <u>so</u> nicación/ después de <u>so</u> nicación
	%			
Mitocondrias,				
N ₂ , antimicina	58	91	1,6	
	52	78	1,5	
	47	77	1,6	
Mitocondrias,				
antimicina		62		
Después de <u>so</u> nicación		39		1,6

producida por la acción conjunta de NADH y malato más piruvato fue nuevamente incompleta e, inesperadamente, el nivel de activación alcanzado por la enzima fue menor al inducido por el NADH solo.

Estos resultados pueden estar relacionados con la probable presencia de dos NADH deshidrogenasas ligadas a la membrana interna de las mitocondrias de vegetales (97, 98), localizadas en la superficie externa e interna de dicha membrana respectivamente (99). Como el NADH no puede atravesar la membrana mitocondrial interna (96), se supone que en mitocondrias intactas, dicho compuesto es oxidado por acción de la NADH deshidrogenasa "externa". En cambio, el NADH generado intramitocondrialmente, mediante la deshidrogenasa málica localizada en la matriz mitocondrial (100), produciría la reducción de la NADH deshidrogenasa "interna" (98). Por lo tanto, es necesario considerar estos antecedentes al interpretar los diferentes grados de activación de la deshidrogenasa succínica, inducidos por sustratos NAD-dependientes y NADH en mitocondrias intactas de coliflor y, también, para comparar la activación producida por el NADH antes y después de someter las mitocondrias a sonicación.

La Tabla III muestra que en mitocondrias intactas de coliflor, la razón entre los porcentajes de activación producidos por el NADH y por malato más piruvato, respectivamente, es muy constante y que el mismo valor numérico se obtiene para el cociente entre el porcentaje de activación por el NADH en mitocondrias intactas y el porcentaje de activación producido por este compuesto

después de sonicar las mitocondrias. Estos resultados parecen indicar que al sonicar las mitocondrias, se expone la NADH deshidrogenasa interna, probablemente por una inversión "adentro-afuera" de la membrana mitocondrial interna, tal como sucede en mitocondrias de tejidos animales (101). Así mismo, sugieren que el cociente de activación indicado en la Tabla III sería una medida del grado relativo de activación producido por acción de las NADH deshidrogenasas externa e interna respectivamente, en condiciones de equilibrio aparente.

D. ACTIVACION POR ATP Y ADP

1. Activación por ATP y ADP en mitocondrias de poroto mung

La deshidrogenasa succínica en mitocondrias intactas de tejidos animales (6) y de levadura de panadería (102), es activada por ATP mediante un proceso insensible a oligomicina. El ADP, por otra parte, no produce activación de la enzima sino que, por el contrario, induce indirectamente una desactivación de ella al promover la transición desde el estado 4 al estado 3, lo que se traduce en la oxidación de la $\text{Co}_2_{10}\text{H}_2$. Otra característica de este proceso de activación por ATP en los sistemas anteriormente mencionados, es que no se presenta en partículas submitocondriales ni en mitocondrias dañadas (6).

En la Figura 9 se presentan los resultados obtenidos al estudiar la activación de la deshidrogenasa succínica por ATP y ADP en presencia de

Figura 9. Activación de la deshidrogenasa succínica por ATP y ADP en mitocondrias de poroto mung.

A: Curva de progreso para la activación por ADP 0,8 mM;
B: Efecto de la concentración de ATP en el nivel final de activación.

Se suspendieron mitocondrias intactas (1,8 mg de proteína) en un volumen final de 0,25 ml del medio especificado en la leyenda de la Fig. 5 y se incubaron a 30° en tubos de ensayo, en presencia de 5 ug de oligomicina. En la Figura 9 A la activación se inició adicionando 5 μ l de ADP 0,04 M y en la Figura 9 B, mediante la adición de alícuotas apropiadas de ATP 5 mM. Se tomaron muestras de 50 μ l a diferentes tiempos e inmediatamente se midió la actividad de la deshidrogenasa succínica a 15°. En la Figura B sólo se muestra el nivel final de activación (determinado después de incubar 5 min a 30°). Las actividades se expresan como el porcentaje de actividad con respecto a la actividad de una muestra totalmente activada por succinato.

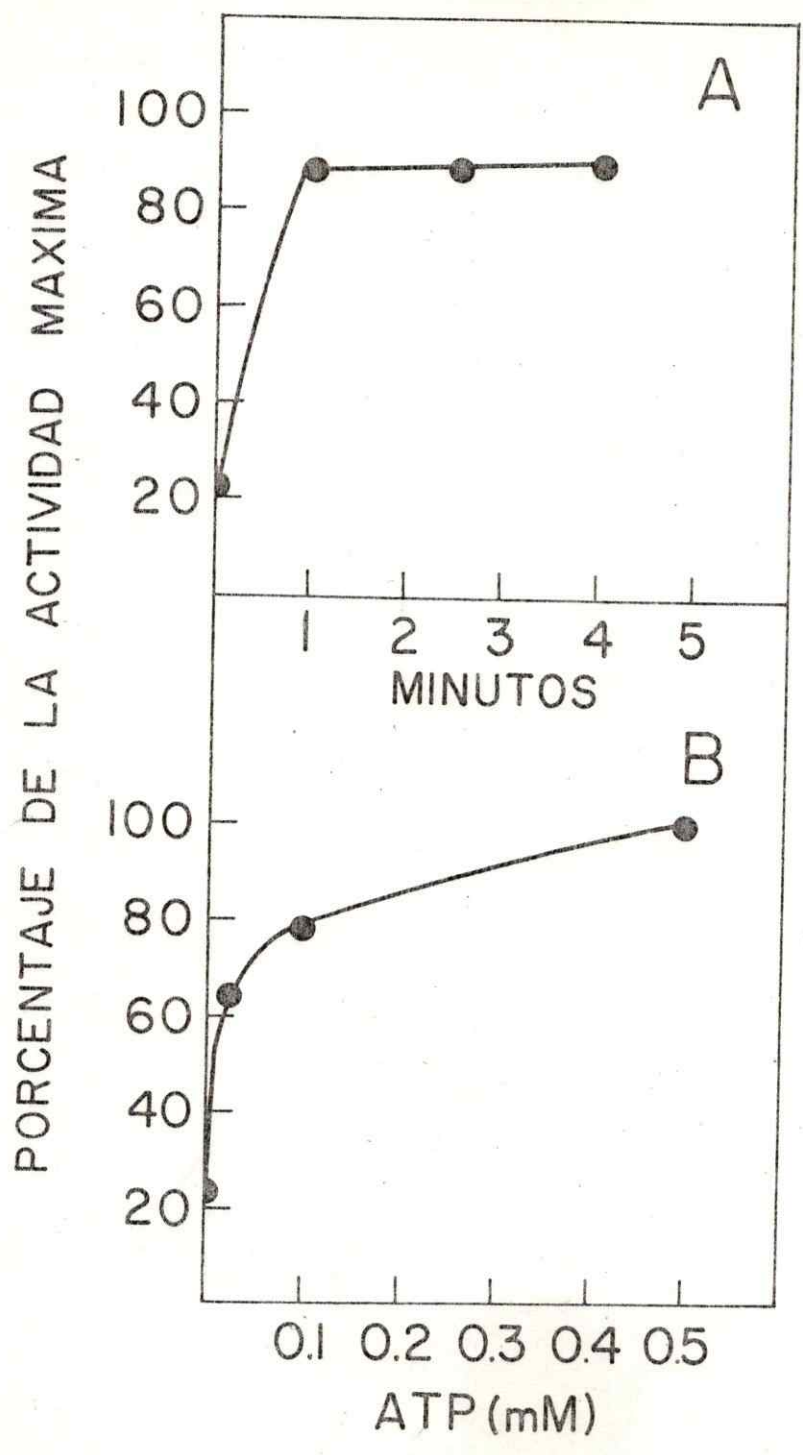


Figure 9

oligomicina, en mitocondrias de poroto mung. La adición del inhibidor de la fosforilación oxidativa tiene por objeto excluir la participación del sistema de conservación de la energía en el proceso de activación por estos nucleótidos, así como impedir la reducción de la CoQ_{10} endógena, ya que el ATP aumenta el estado de reducción de la quinona en ciertos estados metabólicos (6).

La Figura 9 A muestra que a concentraciones de ATP relativamente bajas, aproximadamente 0,5 mM, la deshidrogenasa succínica alcanza igual actividad que con succinato como activador. Este proceso de activación se produce con bastante rapidez a 30°; en efecto, en presencia de ATP 0,1 mM, la reacción se completa en 1 minuto aproximadamente.

La Figura 9 B representa la curva de progreso para la activación de la deshidrogenasa succínica por ADP en presencia de oligomicina. Como puede apreciarse en esta Figura, a concentraciones de ADP comparables a las de ATP (Fig. 9 A), la enzima alcanza entre un 90 a un 100% de activación. Este resultado contrasta con el efecto desactivante de este nucleótido en mitocondrias de corazón (6).

2. Activación por ATP y ADP en mitocondrias de coliflor.

En mitocondrias de coliflor, el efecto activante del ATP y ADP (Fig. 10) fue nuevamente más complicado que en mitocondrias de poroto mung, debido a que la activación de la enzima fue incompleta a todas las concentraciones de ATP y ADP ensayadas, tanto en

Figura 10. Efecto del ATP y ADP en la actividad de la deshidrogenasa succínica de coliflor.

- A: Activación por ATP 0,5 mM con (Δ) y sin (o) oligomicina en mitocondrias intactas y sin oligomicina (\bullet) en mitocondrias sometidas a congelación y descongelación. En un volumen final de 0,25 ml se colocó 0,1 de la respectiva preparación mitocondrial (3 mg de proteína) con o sin 5 μ g de oligomicina, 0,125 ml de una solución formada por sacarosa 0,25 M, amortiguador HEPES 0,02 M, seroalbúmina de bovino al 0,1% (p/v) y EDTA 0,1 mM, pH 7,5 y 25 μ l de ATP 5 mM. La suspensión se incubó a 29° y se tomaron alícuotas de 25 μ l, las que se ensayaron inmediatamente. El grado de activación se comparó con la activación máxima producida por el succinato.
- B: Activación por ADP 0,8 mM en presencia de oligomicina en mitocondrias intactas (o) y en mitocondrias sometidas a congelación, descongelación y sonicación (\bullet). Las condiciones experimentales fueron iguales que en A, excepto que el medio de suspensión durante la activación fue manitol 0,3 M y cisteína 0,1 mM, pH 7,5.
- C: Comparación de la activación por ADP y ATP en mitocondrias intactas de coliflor; (Δ): ATP 0,5 mM en presencia de 5 μ g de oligomicina; (\bullet): ADP 0,5 mM en presencia de 5 μ g de oligomicina; (o): ADP 0,5 mM sin oligomicina.

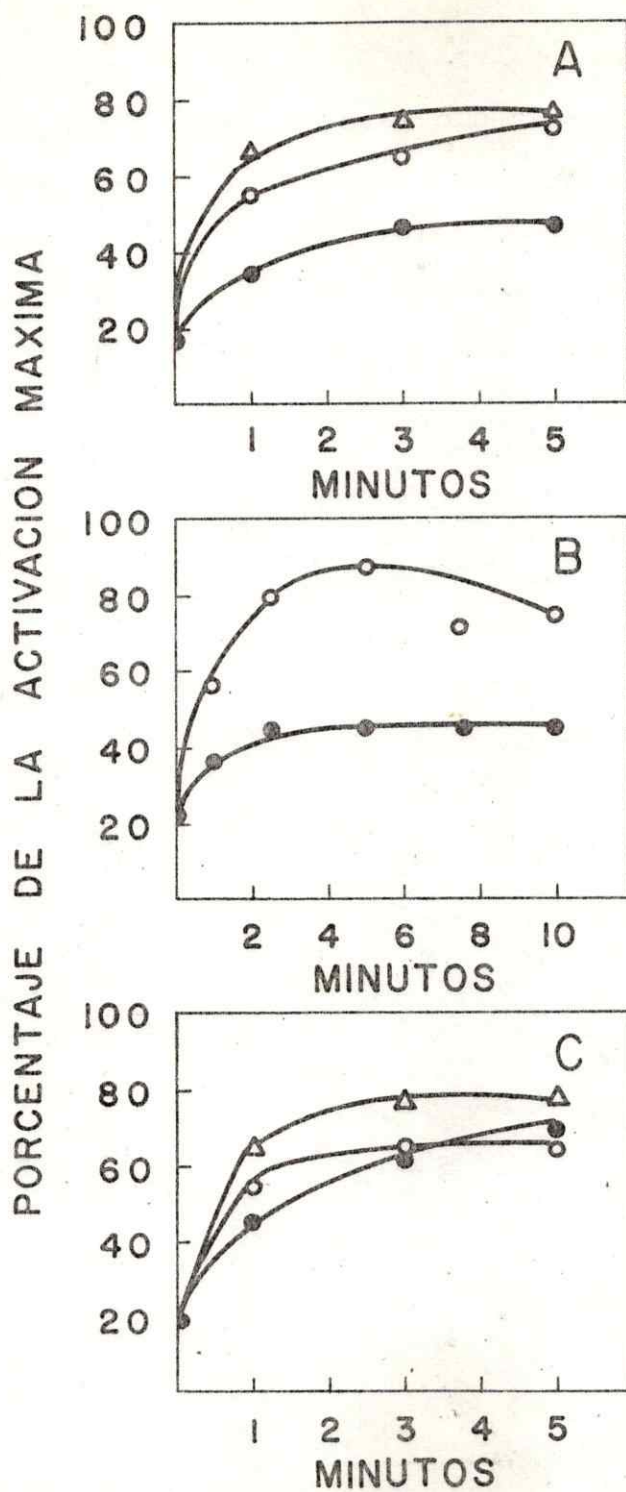


Figura 10

presencia como en ausencia de oligomicina. La Figura 10A representa la curva de progreso para la activación de la deshidrogenasa succínica por ATP, tanto en mitocondrias intactas de coliflor, como en mitocondrias sometidas a un ciclo de congelamiento-descongelamiento. Como se puede apreciar en dicha figura, la activación por ATP en mitocondrias intactas es algo más rápido en presencia de oligomicina que en ausencia de ella, lo que sugeriría la presencia de una ATPasa sensible a oligomicina en la preparación. Al igual que en el caso de mitocondrias de poroto mung, el ADP también produjo activación de la enzima, aunque ésta declinó después de alcanzar su nivel máximo (Figura 10 B).

Aunque no se señala, la inclusión de arsenito 1 mM en las condiciones experimentales de la Figura 10 B, se tradujo en una disminución del nivel máximo de activación producido por el ADP en mitocondrias intactas y en una aceleración marcada de la desactivación que se produce después de 5 minutos de incubación en presencia del nucleótido. Este resultado sugiere que, al menos en parte, el efecto activador del ADP podría deberse a síntesis de GTP. Por otra parte, el hecho que la activación de la deshidrogenasa succínica lograda en presencia de ADP se manifieste en presencia de oligomicina (Figura 10 C), indicaría que este fenómeno no se debe a una conversión del ADP en ATP mediante el proceso de fosforilación oxidativa. Sin embargo, no puede excluirse la posibilidad de tal conversión mediante otros mecanismos (por ejemplo, adenilato quinasa).

La activación producida tanto por ATP como por ADP, se presenta también, aunque en menor grado, en mitocondrias sonicadas de coliflor o en mitocondrias sometidas a ciclos de congelamiento-descongelamiento (Fig. 10 A y B). Esto está en total oposición con la ausencia de activación de la enzima por estos dos nucleótidos en mitocondrias dañadas de mamíferos (6).

E. ACTIVACION POR ITP E IDP

En partículas submitocondriales y en preparaciones solubles obtenidas a partir de tejidos animales, el IDP y el ITP a concentraciones moderadas, producen activación de la deshidrogenasa succínica. En cambio, el IMP, el IMP cíclico y varios otros mono y dinucleótidos, incluyendo el AMP cíclico, a concentraciones comparables, no tienen efecto en la actividad de la enzima (6).

La Figura 11 muestra la curva de progreso para la activación de la deshidrogenasa succínica en mitocondrias sonicadas de coliflor por IDP 5 mM. Como parece ser una norma general para todos los procesos de activación de esta enzima en mitocondrias de esta especie vegetal, el efecto activador del IDP fue de nuevo incompleto. El porcentaje de activación alcanzado por la deshidrogenasa en estas condiciones, fue de aproximadamente un 70%, en comparación con la activación producida por succinato. En estas mismas condiciones experimentales, el ITP también produjo activación de la enzima, aunque cuantitativamente

Figura 11. Activación de la deshidrogenasa succínica por IDP en mitocondrias sonicadas de coliflor.

Se incubaron mitocondrias sonicadas de coliflor (3,6 mg de proteína) con IDP 5 mM, en un volumen final de 0,8 ml del medio de suspensión especificado en la Figura 8. A los tiempos indicados, se tomaron alícuotas de 0,2 ml y se ensayaron inmediatamente a 15°. La actividad enzimática medida en estas condiciones se comparó con la de una muestra totalmente activada con succinato.

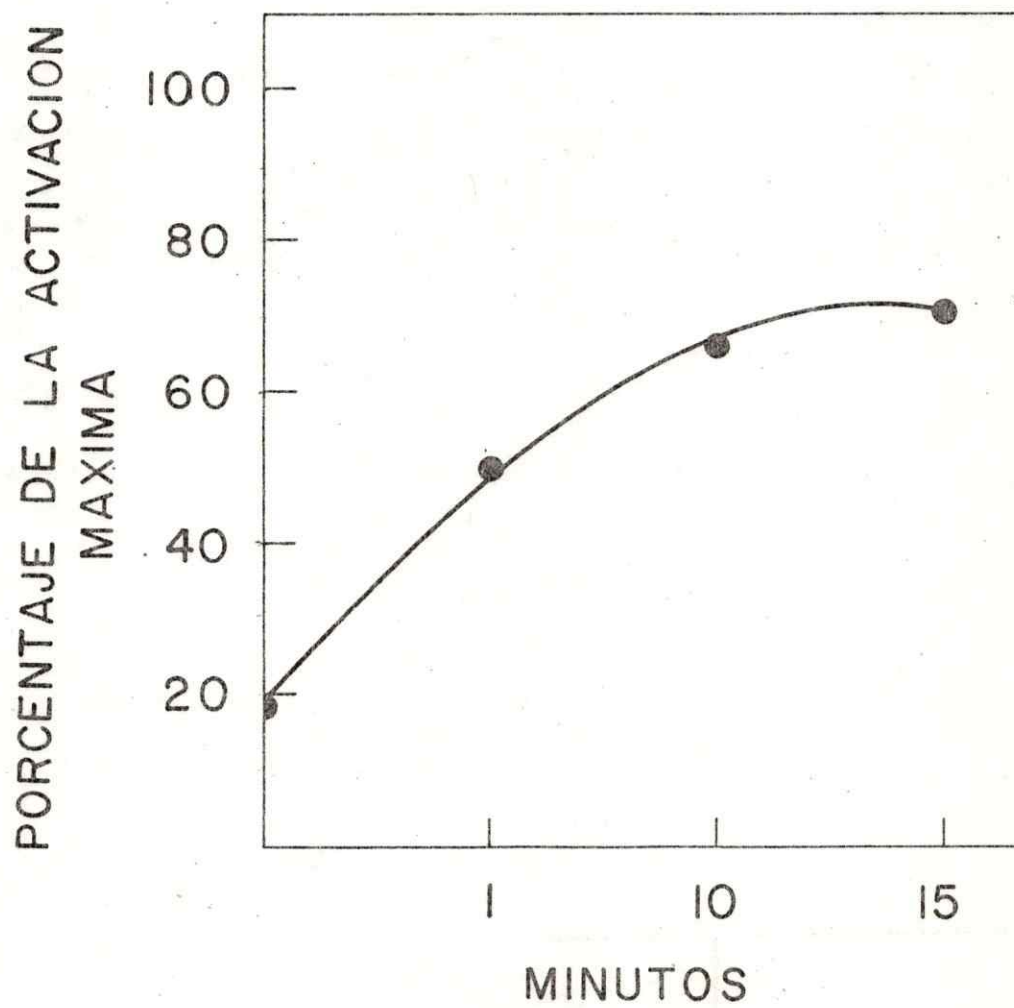


Figura 11

su efecto activador fue menor que el del nucleótido difosforado. Estos resultados son muy similares a los obtenidos con la enzima de corazón de vacuno (6, 70).

F. ACTIVACION POR ANIONES INORGANICOS Y pH ACIDO

1. Cinética de activación

En la Figura 12 se presentan las curvas de progreso para la activación de la deshidrogenasa succínica a pH ácido y por aniones en mitocondrias sonificadas de coliflor. Tal como lo indica dicha figura, al disminuir el pH de la suspensión mitocondrial, desde 7,2 a 6,5 o 6,1 e incubarla a 30°, la actividad de la deshidrogenasa succínica aumenta gradualmente. El nivel final de activación alcanzado por la enzima en estas condiciones, es mayor a medida que disminuye el pH del medio de incubación (en el rango comprendido entre pH 7,2 a 6,0). Si la incubación de la preparación enzimática a los pH indicados se realiza en presencia de Br^- 0,1 M, el grado de activación aumenta marcadamente, manteniéndose la misma dependencia del Ph anteriormente anotada. Por otra parte, si la incubación de la enzima particulada con Br^- 0,1 M se realiza al pH original de la suspensión (pH 7,2), no se produce activación. En consecuencia, el proceso de activación de la enzima por aniones inorgánicos parece ser estrictamente dependiente del pH del medio de incubación y sólo se producirá a pH ácido.

Figura 12. Curva de progreso de la activación de la deshidrogenasa succínica a pH ácido en presencia y ausencia de Br^- 0,1 M en mitocondrias sonicadas de coliflor.

(o): pH 6,5; (●): pH 6,1; (□): pH 6,5 en presencia de Br^- 0,1 M; (Δ): pH 6,1 en presencia de Br^- 0,1 M.

Se suspendieron mitocondrias sonicadas (5,7 mg de proteína) en 0,7 ml de una solución formada por: manitol 0,3 M, sero - albúmina de bovino al 0,1% (p/v), EDTA 0,1 mM pH 7,5 y la mezcla se equilibró a 30°. El pH de la suspensión fue 7,2 a 30°. Para iniciar la activación se agregó 0,1 ml de amortiguador 2-(N-morfolino)etanosulfonato, pH 6,05 ó 6,5 según el caso, con o sin Br^- 0,1 M. Se tomaron alícuotas de 40 ul a los tiempos indicados, las que se ensayaron inmediatamente a 15°. La actividad medida en estas condiciones se comparó con la de una muestra totalmente activada con succinato. Una muestra control, mantenida a 30° a su pH original (pH 7,2), no presentó cambios de actividad en el curso del experimento.

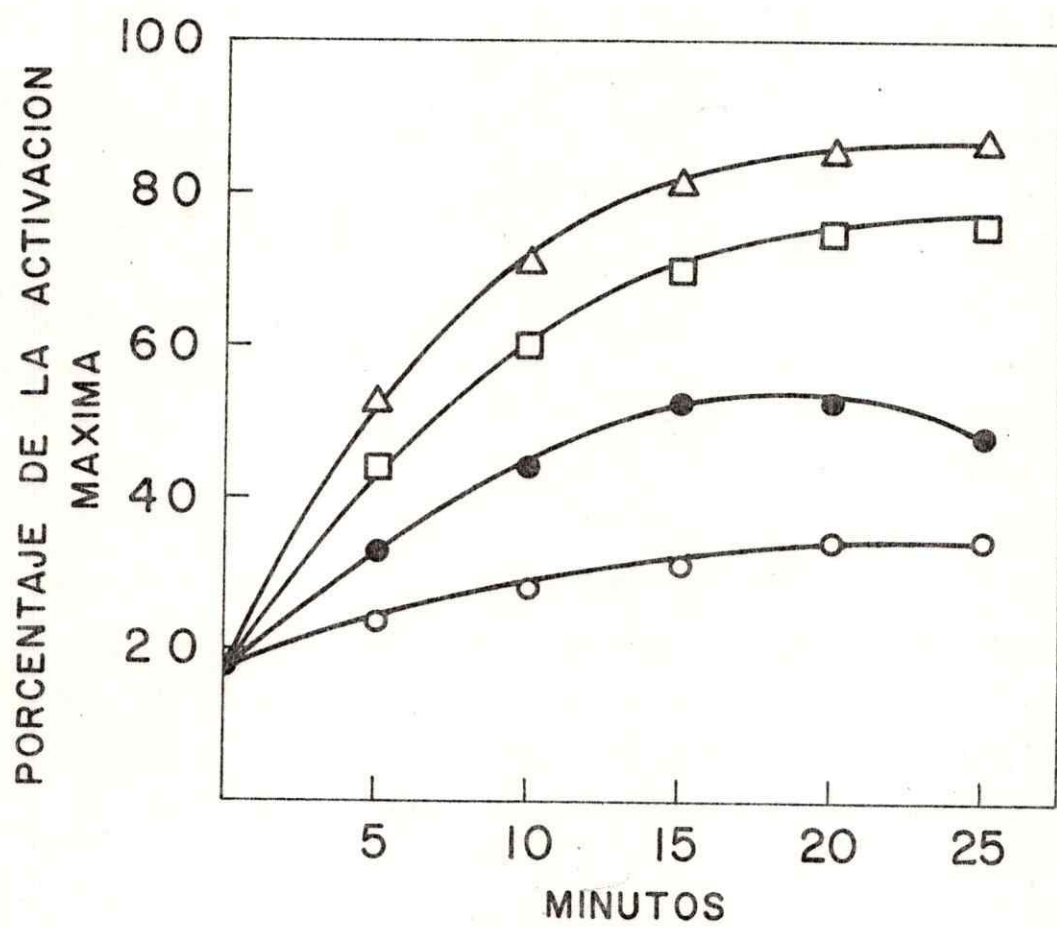


Figura 12

La Figura 13 indica que la activación de la deshidrogenasa succínica a pH ácido y por Br^- , sigue una cinética de primer orden y que la adición del anión se traduce en un aumento de unas tres veces en el valor de la constante aparente de velocidad para este proceso.

2. Relación entre activación de la deshidrogenasa succínica y contenido de oxaloacetato de mitocondrias de coliflor

Los resultados presentados en la Tabla II indican que tanto la enzima de coliflor como la de poroto mung, se encuentra en un gran porcentaje en el estado desactivado. Con el objeto de analizar si la fracción de la enzima que se aísla en este estado contiene o no oxaloacetato firmemente unido y si el proceso de activación implica desplazamiento y disociación de este oxaloacetato, tal como se ha descrito para la enzima de mamíferos (74 - 76), se incubó la enzima a 30° con Br^- 0,2 M a pH 6,0 y se determinó el contenido de oxaloacetato de la enzima antes y después de la activación. Los resultados presentados en la Tabla IV indican que antes de someter la enzima al proceso de activación, las partículas contenían 0,06 nmoles de oxaloacetato por mg de proteína; en cambio, en la preparación enzimática activada y lavada por centrifugación, no se pudo detectar la presencia del cetoácido. Una muestra control (no activada) incubada a 30° y a pH 7,2 en ausencia de Br^- y tratada en forma similar a la muestra activada, contenía también 0,06 nmoles de

Figura 13. Cinética de activación de la deshidrogenasa succínica a pH ácido en presencia y ausencia de Br^- 0,1 M en mitocondrias sonicadas de coliflor.

(o): pH 6,1; (●): pH 6,1 en presencia de Br^- 0,1 M. Las condiciones experimentales fueron las mismas que para la Figura 12. La concentración de la enzima desactivada se expresó como la diferencia entre la actividad de la enzima totalmente activada y la actividad de la enzima medida a los tiempos indicados.

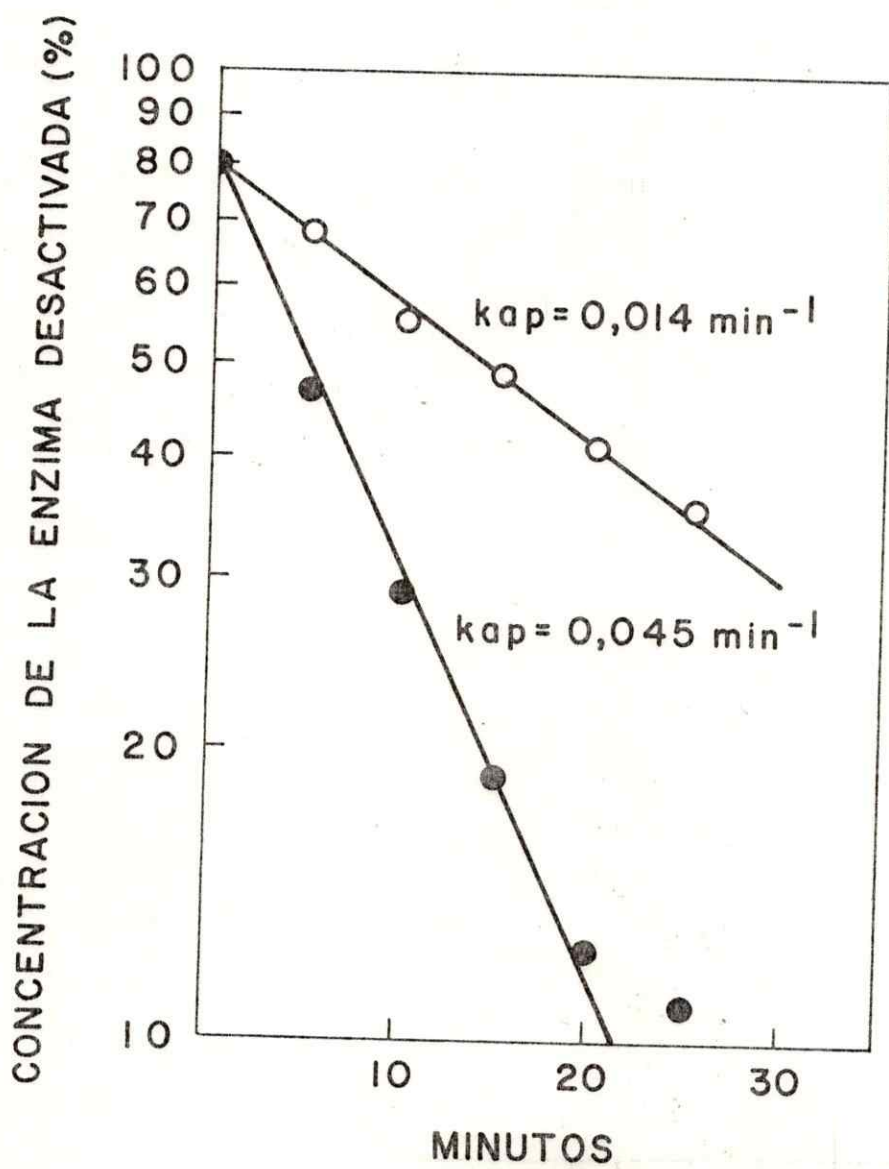


Figura 13

Tabla IV. Activación de la deshidrogenasa succínica por Br^- y liberación del oxaloacetato ligado firmemente.

Mitocondrias sonicadas de coliflor (46 mg), se incubaron a 30° con NaBr 200 mM en presencia de amortiguador MES 0,133 M pH 6,0, en un volumen final de 5,0 ml. A los tiempos indicados, se tomaron alícuotas de 15 μl , a las cuales se les determinó la actividad de la deshidrogenasa succínica a 15° . La actividad específica de la enzima totalmente activada fue 0,068 $\mu\text{moles de succinato/min} \times \text{mg de proteína}$. Después de 18 min de incubación, la muestra se enfrió a 0° y se centrifugó 30 min a 144.000 x g; el residuo se resuspendió en 3 ml de amortiguador HEPES 50 mM pH 7,5 y se centrifugó nuevamente en las condiciones anteriores. El sedimento resultante se resuspendió en 2,2 ml del mismo amortiguador y se precipitó con 0,3 ml de ácido perclórico al 70% (p/v). El sobrenadante que contiene el oxaloacetato liberado por el ácido perclórico, se neutralizó con KOH 6 N, se clarificó por centrifugación y finalmente se determinó fluorimétricamente el contenido del oxaloacetato. El contenido de oxaloacetato de la enzima desactivada se determinó en otra muestra tratada en forma similar, excepto que se mantuvo a pH 7,5 y se omitió la adición de NaBr.

Tabla IV

Tiempo a 30°	Actividad enzimática ^a	%Activación máxima ^b	Contenido de oxaloacetato
min			nmoles / mg de proteína
0	0,025	21	0,06
5	0,086	71	
10	0,101	83	
15	0,107	89	
18	0,107	89	0,00

^a La actividad enzimática se expresó como el cambio de absorbancia a 600 nm/min x 15 μ l de preparación enzimática.

^b El porcentaje de activación se calculó tomando como 100% la actividad máxima producida mediante la activación por succinato.

oxaloacetato por mg de proteína.

Es muy difícil concluir sólo en base a estos experimentos que el oxaloacetato detectado en las partículas extensamente desactivadas está ligado únicamente a la deshidrogenasa succínica. Idealmente, estos experimentos deberían haberse realizado en preparaciones altamente purificadas y homogéneas de la enzima, las cuales fueron imposible de obtener. Entre los procedimientos ensayados para extraer la enzima en forma soluble se pueden mencionar los siguientes: incubación de las mitocondrias con fosfolipasa A de veneno de Naja naja, tratamientos con varios agentes caotrópicos, extracción alcalina de polvos acetónicos y butanólicos de mitocondrias sonicadas y tratamientos con distintos detergentes.

G. EFECTO DEL 2,4-DINITROFENOL EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA DESHIDROGENASA SUCCINICA

En mitocondrias de corazón o de hígado, los agentes desacoplantes, tales como el DNF, producen una desactivación rápida y extensa de la deshidrogenasa succínica debido, probablemente, a que inducen la oxidación casi completa de la $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ endógena (65). Sin embargo, en mitocondrias de coliflor, el DNF a concentraciones suficientes para producir el desacoplamiento completo de la respiración del proceso de fosforilación (66 μM), no indujo la desactivación de la enzima presente en forma parcialmente activa en dichas mitocondrias (Tabla II), ni

contrarrestó la activación producida por sustratos NAD-dependientes, a pesar de que este tipo de activación es, seguramente, mediada por la $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$.

El efecto del DNF sobre el estado de activación de la deshidrogenasa se estudió con mayor profundidad en mitocondrias de poroto mung. Mitocondrias de esta especie vegetal, con una razón de control respiratorio de 4 a 5 con malato o succinato como sustratos, se titularon con DNF, con el objeto de determinar la concentración de este compuesto requerida para producir un desacoplamiento total de los procesos de respiración y de fosforilación. En seguida, las mitocondrias se incubaron a 30° con DNF 1,3 mM, que corresponde a una concentración significativamente mayor a la requerida para producir desacoplamiento completo y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos para determinar la actividad de la deshidrogenasa succínica. En estas condiciones no se observó ningún efecto del DNF, a pesar de que el nivel de activación de la enzima antes de la adición del desacoplante (21 a 40%), habría permitido detectar fácilmente cualquier efecto desactivante.

III SUSTITUCION DEL GRUPO PROSTETICO DE LA DESHIDROGENASA SUCCINICA POR ANALOGOS FLAVINICOS

A. ENFOQUE EXPERIMENTAL

El procedimiento experimental diseñado (Fig. 14) fue el siguiente: se cultivó levaduras de la cepa HK 645 (79, 103, 104) en presencia de diferentes análogos de riboflavina, como única fuente de flavina en el medio de cultivo. Posteriormente se solubilizó y se purificó la deshidrogenasa succínica sintetizada por las células en esas condiciones, con el objeto de analizar sus propiedades catalíticas e identificar la flavina que forma su grupo prostético. Para identificar el grupo prostético flavínico, la enzima purificada se hidrolizó con enzimas proteolíticas; en seguida, se aislaron los péptidos flavínicos resultantes y se rompió el enlace flavina-proteína.

Los compuestos análogos de riboflavina empleados fueron: 7-metilriboflavina y 8-metilriboflavina. La estructura de estos análogos y la de la riboflavina se esquematizan en la Figura 15.

Figura 14. Procedimiento experimental para identificar la flavina del grupo prostético de la deshidrogenasa succínica de levadura.

Cultivo de la levadura con diferentes análogos de riboflavina

|

Solubilización y purificación de la deshidrogenasa succínica

|

Digestión proteolítica

|

Aislamiento de los péptidos flavínicos

|

Ruptura del enlace covalente flavina-proteína

|

Identificación de la flavina libre resultante

Figura 15. Estructura de la riboflavina, 7-metilriboflavina y 8-metilriboflavina

A: riboflavina; B: 7-metilriboflavina; C: 8-metilriboflavina.

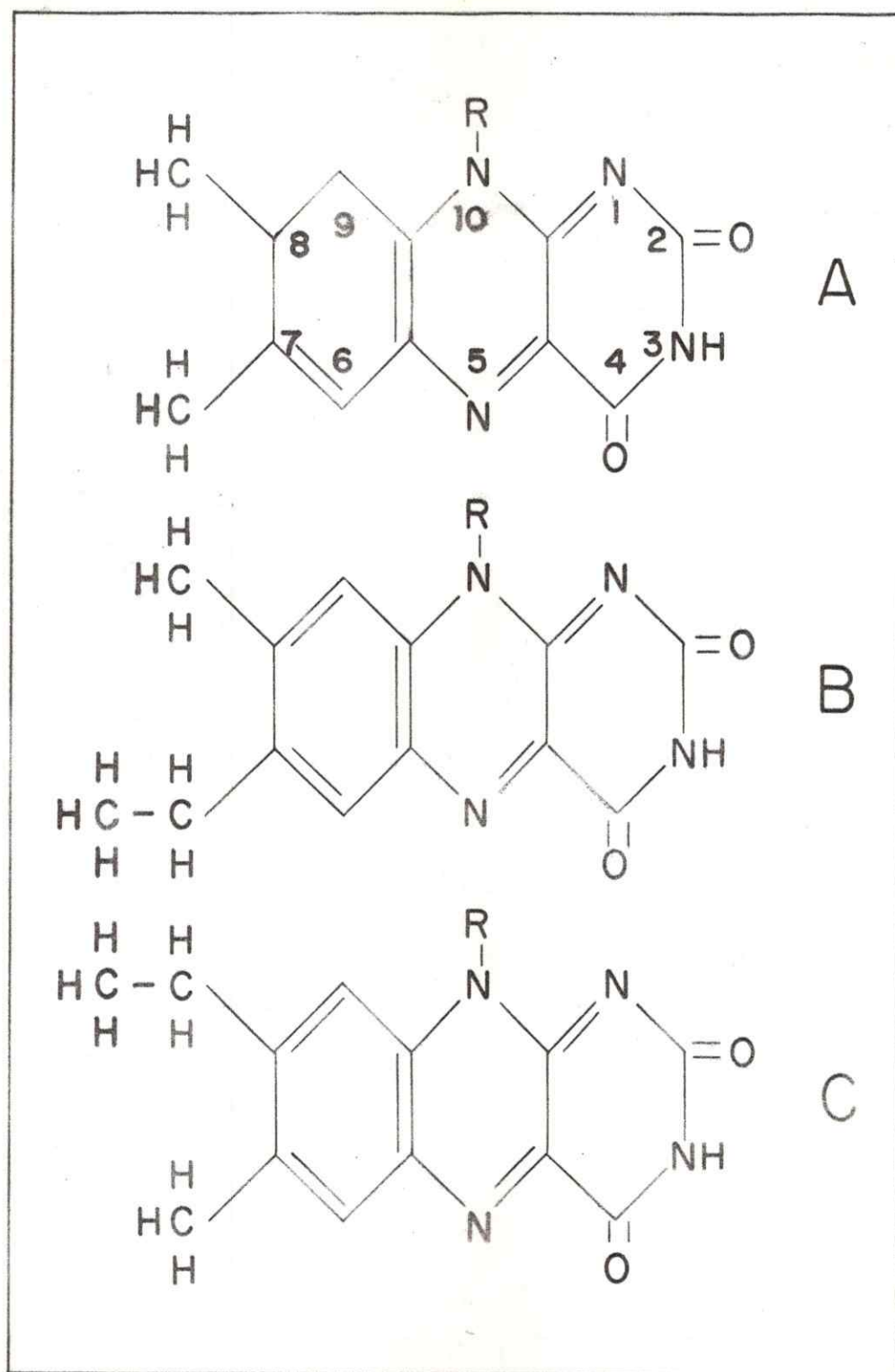


Figura 15

B. CRECIMIENTO DE LA CEPA MUTANTE HK 645 EN PRESENCIA DE DIFERENTES FLAVINAS

1. Crecimiento aeróbico

En la Figura 16 se presentan las curvas de crecimiento aeróbico del Saccharomyces cerevisiae HK 645 en presencia de riboflavina, 7-metilriboflavina y 8-metilriboflavina. Como se puede apreciar en esa figura, la cepa de levadura empleada puede utilizar cualquiera de los dos análogos metilados de riboflavina para su crecimiento. Sin embargo, la velocidad de crecimiento depende de la naturaleza de la flavina adicionada al medio de cultivo. Con 8-metilriboflavina el cultivo llegó a la fase estacionaria después de 46 horas de incubación en las condiciones especificadas en la leyenda de la Figura 16. Con riboflavina, el período de incubación fue de 72 horas, mientras que con 7-metilriboflavina, el cultivo sólo alcanzó la fase estacionaria después de 98 horas de incubación. En ausencia de flavinas no se observó crecimiento del mutante.

2. Crecimiento anaeróbico

La cepa mutante HK 645 puede crecer anaeróbicamente (Figura 17) utilizando cualquiera de las tres flavinas mencionadas. Sin embargo, a diferencia de lo que sucede con el crecimiento aeróbico, en este caso no se observó diferencias en la velocidad de crecimiento de acuerdo a la naturaleza de la flavina presente en el medio de cultivo. Estos resultados sugieren que la

Figura 16. Crecimiento aeróbico de la cepa mutante HK 645 de levadura.

Las condiciones para realizar los cultivos se describen en METODOS (D). Se empleó el medio de cultivo libre de riboflavina descrito en METODOS (E). (●): 5 mg/l de riboflavina; (Δ): 5 mg/l de 7-metilriboflavina; (o): 5 mg/l de 8-metilriboflavina.

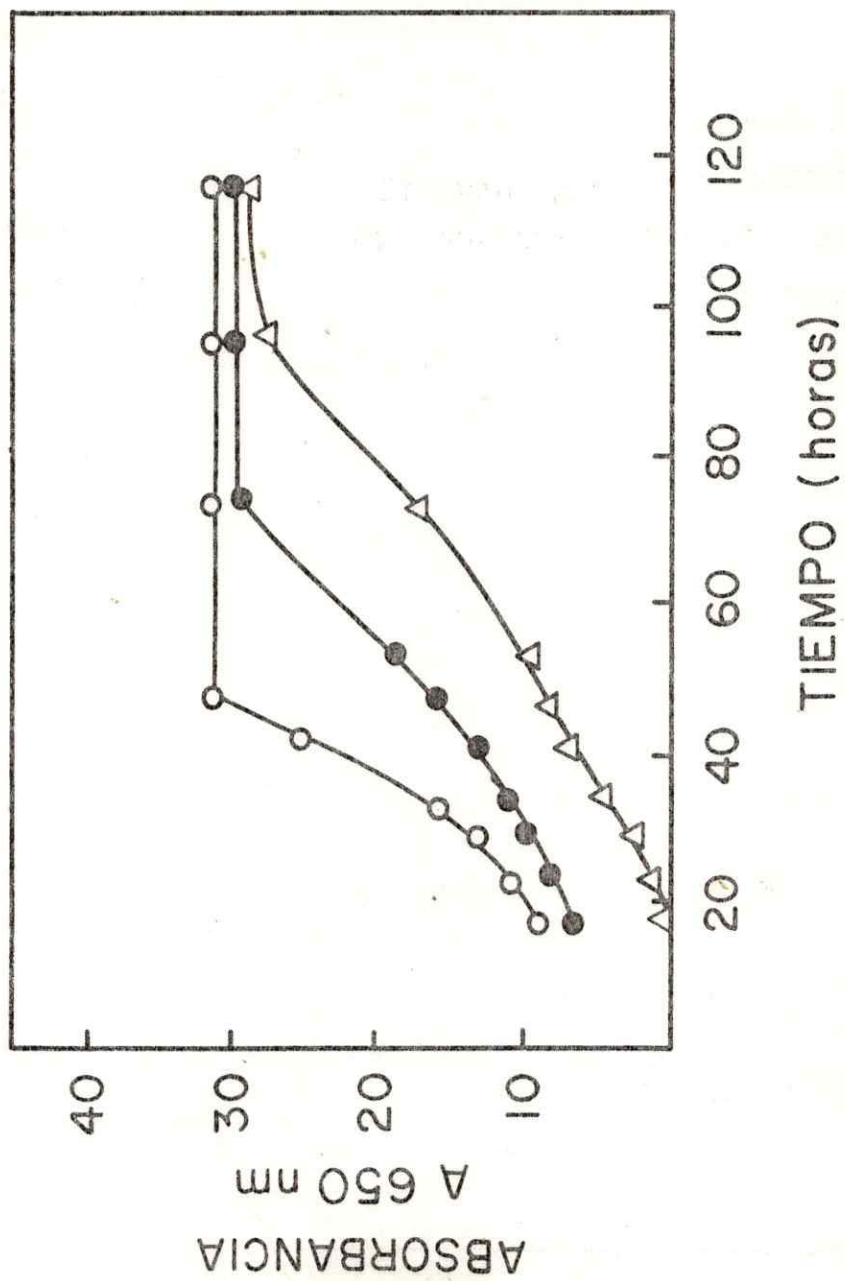


Figura 16

Figura 17. Crecimiento anaeróbico de la cepa mutante HK 645 de levadura.

El cultivo anaeróbico se realizó en las condiciones descritas en METODOS (D), empleando el medio de cultivo libre de riboflavina, preparado de acuerdo a la técnica descrita en METODOS (E). La cantidad de flavina agregada al medio de cultivo fue de 5 mg/l. La gráfica representa el crecimiento en presencia de riboflavina.

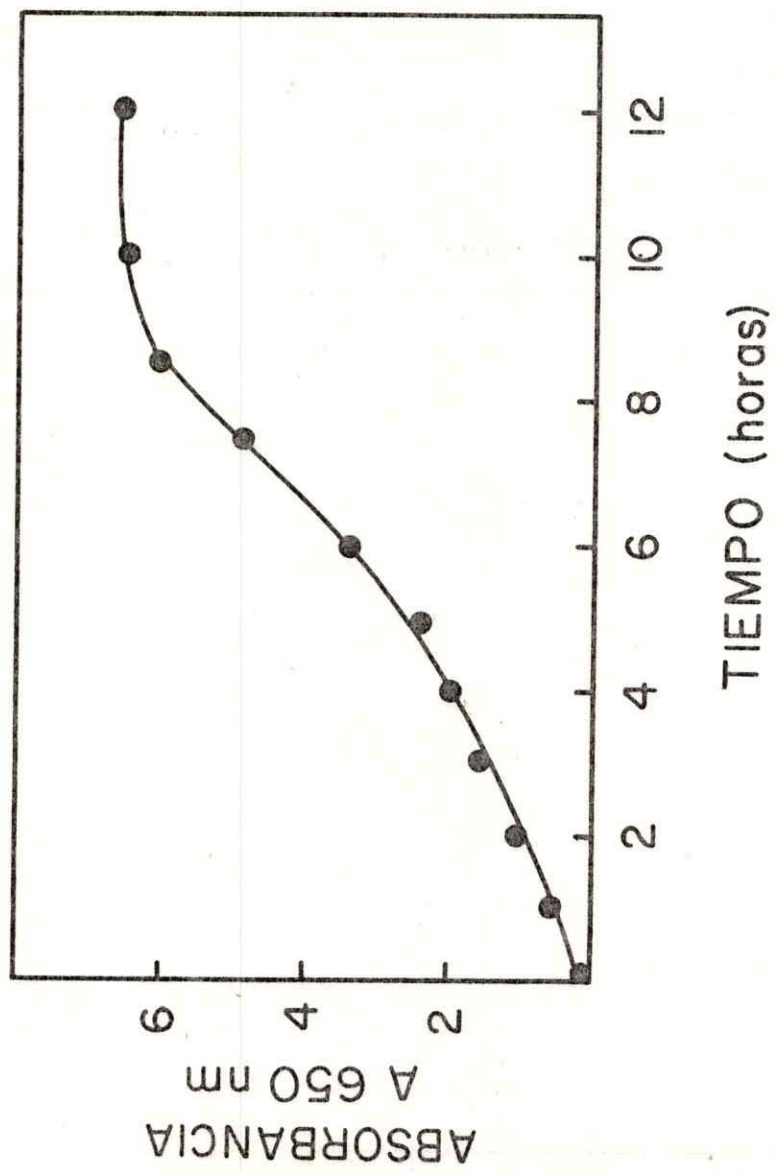


Figura 17

diferencia observada en el crecimiento aeróbico del microorganismo se debería a diferencias en la efectividad de dichas flavinas en el metabolismo aeróbico de estas células al actuar, probablemente, a nivel de alguna(s) flavoenzima(s).

C. ANALISIS DEL CONTENIDO FLAVINICO INTRACELULAR

El hecho de que esta cepa de levadura riboflavina dependiente pueda crecer en presencia de 7-metilriboflavina y 8-metilriboflavina, no significa necesariamente que dichos compuestos sean incorporados como tales a las células, ya que podrían ser modificados por descomposición durante la esterilización del medio de cultivo o por transformación a riboflavina en el interior de las células. Con el objeto de descartar estas posibilidades, levaduras cultivadas en presencia de los dos análogos de riboflavina se extrajeron con ácido perclórico y los extractos, una vez neutralizados, se analizaron mediante cromatografía en capa delgada. Los resultados presentados en la Figura 18 indican que en los extractos celulares de las levaduras cultivadas con 7-metilriboflavina y 8-metilriboflavina no se detectó riboflavina.

Figura 18. Análisis del contenido flavínico intracelular de levaduras cultivadas en presencia de riboflavina, 7-metilriboflavina y 8-metilriboflavina.

Células de la cepa HK 645 cultivadas con riboflavina, 7-metilriboflavina y 8-metilriboflavina, obtenidas según se describe en METODOS (D, E y F), se homogeneizaron con 5 volúmenes de HClO_4 al 10% (v/v). Después de separar los restos celulares mediante centrifugación, los extractos perclóricos se neutralizaron con KOH y se concentraron por evaporación al vacío. Los extractos se analizaron mediante cromatografía en capa delgada, en placas de celulosa Eastman Kodak, utilizando como solvente butanol/ácido acético/ H_2O (12:3:4, v/v/v). Las flavinas se visualizaron mediante su fluorescencia, iluminando la placa cromatográfica con luz ultravioleta. El número bajo cada mancha representa el R_f de cada muestra.

RIBOFLAVINA

8-METILRIBOFLAVINA

7-METILRIBOFLAVINA

EXTRACTO CELULAR
(CELULAS CULTIVADAS
CON RIBOFLAVINA)

EXTRACTO CELULAR
(CELULAS CULTIVADAS
CON 8-METIL RIBOFLAVINA)

EXTRACTO CELULAR
(CELULAS CULTIVADAS
CON 7-METIL RIBOFLAVINA)

RIBOFLAVINA

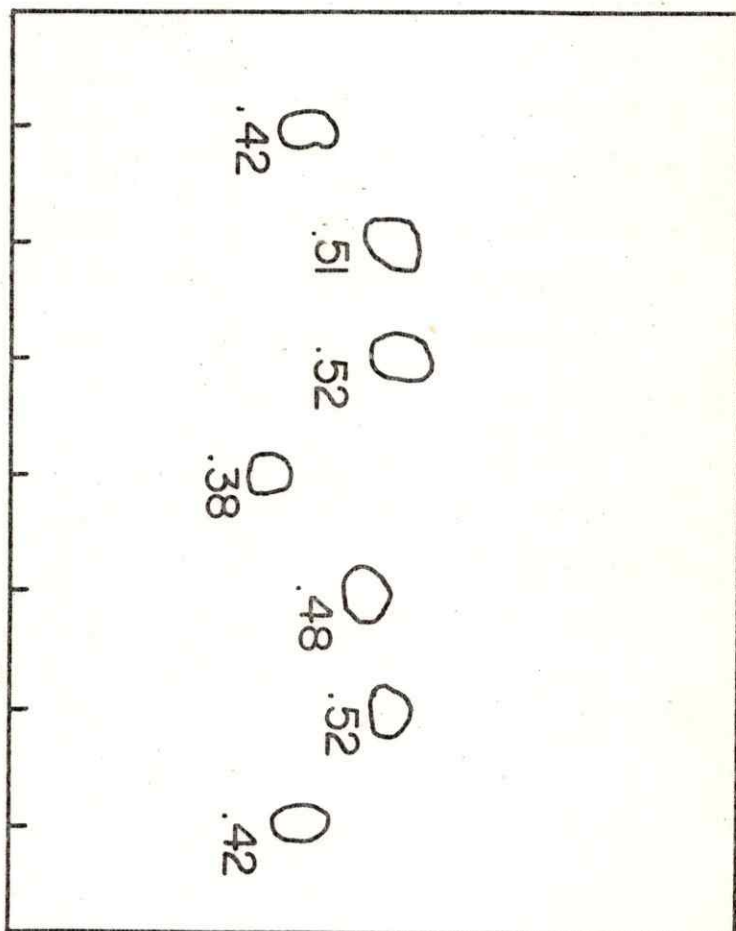


Figura 10

D. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA DESHIDROGENASA SUCCINICA Y DEL CONTENIDO DE 8 α -HISTIDILFLAVINA EN LEVADURAS CULTIVADAS CON DIFERENTES FLAVINAS

Como se indicó en las Secciones A y B, la 7-metilriboflavina y la 8-metilriboflavina son capaces de reemplazar a la riboflavina en la inducción del crecimiento del mutante HK 645. A nivel molecular, este hecho sugiere que dichos análogos podrían reemplazar a la riboflavina como parte del grupo prostético de la deshidrogenasa succínica y de otras flavoproteínas, a pesar de tener modificaciones en el anillo bencenoide del núcleo de iscaloxazina, en posiciones claves para la unión del grupo prostético al esqueleto proteico de la flavoproteína (45).

Los resultados presentados en la Tabla V muestran que las levaduras cultivadas en presencia de los análogos tienen una capacidad respiratoria normal, como la indica el hecho que el consumo de oxígeno, en presencia de glucosa, es muy similar al de levaduras cultivadas con riboflavina. Esta Tabla muestra, además, que la actividad específica de la deshidrogenasa succínica de preparaciones de partículas submitocondriales de levaduras cultivadas en presencia de 7-metilriboflavina, 8-metilriboflavina y riboflavina, es muy similar. Una diferencia más marcada se observó al determinar el contenido de 8 α -histidilflavina de esas preparaciones particuladas. En efecto, tal como se indica en la Tabla

Tabla V. Incorporación de flavinas en la deshidrogenasa succínica durante el crecimiento aeróbico de la levadura mutante HK 645.

Los cultivos de la cepa HK 645 se realizaron en las condiciones descritas en la leyenda de la Figura 16. El consumo de oxígeno, la actividad de la deshidrogenasa succínica y la concentración de histidilflavina, se determinaron en la forma descrita en METODOS (K, M y N).

Tabla V

Flavina	Concentración de la flavina en el medio	CO_2 de las células	Actividad enzimática	Histidil Flavina en ETP	Número de recambio #
	mg/l	$\mu\text{moles de O}_2/\text{min x mg de peso seco}$	$\mu\text{moles de succinato}/\text{min x mg}$	$\mu\text{moles}/\text{mg}$	
Riboflavina	5	88	0,30	21	14.000
8-Metilribo flavina	5	102	0,34	48	7.080
7-Metilribo flavina	5	90	0,36	36	10.000

Moles de succinato oxidado/min x mol de histidil flavina, a 30°, pH 7,5
 Vmáx (PMS).

V, la incorporación de flavinas en la deshidrogenasa succínica fue mayor en levaduras cultivadas con 8-metilriboflavina que en el caso de las células que contenían 7-metilriboflavina o riboflavina. Esta diferencia en el contenido de la flavina unida covalentemente se tradujo, a su vez, en diferencias bastantes marcadas en el número de recambio de la enzima de células cultivadas con riboflavina o 7-metilriboflavina, con respecto a la enzima proveniente de células con 8-metilriboflavina.

E. CARACTERIZACION ENZIMATICA PARCIAL DE LA CADENA RESPIRATORIA DE LEVADURAS CULTIVADAS EN PRESENCIA DE LAS DIFERENTES FLAVINAS

Los resultados presentados en la Tabla VI muestran que la similitud encontrada en los valores de la actividad específica de la deshidrogenasa succínica de levaduras cultivadas con riboflavina y con los dos análogos (Tabla V), se refleja también en otras actividades enzimáticas, típicas de la cadena respiratoria mitocondrial. En este sentido, particularmente interesante es el hecho que la actividad de la NADH deshidrogenasa, que al igual que la deshidrogenasa succínica, es también una flavoproteína (105), sea muy similar para las tres flavinas.

Tabla VI. Comparación de algunas actividades enzimáticas de la cadena respiratoria de levaduras cultivadas con riboflavina, 7-metilriboflavina y 8-metilriboflavina.

Las levaduras de la cepa HK 645 se cultivaron en las condiciones especificadas en la leyenda de la Figura 16. Una vez alcanzada la fase estacionaria de crecimiento, se colectaron las células y se prepararon partículas submitocondriales, de acuerdo a la técnica para experimentos en pequeña escala descrita en METODOS (G). Las diferentes actividades enzimáticas se determinaron según se describe en METODOS (N).

Tabla VI

Flavina en medio de cultivo	Deshidro <u>genasa</u> succínica	NADH des <u>hidroge-</u> nasa	Succino <u>oxidasa</u>	NADH oxidasa	Cito - cromo oxida- sa
	µmoles de sustrato oxidado/min x mg de proteína				
Riboflavina	0,69	0,96	0,14	0,26	0,53
7-Metilribo <u>flavina</u>	0,70	0,89	0,13	0,36	0,75
8-Metilribo <u>flavina</u>	0,70	0,92	0,13	0,31	0,68

F. EFECTO DEL pH EN LA FLUORESCENCIA DE LAS δ -HISTIDIL-FLAVINAS

El hecho que la deshidrogenasa succí - nica en levaduras cultivadas con los derivados metilados de riboflavina (7-metil y δ -metilriboflavina) sea activa y contenga la flavina unida covalentemente, planteó el pro - blema de identificar tanto la flavina que forma parte de la enzima, como el enlace mediante el cual dicha flavina se une a la apoproteína. El primer punto será considera - do en la parte final del presente trabajo. En relación a la caracterización del enlace covalente flavina-proteína, una de las metódicas más empleadas con tal objeto ha sido el análisis de las características de la fluorescencia de los péptidos flavínicos que resultan de la digestión pro - teolítica de las flavoproteínas (55, 106, 107).

En la Figura 19 se presenta el efecto del pH sobre la emisión de fluorescencia de los péptidos flavínicos resultantes al tratar con tripsina y quimitrip - sina, preparaciones particuladas de deshidrogenasa succí - nica obtenidas de levaduras cultivadas con riboflavina (Figura 19 A), 7-metilriboflavina (Figura 19 B) y δ -metil - riboflavina (Figura 19 C). Como se muestra en la Figura 19, en los tres casos el perfil de variación de la fluo - rescencia con el pH fue esencialmente el mismo. En todos los casos, la intensidad de la fluorescencia fue máxima aproximadamente a pH 3,0 , disminuyendo gradualmente a va - lores de pH más altos, de tal forma que a pH 7,0 aproxi - madamente, un 75 a un 90% de la fluorescencia medida a pH

Figura 19. Efecto del pH sobre la fluorescencia de péptidos flavínicos de la cepa HK 645 cultivada aeróbicamente con riboflavina, 7-metilriboflavina y 8-metilriboflavina.

Los péptidos flavínicos se obtuvieron de acuerdo a la técnica descrita por Singer y col. (89). Una vez realizada la digestión proteolítica de las preparaciones de ETP, las muestras se trataron con ácido tricloroacético (concentración final, 5% v/v), durante 12 horas a 38°, con el objeto de hidrolizar la forma dinucleotídica de la flavina, a la forma mononucleotídica. En seguida, se midió la fluorescencia de la solución sobrenadante a diferentes pH, lo que se logró mediante adiciones secuenciales de NaOH. Los valores de fluorescencia se corrigieron por la dilución respectiva. La fluorescencia se expresó en unidades arbitrarias.

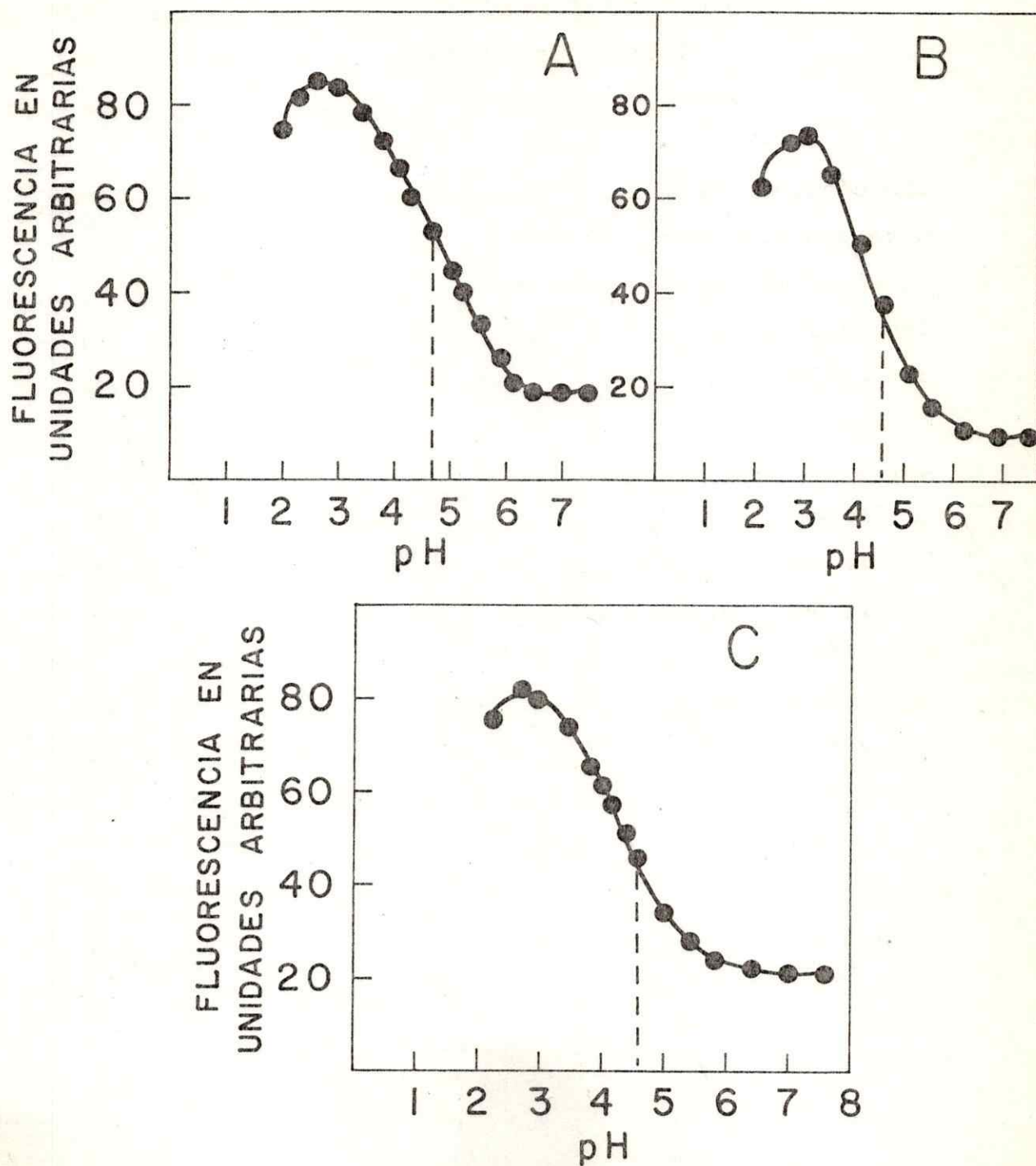


Figura 19

3,0 se encuentra reprimida. El pKa aparente para esta extinción (quenching) de la fluorescencia fue 4,6 a 4,7 para los tres péptidos flavínicos analizados. Este valor de pKa es característico para flavinas sustituidas con un nitrógeno terciario ionizable, preferentemente heteroaromático, tal como uno de los nitrógenos imidazólicos de un residuo de histidina (55, 106).

G. ESPECTRO DE EXCITACION DE LA FLUORESCENCIA DE LOS PEPTIDOS FLAVINICOS

En la Figura 20 se presentan los espectros de excitación de la fluorescencia de ambos derivados metilados de la riboflavina y de los péptidos flavínicos resultantes de la hidrólisis triptica-quimotriptica de preparaciones particuladas de la deshidrogenasa succínica, proveniente de levaduras cultivadas con dichos derivados. Con el objeto de no complicar innecesariamente dicha figura, no se incluye los espectros correspondientes a la riboflavina y al péptido flavínico respectivo, por ser éstos idénticos a sus equivalentes presentados en ella. Como se puede apreciar en la Figura 20, los espectros de excitación de la fluorescencia de ambas flavinas libres son idénticos, presentando máximos a 375 y 445 nanómetros, al igual que la riboflavina. Los espectros correspondientes a los péptidos flavínicos respectivos también son idénticos entre sí e indistinguibles del espectro correspondiente a los péptidos flavínicos que contienen riboflavina,

Figura 20. Espectro de excitación de la fluorescencia de 7-metilriboflavina, 8-metilriboflavina y de los péptidos flavínicos provenientes de células de la cepa HK 645 cultivadas con esos análogos.

(---): 7-metilriboflavina; (xxx): 8-metilriboflavina;
(-.-): péptidos flavínicos (7-metilriboflavina);
(—): péptidos flavínicos (8-metilriboflavina).

Los péptidos flavínicos se obtuvieron y se convirtieron a la forma mononucleotídica, según se describe en la leyenda de la Figura 19. Los espectros se determinaron disolviendo la muestra flavínica en una solución amortiguadora citrato de sodio-fosfato de sodio 0,1 M, pH 3,4 y registrando la fluorescencia emitida a 525 nm al variar la longitud de onda de la radiación de excitación desde 300 a 500 nm. La intensidad de la fluorescencia se expresa en unidades arbitrarias.

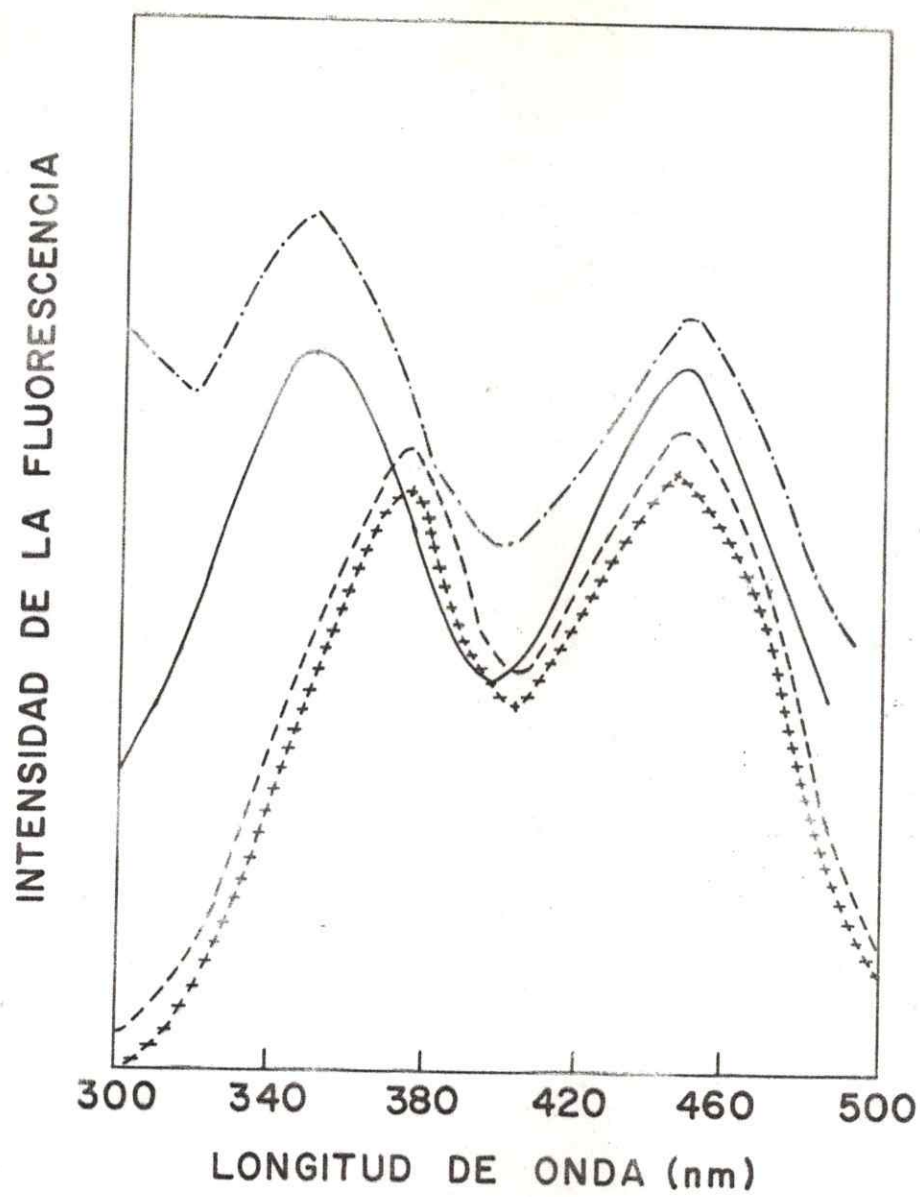


Figura 20

presentando una desviación hipsocrónica del pico de 375 nm a 345 nm. Esto es característico para flavinas sustituidas en la posición 8 α (55, 106, 108).

Debido a que las características espectrales de la riboflavina y los dos análogos son exactamente iguales (Figuras 19 y 20), para demostrar que la deshidrogenasa succínica sintetizada por las levaduras en presencia de los derivados metilados de riboflavina, contiene la flavina modificada como grupo prostético, se analizó por cromatografía en capa delgada la flavina liberada después de la ruptura del enlace covalente flavina-proteína en los péptidos flavínicos respectivos. Esta metódica sólo se pudo aplicar en el caso de la 7-metilriboflavina, ya que no se dispuso de una cantidad suficiente de 8-metilriboflavina como para llevar a cabo los cultivos de levadura en gran escala, como lo requería el procedimiento.

H. SOLUBILIZACION Y PURIFICACION PARCIAL DE LA DESHIDROGENASA SUCCINICA DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE

El único método de solubilización y purificación de la deshidrogenasa succínica de levadura fue publicado en 1957 por Singer y col. (109) y consistía en una extracción alcalina de un polvo butanólico mitocondrial. Este método resultó poco satisfactorio para los propósitos delineados anteriormente, ya que con él se obtiene una preparación enzimática parcialmente inactiva y

con un rendimiento muy bajo. Debido a estas razones, fue necesario diseñar un método que no presentara los problemas señalados. Este método se basó en el procedimiento descrito por Davis y Hatefi (50) y consistió en la extracción de una preparación de partícula transportadora de electrones (ETP) con un agente caotrópico (NaClO_4). A continuación se describe las etapas seguidas en la purificación de la enzima de levadura, todas las cuales se realizaron entre 0 y 3°.

Las preparaciones de ETP obtenidas de acuerdo a como se describe en METODOS (preparación en gran escala), se centrifugaron a $105.000 \times g_{\text{máx}}$ durante 30 minutos. El sedimento se resuspendió en un medio compuesto de amortiguador Tris 50 mM, succinato de sodio 20 mM y DTT 5 mM, pH 8,0, para dar una concentración de proteínas de 13 mg/ml. Esta suspensión se trató con una solución 8 M de perclorato de sodio (pH 7,0), para dar una concentración final del agente caotrópico de 0,8 M y se incubó durante 20 minutos con agitación ocasional sobre hielo; posteriormente, se centrifugó a $105.000 \times g_{\text{máx}}$ por 60 minutos.

La solución sobrenadante que resultó del tratamiento de las partículas submitocondriales con el perclorato de sodio, se fraccionó con una solución de sulfato de amonio a pH 7,0. La fracción que precipitó entre 31,5 y 50,5% de saturación se colectó mediante centrifugación a $20.000 \times g_{\text{máx}}$ por 10 minutos. Esta fracción puede mantenerse por algunos días sin grandes pérdidas de actividad si se mantiene congelada a -70°, bajo una

atmósfera de nitrógeno y en forma de precipitado.

La fracción resultante del tratamiento con sulfato de amonio se disolvió en un volumen suficiente de un medio compuesto por amortiguador Tris 50 mM, succinato de sodio 20 mM y β -mercaptoetanol 10 mM (pH 8,0), para dar una concentración de proteínas de 30 a 40 mg/ml. La solución resultante se sometió a una filtración en una columna de Sephadex G-200 (1,5 x 28 cm), la cual se equilibró y eluyó con la misma solución utilizada para disolver la enzima. Como muestra la Figura 21, de la columna emergen dos picos que contienen la actividad enzimática. El primero de estos picos de actividad eluye en el volumen de exclusión de la columna y representa aproximadamente un 40% de la actividad enzimática recuperada de la columna, mientras que el segundo, que representa el 60% restante de la actividad, es retenido en la columna y contiene sólo una pequeña fracción de la proteína total. Las fracciones correspondientes a los dos picos se combinaron por separado y se precipitaron, llevándolas a un 70% de saturación con sulfato de amonio. Para preservar la actividad enzimática de estas dos fracciones, se mantuvieron congeladas a -70° en forma de precipitado y en condiciones anaeróbicas.

En la Tabla VII se presenta un resumen de la purificación de la enzima de la cepa de levadura comercial Red Star que se utilizó para diseñar el método de purificación. Como se muestra en dicha Tabla, tanto el rendimiento como la actividad específica de las distintas

Figura 21. Filtración molecular en columna de Sephadex G-200 de la fracción precipitada entre 31,5 y 50,5% de saturación con sulfato de amonio.

La preparación enzimática (21,2 mg de proteína) resultante del fraccionamiento con sulfato de amonio, se disolvió en un volumen final de 0,7 ml de una solución formada por: amortiguador Tris 50 mM, succinato de sodio 20 mM y - mercaptoetanol 10 mM, pH 8,0 y se aplicó a una columna de Sephadex G-200 (1,5 x 28 cm) equilibrada y eluida con la misma solución amortiguadora. Se colectaron fracciones de 1,0 ml a las que se le midió inmediatamente la actividad de la deshidrogenasa succínica a 30° (o), por el método del PMS-DCIP (91) y la absorbancia a 280 nm (●). La actividad enzimática de cada fracción se expresó como los umoles de succinato oxidado/min x alícuota de 30 ul.

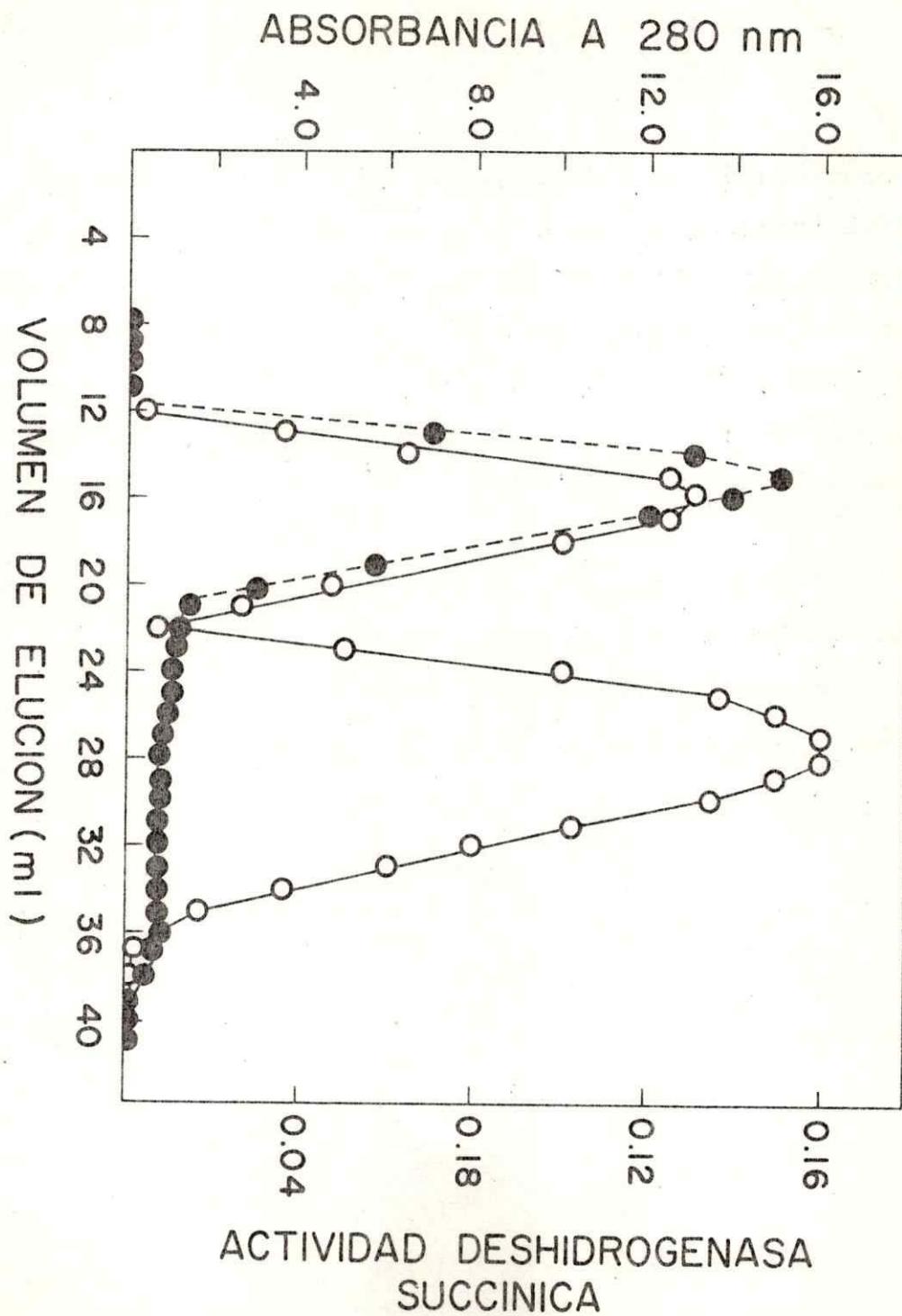


Figura 21

Tabla VII. Solubilización y purificación parcial de la deshidrogenasa succínica de levadura.

Para la preparación de las partículas submitocondriales (ETP) a partir de células de levadura de la cepa Red Star, se utilizó la técnica para experimentos en gran escala descrita en METODOS (G). El detalle de cada una de las etapas del método de purificación se describen en el texto.

Tabla VII

Etapa	Proteínas totales (mg)	Actividad total (unidades)	Actividad específica (μ moles de succinaty/ min x mg)	Rendimiento (Actividad) (%)	Histifilflavina		
					Total (μ moles) (mg)	Por mg (μ moles /mg)	Rendi- miento (%)
ETP 30,5-50,5% saturación con (NH ₄) ₂ SO ₄	535,0	372	(1,4) 0,7 [#]	(100)	48,2	0,09	(100)
Pico I, Se- phadox G-200	15,6	87	5,6	23	8,3	0,47	17
Pico II, Se- phadox G-200	5,0	98	19,4	26	19,0	2,92	40

La actividad enzimática se determinó en presencia de TTF 6,7 mM.

fracciones obtenidas en las diferentes etapas del método de purificación, se expresaron tanto en función de la actividad enzimática, como de la concentración de histidilflavina. Por razones que se explicarán más adelante, la actividad de la preparación particulada utilizada como material de partida para la purificación, se determinó en presencia de TTF.

Tal como se indica en la Tabla VII, al final del procedimiento de purificación se obtuvo una preparación soluble de la deshidrogenasa succínica con una actividad específica de 19,4 unidades/mg de proteína y un contenido de histidilflavina de 2,92 nmoles/mg de proteína. Sin embargo, debido a la inestabilidad de esta preparación enzimática, se prefirió utilizar la fracción obtenida mediante el tratamiento con sulfato de amonio para el análisis de las propiedades catalíticas de la enzima soluble y la identificación de la flavina que forma parte de ella.

I. INHIBICION DE LA DESHIDROGENASA SUCCINICA POR TENOilTRIFLUORACETONA

En la Figura 22 se presentan los resultados obtenidos al estudiar la inhibición de la deshidrogenasa succínica de ETP de levadura por tenoiltrifluoroacetona. Como se muestra en la Figura 22 A, al tratar dichas partículas con concentraciones crecientes de TTF, el porcentaje de inhibición de la actividad enzimática

Figura 22. Efecto inhibitorio del TTF sobre la deshidrogenasa succínica de preparaciones de ETP de levadura.

A: Efecto de la concentración de TTF sobre la actividad de la deshidrogenasa succínica. La actividad enzimática se midió mediante el método del PMS-DCIP (91) a una concentración fija de PMS (0,3 ml de PMS al 0,33% (p/v) en un volumen total de 3,0 ml), en presencia de diferentes concentraciones de TTF. El inhibidor se adicionó inmediatamente después del período de 10 min de activación a 30°. La cantidad de ETP utilizada por ensayo fue de 0,22 mg de proteína.

B: Efecto del TTF a diferentes concentraciones de PMS. Condiciones experimentales iguales que en A, salvo que se usaron concentraciones variables de PMS. La concentración de PMS se expresa como el volumen (en ml) de una solución de PMS al 0,33% (p/v) agregado en un volumen total de 3,0 ml. La actividad enzimática se expresa como el cambio de absorbancia a 600 nm/min x 0,22 mg de proteína. (o) sin TTF; (●) con TTF 6,7 mM.

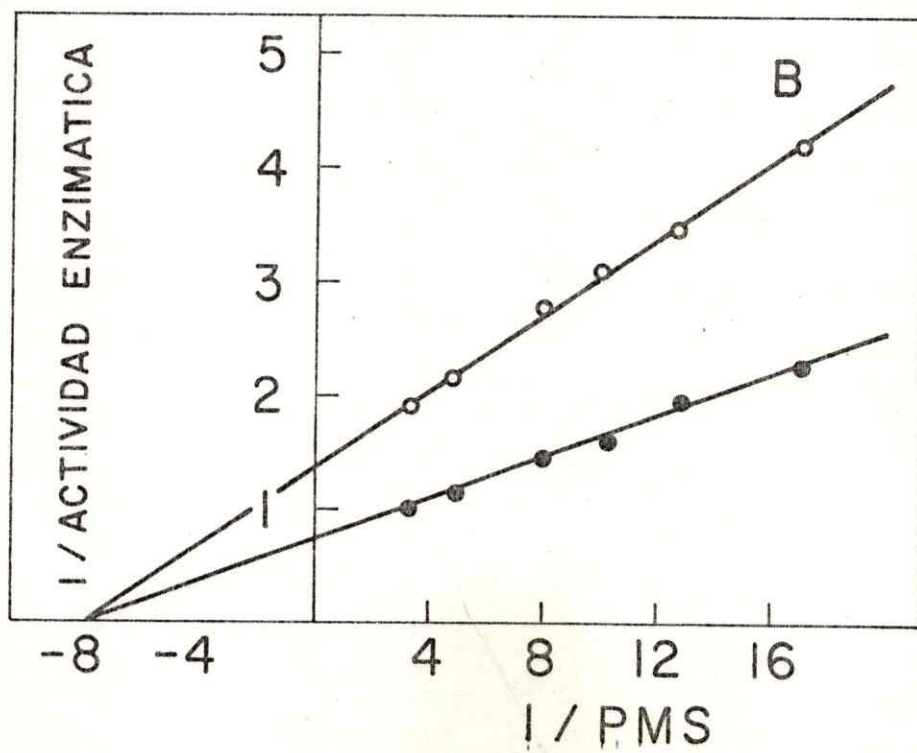
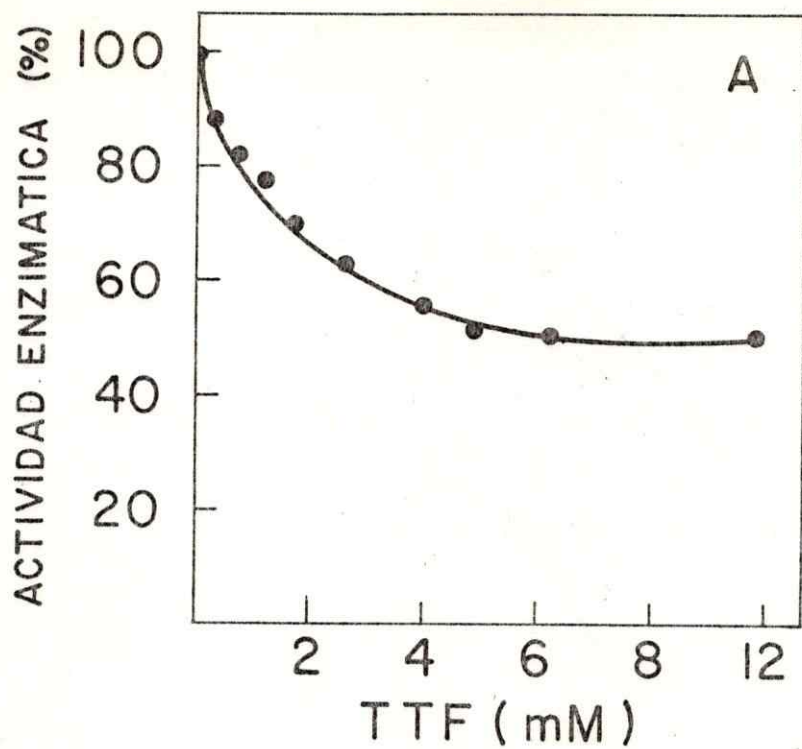


Figura 22

aumenta hasta alcanzar un valor máximo equivalente a un 50% de inhibición. Esta inhibición es de tipo no competitivo (Figura 22 B) y si como en el caso representado en esta figura, la concentración del inhibidor es lo suficientemente alta como para producir su efecto máximo, el porcentaje de inhibición en la velocidad máxima es también aproximadamente un 50%. Por otra parte, las preparaciones solubles de la enzima, extraídas de las ETP mediante el método descrito, no son inhibidas por concentraciones de TTF suficientes para producir un 50% de inhibición en la enzima particulada. Estos resultados son totalmente equivalentes a los encontrados para las enzimas particulada y soluble, respectivamente, de tejidos animales (110).

Los resultados presentados en la Tabla VIII demuestran que el número de recambio de la enzima soluble es aproximadamente igual a la mitad del correspondiente a las preparaciones particuladas de la enzima. En esta tabla puede observarse, además, que si esta preparación de la enzima ligada a membranas se trata con una concentración de TTF suficiente como para producir un efecto inhibitorio máximo, el número de recambio de la enzima así tratada es igual al de la deshidrogenasa succínica soluble. Estos resultados, junto con los presentados en la Figura 22, indicarían que, al igual que en el caso de la enzima de mamífero (70, 110), al solubilizar la deshidrogenasa succínica de Saccharomyces cerevisiae se pierde uno de los dos sitios de reacción para

Tabla VIII

Número de recambio de preparaciones^a particuladas y solubles de la deshidrogenasa succínica de levadura.^a

Muestra	Número de recambio ^b
ETP	15.885 \pm 100
Enzima soluble	8.340 \pm 260
ETP + TTF 6,7 mM	8.025 \pm 300

^a La obtención de las partículas submitocondriales (ETP) y la determinación de la actividad de la deshidrogenasa succínica, se realizó según se describe en METODOS (G y N). La preparación soluble de la deshidrogenasa succínica que se usó fue la fracción obtenida entre 30,5 y 50,5% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Tabla VI), la cual se disolvió en un medio formado por amortiguador Tris 50 mM, succinato de sodio 20 mM y β -mercaptoetanol 10 mM, pH 8,0. Tanto las partículas submitocondriales como la enzima soluble provenían de levaduras de la cepa Red Star.

^b Moles de succinato oxidado/min x mol de histidilflavina, 30°, pH 7,5, $V_{\text{máx}}$ (PMS). Promedio de tres determinaciones.

PMS, así como el sitio responsable de la inhibición por TTF. De este modo, la disminución de la actividad enzimática, que se traduce en una disminución del número de recambio de la enzima soluble, se debe a estas características de la enzima y al método de determinación de su actividad y no a una inactivación de ella.

J. DESHIDROGENASA SUCCINICA DE LEVADURAS DE LA CEPA
MUTANTE HK 645 CULTIVADAS EN PRESENCIA DE 7-METILRI -
BOFLAVINA

1. Número de recambio

El hecho de contar con un método de solubilización y purificación parcial de la enzima de levadura, mediante el cual es posible obtener la deshidrogenasa en forma soluble, con un buen rendimiento y un adecuado grado de pureza, permitió el aislamiento de la enzima sintetizada por el mutante, al ser cultivado con 7-metilriboflavina. La semejanza entre la enzima obtenida en estas condiciones y la deshidrogenasa del mutante cultivado con riboflavina, se manifiesta por la similitud de los números de recambio de ambos tipos de enzima (Tabla IX). Como se muestra en la Tabla IX, esta similitud se evidencia tanto cuando las enzimas se encuentran en forma particulada, como después de solubilizarlas y al igual que en el caso de la enzima aislada de levadura comercial de panadería (Tabla VIII), o la de tejidos de

Tabla IX. Número de recambio de la deshidrogenasa succínica de levaduras de la cepa HK 645 cultivadas con riboflavina y 7-metilriboflavina.

A partir de células de la cepa HK 645, cultivadas aeró - bicamente en presencia de riboflavina o 7-metilribofla - vina (condiciones experimentales descritas en la leyenda de la Figura 16), se obtuvo partículas submitocondriales y se solubilizó la deshidrogenasa succínica de acuerdo al método descrito en el texto y Tabla VI. La prepara - ción soluble de la deshidrogenasa succínica, en ambos casos, fue la fracción obtenida entre 30,5 y 50,5% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, la que se suspendió en las con - diciones descritas en la leyenda de la Tabla VII. La actividad de la deshidrogenasa succínica y la concentra - ción de histidilflavina se determinaron según se descri - be en METODOS (M y N).

Tabla IX

Flavina	Tipo de preparación	Actividad específica	Histidil-flavina	Número de recambio [#]
		$\mu\text{moles de succinato/ min x mg de proteína}$	$\text{nmoles / mg de proteína}$	
	ETP	0,85	0,048	17.700
Riboflavina	Enzima soluble	4,69	0,550	8,360
	ETP	0,55	0,031	17.600
7-Metilriboflavina	Enzima soluble	1,32	0,160	8.250

[#] Moles de succinato oxidado/min x mol de histidilflavina, 30°, pH 7,5, V_{máx} (PMS).

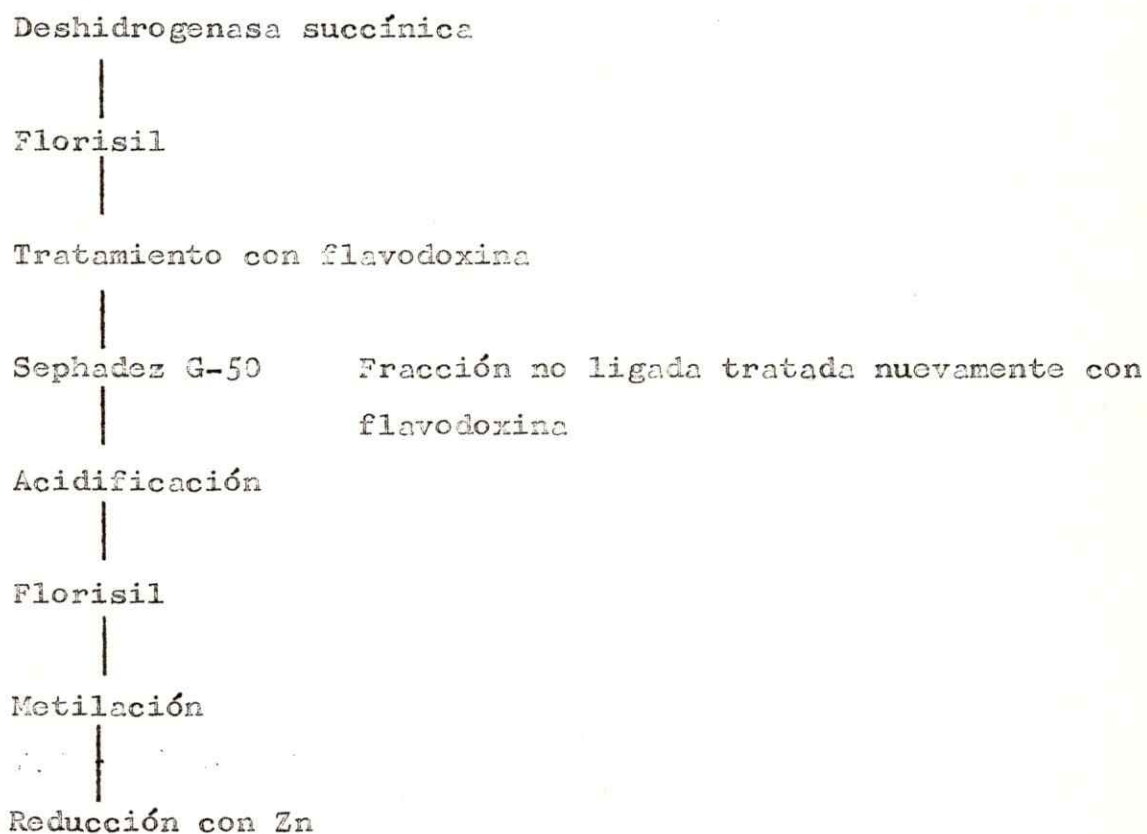
mamíferos (70, 110), el número de recambio de la enzima soluble es aproximadamente igual a la mitad del correspondiente a la enzima particulada.

2. Purificación de los péptidos flavínicos

La etapa siguiente para demostrar la presencia de la 7-metilriboflavina como parte del grupo prostético de la deshidrogenasa succínica obtenida en presencia de dicha flavina, fue el aislamiento de los péptidos flavínicos resultantes de la digestión proteolítica de la enzima soluble. Con este objeto, se diseñó un método de purificación basado en la propiedad de la apoproteína resultante de la flavodoxina del Azotobacter vinelandii de ligar firmemente flavinas sustituidas en la posición 8 α . Las bases fisicoquímicas de este método de purificación se detallan en el APENDICE.

En la Figura 23 se presenta un cuadro resumen de las diferentes etapas del procedimiento empleado para obtener y purificar los péptidos flavínicos. La digestión proteolítica se realizó utilizando una mezcla de tripsina y quimotripsina, de acuerdo a la técnica descrita por Singer y col. (89), partiendo de 87,5 mg de proteínas, correspondientes a 140 nmoles de histidilflavina. La proteólisis se detuvo por calentamiento a 100° durante 3 minutos y la proteína coagulada se separó mediante centrifugación. La solución sobrenadante, que contiene la mezcla peptídica, se incubó a 38° con nucleótido pirofosfata-sa (5 μ g/nmol de flavina) durante 45 min con el objeto de

Figura 23. Esquema de la purificación de los péptidos flavínicos resultantes de la digestión proteolítica de la deshidrogenasa succínica



convertir la forma dinucleotídica de la flavina unida covalentemente, a la forma mononucleotídica. Una vez comprobada la hidrólisis total del enlace pirofosfórico de la flavina, la reacción se detuvo por calentamiento y la mezcla peptídica se aplicó a una columna de florisil (1,0 x 15 cm), equilibrada y eluída en la forma descrita por Kearney (41). El eluido de la columna, que contenía 125 nmoles de péptidos flavínicos, se liofilizó y se incubó por 1,5 horas con 170 nmoles de apoflavodoxina en presencia de amortiguador fosfato de sodio 0,025 M, en un volumen final de 1,0 ml; el pH de la mezcla se ajustó a 7,3. El complejo péptido flavínico-apoflavodoxina se separó de los péptidos no flavínicos contaminantes, mediante filtración molecular en una columna de Sephadex G-50 (0,9 x 30 cm), equilibrada y eluída con amortiguador fosfato de sodio 0,025 M pH 7,0. El pico de flavina que emerge en el volumen excluido de la columna y que corresponde al complejo péptido flavínico-apoflavodoxina, constituyó el 31% de la flavina recuperada. El péptido flavínico se disoció de la apoflavodoxina, mediante un tratamiento a 0° con TCA al 3% (p/v) en presencia de DTT 1 mM. La apoproteína precipitada se eliminó mediante centrifugación. La solución sobrenadante, que contiene los péptidos flavínicos, se sometió finalmente a una cromatografía en una columna de florisil (1 x 8 cm). La fracción de péptidos flavínicos que no se unió a la apoflavodoxina (70 nmoles) y que fue retenida en la columna Sephadex G-50, se sometió a un nuevo tratamiento con la apoproteína (70 nmoles) en las mismas condiciones descritas.

Esto se tradujo en la recuperación de 17 nmoles de péptidos flavínicos unidos a la apoflavodoxina.

3. Análisis cromatográfico de los péptidos flavínicos

Los péptidos flavínicos purificados mediante el tratamiento con la apoflavodoxina se analizaron por cromatografía en capa delgada (Figura 24). El análisis cromatográfico reveló la presencia de una pequeña cantidad de material no fluorescente, ninhidrina positivo y reveló, además, que los péptidos flavínicos purificados mediante los dos tratamientos con la apoproteína son, probablemente, diferentes. En efecto, tal como se puede apreciar en la Figura 24, el material flavínico resultante del primer proceso de purificación está constituido casi exclusivamente por un péptido flavínico cuyo R_F es 0,20, mientras que la flavina obtenida mediante el segundo tratamiento con la apoflavodoxina, está representada principalmente por un péptido flavínico con un R_F de 0,39. La diferencia en la movilidad cromatográfica puede atribuirse a una diferente longitud de la cadena polipeptídica de los péptidos flavínicos, lo que a su vez sería la causa de la diferente afinidad de ellos por la apoflavodoxina.

4. Liberación de la flavina unida covalentemente a los péptidos

El enlace covalente C-N, mediante el cual el residuo de FAD de la deshidrogenasa succínica se une a un residuo de histidina del sitio activo de la enzima, es muy resistente. En efecto, para romper este enlace se

Figura 24. Análisis cromatográfico de los péptidos flavínicos purificados mediante el uso de la apoflavodoxina.

La cromatografía se realizó en placas de celulosa, utilizando como solvente: butanol/ácido acético/H₂O (4:1:5, v/v/v, fase superior). Se aplicaron a la placa 2 nmoles de cada uno de los siguientes compuestos: a, histidina; b, 7-metilriboflavina; c, 8 α -(H-3)-histidilriboflavina; d, péptidos flavínicos (primer tratamiento con apoflavodoxina); e, péptidos flavínico (segundo tratamiento con apoflavodoxina); f, péptidos flavínicos (fracción no ligada a la apoflavodoxina). La fluorescencia de las flavinas se visualizó mediante la iluminación de la placa cromatográfica con luz ultravioleta, después de acidificarla con ácido acético al 5% (v/v). Para detectar el material peptídico, se roció el cromatograma con una solución de ninhidrina al 0,2% (p/v) en butanol y luego se calentó durante 5 min a 100°. Áreas con línea punteada: reacción positiva con ninhidrina; áreas achuradas: fluorescencia amarilla débil; áreas negras: fluorescencia amarilla intensa.

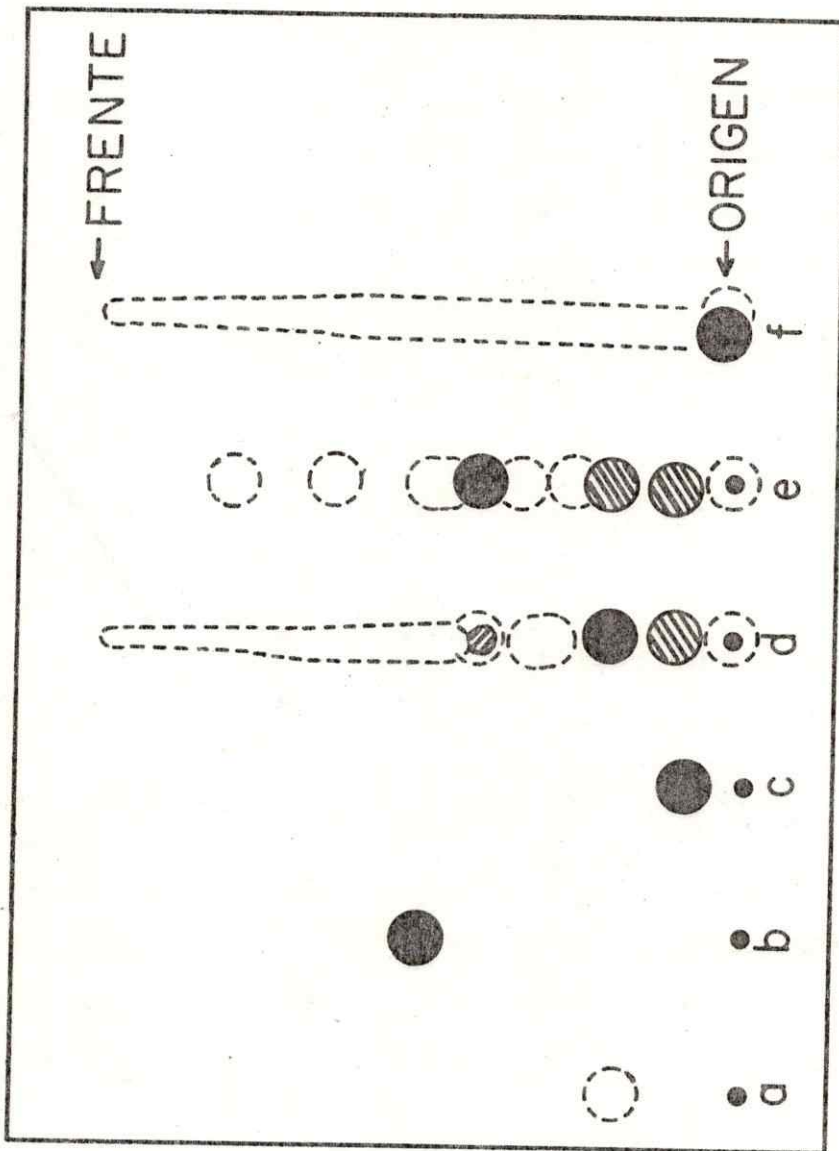


Figure 24

requieren tratamientos muy drásticos, como por ejemplo, hidrólisis con HCl 6 N a 125° por 20 horas (55). Sin embargo, estos tratamientos, junto con producir la liberación de la flavina unida covalentemente, producen una destrucción casi completa de ella. Por otra parte, tratamientos más moderados, tales como la reducción con Zn metálico en presencia de ácido trifluoracético, no producen una ruptura cuantitativa del enlace covalente que une la flavina a la apoproteína. Sin embargo, si el residuo de histidina se metila previamente, la liberación de la flavina mediante reducción con Zn, se produce en forma cuantitativa (111).

Las condiciones para la metilación y la ruptura reductiva del enlace flavina-proteína se describen en METODOS. En la Figura 25 se muestra el espectro de excitación de la fluorescencia de los péptidos flavínicos, antes y después del tratamiento con Zn. Como puede apreciarse en esta Figura, el espectro correspondiente a los péptidos flavínicos intactos, presenta máximos a 445 y 345 nm respectivamente, los que son típicos para las flavinas sustituidas en la posición 8 (55, 106, 108), mientras que el espectro del material flavínico recuperado después de la reducción con Zn, es el característico para flavinas no sustituidas, con máximos a 445 y 375 nm respectivamente. La desaparición de la desviación hipsocrónica, que se produce como consecuencia del tratamiento con Zn, sugiere la ruptura completa del enlace covalente flavina-proteína.

Figura 25. Espectro de fluorescencia de los péptidos flavínicos antes y después de la reducción con Zn

A: Espectro de emisión de fluorescencia de los péptidos flavínicos antes (—) y después (---) de la reducción con Zn. El espectro se determinó utilizando una radiación de excitación de 445 nm. B: Espectro de excitación de la fluorescencia de las mismas muestras. Condiciones experimentales iguales que en la leyenda de la Figura 20. Todos los espectros se determinaron disolviendo la muestra flavínica en un volumen final de 2 ml de una solución amortiguadora citrato-fosfato 0,1 M, pH 3,4.

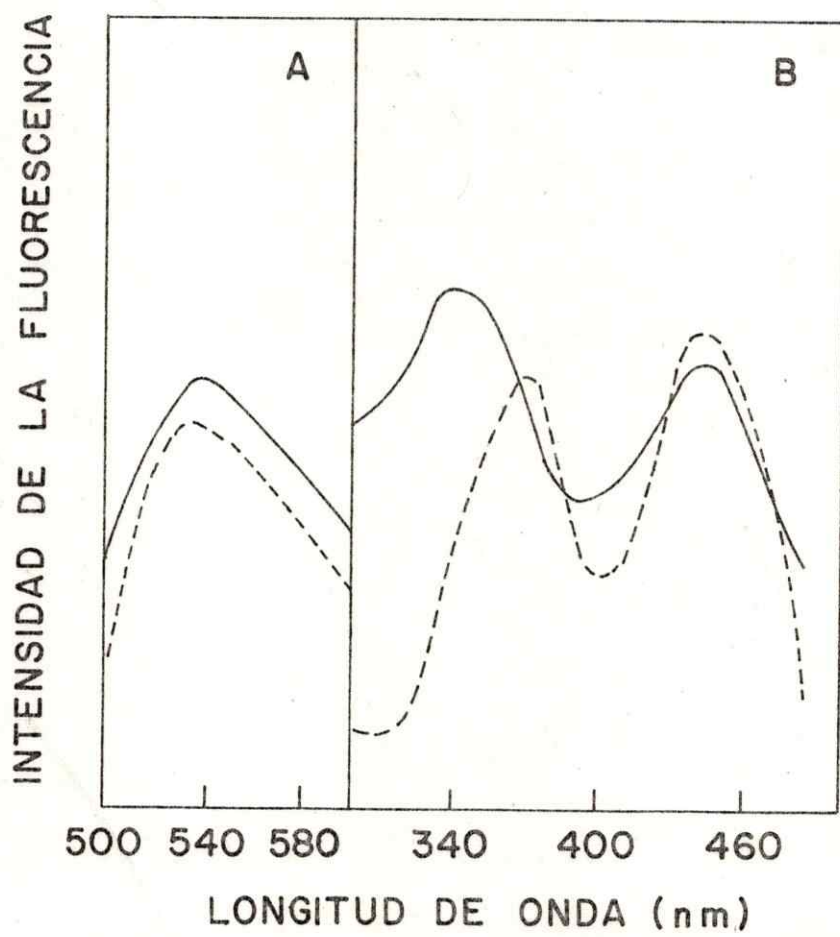


Figura 25

5. Identificación de la flavina unida covalentemente

El material flavínico resultante de la reducción con Zn de los péptidos flavínicos provenientes de la deshidrogenasa succínica sintetizada en presencia de 7-metilriboflavina, se identificó mediante cromatografía en capa delgada, resultando ser 7-metilriboflavina (Figura 26). Este resultado demuestra la sustitución completa de la riboflavina por el análogo en la estructura del grupo prostético de dicha enzima.

Figura 26. Identificación de la 7-metilriboflavina después de la reducción de los péptidos flavínicos con Zn

Las condiciones experimentales para la cromatografía en capa delgada fueron las mismas descritas en la leyenda de la Figura 18. Se aplicaron a la placa cromatográfica 5 μ moles de cada uno de los siguientes compuestos: a, riboflavina; b, 8-metilriboflavina; c, 7-metilriboflavina; d, flavina resultante de la reducción de los péptidos flavínicos con Zn; e, 8 α -(N-3)-histidilriboflavina; f, FMN.

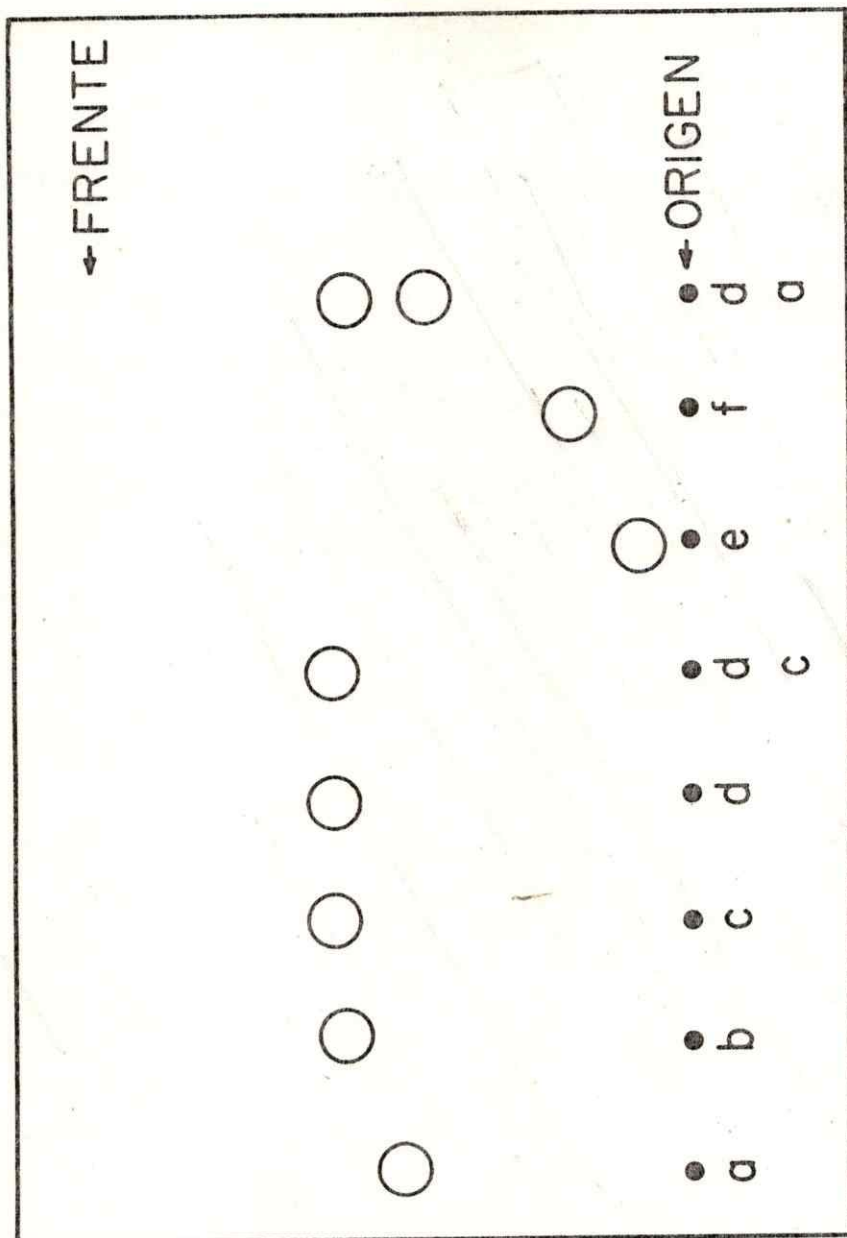


Figure 26

DISCUSION

I. CARACTERISTICAS GENERALES DE LA ENZIMA DE DICOTILEDONEAS

A. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

Para determinar la actividad de la deshidrogenasa succínica de las especies vegetales estudiadas en este trabajo, se empleó un método adaptado de la técnica descrita por Arrigoni y Singer para la enzima de mitocondrias de corazón de vacuno (94). Este método hace uso del fenacimetosulfato y del 2,6-diclorofenolindofenol, como aceptores artificiales de electrones.

Algunos autores han objetado el uso de este tipo de compuestos en el ensayo de la actividad enzimática de las deshidrogenasas ligadas a la cadena respiratoria mitocondrial, incluyendo la deshidrogenasa succínica, debido a que la actividad enzimática medida en estas condiciones no reflejaría ciertas "propiedades nativas" de la enzima, como la de recombinarse a la cadena respiratoria una vez que ha sido extraída en forma soluble de la preparación particulada (112). Sin embargo, es necesario considerar que el ensayo basado en el empleo del PMS y del DCIP se diseñó con el objeto de medir la actividad catalítica de la deshidrogenasa succínica y, por lo tanto, no guarda

necesariamente ninguna relación, ni con las propiedades regulatorias, ni con las propiedades "reconstitutivas" de la enzima. Estas últimas son expresiones de la conformación proteica, que bien podrían no incluir el sitio catalítico de la enzima. A pesar de ésto, el ensayo de la actividad de la deshidrogenasa succínica con PMS y DCIP en mitocondrias de coliflor y poroto mung, refleja en una forma muy exacta los cambios en el estado de activación de la enzima que se producen en diversas transiciones metabólicas (4, 6) (ver, también, Parte II de RESULTADOS).

La determinación de la actividad enzimática de la deshidrogenasa succínica en mitocondrias de coliflor y poroto mung, implicó dos tipos de problemas principales: **impermeabilidad** al PMS de las mitocondrias intactas e inestabilidad de la enzima. Ni el PMS ni el DCIP pueden atravesar libremente la membrana mitocondrial interna, de modo que para medir la actividad de la deshidrogenasa succínica mediante estos aceptores artificiales de electrones, es necesario abolir esta barrera de permeabilidad. En mitocondrias de mamíferos, ésto se ha logrado mediante el tratamiento de ellas con fosfolipasa A, con Ca^{+2} , o mediante una combinación de ambos agentes. Sin embargo, tal como se mencionó en RESULTADOS, las mitocondrias de ambas especies vegetales se comportaron de un modo distinto, ya que ninguno de estos tratamientos por sí solos o en conjunto, produjeron la libre penetración de los colorantes. Este efecto sólo se logró mediante la ruptura de la membrana mitocondrial interna, ya sea por la aplicación de

ultrasonido o mediante ciclos de congelación y descongelación. La ruptura de esta membrana se determinó mediante mediciones de la actividad de la deshidrogenasa málica (E. C. 1.1.1.37), una enzima típica de la matriz mitocondrial (100, 101), en la solución sobrenadante que resulta al sedimentar las mitocondrias tratadas. El hecho que en mitocondrias sonicadas de coliflor, el número de recambio de la deshidrogenasa succínica sea prácticamente igual al de la enzima de preparaciones particuladas de mamíferos (Tabla I), indica que después de este tratamiento se mide la actividad total de la deshidrogenasa.

Otra forma de eliminar la barrera de permeabilidad a los colorantes que presenta la membrana mitocondrial interna, sería mediante el empleo de preparaciones de partículas submitocondriales, tales como las de ETP o ETP_H. Todos los datos existentes parecen indicar que en este tipo de preparación, la membrana mitocondrial interna se encuentra invertida (101). De este modo, la deshidrogenasa succínica, originalmente localizada en la superficie interna de la membrana interna, se encuentra ligada a la superficie externa de las vesículas que forman este tipo de preparación submitocondrial y, por lo tanto, no existiría ningún impedimento para la interacción de la flavoproteína con los aceptores artificiales de electrones.

El segundo tipo de problema encontrado en la determinación de la actividad de la deshidrogenasa succínica, derivó de la inestabilidad de la enzima en ausencia de grupos tioles, tales como la cisteína,

β -mercaptoetanol, DTT, etc. Sin embargo, la adición de estos compuestos produce altos blancos de la reacción enzimática, debido a la reducción no enzimática, tanto del PMS como del DCIP. Esta interferencia se eliminó mediante la adición de NEM 0,03 M, en condiciones tales en que se produjo la reacción del reactivo alquilante con los agentes reductores, sin afectar los grupos SH de la enzima (113). De todas maneras, como es lógico, la adición del reactivo complica el sistema de ensayo y, además, puede ocasionar problemas en condiciones en que por determinados tratamientos de la preparación enzimática (por ejemplo, solubilización), puede modificarse la reactividad de los grupos sulfhidrilos de la enzima (113).

B. ACTIVACION POR SUCCINATO

La activación de la deshidrogenasa succínica por succinato, parece ser una característica general de la enzima de organismos aeróbicos (114), ya que se ha observado en una gran variedad de tejidos animales (rata, vacuno y cerdo), en mitocondrias de levaduras y también en tejidos de vegetales (64, 66, 67, 91). En cambio, la deshidrogenasa succínica de organismos anaeróbicos (115), al parecer no presenta este tipo de activación, al menos en las condiciones experimentales en las que se produce la activación de la deshidrogenasa "aeróbica". En el caso de la enzima de coliflor y de poroto mung, este fenómeno de

activación se caracteriza por seguir una cinética de primer orden (Fig. 3) y por ser profundamente afectado por la temperatura, teniendo una energía de activación muy alta, aproximadamente 31.000 cal/mol (Fig. 4). Esta energía de activación es muy similar a la determinada para la enzima de tejidos animales (64, 65). La deshidrogenasa succínica de coliflor y de poroto mung, así como la de mamíferos, puede también ser activada por compuestos de estructura semejante a la del sustrato, como por ejemplo, el malonato, que es un inhibidor competitivo de la enzima (19 - 21) o el fumarato, uno de los productos de la reacción. Otra característica de este proceso de activación es su reversibilidad. En efecto, al eliminar el agente activante (succinato), mediante lavados repetidos y centrifugación, se produce la desactivación de la enzima y al incubar esta enzima "desactivada" con succinato, en las condiciones en que se produce normalmente la activación de la enzima, se logra la recuperación de la actividad enzimática original.

De acuerdo a las características mencionadas, este fenómeno de activación de la deshidrogenasa succínica por su sustrato o un análogo de él, puede visualizarse como la combinación del activador con el sitio activo de la forma desactivada de la enzima, seguida de una conversión más lenta y reversible de este complejo a la forma activada de la enzima. Esta conversión sería aparentemente un cambio de conformación de la proteína, el que daría cuenta de la alta energía de activación que

caracteriza a este proceso y de la relativa lentitud con que se produce, ya que la etapa inicial de combinación del activador con la forma desactivada de la enzima, que ha podido ser analizada separadamente del proceso total en la enzima de corazón de buey (69), es una reacción muy rápida y no presenta la dependencia de la temperatura que caracteriza al proceso de activación. Esta hipótesis puede resumirse en el esquema siguiente, en el cual E_i y E_a representan las formas desactivadas y activada de la enzima, respectivamente y A, un sustrato o inhibidor competitivo que actuaría como el agente activador:



El agente activador estabilizaría la forma activada de la enzima y al disociarse, el proceso se invertiría rápidamente, dando origen nuevamente a la forma desactivada de la enzima.

Otro aspecto que es necesario mencionar, es el que dice relación con la posible significación fisiológica que pudiera tener este fenómeno de activación. Al respecto, se ha podido comprobar que las fluctuaciones en la concentración de succinato en diferentes estados metabólicos, no son lo suficientemente altas como para inducir cambios apreciables en la actividad de la deshidrogenasa succínica (4). Por lo tanto, es poco probable que el succinato pueda actuar en condiciones fisiológicas como un modulador positivo de la enzima. Este punto será

tratado nuevamente más adelante, al analizar los diferentes procesos de activación que afectan la actividad de esta enzima.

C. NUMERO DE RECAMBIO

Otra de las características de la deshidrogenasa succínica de coliflor y de poroto mung, que es típica de la enzima de organismos aeróbicos, es la unión covalente de su grupo prostético flavínico al esqueleto polipeptídico de la enzima (4, 77, 114). Esto hace que la flavina se mantenga unida a la apoenzima, incluso después de tratamientos tales como desnaturación térmica, precipitación por ácidos, tratamiento con solventes orgánicos, proteólisis, etc. Además de estas propiedades, el enlace covalente flavina-proteína le confiere a la flavina de la deshidrogenasa succínica propiedades fluorescentes muy características (Fig. 19), que constituyen la base para la determinación cuantitativa de ella (89), lo que a su vez permite determinar la concentración de esta flavoenzima, en una forma independiente de su estado de activación y de la pureza de la preparación.

Con respecto al número de recambio de la enzima de mitocondrias de coliflor (Tabla I), el valor encontrado es muy similar al determinado para preparaciones particuladas de la enzima de tejidos de mamíferos y de levaduras (66, 95, 114). Esta similitud indica que la

eficiencia catafítica de la deshidrogenasa succínica de vegetales y la de los otros organismos mencionados, es prácticamente la misma. Este hecho constituye una nueva evidencia de la notoria constancia en las propiedades de esta enzima en organismos de naturaleza muy distinta, pero que tienen en común el hecho que sus células suplen sus requerimientos energéticos a partir de "reacciones ligadas al oxígeno", en las cuales la deshidrogenasa succínica cumple un papel preponderante.

II. REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE LA DESHIDROGENASA SUCCINICA DE DICOTILEDONEAS

A. COMPARACION DE LAS PROPIEDADES REGULATORIAS DE LA DESHIDROGENASA SUCCINICA DE BRASSICA OLERACEA Y DE PHASEOLUS AUREUS

Los experimentos presentados en la Parte II de esta tesis, indican que las propiedades regulatorias de la deshidrogenasa succínica de poroto mung son muy semejantes a las de la enzima de mamíferos. Las únicas diferencias encontradas fueron que el desacoplante 2,4-dinitrofenol no produce desactivación de la deshidrogenasa de porotomung y que el ADP, al igual que el ATP, pueden activarla (Fig. 9). En las preparaciones de la enzima de coliflor, además de las mencionadas, se encontraron dos diferencias adicionales con respecto a la enzima de

mamíferos. En primer lugar, la activación, tanto por ATP como por ADP, se produce también en mitocondrias sonicadas y en mitocondrias sonicadas y además sometidas a ciclos de congelación y descongelación, mientras que en tejidos animales sólo el ATP produce activación y su efecto se presenta únicamente en mitocondrias intactas (4, 6). La otra diferencia es que en mitocondrias de coliflor, ni los sustratos NAD-dependientes, ni el NADH, ni la combinación de ambos, pueden producir la activación completa de la deshidrogenasa succínica en presencia de antinicina A y en condiciones anaeróbicas (Fig. 8).

B. ACTIVACION POR $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$

Los resultados presentados en la Figura 8 y la Tabla III indican que la deshidrogenasa succínica de mitocondrias intactas de vegetales, puede activarse mediante la adición de NADH. Este fenómeno se debería a la existencia de una NADH deshidrogenasa ligada a la superficie externa de la membrana mitocondrial interna, capaz de reducir a la CoQ_{10} (97 - 99). Sin embargo, la existencia de las dos NADH deshidrogenasas no explica la activación incompleta producida por el NADH y los sustratos NAD-dependientes, en preparaciones mitocondriales de coliflor. Los resultados de las Figuras 7 y 8 y de la Tabla III, sugieren que se establece algún tipo de equilibrio entre las formas activadas y desactivada de la enzima, cuando los equivalentes reductores son aportados por

malato más piruvato o por NADH, incluso en condiciones anaeróbicas o en presencia de antinicina A. Cuando se agrega malato más piruvato a las mitocondrias de coliflor, pueden producirse dos efectos juxtapuestos: por una parte, la oxidación del malato genera NADH intramitocondrialmente, el cual a su vez reduce a la CoQ_{10} , produciéndose de esta manera la activación de la deshidrogenasa succínica; por otra parte, el malato, al ser oxidado por la deshidrogenasa málica en la matriz mitocondrial, da origen a oxaloacetato, el cual produce la desactivación de la enzima. El hecho que este tipo de experimento se realice en condiciones anaeróbicas, limitaría severamente la cantidad de oxaloacetato producida. Sin embargo, como sólo basta un equivalente molar de oxaloacetato para ocasionar una gran pérdida de actividad de la deshidrogenasa succínica (70, 76), en la mitocondria podría haber suficientes equivalentes oxidantes como para permitir la acumulación de esa cantidad de oxaloacetato. En consecuencia, en el caso de la activación por malato más piruvato, el equilibrio aparente alcanzado podría representar el balance de los dos efectos mencionados, vale decir, formación de oxaloacetato y reducción de la CoQ_{10} . La diferencia con respecto a las mitocondrias de hígado de rata (6), donde los sustratos NAD-dependientes producen una activación casi completa de la deshidrogenasa succínica, podría ser una consecuencia de diferencias en la velocidad de remoción del oxaloacetato por reacciones metabólicas, tales como las reacciones de transaminación.

La posible explicación enunciada con el objeto de dar cuenta de la activación incompleta producida por el malato más piruvato en mitocondrias de coliflor, no puede, evidentemente, explicar el efecto incompleto del NADH. Sin embargo, es posible que el equilibrio aparente alcanzado ya sea con NADH o con malato más piruvato, refleje diferentes grados de reducción del reservorio de CoQ_{10} producidos por la acción de las NADH deshidrogenasas "interna" y "externa", sin que ninguna de las dos enzimas sea capaz de reducir el reservorio de CoQ_{10} hasta un grado suficiente como para permitir la activación completa de la deshidrogenasa succínica. Sin embargo, esta noción y la compartimentalización del reservorio de CoQ_{10} que ella implica, no es apoyada por los resultados presentados en la Figura 8, ya que al adicionar conjuntamente NADH y malato más piruvato, el grado de activación alcanzado por la enzima es intermedio con respecto a los valores obtenidos con cada "activador" por separado. El hecho que la inclusión de malato más piruvato a un sistema sometido a activación por NADH agregado externamente retarde el proceso, apoya la idea que la formación de oxaloacetato, aún en anaerobiosis, puede ser, al menos, en parte, responsable de la activación incompleta de la deshidrogenasa succínica.

C. ACTIVACION POR ATP Y ADP

Tal como se mencionó anteriormente, una de las diferencias más sobresalientes de la regulación de la deshidrogenasa succínica de vegetales, con respecto a la enzima de mamíferos, es la activación de la primera de ellas, tanto por el ATP como por el ADP y la ausencia del efecto desactivante del 2,4-dinitrofenol, a pesar de su efecto desacoplante. A este respecto, es necesario considerar que existiría al menos dos mecanismos mediante los cuales estos nucleótidos podrían regular la actividad de la deshidrogenasa succínica. El primero de ellos implicaría la modificación del cociente $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2/\text{CoQ}_{10}$ y el segundo, un efecto activador directo sobre la enzima del ATP y ADP. En relación al primer mecanismo, Kroger y Klingenberg (72) han demostrado que al producirse la transición del estado 4 al estado 3 (116), el cociente de oxidorreducción $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2/\text{CoQ}_{10}$ disminuye sustancialmente y que lo mismo sucede en presencia de un desacoplante de la fosforilación oxidativa. Además, se ha podido comprobar que en el estado 4 la deshidrogenasa succínica se encuentra activada, mientras que en presencia de ADP o de un agente desacoplante, se produce la desactivación de la enzima debido a la oxidación de la $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ (4, 6). Vale decir, entonces, que este primer mecanismo para la regulación de la deshidrogenasa no sería otra cosa que una nueva manifestación de la regulación de la enzima por variaciones en la concentración de la CoQ_{10} , mediada por el

sistema de conservación de la energía.

El segundo mecanismo no es mediado por el sistema de conservación de la energía, ya que la activación se produce en presencia de oligomicina, pudiendo considerarse como una regulación alostérica de la deshidrogenasa por el ATP.

Las mitocondrias de vegetales, probablemente por problemas asociados con su aislamiento, presentan cuocientes de control respiratorio mucho menores que las mitocondrias de mamíferos (117). Este hecho implicaría que los niveles, en estado estable, de reducción de los diferentes componentes de la cadena respiratoria, que caracterizan a los diferentes estados metabólicos de la mitocondria, se modifican bastante menos que en las mitocondrias de mamíferos. Por lo tanto, es posible que en las mitocondrias de vegetales, la razón de oxidorreducción $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2/\text{CoQ}_{10}$ no varíe lo suficiente como para notar un efecto desactivante del ADP o del 2,4-dinitrofenol, al inducir la transición del estado 4 al estado 3, o del estado 1 al estado 2.

La activación de la enzima de vegetales por ADP, tanto en presencia como en ausencia de oligomicina, se explicaría de acuerdo al segundo mecanismo postulado, vale decir, que el ADP, al igual que el ATP, IDP e ITP, sería un efector positivo de la deshidrogenasa de poroto mung y de coliflor. Otra explicación para el efecto del ADP, sería su conversión en ATP por mecanismos distintos a la fosforilación oxidativa (por ejemplo, adenilato quinasa).

D. POSIBLE SIGNIFICACION METABOLICA DE LA REGULACION DE LA DESHIDROGENASA SUCCINICA

Uno de los factores que es necesario considerar, al analizar el posible rol metabólico de la regulación de la deshidrogenasa succínica de vegetales, es el efecto que tiene el ADP. Si el efecto de este nucleótido, tal como se discutió en la sección precedente, se debe al bajo control respiratorio de las mitocondrias de vegetales y a la transformación de él en ATP mediante mecanismos que no implican los componentes del sistema de fosforilación oxidativa, la significación fisiológica de la regulación de la actividad de esta enzima sería muy similar a la que se ha postulado para ella en mitocondrias de mamíferos (4, 6).

La deshidrogenasa succínica es un componente común del ciclo de Krebs y de la cadena respiratoria mitocondrial y, como los resultados de esta tesis indican que esta flavoproteína puede oscilar entre un estado activado y un estado desactivado, estas transiciones podrían regular el funcionamiento de dicho ciclo. Sin embargo, se ha comprobado que aún en el estado desactivado, la actividad de la deshidrogenasa succínica no es limitante para el funcionamiento del ciclo de Krebs (4, 6). De esta manera, la desactivación de la enzima, inducida por el ADP, deja siempre una actividad residual suficiente para el funcionamiento normal del ciclo. Esto se debe, probablemente, a que la síntesis de ATP durante el estado 3

revierte la desactivación producida por la oxidación de la $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ inducida por el ADP. De modo que la deshidrogenasa succínica no regula el ciclo de Krebs, sino que más bien es regulada por el estado metabólico de la mitocondria, fluctuando su actividad en un rango de 5 a 6 veces entre los extremos.

Hace algunos años, se comprobó (118 - 120) que los sustratos de las diferentes flavoproteínas ligadas a la cadena respiratoria interferían entre sí en la oxidación de cada uno de ellos. Esta inhibición mutua no se debe a un sobrepaso de la capacidad máxima de transporte de electrones de la cadena respiratoria. Así lo demuestra, por ejemplo, el hecho de que la presencia simultánea de un sustrato que se oxida a alta velocidad, tal como el succinato y de otro que se oxida lentamente, tal como la colina, se traduce en un menor consumo de O_2 que con succinato solo (120, 121). Este comportamiento sugiere que el sistema de transporte de electrones puede "orientarse" hacia aquella flavoproteína que se encuentra en forma reducida en un momento dado, no estando, entonces, disponible para aceptar electrones de las otras flavoproteínas. De manera que si existiera un flujo suficiente de succinato como para mantener la enzima en un gran porcentaje en el estado reducido, la alta actividad de la deshidrogenasa succínica, en estas condiciones, restringiría la oxidación del NADH. Mientras en cada vuelta del ciclo de Krebs se genera 10 moles de ATP debido a la oxidación del NADH, solamente 2 moles de ATP resultan del paso succinato \rightarrow fumarato.

De modo que la síntesis acelerada de ATP requeriría cierta inhibición de la actividad de la deshidrogenasa succínica para permitir una máxima velocidad de oxidación del NADH. Sin embargo, la inhibición de la enzima no debe ser lo suficientemente grande como para que su actividad se haga limitante para el funcionamiento del ciclo de Krebs. Esta situación ocurre en la práctica, ya que se ha comprobado (4, 6) que al agregar ADP a mitocondrias de hígado de rata, se produce inmediatamente una brusca disminución de la actividad de la deshidrogenasa succínica, pero la desactivación no llega a límites a los cuales la actividad de la enzima es limitante, pues antes de que ello ocurra, comienza la acumulación de ATP y la flavoproteína se activa nuevamente.

La regulación que se propone y que ya ha sido postulada para la enzima de mamíferos (4, 6), operaría de la siguiente manera. Cuando el cociente ATP/ADP es bajo y por lo tanto se necesita la síntesis acelerada de ATP, la deshidrogenasa succínica estará desactivada, debido parcialmente, a la baja concentración de ATP (un activador de la enzima) y, parcialmente, porque la concentración de $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$, otro activador, es baja en el estado 3. Esto permitirá la oxidación acelerada del NADH y en estas condiciones se producirá una gran síntesis de ATP. Cuando el cociente ATP/ADP alcance un valor alto (estado 4), la deshidrogenasa succínica se activará debido a la acumulación de succinato en el estado 3 (122), al aumento de la concentración de $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ y al ATP formado. Esta activación de la

enzima se traducirá en la oxidación del succinato acumulado, con lo cual la oxidación del NADH se restringirá severamente y la concentración de ATP disminuirá. Para que esta hipótesis tenga validez, es preciso que existan otras vías de formación de succinato, fuera de la correspondiente a la oxidación del α -cetoglutarato, ya que en caso contrario, el succinato que se origina a partir del α -cetoglutarato automáticamente regulará la actividad de la deshidrogenasa succínica. Sin embargo, se sabe que se producen cantidades apreciables de succinil-CoA y por lo tanto de succinato, a partir de la oxidación de ácidos grasos de número impar de átomos de carbono, de aminoácidos ramificados y de la metionina (4).

Si la activación de la deshidrogenasa succínica producida por el ADP en mitocondrias de vegetales es un hecho real y no un efecto debido a modificaciones artificiales introducidas al sistema experimental, la significación metabólica de la activación de la enzima no podría ser la misma que la que tiene en mitocondrias de mamíferos. Esto pone de manifiesto la necesidad de una investigación profunda del problema, tanto en mitocondrias intactas altamente acopladas, como en sistemas más simples, como partículas submitocondriales y preparaciones solubles de la enzima, las que hasta la fecha han sido imposibles de obtener, a pesar de los múltiples intentos realizados.

III. SUSTITUCION DEL GRUPO PROSTETICO DE LA DESHIDROGENASA SUCCINICA POR ANALOGOS FLAVINICOS

A. METODICA EXPERIMENTAL EMPLEADA

En las flavoproteínas, como la deshidrogenasa succínica, en que la flavina se encuentra unida covalentemente a la proteína, el efecto de modificaciones químicas del grupo prostético sobre la actividad catalítica no puede ser analizado mediante la recombinación de la apoenzima con los nucleótidos flavínicos modificados. Para estudiar este problema, se podría haber utilizado el método tradicional consistente en el tratamiento de la holoenzima con diferentes reactivos que produjeran modificaciones en diversas posiciones del anillo flavínico. Sin embargo, este tipo de metódica está limitado por el hecho que el reactivo, conjuntamente con producir modificaciones en alguna posición del grupo prostético, podría también hacerlo en otros componentes de la enzima. Por lo tanto, la identificación del sitio de reacción del agente modificador responsable de la variación de la actividad catalítica, podría ser una tarea bastante difícil e inútil, en el caso que la reacción no ocurriera a nivel de la flavina. Por otra parte, mediante este tipo de metódica, probablemente ciertas posiciones del grupo prostético no serían accesibles al reactivo modificador, dada la estructura tridimensional del sitio activo. Por estas razones, se prefirió la metódica experimental planteada en la Sección A de la Parte III de RESULTADOS y

que se basa en el cultivo de un organismo, en este caso una cepa de levadura que requiere la presencia de riboflavina para su crecimiento, con diferentes compuestos análogos a ella. En estas condiciones, los análogos se incorporarán a las distintas flavorproteínas del organismo, las cuales tendrán, entonces, modificaciones muy precisas en su grupo prostético. Esta metódica tiene ciertas ventajas sobre la mencionada anteriormente, pero también adolece de algunas limitaciones. Entre las ventajas se puede mencionar la eliminación de las interferencias producidas por la reacción del agente modificador con la proteína y el hecho de que teóricamente sería posible obtener derivados de la flavina con modificaciones bien determinadas y en cada una de las posiciones del anillo flavínico. Sin embargo, la metódica elegida está restringida a aquellos análogos de riboflavina que son compatibles con el crecimiento de la levadura mutante. Esto excluiría el uso de análogos, que al ser incorporados a las flavoproteínas durante el ciclo de crecimiento, den origen a enzimas inactivas o con una actividad insuficiente como para permitir el crecimiento de la levadura. También estarían excluidos aquellos compuestos que, a pesar de cumplir con el requisito anterior, tengan problemas de permeabilidad y no puedan penetrar a la célula de Saccharomyces cerevisiae. En relación a este punto, recientemente se ha demostrado en la cepa mutante HK 645, la existencia de un transporte de riboflavina mediado por una permeasa bastante específica (123).

B. SOLUBILIZACION Y PURIFICACION PARCIAL DE LA DESHIDRO -
GENASA SUCCINICA DE LEVADURAS Y AISLAMIENTO DE LOS
PEPTIDOS FLAVINICOS RESULTANTES DE SU HIDROLISIS

La deshidrogenasa succínica de levaduras (109), al igual que la enzima de tejidos animales (46, 49), es altamente inestable al ser extraída en forma soluble del resto de los componentes de la cadena respiratoria mitocondrial. Por este motivo, para solubilizar y purificar la enzima, debe emplearse un método que sea lo más rápido y simple posible y que, además, pueda realizarse en condiciones bastante moderadas.

En este trabajo, la enzima se solubilizó mediante un método diseñado tomando como base la técnica descrita por Davis y Hafezi (50). Por medio de este método, fue posible extraer en forma soluble desde las partículas submitocondriales, entre un 80 a un 90% de la deshidrogenasa succínica (Tabla VII). El método original descrito por estos autores para solubilizar la enzima de mamíferos, requiere como material de partida preparaciones de complejo II de la cadena respiratoria (124). Este tipo de preparación particulada, de por sí representa una forma bastante purificada de la enzima, pero cuya obtención es bastante larga y laboriosa. En cambio, en el caso de la enzima de levadura, no es necesario utilizar una preparación particulada tan purificada de la deshidrogenasa, ya que bastan preparaciones de ETP para lograr una extracción casi cuantitativa de ella (Tabla VII).

STUDIES ON PLANT SUCCINATE DEHYDROGENASE

AN ABSTRACT

of a dissertation submitted to the Faculty of Sciences
of the University of Chile
in partial fulfillment of the requirements for the degree of
Doctor en Ciencias con Mención en Biología
Especialidad en Bioquímica

by

Enrique G. Oestreicher A.

May, 1977

Dissertation supervisor: Professor Thomas P. Singer

ABSTRACT

Plant succinate dehydrogenase (succinate: acceptor oxidoreductase E.C. 1.3.99.1) was studied in relation to the general characteristics of the particulated form of the enzyme, the mechanisms that regulate its activity and the substitution of its prosthetic group. The first two aspects were investigated in mitochondria isolated from two plant species: Brassica oleracea L. (cauliflower) and Phaseolus aureus L. variety Jumbo (mung bean). The third point was analyzed in Saccharomyces cerevisiae (baker's yeast).

The determination of the enzymatic activity of succinate dehydrogenase in mitochondria from both higher plant species, was performed by an adaptation of the spectrophotometric phenazine methosulfate assay. Procedures in the literature for isolation and sonic disruption of mitochondria from these sources were modified to assure maximal yield and stability of the enzyme. Succinate dehydrogenase in mung bean and cauliflower mitochondria exists mainly in a deactivated state but incubation of it with succinate leads to its full activation. The energy of activation for the conversion of the deactivated to activated form of the enzyme under the influence of substrate is about 30,000 cal/mol. As

in animal tissues, the enzyme appears to contain covalently bound flavin (8α -histidylFAD) and the turnover number is $19,400 \text{ min}^{-1}$ at pH 7,5 and 38° .

The effect of various agents on the activation of succinate dehydrogenase in cauliflower and mung bean mitochondria and in sonicated particles was investigated. Reduced coenzyme Q_{10} , IDP, ITP, acid pH and anions activate the plant enzyme in the same manner as in mammalian mitochondria. Significant differences were detected in the behavior of plant and animal preparations in the effects of ATP, ADP, NADH, NAD-linked substrated and of 2,4-dinitrophenol. In mammalian mitochondria ATP activates the enzyme, whereas ADP does not, and the ATP effect is shown only in intact mitochondria. In mung bean and cauliflower mitochondria, as in sonicated and frozen-thawed preparations, both ATP and ADP activate the enzyme. In sonicated mung bean mitochondria NADH causes complete activation, as in mammalian submitochondrial particles, but in intact and in sonicated cauliflower mitochondria, activation by NADH is incomplete. Moreover, neither NAD-linked substrates nor a combination of these with NADH can fully activate the enzyme in cauliflower mitochondria. In contrast to mammalian mitochondria, succinate dehydrogenase is not deactivated in cauliflower or mung bean mitochondria under the oxidized conditions brought about by uncoupling of oxidative phosphorylation by 2,4-dinitrophenol.

The substitution of the prosthetic group of succinate dehydrogenase was performed in the yeast mutant HK 645, a riboflavinless mutant. This characteristics allowed the growth of the mutant in the presence of different riboflavin analogs, such as 7-methylriboflavin and 8-methylriboflavin and the incorporation of them into the enzyme, giving rise to an active succinate dehydrogenase. The identification of the flavin which form part of the prosthetic group of the enzyme obtained in the presence of 7-methylriboflavin was achieved by a procedure involving solubilization and purification of the flavoprotein, isolation of the flavin peptides resulting from the proteolytic digestion of it and cleavage of the covalent flavin-protein bond. The free flavin resulting from such treatment was 7-methylriboflavin. These data are consistent with a complete substitution of the analog for riboflavin in the prosthetic group of the enzyme.

RESUMEN

En esta tesis se analizó la enzima deshidrogenasa succínica (succinato: aceptor oxidorreductasa E.C. 1.3.99.1) de vegetales, con respecto a ciertas características generales de la enzima particulada, a los mecanismos que regulan su actividad y a la sustitución de su grupo prostético por análogos de él. Los dos primeros aspectos se estudiaron en mitocondrias aisladas de dos especies de dicotiledóneas: Brassica oleracea L (coliflor) y Phaseolus aureus L variedad Jumbo (poroto. mung). El tercer punto se analizó en células de Saccharomyces cerevisiae (levadura de panadería).

Para determinar la actividad enzimática de la deshidrogenasa succínica de las mitocondrias de las dos dicotiledóneas, se adoptó el método espectrofotométrico del fenacínmetosulfato. El aislamiento y ruptura sónica de estas mitocondrias se modificó con el objeto de lograr un máximo rendimiento y estabilidad de la enzima. La deshidrogenasa succínica de ambas especies vegetales se encuentra principalmente en el estado desactivado, pero su incubación con succinato produce una activación total de ella. Este proceso de activación se caracteriza por una energía de activación de aproximadamente 30.000 cal/mol, que es prácticamente la misma que

la determinada en tejidos animales. Al igual que en estos tejidos, la enzima contiene la flavina unida covalentemente (8 α -histidilFAD) y el número de recambio es 19.400 min^{-1} , a pH 7,5 y 38°.

Se investigó el efecto de varios agentes en el grado de activación de la enzima en mitocondrias intactas y sonicadas de coliflor y poroto mung. Los resultados obtenidos indican que la coenzima Q₁₀, el IDP, el ITP, el pH ácido y ciertos aniones, activan la enzima en igual forma que en mitocondrias de mamíferos. Sin embargo, existen diferencias en el comportamiento de la enzima en relación al efecto del ATP, ADP, NADH, sustratos NAD-dependientes y del 2,4-dinitrofenol. En mitocondrias de mamíferos, el ATP activa la deshidrogenasa, mientras que el ADP no presenta efecto activador y el efecto del ATP se manifiesta sólo en mitocondrias intactas. En cambio, tanto en mitocondrias intactas como dañadas de coliflor y poroto mung, tanto el ATP como el ADP activan la enzima. En mitocondrias sonicadas, al igual que en partículas submitocondriales de mamíferos, el NADH produce una activación completa de la enzima. Sin embargo, en mitocondrias intactas y sonicadas de coliflor, la activación por NADH es incompleta, así como lo es la activación por sustratos NAD-dependientes y por la combinación de éstos y NADH. A diferencia de lo que sucede en mitocondrias de mamíferos, en mitocondrias de coliflor y de poroto mung la deshidrogenasa succínica no se desactiva por las condiciones oxidativas producidas por el desacoplamiento de la

fosforilación oxidativa mediante el 2,4-dinitrofenol.

La sustitución del grupo prostético de la deshidrogenasa succínica se realizó en levaduras de la cepa HK 645, una cepa que requiere la presencia de flavinas para su crecimiento. Esta propiedad permitió cultivar esta cepa con diferentes análogos de riboflavina, tales como la 7-metilriboflavina y la 8-metilriboflavina y lograr la incorporación de ellos a la enzima, dando origen a una flavoproteína activa. La identificación de la flavina del grupo prostético se realizó con la enzima obtenida en presencia de 7-metilriboflavina, mediante un procedimiento consistente en la solubilización y purificación de la flavoproteína, el aislamiento de los péptidos flavínicos resultantes de la digestión proteolítica de ella y la ruptura del enlace covalente flavina-proteína. La flavina libre resultante de este tratamiento fue la 7-metilriboflavina. Esto demuestra la sustitución total de la riboflavina por el análogo en el grupo prostético de la enzima.

Este método de solubilización y purificación de la deshidrogenasa succínica de levadura presenta ventajas muy importantes con respecto al único otro método existente para tal objeto, descrito por Singer y col. (109). Así, por ejemplo, el rendimiento mencionado anteriormente (80 a 90%), es muy superior al de 40% logrado mediante el método de Singer. Otra ventaja del método utilizado en este trabajo es que permite la obtención de una enzima soluble totalmente activa. Esto se pone de manifiesto porque el número de recambio de la enzima soluble (Tabla VIII), concuerda con el que teóricamente habría que esperar para una preparación en la que no ha habido inactivación. Una conclusión similar se puede obtener de la excelente correspondencia existente entre el rendimiento calculado en base a la actividad enzimática y el correspondiente a la concentración de δ α -histidilflavina (Tabla VII), ya que tal como se mencionó con anterioridad, este parámetro puede considerarse como una determinación química de la concentración de la deshidrogenasa succínica. Esta concordancia no se observó en la fracción correspondiente a la etapa de filtración en Sephadex G-200 (Tabla VII), lo que indicaría la inactivación de la enzima en esta última etapa del procedimiento de purificación. Si se considera que la deshidrogenasa succínica tiene un peso molecular de 100.000 daltones (50, 125), que el contenido de δ α -histidilflavina de la enzima pura teóricamente debiera ser de 10 nmoles/mg de proteína y que el contenido de δ α -histidilflavina de la preparación enzimática obtenida al final del procedimiento

de purificación es de 2,92 nmoles/mg de proteína, se puede concluir que la pureza de la preparación es de un 30% a aproximadamente.

El aislamiento de los péptidos flavínicos resultantes de la digestión proteolítica de las flavoproteínas es generalmente una tarea muy difícil y laboriosa, debido al gran exceso de péptidos no flavínicos que deben ser eliminados por medio de procedimientos relativamente inespecíficos y, también, debido a la gran pérdida de material flavínico durante el largo procedimiento de purificación. Como las cantidades de péptidos flavínicos de las que se dispuso eran extremadamente limitadas, fue necesario desarrollar un método de purificación que pudiera ser empleado en una escala de nanomoles, ya que los métodos tradicionales (52, 106) sólo pueden ser empleados en un rango de concentración mil veces superior al deseado. El método que finalmente se adoptó (Fig. 23) incluyó una etapa de purificación en la cual se hace uso de la apoflavodoxina de Azotobacter vinelandii como agente específico de combinación para flavinas sustituidas en la posición 8α del anillo de isoaloxazina, tal como lo son los péptidos flavínicos resultantes de la hidrólisis de todas las flavoproteínas que poseen la flavina unida en forma covalente a la proteína (9, 107, 109, 126, 127). Sin embargo, los resultados obtenidos (Fig. 24) indican que, a pesar de que se logra una purificación sustancial mediante la aplicación de este simple procedimiento, los péptidos flavínicos se encuentran contaminados con algunos péptidos

no flavínicos. Esto no es de extrañar, ya que la apoflavo-
doxina es una proteína ácida (87) y por lo tanto, puede
unir péptidos en una forma no específica.

C. UNIÓN DE LA FLAVINA A LA APOENZIMA

Los resultados representados en la Fi -
gura 26 sugieren que se ha producido una sustitución total
de la riboflavina por la 7-metilriboflavina como constitu -
yente del grupo prostético de la deshidrogenasa succínica
de las levaduras cultivadas con ese análogo metilado. La
enzima sintetizada en estas condiciones presenta una efi -
ciencia catalítica idéntica a la de la enzima que contiene
riboflavina (Tabla IX), lo que sugiere que el grupo etilo
de la posición 7 del anillo flavínico no interfiere en la
unión de la flavina a la apoenzima, así como tampoco en la
actividad catalítica de ella, como era de esperar dada la
posición de la modificación. Por otra parte, las caracte -
rísticas espectrales de los péptidos flavínicos provenien -
tes de la enzima que contiene 7-metilriboflavina (Figs. 19B
y 20), indican la incorporación de ella en forma de una es -
trutura típica de una δ α -histidilflavina. Este mismo
tipo de evidencia se obtuvo, también, para los péptidos re -
sultantes de la enzima que contiene δ -metilriboflavina
(Figs. 19C y 20), lo que sugiere ese mismo tipo de estruc -
tura en este caso, a pesar de que por la presencia del gru -
po etilo en la posición 8 del núcleo flavínico, podría

pensarse en la unión de la histidina al carbono 8- β de la 8-metilriboflavina. Sin embargo, el pKa extremadamente ácido del protón del nitrógeno imidazólico libre del residuo de histidina implicado en el enlace (Fig. 19), es atribuible al retiro de electrones π del grupo imidazólico, debido a efectos resonantes e inductivos del núcleo flavínico. Este efecto atractor de electrones del anillo flavínico no se podría explicar si la unión de la flavina a la proteína se efectuara mediante el carbono 8- β , ya que el grupo etileno que uniría en este caso a ambos núcleos, ejercería un efecto "aislante" que lo impediría.

En base a los antecedentes recién mencionados, en la Figura 27 se presenta un esquema de la estructura probable que tendría la flavina que forma parte del grupo prostético de la deshidrogenasa succínica obtenida en presencia de riboflavina, 7-metilriboflavina y 8-metilriboflavina.

Figura 27. Estructura probable del grupo prostético de la deshidrogenasa succínica sintetizada en presencia de riboflavina, 7-metilriboflavina y 8-metilriboflavina.

A: 8 α -(N-3)-histidilriboflavina; B: 8 α -(N-3)-histidil-7-metilriboflavina; C: 8 α -(N-3)-histidil-8-metilriboflavina.

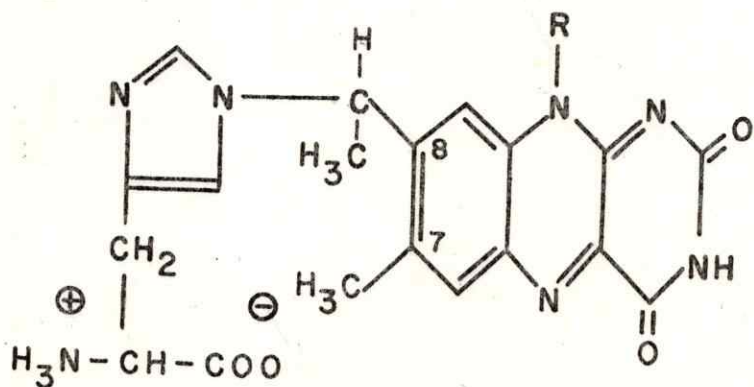
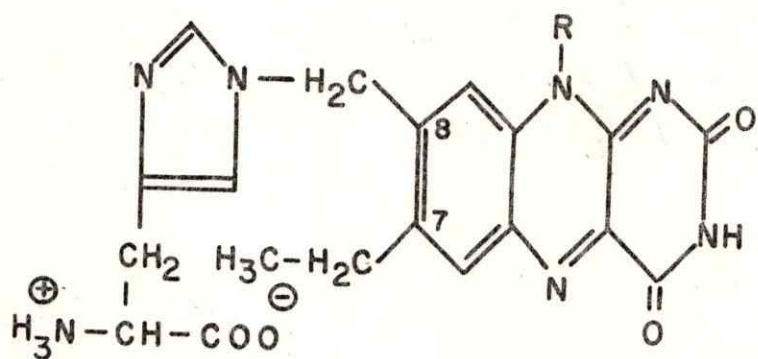
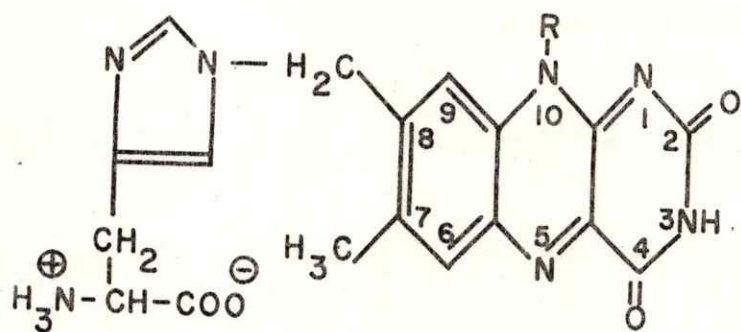


Figure 27

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Storey, B.T., *Plant Physiol.* 46, 13 (1970)
- 2.- Hiatt, A.J., *Plant Physiol.* 36, 552 (1961)
- 3.- Singer, T.P. en *Biochemical Evolution and the Origin of Life* (Schoffeniels, E., ed.) North Holland, Amsterdam, pág. 203 (1963)
- 4.- Singer, T.P., Kearney, E.B. y Gutman, M., en *Biochemical Regulatory Mechanisms* (Kun, E. y Grisolia, S., ed.) J. Wiley and Sons, New York, pág. 271 (1972)
- 5.- Singer, T.P., Gutman, M. y Kearney, E.B. en *Biochemistry and Biophysics of Mitochondrial Membranes* (Azzone, G.F., Carafoli, E., Lehninger, A.L., Quagliariello, E. y Silipandi, N., eds.) Academic Press, New York, pág. 41 (1972)
- 6.- Gutman, M., Kearney, E.B. y Singer, T.P., *Biochemistry* 10, 4763 (1971)
- 7.- Singer, T.P., Kearney, E.B. y Bernath, P., *J. Biol. Chem.* 223, 599 (1956)
- 8.- Hemmerich, P., Ehrenberg, A., Walker, W.H., Eriksson, L.E., Salach, J., Bader, P. y Singer, T.P., *FEBS Lett.* 3, 37 (1969)
- 9.- Singer, T.P. y Edmondson, D.E., *FEBS Lett.* 42, 1, (1974)
- 10.- Singer, T.P., Salach, J., Walker, W.H., Gutman, M., Hemmerich, P., Ehrenberg, A., en *Flavins and Flavoproteins* (Kamin, H., ed.) Univ. Park Press, Baltimore, Maryland, pág. 607 (1971)
- 11.- Salach, J., Walker, W.H., Singer, T.P., Ehrenberg, A., Hemmerich, P., Ghisla, S. y Hartman, U., *Eur. J. Biochem.* 26, 267 (1972)

- 12.- Walker, W.H. y Singer, T.P., *J. Biol. Chem.* 245, 4224 (1970)
- 13.- Bueding, E. en *Control Mechanisms in Respiration and Fermentation* (Wright, B., ed.) Ronal Press, New York, pág. 167 (1963)
- 14.- Bueding, E., Saz, H. y Farrow, G.W., *Brit. J. Pharmacol.* 14, 497 (1959)
- 15.- Hirsch, C.A., Raminsky, M., Davis, B.D. y Lin, E.C., *J. Biol. Chem.* 238, 3370 (1963)
- 16.- Thunberg, T., *Skand. Arch. Physiol.* 22, 430 (1909)
- 17.- Batelli, F. y Stern, L., *Biochem. Z.* 30, 172 (1910)
- 18.- Szent-György, A.Z., *Physiol. Chem.* 249, 211 (1937)
- 19.- Quastel, J.H. y Wooldridge, W.R., *Biochem. J.* 22, 689 (1928)
- 20.- Quastel, J.H. y Wheatley, H.M., *Biochem. J.* 25, 117 (1931)
- 21.- Mann, P.J. y Quastel, J.H., *Biochem. J.* 35, 502 (1941).
- 22.- Krebs, H.A., *Adv. in Enzymol.* 3, 191 (1943)
- 23.- Das, N.B., *Biochem. J.* 31, 1124 (1937)
- 24.- Hopkins, F.G. y Morgan, E.J., *Biochem. J.* 32, 611 (1938)
- 25.- Hopkins, F.G., Morgan, E.J. y Lutwak-Mann, C., *Biochem. J.* 32, 1929 (1938)
- 26.- Keilin, D. y Hartree, E.F., *Proc. Roy. Soc. London B* 125, 171 (1938)
- 27.- Keilin, D. y Hartree, E.F., *Proc. Roy. Soc. London B* 129, 277 (1940)
- 28.- Keilin, D. y Hartree, E.F., *Biochem. J.* 41, 500 (1947)
- 29.- Keilin, D. y Hartree, E.F., *Biochem. J.* 44, 205 (1949)

- 30.- Keilin, D. y Hartree, E.F., Nature 176, 200 (1949)
- 31.- Potter, R.V., J. Biol. Chem. 137, 13 (1941)
- 32.- Slater, E.C., Biochem. J. 45, 1 (1949)
- 33.- Green, D.E., Mui, S. y Kohout, P.M., J. Biol. Chem. 217, 551 (1955)
- 34.- Kun, E. y Abood, L.G., Science 109, 144 (1949)
- 35.- Glock, E. y Jensen, C.O., J. Biol. Chem. 201, 271 (1953)
- 36.- Ball, E.G., en Enzymes: Units of Biological Structure and Function (Gaebler, O.H., ed.) Academic Press, New York, pág. 403 (1956)
- 37.- Quastel, J.H. y Wheatly, A.H., Biochem. J. 22, 936 (1928)
- 38.- Slater, E.C. y Bonner Jr., W.D., Biochem. J. 52, 185 (1952)
- 39.- Kearney, E.B. y Singer, T.P., J. Biol. Chem. 219, 963 (1956)
- 40.- Singer, T.P. y Kearney, E.B. en Methods of Biochemical Analysis (Glick, D., ed.) Interscience, New York, vol. IV, pág. 307 (1957)
- 41.- Singer, T.P., Zastrow, N., Massey, V. y Kearney, E.B., Arch. Biochem. Biophys. 62, 497 (1956)
- 42.- Hogeboom, G.H., J. Biol. Chem. 162, 739 (1946)
- 43.- Morton, R.K., Nature 166, 1092 (1950)
- 44.- Kearney, E.B. y Singer, T.P., Biochem. Biophys. Acta 14, 572 (1954)
- 45.- Singer, T.P. y Kearney, E.B. en Aminoacid Metabolism (Elroy, W.D. y Glass, B., eds.) John Hopkins Press, Baltimore, pág. 558 (1954)
- 46.- Singer, T.P. y Kearney, E.B., Biochem. Biophys. Acta 15, 151 (1954)

- 47.- Singer, T.P., Kearney, E.B. y Zastrow, N., *Biochem. Biophys. Acta* 17, 154 (1955)
- 48.- Wang, T.Y., Tsou, C.L. y Wang, Y.L., *Sci. Sinica (Pekin)* 5, 73 (1956)
- 49.- Bernath, P. y Singer, T.P. en *Methods in Enzymology* (Colowick, S.P. y Kaplan, N.O., eds.) Academic Press, New York, vol. 5, pág. 597 (1962)
- 50.- Davis, K.A. y Hatefi, Y., *Biochemistry* 10, 2509 (1971)
- 51.- Axelrod, A.E., Potter, R.V. y Elvehjem, C.A., J. *Biol. Chem.* 142, 85 (1942)
- 52.- Kearney, E.B., *J. Biol. Chem.* 235, 865 (1960)
- 53.- Singer, T.P., Kearney, E.B. y Massey, V., *Arch. Biochem. Biophys.* 60, 255 (1955)
- 54.- Walker, W.H., Salach, J., Gutman, M., Singer, T.P., Hyde, J.S. y Ehrenberg, A., *FEBS Lett.* 5, 237 (1969)
- 55.- Walker, W.H., Singer, T.P., Ghisla, A., Hemmerich, P., Hartmann, U. y Zeszotek, E., *Eur. J. Biochem.* 26, 279 (1972)
- 56.- Kenney, W.C., Walker, W.E. y Singer, T.P., *J. Biol. Chem.* 247, 4510 (1972)
- 57.- Massey, V., *J. Biol. Chem.* 229, 763 (1957)
- 58.- Kearney, E.B. y Singer, T.P., *Biochem. Biophys. Acta* 17, 596 (1955)
- 59.- Lusty, C.J., Machinist, J.M. y Singer, T.P., *J. Biol. Chem.* 240, 1804 (1965)
- 60.- Beinert, H. y Sands, R.H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 3, 41 (1960)
- 61.- Sands, R.H. y Beinert, H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 3, 47 (1960)
- 62.- Der Vartanian, D.V., Veeger, C., Orme-Johnson, W.H. y Beinert, H., *Biochem. Biophys. Acta* 191, 22 (1969)

- 63.- Beinert, H., Ackrell, B.A.C., Kearney, E.B. y Singer, T.P., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 58, 564 (1974)
- 64.- Kearney, E.B., *J. Biol. Chem.* 229, 363 (1957)
- 65.- Gutman, M., Kearney, E.B. y Singer, T.P., *Biochemistry* 10, 2726 (1971)
- 66.- Singer, T.P. en *Comprehensive Biochemistry* (Florkin, M. y Stotz, E.H., eds.) Elsevier, Amsterdam, vol. 14, pág. 127 (1966)
- 67.- Thorn, M.B., *Biochem. J.* 85, 116 (1962)
- 68.- Kearney, E.B., Singer, T.P. y Zastrow, N., *Arch. Biochem. Biophys.* 55, 579 (1955)
- 69.- Kimura, T., Hauber, J. y Singer, T.P., *J. Biol. Chem.* 242, 4987 (1955)
- 70.- Singer, T.P., Kearney, E.B. y Kenney, W.C. en *Advances in Enzymology* (Meister, A., ed.) J. Wiley and Sons, New York, vol. 37, pág. 189 (1972)
- 71.- Singer, T.P., Gutman, M. y Kearney, E.B., *FEBS Lett.* 17, 11 (1971)
- 72.- Kröger, A. y Klingenberg, M., *Biochem. Z.* 344, 317 (1966)
- 73.- Kearney, E.B., Mayr, M. y Singer, T.P., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46, 531 (1972)
- 74.- Kearney, E.B., Ackrell, B.A.C., Mayr, M. y Singer, T.P., *J. Biol. Chem.* 249, 2016 (1974)
- 75.- Kearney, E.B., Ackrell, B.A.C. y Mayr, M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49, 1115 (1972)
- 76.- Kearney, E.B. y Ackrell, B.A.C. en *Dynamics of Energy-Transducing Membranes* (Ernster, L., Estabrook, D. y Slater, E.C., eds.) Elsevier, Amsterdam, pág. 111 (1974)
- 77.- Singer, T.P., Gutman, M. y Massey, V. en *Iron-Sulfur Proteins Biological Properties*, Academic Press, New York, vol. 1, pág. 225 (1973)

- 78.- Ackrell, B.A.C., Kearney, E.B. y Mayr, M., J. Biol. Chem. 249, 2021 (1974)
- 79.- Oltmans, O. y Lingens, F., Z. Naturforschg. 22h, 757 (1967)
- 80.- Lance, C., Physiol. Veg. 9, 259 (1971)
- 81.- Ikuna, H. y Bonner, W.D. Jr., Plant Physiol. 42, 67 (1967)
- 82.- Hebb, C.R., Slebodnik, J., Singer, T.P. y Bernath, P., Arch. Biochem. Biophys. 83, 10 (1959)
- 83.- Cobley, J.G., Grossman, S., Beinert, H. y Singer, T.P., Biochem. Biophys. Res. Commun. 53, 1273 (1973)
- 84.- Mahler, H.R., Mackler, B., Grandchamp, S. y Slonimski, P.P., Biochemistry 3, 668 (1964)
- 85.- Bulen, W.A., J. Bacteriol. 82, 130 (1961)
- 86.- Hinkson, J.W. y Bulen, W.A., J. Biol. Chem. 242, 3345 (1967)
- 87.- Edmondson, D.E. y Tollin, G., Biochemistry 10, 124 (1971)
- 88.- D'Anna, J.A. y Tollin, G., Biochemistry 10, 57 (1971)
- 89.- Singer, T.P., Salach, J., Hemmerich, P. y Ehrenberg, A., Methods in Enzymol. 18 B, 416 (1971)
- 90.- Williamson, J.B. y Corkey, B.E., Methods in Enzymol. 13, 434 (1969)
- 91.- Singer, T.P., Rocca, E. y Kearney, E.B. en Flavins and Flavoproteins (Slater, E.C., ed.) Elsevier, Amsterdam pág. 391 (1966)
- 92.- Singer, T.P. en Methods of Biochemical Analysis (Glick, D., ed.) J. Wiley and Sons, New York, vol. 22, pág. 123 (1974)
- 93.- Layne, E., Methods in Enzymol. 3, 447 (1957)
- 94.- Arrigoni, O. y Singer, T.P., Nature 193, 1256 (1962)

- 95.- Cerletti, P., Strom, R., Giovenco, A. y Giordano, M.,
Abstr. 6th Intern. Congr. Biochem., pág. 775 (1965)
- 96.- Klingenberg, M. y Pfaff, E. en Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria (Tager, J.M., Pappa, S., Quagliariello, E. y Slater, E.C., eds.) Elsevier Publ. Co., Amsterdam, pág. 180 (1966)
- 97.- Coleman, J.O.D. y Palmer, J.M., FEBS Lett. 17, 203 (1971)
- 98.- Coleman, J.O.D. y Palmer, J.M., Eur. J. Biochem. 26, 499 (1972)
- 99.- Douce, R., Manella, E.A. y Bonner, W.D.Jr., Biochem. Biophys. Acta 275, 148 (1972)
- 100.- Matlib, M.A. y O'Brien, P.J., Arch. Biochem. Biophys. 167, 193 (1975)
- 101.- Lee, C.P. y Ernster, L. en The Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria (Tager, J.M., Pappa, S., Quagliariello, E. y Slater, E.C.) Elsevier, Amsterdam, pág. 218 (1966)
- 102.- Gregolin, C. y Scaletta, P., Biochem. Biophys. Acta 99, 185 (1965)
- 103.- Bacher, A. y Lingens, F., J. Biol. Chem. 245, 4647 (1970)
- 104.- Bacher, A. y Lingens, F., J. Biol. Chem. 246, 7018 (1971)
- 105.- Ringler, R.L., Minakami, S. y Singer, T.P., J. Biol. Chem. 238, 80 (1965)
- 106.- Kenney, W.C., Edmondson, D.E. y Singer, T.P., Biochem. Biophys. Res. Commun. 57, 106 (1974)
- 107.- Möhler, M., Brühmüller, M. y Decker, K., Eur. J. Biochem. 29, 152 (1972)
- 108.- Kenney, W.C. y Walker, W.H., FEBS Lett. 20, 297 (1972)
- 109.- Singer, T.P., Massey, V. y Kearney, E.B., Arch. Biochem. Biophys. 69, 405 (1957)

- 110.- Baginsky, M.L. y Hatefi, Y., J. Biol. Chem. 244, 5313 (1969)
- 111.- Edmondson, D.E. y Oestreicher, E.G., Resultados sin publicar.
- 112.- King, T.E., Biochem. Biophys. Acta 47, 430 (1961)
- 113.- Kenney, W.C., J. Biol. Chem., 250, 3089 (1975)
- 114.- Singer, T.P. en International Symposium on Oxidases and Related Oxidation-Reduction Systems (King, T.E., Mason, H.S. y Morrison, M., eds.) J. Wiley and Sons, New York, vol. 1, pág 448 (1965)
- 115.- Warringa, M.G., Smith, O.H., Guiditta, A. y Singer, T.P., J. Biol. Chem. 230, 97 (1958)
- 116.- Chance, B. y Williams, G.R. en Advances in Enzymology, (Nord. F.F., ed.) Interscience, New York, vol. XVII, pág. 65 (1956)
- 117.- Ikuma, I., Ann. Rev. Plant Physiol. 23, 419 (1972)
- 118.- Ringler, R.L. y Singer, T.P., J. Biol. Chem. 234, 2211 (1959)
- 119.- Wu, C.Y. y Tsou, C.L., Sci. Sinica 4, 137 (1955)
- 120.- Kimura, T., Singer, T.P. y Lusty, C.J., Biochem. Biophys. Acta 44, 284 (1960)
- 121.- Kimura, T. y Singer, T.P., Nature 184, 791 (1959)
- 122.- La Noue, K., Nicklas, W.J. y Williamson, J.R., J. Biol. Chem. 245, 102 (1970)
- 123.- Perl, M., Kearney, E.B. y Singer, T.P., J. Biol. Chem. 251, 3221 (1976)
- 124.- Hatefi, Y. y Hanstein, W.G., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 62, 1129 (1969)
- 125.- Coles, C.J., Tisdale, H.D., Kenney, W.C. y Singer, T.P., Physiol. Chem. & Physics 4, 301 (1972)
- 126.- Kearney, E.B., Salach, J.I., Walker, W.H., Seng, R.L., Kenney, W.C., Zezotek, E. y Singer, T.P., Eur. J. Biochem. 24, 321 (1971)

- 127.- Walker, W.H., Kenney, W.C., Edmondson, D.E., Singer, T.P., Cronin, J.R. y Hendricks, R., *Eur. J. Biochem.* 48, 439 (1974)
- 128.- Watenpaugh, K.D., Sieker, L.C. y Jensen, L.H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 70, 3857 (1973)
- 129.- Burnett, R.M., Darling, G.D., Kendall, D.S., Le-
Quesne, M.E., Mayhew, S.G., Smith, W.W. y Ludwig,
M., *J. Biol. Chem.* 249, 4383 (1974)
- 130.- Ghisla, S. y Hemmerich, P., *FEBS Lett.* 16, 229 (1971)
- 131.- Flexer, L.A. y Farkas, W.G., *Chem. Abstr.* 47, 8781
(1952)
- 132.- Neal, R.A., *J. Biol. Chem.* 245, 2599 (1970)

APENDICE

UNION DE FLAVINAS SUSTITUIDAS EN LA POSICION 8 α Y PEPTIDOS FLAVINICOS A LA FLAVODOXINA DE AZOTOBACTER

La unión de flavinas sustituidas en la posición 8 α y péptidos flavínicos a apoflavoproteínas puede ser útil desde dos puntos de vista. En primer lugar, puede dar información acerca de las limitaciones estéricas de la porción bencenoide de la molécula de flavina en su sitio de unión en la proteína. Además, puede proporcionar un método atractivo para la purificación de los péptidos flavínicos que resultan de la hidrólisis de flavoproteínas que contienen flavinas unidas covalentemente.

Con estos objetivos en mente, se analizó la unión de diferentes flavinas sustituidas en la posición 8 α a la apoflavodoxina de Azotobacter. Se eligió esta flavoproteína debido a que puede obtenerse fácilmente en forma pura y en cantidades apropiadas. Además, esta flavoproteína presenta una baja especificidad en la unión de análogos flavínicos (87) y los datos de cristalografía de rayos X (128, 129) demuestran que la porción bencenoide de la flavina unida (FMN) está expuesta al solvente.

Cuando un digerido triptico-quimotriptico de la deshidrogenasa succinica (a nivel del FMN) se incubaba con apoflavodoxina y la mezcla de incubación se somete a una filtración en una columna de Sephadex G-50, solamente entre un 38 a un 40% de los péptidos flavinicos se recuperan, asociados con la flavodoxina en el pico excluido de la columna (Fig. 28A). Sin embargo, el tratamiento del digerido triptico-quimotriptico con pronasa antes de la adición de la apoflavodoxina, se tradujo en la unión de un 80% de los péptidos flavinicos a la apoproteína (Fig. 28B). Estos resultados sugieren que una fracción importante de los péptidos flavinicos (aproxinadamente un 40%) corresponde a péptidos mayores que el pentapéptido descrito para la digestión triptica-quimotriptica de la deshidrogenasa succinica (11) y que la presencia de la larga cadena peptidica dificultaría la unión a la apoflavodoxina. Otra explicación a este fenómeno sería la interferencia que péptidos no flavinicos podrían ejercer en la unión del péptido flavinico. De acuerdo con esta explicación, el aumento de la unión después del tratamiento con pronasa sería el resultado de la hidrólisis de los péptidos interferentes.

Los resultados de la Tabla X muestran que al aplicar esta metódica a digeridos tripticos-quimotripticos de la monoaminooxidasa y de la tiamina deshidrogenasa (ambos a nivel del FMN), entre un 60 a un 70% de la flavina unida covalentemente, se une a la apoflavodoxina. A modo de comparación, la tabla muestra, además, que la

Figura 28. Filtración molecular en columna de Sephadex G-50 de digeridos proteolíticos de la deshidrogenasa succínica de corazón de vacuno tratados con apoflavodoxina.

Digeridos proteolíticos de la deshidrogenasa succínica de corazón de vacuno (80 a 100 nmoles) se incubaron con apoflavodoxina durante una hora a 22° en amortiguador fosfato de sodio 25 mM, pH 7,0. El volumen final de la mezcla de incubación fue de 1 ml. Esta mezcla se sometió a una filtración molecular en una columna de Sephadex G-50 (1 x 50 cm), equilibrada y eluida con el mismo amortiguador usado durante la incubación. Se colectaron fracciones de 1,0 ml, a las cuales se les determinó la absorbancia a 445 nm (●) y 280 nm (○). A: digerido triptico - quimotriptico. B: digerido triptico-quimotriptico, tratado, además, con pronasa durante 24 horas a 38° en amortiguador fosfato de sodio 100 mM, pH 7,4. En ambos casos la razón molar de apoflavodoxina a péptido flavínico fue igual a 2.

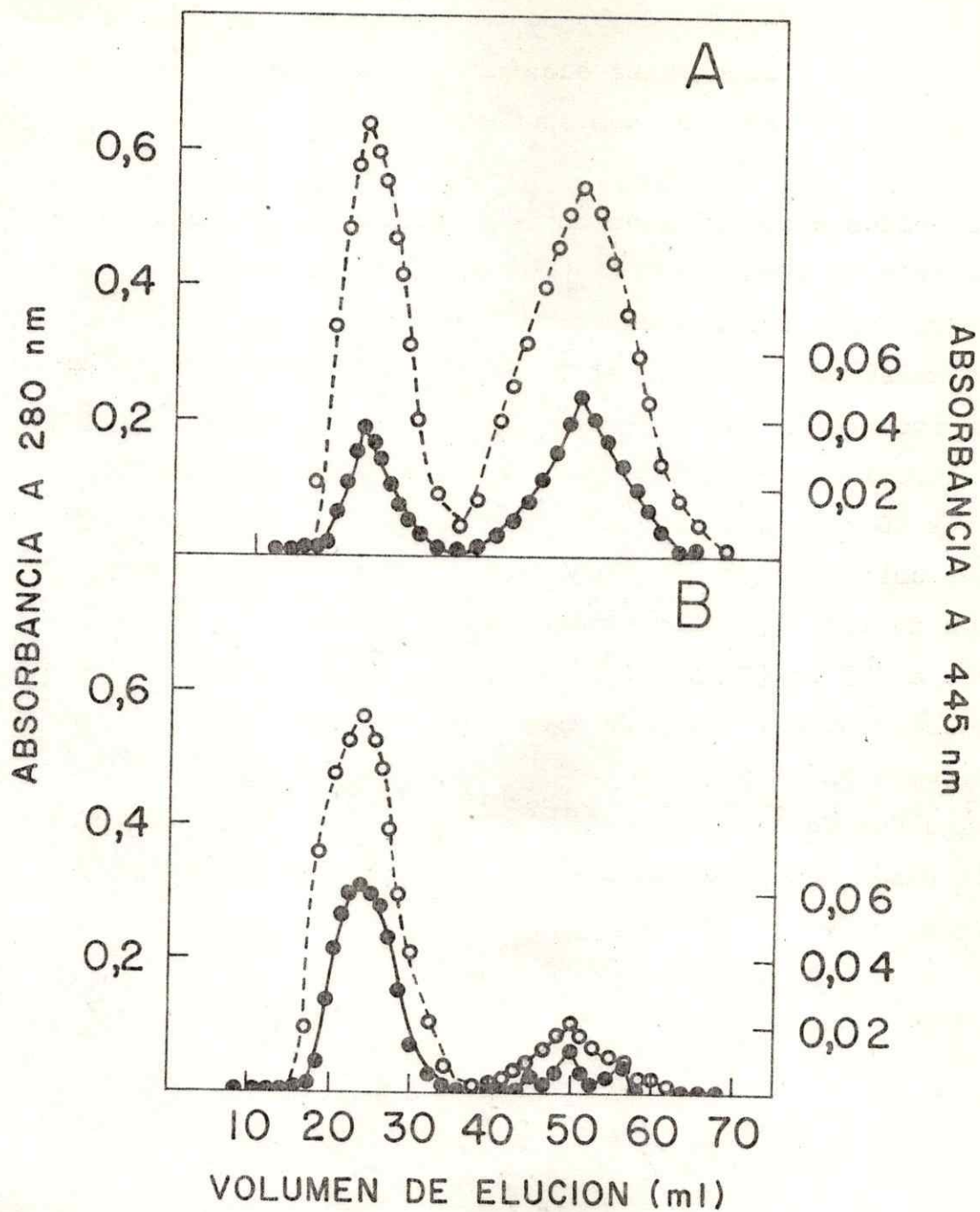


Figura 28

riboflavina y la 8α -(N-3)-histidilriboflavina se unieron un 92 y un 86%, respectivamente, en las mismas condiciones. Estos resultados sugieren que si las constantes de disociación de los diversos complejos flavina-apoflavodoxina fuesen 10^{-6} M o menores, la flavina en cuestión podría permanecer unida a la apoflavodoxina, en las condiciones en que se efectuó la filtración en Sephadex (Leyenda Fig. 28).

Con el objeto de cuantificar la afinidad de unión de las diferentes flavinas sustituidas en la posición 8α y péptidos flavínicos a la apoflavodoxina, se determinó fluorimétricamente la constante de disociación (K_D) en cada caso. Esta determinación se realizó midiendo la extinción (quenching) de la fluorescencia del triptofano de la apoproteína al producirse la unión de la flavina. Se prefirió este método, en lugar de medir la extinción de la fluorescencia de la flavina, ya que la fluorescencia de todas las flavinas sustituidas en la posición 8α , incluyendo los péptidos flavínicos, se caracteriza por rendimientos cuánticos muy bajos en las condiciones en que se produce la unión a la apoflavodoxina. La curva de titulación representada en la Figura 29 muestra que el 8α -(N-3)-histidilFMN sintético y el pentapéptido flavínico proveniente de la deshidrogenasa succínica de corazón de buey, presentan casi la misma afinidad por la apoflavodoxina y que ambos casos la estequiometría de la unión fue de un mol de flavina por mol de proteína.

La Tabla XI es un resumen de los resultados obtenidos al determinar las constantes de

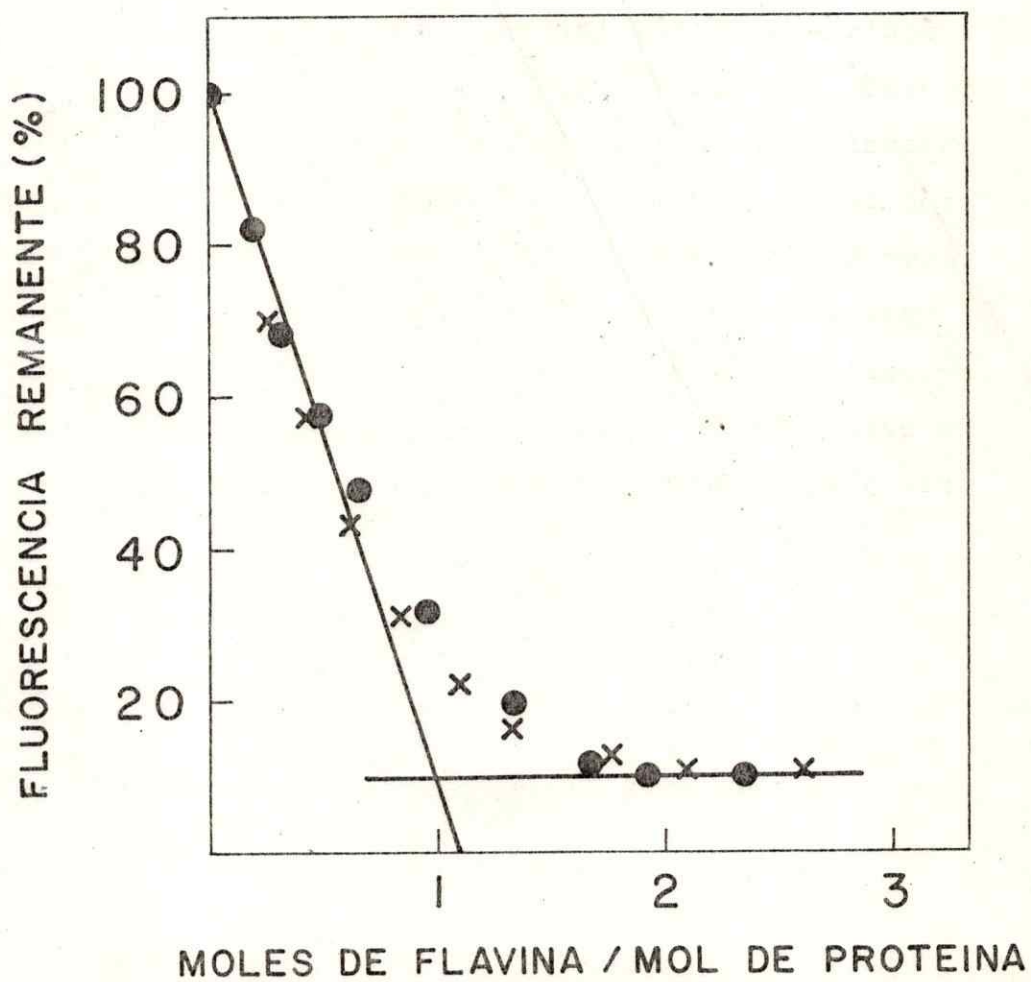


Figura 29

Figura 29. Titulación fluorimétrica de la apoflavodoxina con flavinas sustituidas en la posición 8 α .

Extinción de la fluorescencia del triptofano de la apoflavodoxina al ligar 8 α -(N-3)-histidilFMN (●) o el pentapéptido flavínico purificado, resultante de la digestión triptica-quimotriptica de la deshidrogenasa succínica de corazón de vacuno (89) (x). La longitud de onda de la radiación de excitación fue 280 nm y se determinó la emisión de fluorescencia a 330 nm. La concentración de apoflavodoxina fue 3×10^{-7} M, la que se suspendió en amortiguador fosfato de sodio 25 mM, pH 7,0. La ordenada representa el porcentaje de fluorescencia remanente después de cada adición de flavina, una vez alcanzado el equilibrio y está corregido por la dilución respectiva.

Tabla X

Flavina	Concentración de la flavina (μ M)	% ligado a la apoflavodoxina
Riboflavina	85	92
8 α -(N-3)-histidil- riboflavina	100	86
Flavina en digerido triptico- quimotriptico de la deshidrogenasa succinica de corazón de vacuno	100	38
Igual pero digerido con pronasa después de tripsina-quimotripsina	82	75
Flavina en digerido triptico- quimotriptico de la monoaminooxidasa	80	69
Flavina en digerido triptico- quimotriptico de la tiamina deshidrogenasa	200	63

Tabla X. Unión a la apoflavodoxina de los péptidos flavínicos obtenidos por digestión proteolítica de varias flavoenzimas.

La unión de los péptidos flavínicos y flavinas sustituidas en la posición 8α a la apoflavodoxina, se analizó mediante filtración en una columna de Sephadex G-50, la que se realizó en las condiciones descritas en la Figura 28. Las 8α -histidilflavinas sintéticas empleadas se prepararon de acuerdo a Walker y col. (55), mientras que la 8α -cisteinilriboflavina se sintetizó por el procedimiento de Ghisla y Memmerich (130). La fosforilación de la 8α -(N-3)-histidilriboflavina, para obtener el 8α -(N-3)-histidilFMN, se realizó de acuerdo al método de Flexer y Farkas (131). Las preparaciones de las diferentes flavoenzimas se obtuvieron de acuerdo a procedimientos publicados: deshidrogenasa succínica (11), monoaminoxidasa (126) y tiamina deshidrogenasa (132). Los digeridos trípticos-quimotrípticos de estas enzimas se prepararon según el procedimiento descrito por Singer y col. (89). Los péptidos flavínicos se convirtieron a la forma mononucleotídica por incubación con fosfodiesterasa de veneno de serpiente. En todos los casos, la razón de flavina a apoflavodoxina fue de 1 : 2.

disociación de los diversos complejos flavina-apoflavodoxina. Tal como se indica en la Tabla XI, tanto el isómero N-1 como el isómero N-3 de la $\delta\alpha$ -histidilriboflavina se unieron a la apoflavodoxina más firmemente que la riboflavina misma, como lo indica el hecho que sus constantes de disociación son aproximadamente un orden de magnitud menores que la de la riboflavina. Esto indicaría el establecimiento de una interacción energéticamente favorable del sustituyente $\delta\alpha$ -histidilo con la proteína, la cual aumentaría la afinidad de la unión. Los datos de la Tabla XI indican, también, que la interacción flavina-apoflavodoxina es más firme cuando la flavina se encuentra en forma fosforilada.

El péptido flavínico más largo purificado hasta la fecha es un péptido tríptico de la deshidrogenasa succínica, el cual contiene 23 residuos de aminoácidos (56). La Tabla XI muestra que este péptido se unió a la apoproteína al menos tan firmemente como los isómeros de la $\delta\alpha$ -histidilriboflavina, lo que sugiere que el péptido que no se une a la apoflavodoxina después de la digestión tríptica-quimotríptica de la deshidrogenasa succínica, no es este péptido flavínico tríptico.

La reducción de los complejos de la apoflavodoxina con el $\delta\alpha$ -(N-3)-histidilFMN, el pentapéptido flavínico de la deshidrogenasa succínica (a nivel del FMN) y el pentapéptido flavínico de la monoaminoxidasa (a nivel del FMN), mediante un equivalente de electrones de ditionito, se traduce en la formación de la especie semiquinónica de la flavina, tal como lo demuestra el espectro

Tabla XI. Constantes de disociación de diferentes complejos apoflavodoxina-flavina sustituida en la posición 8 α .

Las constantes de disociación se determinaron fluorimétricamente, midiendo la extinción de la fluorescencia del triptofano de la apoflavodoxina al ligar la flavina. Las condiciones experimentales son las mismas descritas en la leyenda de la Figura 29. Las flavinas sustituidas en la posición 8 α se obtuvieron en la forma descrita en la leyenda de la Tabla IX. Los diferentes péptidos flavínicos se purificaron a partir de los respectivos digeridos proteolíticos, mediante el procedimiento descrito en RESULTADOS (I), excepto el péptido tríptico de la deshidrogenasa succínica, que fue donado por el Dr. W.C. Kenney de la Universidad de California, Sn. Francisco

Tabla XI

Flavina	$K_D \times 10^7$
	(M)
Riboflavina	28,4
8α -(N-1)-histidilriboflavina	4,1
8α -(N-3)-histidilriboflavina	1,0
8α -(N-3)-histidilFMN	0,15
Péptido flavínico tríptico de la deshidrogenasa succínica (a nivel del FMN)	2,9
Péptido flavínico tríptico-quimotríptico de la deshidrogenasa succínica (a nivel del FMB)	0,14
Péptido flavínico tríptico-quimotríptico- pronásico de la deshidrogenasa succínica (a nivel del FMN)	0,42
Péptido flavínico-quimotríptico de la monoaminooxidasa (a nivel del FMN)	1,22
8α -cisteinilriboflavina	14,1

de absorción resultante (Fig. 30). Sin embargo, mientras los complejos de la apoflavodoxina con los análogos del $\delta\alpha$ -histidilFMN se reducen a su forma hidroquinónica respectiva al agregar un segundo equivalente de electrones de ditionito, el complejo apoflavodoxina-pentapéptido flavínico de la monoaminooxidasa no se redujo, ni siquiera en presencia de 4 a 5 equivalentes reductores. La razón para este comportamiento no se conoce y, por lo tanto será necesario analizar exhaustivamente las propiedades de oxidoreducción de este tipo de complejo.

Figura 30. Espectro de absorción de los complejos 8α -(N-3)-histidilFMN-apoflavodoxina y péptido flavínico de la monoaminoxidasa-apoflavodoxina en diversos estados de oxidación.

Espectro de absorción de las formas oxidada (—), semiquinónica (---) e hidroquinónica (···) del complejo apoflavodoxina- 8α -(N-3)-histidilFMN (A); y de las formas oxidada (—) y semiquinónica (---) del complejo apoflavodoxina-péptido flavínico de la monoaminoxidasa (B). Las formas semiquinónica e hidroquinónica se lograron mediante la adición de hidrosulfito de sodio, en condiciones anaeróbicas, a la solución del complejo en amortiguador fosfato de sodio 25 mM, pH 7,0.

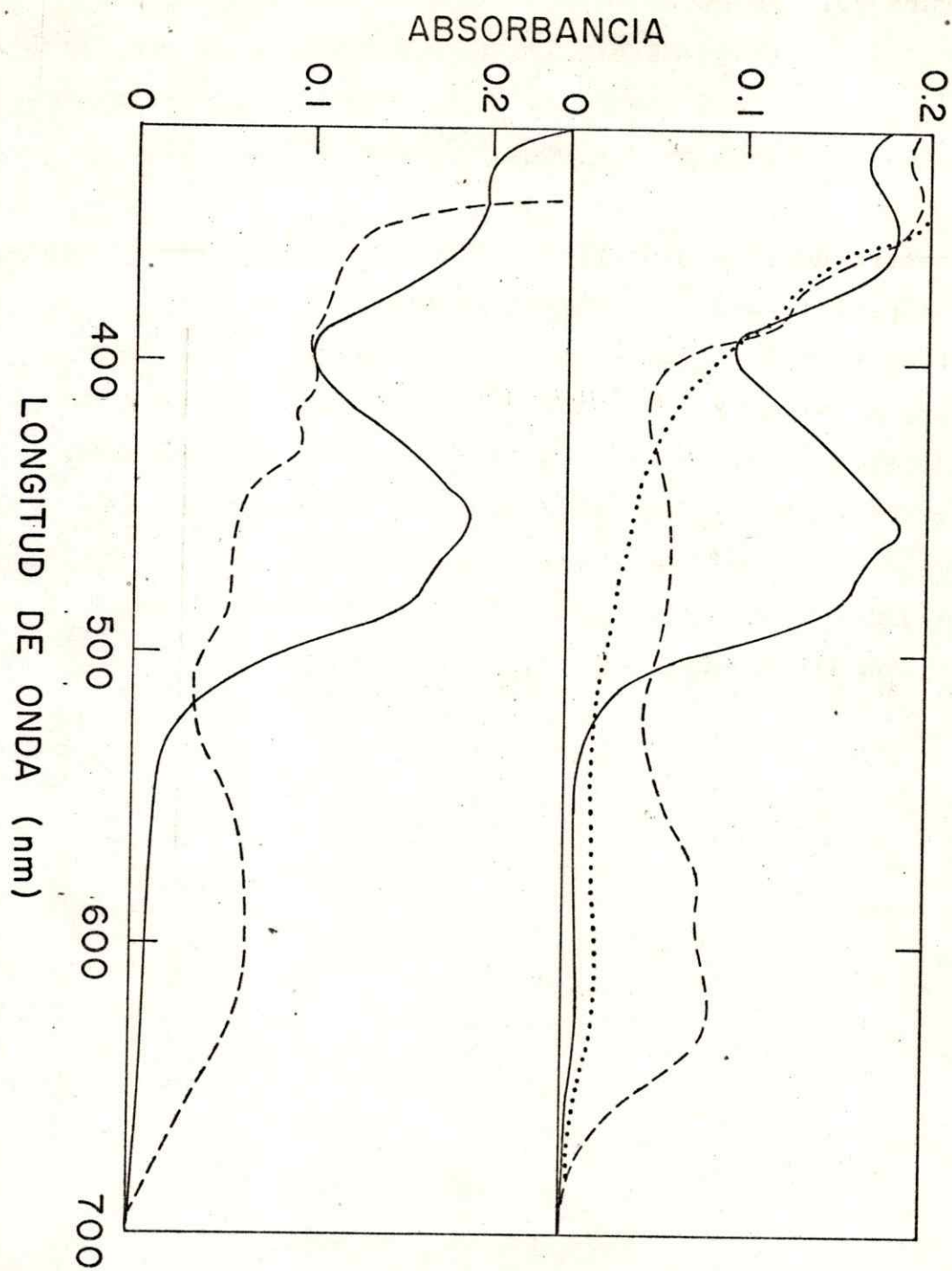


Figura 30