

112 81 8



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR

CARACTERIZACION CINÉTICA Y
ESTRUCTURAL DEL SITIO DE
OXIDACIÓN DE QUINOL DEL COMPLEJO
bc₁ DE MITOCONDRIAS DE BOVINO Y DE
Euglena gracilis

TESIS

Que para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS *Biomedicas*

presenta:

Biol. Raúl Miguel Covián García

ASESOR: Dr. Rafael Moreno Sánchez

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Ciudad Universitaria

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a digitalizar en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: Raúl Miguel Covián García
FECHA: 17 / Octubre / 2002
FIRMA: [Firma]



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**CARACTERIZACIÓN CINÉTICA Y ESTRUCTURAL DEL SITIO DE
OXIDACIÓN DE QUINOL DEL COMPLEJO *bc₁* DE
MITOCONDRIAS DE BOVINO Y DE *Euglena gracilis***

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

El complejo bc_1 mitocondrial es una enzima multimérica que cataliza la transferencia de electrones entre el quinol y el citocromo c acoplada a la translocación de protones a través de la membrana interna de la mitocondria. Además de participar en la generación del gradiente electroquímico de protones para la síntesis de ATP, el complejo bc_1 es uno de los principales sitios de producción de especies reactivas de oxígeno y participa en la cascada de señalización de la apoptosis. La reacción que permite la conservación de energía en este complejo ocurre en el sitio de oxidación de quinol (Q_o), y consiste en la bifurcación de los dos electrones que dona el quinol, uno hacia el centro hierro-azufre, y el otro hacia el hemo b_L del citocromo b . Las estructuras cristalográficas del complejo bc_1 en presencia de inhibidores de la oxidación de quinol muestran que el sitio Q_o está conformado principalmente por residuos del citocromo b , sólo uno de los cuales (glutámico 272), es polar. Se ha propuesto que este residuo, junto con la histidina 161 de la proteína hierro-azufre, son esenciales para la unión del quinol a través de puentes de hidrógeno, y que ambos residuos participan en la oxidación del quinol al recibir los protones del sustrato. También se ha propuesto que la protonación de la histidina 161 asociada a la reducción de la proteína hierro-azufre estabiliza fuertemente a la semiquinona formada tras la transferencia del primer electrón del quinol, manteniendo reducida al centro hierro-azufre hasta que ocurre la oxidación de la semiquinona por parte del hemo b_L .

En este trabajo, se ha investigado la dependencia de la catálisis y la unión de ligandos (sustrato, producto e inhibidores) con respecto al estado de protonación del glutámico 272 del citocromo b y la histidina 161 de la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

proteína fierro-azufre, así como con respecto al estado redox de esta última subunidad en el complejo bc_1 aislado de corazón de bovino. Además, se han estudiado las bases moleculares que confieren resistencia al mixotiazol, uno de los inhibidores de la oxidación de quinol, mediante la caracterización estructural del citocromo b del protista *Euglena gracilis*.

Los resultados obtenidos indican que residuos protonables con pK_a de 5.2-5.7 y 7.5 son los aceptores primarios de los protones provenientes de la oxidación del quinol. La protonación del residuo ácido incrementa fuertemente la afinidad hacia quinona, mientras que la saturación con quinol incrementa la afinidad de este residuo por el protón. Estos datos son consistentes con las propuestas de que el glutámico 272 del citocromo b establece un puente de hidrógeno con el ligando del sitio Q_o , y que este residuo se mueve hacia un canal acuoso cuando se desocupa dicho sitio. En contraste, la unión de quinol y de los inhibidores estigmatelina y mixotiazol, resultó ser independiente del estado de protonación del residuo con pK_a de 7.5, que probablemente corresponde a la histidina 161 de la proteína fierro-azufre. La afinidad hacia quinona y estigmatelina se incrementó menos de dos veces al reducirse el centro fierro-azufre. Estos resultados descartan la posibilidad de una estabilización importante de los ligandos del sitio Q_o tras la reducción de la proteína fierro-azufre asociada a la formación de un puente de hidrógeno fuerte con la histidina 161. En consecuencia, la semiquinona formada tras la primera oxidación del quinol debe ser altamente inestable.

Por otra parte, mientras que en el complejo bc_1 de bovino tanto la estigmatelina como el mixotiazol actuaron como inhibidores fuertemente unidos compitiendo con el quinol y la quinona ($K_d < 5$ nM), en el caso del complejo bc_1 de mitocondrias de *Euglena gracilis*, sólo la estigmatelina presentó este tipo de inhibición. El mixotiazol, en cambio, fue un inhibidor

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

reversible ($K_i = 2 \mu\text{M}$), aunque también competitivo. Esta inhibición anómala del mixotiazol sobre el complejo de *E. gracilis* parece estar asociados con diferencias estructurales del sitio Q_o , distintas a las que poseen los tripanosomátidos. Además, los tamaños que presentan tanto el citocromo *b* como la proteína fierro-azufre en este organismo parecen ser anómalos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

SUMMARY

Mitochondrial bc_1 complex is a multimeric enzyme which catalyzes electron transfer between quinol and cytochrome c coupled to proton translocation across the inner membrane of mitochondria. Besides participating in the generation of the electrochemical proton gradient that drives ATP synthesis, the bc_1 complex is one of the main sources of reactive oxygen species in the cell, and participates in apoptosis signalling cascades. The reaction which allows energy conservation in this complex occurs in the quinol oxidation (Q_o) site, where the two electrons from quinol are transferred in a bifurcated manner, one to the iron-sulfur center, and the second to heme b_L of cytochrome b . Crystallographic structures of the bc_1 complex in the presence of inhibitors of quinol oxidation show that the Q_o site is formed mainly by cytochrome b residues, only one of which (glutamate 272) is polar. This residue, together with histidine 161 of the iron-sulfur protein, are proposed to be essential for binding of quinol through hydrogen bonding, and to participate in quinol oxidation as primary acceptors of protons from quinol. Protonation of histidine 161 upon reduction of the iron-sulfur protein has also been proposed to strongly stabilize the semiquinone molecule formed after the first oxidation of quinol, impeding the oxidation of the iron-sulfur cluster until semiquinone is oxidized by heme b_L .

In this work, catalysis and ligand (substrate, product and inhibitors) binding has been investigated with respect to the protonation state of glutamate 272 of cytochrome b and histidine 161 of the iron-sulfur protein, and upon reduction of this subunit in the purified bovine heart bc_1 complex. Moreover, the molecular basis of myxothiazol (an inhibitor of quinol

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

oxidation) resistance have been studied by characterizing structurally the cytochrome *b* from the protist *Euglena gracilis*.

The present results indicate that protonatable residues with pK_a values of 5.2-5.7 and 7.5 are primary proton acceptors in quinol oxidation. The protonation of the more acidic residue is favored by quinol saturation and greatly increases quinone binding. These data are in agreement with proposals that state that glutamate 272 of cytochrome *b* hydrogen-bonds to the Q_o site ligand, moving away towards a water channel when the Q_o site is emptied. In contrast, binding of quinol and of the inhibitors stigmatellin and myxothiazol was independent of the protonation state of the residue with pK_a of 7.5, probably corresponding to histidine 161 of the iron-sulfur protein. These results discard the possibility of a strong stabilization of Q_o site ligands upon reduction of the iron-sulfur protein associated to a strong hydrogen bond with histidine 161. In consequence, semiquinone formed after the first oxidation of quinol must be highly unstable.

In addition, while stigmatellin and myxothiazol bound tightly to the bovine bc_1 complex in competition with quinone and quinol ($K_d < 5$ nM), only stigmatellin presented this type of inhibition in the bc_1 complex from *Euglena gracilis* mitochondria. Myxothiazol, in contrast, was a reversible inhibitor ($K_i = 2$ μ M), although the competitive binding persisted. The unusual properties of myxothiazol binding to the complex from *Euglena* is related to differences in the structure of the Q_o site not shared with trypanosomes. In addition, the molecular weights of cytochrome *b* and of the iron-sulfur protein in this organism seem to be abnormal.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE

	Pág.
Capítulo 1. Estructura y función del complejo bc_1 .	
1.1 Aspectos estructurales del complejo bc_1	1
1.2 Mecanismo de oxidación de quinol en el complejo bc_1	4
1.3 El complejo bc_1 en el contexto de las cadenas ramificadas de organismos protistas	38
Capítulo 2. Objetivos e hipótesis.....	54
Capítulo 3. Resultados.	
3.1 Papel de grupos protonables del complejo bc_1 de corazón de bovino en la unión y oxidación de quinol.....	56
3.2 La estigmatelina y el mixotiazol se unen fuertemente al sitio de oxidación de quinol (Q_0), de manera independiente del estado redox de la proteína hierro-azufre.....	70
3.3 Caracterización de la resistencia a mixotiazol en el complejo bc_1 de <i>Euglena gracilis</i>	114
Capítulo 4. Discusión General.....	136
Capítulo 5. Conclusiones.....	142
Capítulo 6. Perspectivas.....	144
Capítulo 7. Referencias.....	147
Capítulo 8. Apéndice.....	151

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPITULO 1

ESTRUCTURA Y FUNCION DEL COMPLEJO bc_1

1.1 Aspectos estructurales del complejo bc_1 .

El complejo bc_1 pertenece a una familia de enzimas multiméricas conocida como complejos de citocromo bc , caracterizados por la presencia de un citocromo con dos hemos de tipo B y una proteína con un centro de dos átomos de hierro y dos de azufre unidos a dos cisteínas y dos histidinas, denominado de tipo Rieske [1]. El complejo bc_1 , presente en mitocondrias y en proteobacterias de la subdivisión alfa, contiene además un citocromo con un hemo de tipo C los cuales están unidos covalentemente a la proteína. El otro representante más importante de esta familia es el complejo b_6f , presente en cloroplastos y cianobacterias, el cual presenta la subunidad equivalente al citocromo tipo b dividido en dos polipéptidos, junto con un citocromo con hemo C que no está relacionado estructuralmente con el del complejo bc_1 . El citocromo b , la proteína fierro-azufre, y el citocromo c_1 son las únicas subunidades presentes en el complejo bc_1 de α -proteobacterias como *Paracoccus denitrificans*, *Rhodospirillum rubrum* y *Rhodobacter capsulatus* [1]. Por lo tanto, son las únicas que participan directamente en la actividad catalítica de este complejo. En algunas otras bacterias, como *Rhodobacter sphaeroides* y *Rhodovulum sulfidophilum*, existe una subunidad adicional que participa en la estabilidad del complejo. En todos los eucariontes estudiados, el complejo bc_1 contiene siete u ocho subunidades adicionales carentes de centros redox. Solo dos o tres de estas subunidades, llamadas *core* (estructurales), tienen actividad catalítica como parte de la maquinaria de procesamiento de precursores importados a la matriz mitocondrial. Las demás

subunidades participan en el ensamblaje de las proteínas *core* con el complejo *bc₁*, propiamente dicho, así como en su estabilidad [1].

Las estructuras de difracción de rayos X del complejo *bc₁* de eucariontes [2-4] muestran que este complejo es un dímero funcional, en el que el dominio extramembranal de la proteína hierro-azufre de un monómero interactúa con el citocromo *b* del otro monómero (Figura 1).

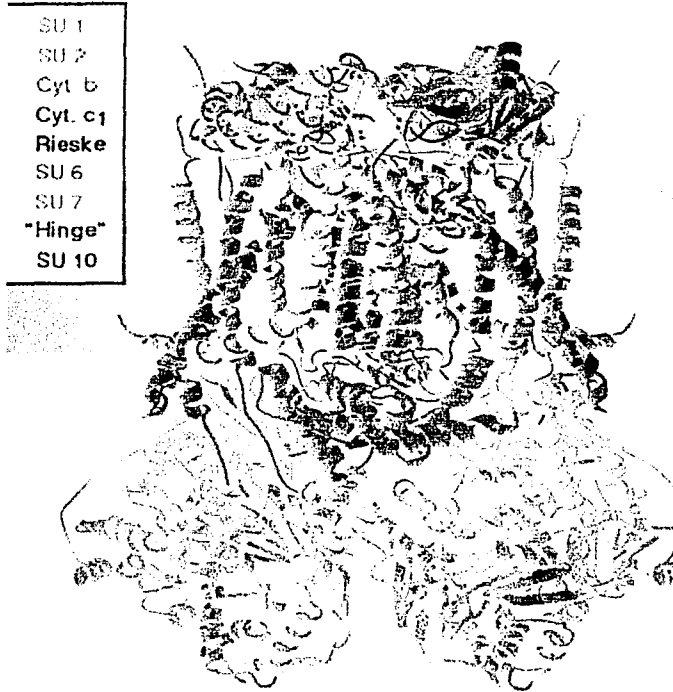


Figura 1. Estructura cristalográfica del complejo *bc₁* de corazón de pollo. Se muestra el dímero de las nueve subunidades que consiguieron resolverse, cada una con distinto color. La posición aproximada de la membrana se representa como una barra gris.

FALLA DE ORIGEN
TESIS CON

Por otra parte, la cristalización en presencia de diferentes inhibidores del complejo bc_1 , tales como la estigmatelina y el mixotiazol, permitió discernir diferentes estados conformacionales del dominio extramembranal de la proteína hierro-azufre (Figura 2). Esto condujo a proponer que el movimiento de la proteína hierro-azufre es importante para el mecanismo de los complejos del tipo bc en general, como se detalla en la siguiente sección.

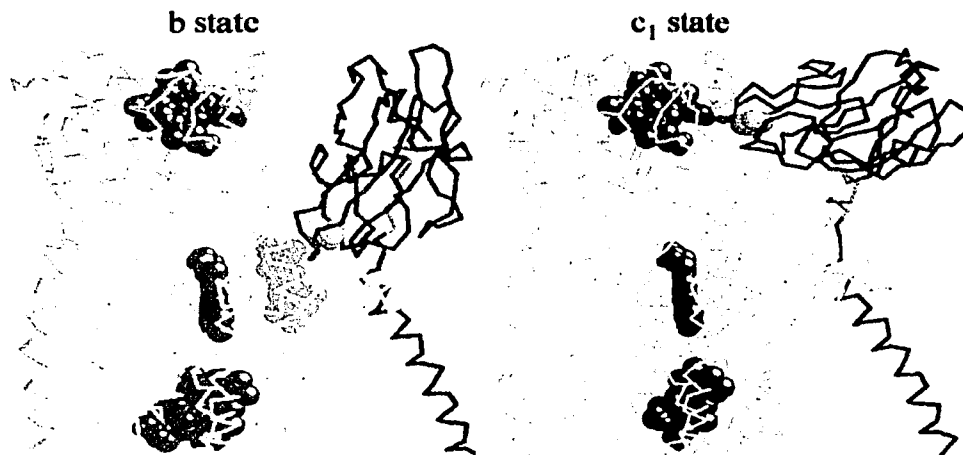


Figura 2. Diferentes estados conformacionales del dominio extramembranal de la proteína hierro-azufre. En el estado b , observado en presencia del inhibidor estigmatelina (azul claro), el dominio móvil de la proteína hierro-azufre (azul oscuro) se encuentra en contacto con el citocromo b (gris), mientras que en el estado c_1 , establece contacto con el citocromo c_1 (amarillo). El segmento que une a dicho dominio con la hélice transmembranal de la proteína hierro-azufre (anaranjado) pasa de una estructura extendida a una alfa hélice durante esta transición. Los grupos hemo se muestran en rojo, el centro hierro-azufre en anaranjado, y una de las histidinas que unen al centro hierro-azufre en color verde.

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

1.2 Mecanismo de oxidación de quinol en el complejo bc_1 .

La importancia de la primera reacción que ocurre en el complejo bc_1 (la oxidación de quinol) se explica a detalle en el siguiente artículo de revisión que se encuentra en prensa en la revista *Trends in Comparative Biochemistry and Physiology*.

MECHANISM OF QUINOL OXIDATION IN CYTOCHROME *bc*₁ COMPLEX

Raúl Covián* and Rafael Moreno-Sánchez

**Departamento de Bioquímica. Instituto Nacional de Cardiología. Juan Badiano
1, Colonia Sección XVI, Tlalpan 14080, Mexico City, Mexico**

***Corresponding author: Fax: +52-55-55730926. E-mail:
covianraul@correo.unam.mx**

ABSTRACT

The cytochrome bc_1 complex is one of the enzymes that couples electron transfer to vectorial proton translocation in energy-transducing biomembranes. It is also one of the main sources of reactive oxygen species in the cell, and an early target for apoptosis-inducing molecules. Energy conservation in this complex is made possible by the obliged bifurcation of the electrons derived from quinol oxidation. Different models have been proposed to explain the mechanism which ensures this electron bifurcation. Some of these models consider that two quinone molecules occupy the quinol oxidation (Q_o) site, while others propose the movement of a single quinone within the two domains that comprise this site. Crystallographic structures and mutational studies have shown the existence of movement of the soluble domain of the iron-sulfur protein (ISP), modifying previous models and generating new ones that assign to this movement a mechanistic role in electron bifurcation. In this review, the evidence supporting the different models of quinol oxidation in the bc_1 complex is critically analyzed.

INTRODUCTION

Cytochrome bc_1 complex is a multimeric enzyme found in the inner mitochondrial membrane of eukaryotes and in the plasma membrane of many aerobic and photosynthetic bacteria. It catalyzes the electron transfer from quinol to ferrocyclochrome c coupled to proton translocation. Therefore, this complex participates in the generation of the transmembrane electrochemical gradient that drives ATP synthesis in energy transducing membranes. In thylakoids, the bc_1 complex homologue, the b_6f complex, participates in photodriven electron cycling.

Dysfunction of the bc_1 complex has severe consequences for aerobic organisms. In humans, several mitochondrial diseases, ranging from exercise intolerance to lethal encephalomyopathies, have been associated with specific mutations in the DNA sequence encoding cytochrome b , one of the subunits of this complex [1]. Moreover, the importance of the bc_1 complex in other cellular processes besides oxidative phosphorylation has become increasingly evident. The redox reaction catalyzed by this complex involving partially reduced semiquinone species is one of the major sources of reactive oxygen species, particularly superoxide anion [2,3]. The oxidative stress generated by this enzyme has been implicated in pathological processes such as cell aging [4] and ischaemia-reperfusion injury [5], and in physiological processes such as apoptosis [6]. In this last process, tumor necrosis factor α increases the intracellular levels of ceramide, a lipid molecule that inhibits mitochondrial electron transfer at the level of the bc_1 complex [7]. This inhibition may increase the levels of free radicals in the mitochondria, which in turn might facilitate the liberation of cytochrome c and other proapoptotic activators to

the cytosol [6]. Thus, the mechanism of quinol oxidation in the bc_1 complex is of central relevance in the overall energetic and physiological state of the cell.

Three redox polypeptides comprise the minimal catalytic unit of the bc_1 complex: cytochrome b (containing the b_L and b_H heme groups), cytochrome c_1 (with a c-type heme, and the Rieske iron-sulfur protein, or ISP (with a 2Fe-2S cluster). The pathway of electrons within these subunits is best explained by the modified Q-cycle [8] (Figure 1). The key reaction of this model is the bifurcation of electrons from quinol, one being transferred to ferrocytochrome c through a high redox potential chain (Fe-S cluster and heme c_1), whereas the other is used to re-reduce quinone through a low redox potential chain (b_L and b_H hemes) after two successive turnovers. Each quinol molecule oxidized in the Q_O site (near heme b_L) releases two protons to the positive side of the membrane. Quinone is reduced in the Q_i site next to heme b_H by two electrons that move opposite to their electrical gradient, taking two protons from the negative side of the membrane. Thus, the bifurcation of electrons in the Q_O site allows the appearance of four positive charges in the positive side of the membrane for every pair of electrons transferred to ferrocytochrome c .

The transfer of both quinol electrons to the high potential chain is about 30 kJ/mol more favorable than their bifurcation; this is because the redox potential of the Fe-S cluster is over 300 mV more positive than the redox potential of heme b_L [9] (Table 1). However, this reaction does not occur even in oxidant-induced reduction conditions, when the low potential chain is blocked by inhibitors such as antimycin, and electron flow is only possible through the high potential segment [15]. Several attempts to explain the mechanism that allows the obligatory reduction of the heme b_L group by the second electron from quinol have been proposed in the past decade. These models can be divided in those that emphasize the number and position of

quinone molecules in the Q_O site, and the proposals derived from structural information that assign an essential role to the movement of the soluble domain of the ISP.

DOUBLE OCCUPANCY Q_O SITE MODELS: A PROSTHETIC QUINONE

Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopic studies using bacterial chromatophore membranes from *Rhodobacter capsulatus* have shown that the reduced ISP cluster is sensitive to the occupancy of the Q_O site [16,17]. The position of a characteristic signal in the g_x band of the EPR spectra varies depending on the amount of endogenous quinone found in the membranes: a trough obtained at 1.800 is shifted to 1.783 after a partial extraction with organic solvents reduces the amount of quinones to about 2 per bc_1 complex. This signal is further moved to 1.765 when more extensive extraction reduces the ratio to $>0.1Q:bc_1$ [16]. These results have been interpreted as indicating the presence of two quinone species in the Q_O site, termed Q_{OS} (strongly bound) and Q_{OW} (weakly bound). In unextracted membranes, both quinones are present, giving rise to the 1.800 EPR signal. When quinone concentration is diminished, only Q_{OS} remains bound to the enzyme. This brings a change in the environment within the Q_O site, which affects the interaction between the remaining quinone and the ISP cluster, shifting its EPR signal to 1.783. Elimination of Q_{OS} yields an empty Q_O site and an unbound ISP cluster with a 1.765 signal. As the rate of quinol oxidation linearly correlates with the amount of Q_{OS} present, it has been suggested that this tightly bound quinone is not exchanged with the quinone pool, and hence it can be considered as a prosthetic quinone [17]. Q_{OW} would

then be the real substrate for the reaction, being rapidly exchanged with the quinone pool within the time scale of each turnover. Q_{OS} is proposed to be the species in contact with ISP, while Q_{OW} is supposed to occupy a domain closer to heme b_L . This double volume within the Q_O site has been confirmed by the crystallographic structures [18-22]. The inhibitory moiety of stigmatellin and undecylhydroxybenzothiazole (UHDBT) occupy a volume from which a hydrogen bond is established between a carbonyl of the inhibitors and one of the ISP cluster ligating histidines. Methoxyacrylate (MOA) compounds and myxothiazol bind deeper into cytochrome b to a site not accessible to the solvent. Furthermore, MOA and excess diphenylamine (DPA) induce the shifting of the EPR signal of the ISP to 1.783 [23,24], consistent with the explanation that they displace Q_{OW} but not Q_{OS} .

Two models of quinol oxidation that incorporate the double occupancy assumption have been proposed:

1. *Sequential semiquinone barrier model* [17] (Figure 2). The essential reaction is considered to be the transhydrogenation between quinones in the Q_{OS} and Q_{OW} domains. When the quinone pool is completely reduced, the catalytic cycle starts when quinol (QH_2) in the Q_{OS} domain reduces the ISP cluster (reaction 1); the resulting Q_{OS} semiquinone (SQ) is converted back to QH_2 by receiving one electron and one proton from the Q_{OW} quinol (reaction 2), which as SQ reduces heme b_L (reaction 3). After the ISP and heme b_L are oxidized (reaction 4), the Q_{OW} quinone can either be exchanged for QH_2 from the membrane pool (reaction 5), returning to the first condition of the cycle, or remain for the second oxidation. In this second possibility, Q_{OS} quinol reduces the ISP cluster (reaction 6) and the Q_{OW} receives the second electron from $SQ(Q_{OS})$ (reaction 7) to form a semiquinone which then reduces heme b_L (reaction 8). The resulting state has two quinones at both Q_{OS} and Q_{OW}

domains. The ISP and heme b_L are oxidized (reaction 9), and Q_{OW} exchanges Q for QH_2 from the pool (reaction 10). Finally, a transhydrogenation reaction results in a Q_{OS} quinol (reaction 11), closing the cycle. In the more realistic case where the Q pool is not completely reduced, the cycle starts from this $Q(Q_{OS})-QH_2(Q_{OW})$ state, and is driven exclusively by the transhydrogenation reaction, which together with the transfer of an electron from $SQ(Q_{OS})$ to $Q(Q_{OW})$ ensures the obligatory bifurcation of electrons between the high and low redox potential components within the bc_1 complex.

2. *Proton-gated charge-transfer model* [25] (Figure 3). This mechanism considers that a transhydrogenation reaction between the two quinone occupants would require a very high reorganization barrier, and instead emphasizes the importance of deprotonation events and the pK_A of one of the histidines ligating the ISP center. Starting from $Q(Q_{OS})$ and $QH_2(Q_{OW})$, deprotonation of quinol to QH^- is interpreted as being responsible for most of the activation barrier [26]. As the second proton is released (reaction 1), a symproportionation step results in a double semiquinone intermediate (reaction 2). At this point, an ISP histidine stabilizes $SQ(Q_{OS})$ by donating a proton to SQ (which has a higher pK_A), being left as an imidazolate anion (reaction 2). This SQ reduces the ISP cluster (reaction 3), while $SQ(Q_{OW})$ is oxidized by heme b_L (reaction 4), followed by exchange of Q for QH_2 in the Q_{OW} position (reaction 5). There may exist the situation in which QH_2 occupies the Q_{OW} domain with heme b_L still in the reduced state. In this case, it is assumed that the symproportionation step is prevented by an electrostatic interaction between heme b_L and $QH_2(Q_{OW})$ impeding the deprotonation of the substrate. As a result, QH_2 cannot reduce the ISP until heme b_L is oxidized, explaining the obligatory bifurcation of electrons in quinol oxidation.

TESTIS CON
FALLA DE ORIGEN

These models were proposed before crystal structures hinted to the possible role of the ISP movement away from the Q_O site in assuring the obliged electron bifurcation. However, they could accommodate this structural information in their schemes without affecting key reactions [27], although the role of the ISP movement would only be to allow rapid electron transfer to cytochrome c_1 . The electron bifurcation would be ensured by the mechanisms envisioned in each model.

Several findings, however, are not compatible with the proposal of two quinones simultaneously occupying the Q_O site:

a) Quinol occupancy does not show two concentration-dependent EPR signals as occurs with quinone. Both unextracted and partially extracted membranes with the quinone pool fully reduced yield a 1.777 g_x signal, shifting to 1.765 until quinol is completely extracted [16]. This would suggest that there is only one high affinity site for quinol.

b) Crystallographic structures show a quinone molecule in the Q_i site but not in the Q_O site, as should be expected for a tightly-bound quinone [22].

c) High resolution crystal structures of cytochrome b show a narrow tunnel extending from the lipid phase to the bifurcated Q_O site [22]. Stigmatellin and myxothiazol densities overlap in this zone, and several functional studies have demonstrated that only one of these inhibitors can be present at a time in the Q_O site [28-30].

d) Mutations that confer resistance to stigmatellin or myxothiazol-MOA compounds, but not to both types of inhibitors, affect Q_{OS} and Q_{OW} in approximately the same degree [17].

e) MOA compounds inhibit bc_1 complex activity in a noncompetitive manner [31]. The expected inhibition pattern should be a competitive one,

TESTES CON
FALLA DE ORIGEN

considering that, according to EPR studies, MOA displaces Q_{ow} (the substrate quinone) [24].

f) The nature of the 1.783 EPR resonance may also be interpreted as the average of the signals derived from enzymes with a single quinone in the Q_o site and from those with an unoccupied site [32], or as two different binding modes of a single quinone [33]. However, simulations of the EPR spectra resulting from a mixture of fully occupied and empty enzymes concluded that the 1.783 signal cannot be explained by the existence of a heterogeneous mixture of Q_o sites with different occupancies [27]. Still, the g_x band trough resulting from the interaction of ISP with the Q_o site occupants is subject to alterations in its position even from organic compounds that do not affect turnover rate, such as ethanol and glycerol [34]. This underlines the fact that these EPR signals are sensitive to subtle factors affecting the environment of the Q_o site, which could be modified after the quinone extraction procedure, raising doubts regarding the true cause of the 1.783 resonance.

A recent work using NMR techniques has found that two quinone molecules are displaced from the Q_o site when stigmatellin or myxothiazol are added to the bc_1 complex containing proteoliposomes [35]. Molecular simulations used in this work showed that small displacements in the residues lining the narrow tunnel that leads to the Q_o site could allow the coexistence of the hydrophobic chains from two quinones. However, the concentration of quinone and inhibitors used in this study was in the millimolar range, causing unspecific binding effects. These results also contradict the evidence that MOA inhibitors displace only one of the quinones from the Q_o site [23].

An interesting possibility has emerged from MOA binding studies using fluorescence quenching. These studies have found that only one MOA molecule binds each oxidized bc_1 complex, while the stoichiometry increases

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

to two MOA molecules per complex when the enzyme is reduced with dithionite [36]. It should be noted that EPR studies can only be performed when the ISP is reduced, and that the Q_O site could experience important redox driven changes not visible in the crystallographic structures, which have solely been obtained from oxidized enzymes. This point is central to some of the models which emphasize different conformations of the ISP.

CONFORMATIONAL CHANGE MODELS: MOLECULAR SWITCHES AND ISP DIFFUSION

Several studies regarding ISP accessibility to protease cleavage [37], spectroscopic monitoring of *b* hemes positions [38], and inhibitor binding [39,40], suggested important conformational changes depending on the redox state of the bc_1 complex. Afterwards, crystallographic evidence showed a 25Å and 60° shifting of the ISP soluble domain between the stigmatellin and myxothiazol-bound complexes [41], together with less dramatic differences in the cytochrome *b* residues lining the Q_O site and the docking site of the ISP [22]. These recent structural data were accomodated in previous models, or generated new proposals, all of which emphasize the importance of ISP movement. The main differences among these models are the causes and degree of constraint of this movement, together with the role of semiquinone in avoiding the energetical wasteful reduction of the high redox potential chain by the two electrons from quinol. Some of these models could incorporate the double occupancy assumption with minor modifications, whereas others require single occupancy of the Q_O site, especially those assigning a functional role to semiquinone. Ranging from a highly controlled

TESTS CON
FALLA DE ORIGEN

and constrained movement to a stochastic diffusion of the ISP hydrophilic domain, conformational change models are:

1. *Catalytic-switch model* (Figure 4). In its earliest version [39], this model proposed two distinct conformations of the Q_O site, evidenced by two different affinities for MOA and naphthoquinone inhibitors which depended on the redox state of the ISP and cytochrome *b*. These two conformations were termed “Fe-S state” and “*b*-state”. In the first conformation, the ISP cluster received the first electron from quinol, while in the second, this subunit was somehow disconnected from the Q_O site, preventing it from receiving the remaining electron from semiquinone. A modified scheme incorporating crystallographic data [9,42] names these two states as “*b*-position” and “ c_1 -position”, describing the position the ISP extrinsic domain adopts in each of them. The model states that the ISP occupies the position closer to cytochrome *b* (and thus to the Q_O site) only when both the ISP cluster and heme b_L are oxidized. From this position, the cluster receives the first electron from quinol, switching then to the position near heme c_1 (reaction 1), where it becomes reoxidized while heme b_L receives the second electron (reaction 2). The ISP soluble domain return to the *b*-position is blocked as long as heme b_L is reduced, switching back only after this heme is oxidized by heme b_H (reaction 3). This model could easily accommodate the double occupancy assumption [42], and leaves open the question of semiquinone accumulation or migration within the Q_O site, which are pivotal to some of the following models. It is not yet clear how the redox state of the ISP center and heme b_L could induce these conformational movements; crystallographic structures of partially and fully reduced bc_1 complex would be extremely useful in testing this model.

An important argument against the redox control of the two defined positions considered in this model comes from EPR spectroscopy experiments

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

[16,17]. As stated above, these studies can only be accomplished with the ISP center in the reduced state, when, according to the catalytic switch model, the ISP soluble domain should exclusively occupy the c_1 position away from the Q_O site. Still, EPR signals from this reduced cluster are sensitive to Q_O site occupants such as quinol, quinone, and inhibitors [16,23,24], requiring the ISP protein to be predominantly in the b position.

2. *Three-state model* [18,43] (Figure 5). This mechanism adds a third position for the ISP head domain, termed the intermediate (Int) position, visible in crystals from bovine heart bc_1 complex in the absence of inhibitors. This position is proposed to be the one occupied by the ISP in a loose manner when the enzyme is oxidized and before quinol binds to the Q_O site [43], which would explain why other native crystals show a disordered ISP head domain [19]. Binding of quinol or its deprotonation to the anionic form (QH⁻) by a protonatable group with a pK_A of ~ 6.5 is proposed to switch the ISP head to the b position (reaction 1), where it would be strongly stabilized by semiquinone after ISP cluster reduction (reaction 2). In this aspect, the three-state model incorporates the proton-gated affinity change mechanism [33], which proposes a strong interaction between reduced ISP cluster and semiquinone involving a strong hydrogen bond between SQ and histidine-161, one of the ligands of the ISP center. This residue appears to experience a drastic pK_A change from 7.6 when the ISP cluster is oxidized to >11 after it is reduced, stabilizing its bond with SQ through this increased affinity for the proton involved in hydrogen bonding. As the proton-gated affinity change mechanism was elaborated before crystal structures were available, it had to invoke a rise in the redox potential of the ISP reduced cluster of +250 mV with respect to its oxidized form in order to explain why the ISP is not reoxidized by cytochrome c_1 until SQ has been oxidized by heme b_L . The

three-state model explains the obliged bifurcation without the need of this elevated redox potential because electron transfer between ISP in the b position and heme c_1 is impossible at the observed rates because of the 25 Å distance that separates these groups in such conformation [27]. The model then proposes that after electron transfer from SQ to heme b_L , the reduced ISP cluster shifts to the c_1 position, while quinone probably occupies the Q_O site domain closer to heme b_L corresponding to the Q_{OW} domain in double occupancy models (reaction 3). However, this scheme does not explain why the c_1 position is preferred at this point; perhaps quinone occupancy in the domain nearer to heme b_L could stabilize this position. After ISP reduces cytochrome c_1 and quinone abandons the Q_O site (reaction 4), the ISP soluble domain returns to the “Int” position (reaction 5).

There are three important objections to the three state model and the proton gated charge transfer mechanism:

a) There are no detectable levels of SQ in the Q_O site. Although an EPR signal attributed to this SQ was reported in membranes in conditions of oxidant-induced reduction [44], several studies have demonstrated that this signal it is not abolished by Q_O site inhibitors, showing that it corresponds to a semiquinone formed in another respiratory complex [45,46].

Thermodynamical considerations indicate that the concentration of semiquinone in the Q_O site during normal turnover would have to be very high to allow rapid electron transfer from a semiquinone in the distal domain to heme b_L [47]. However, high levels of EPR silent SQ could be present if a strong coupling exists between the spins of the unpaired electrons of the reduced ISP cluster and SQ, or if a coulombic effect (electrostatic interaction) exists between SQ and reduced heme b_L in the oxidant-induced reduction experiments [22,33].

b) The stabilization of the ISP in the *b* position by deprotonated ubiquinol and semiquinone rests on several lines of evidence. First, the pH dependence of the steady-state rate of the bovine bc_1 complex was fitted to a pK_A of 6.5 [26]. As the pK_A values of the histidine ligands of the ISP cluster are 7.6 and 9.2 [12, 48, 49], the pK_A of 6.5 was assigned to an unidentified residue in cytochrome *b*. The activation energy decreased linearly as the pH was raised, with a slope consistent with the assumption that a single deprotonation event constituted the activation barrier of the reaction [26]. These results were interpreted as indicating that quinol deprotonation by a cytochrome *b* residue was the rate-limiting step of the reaction, and that the anionic quinol was the real substrate for ISP reduction. However we have demonstrated [50] that the pH dependence of catalysis corresponds to a pK_A value of 7.5 when the decrease of the redox potential of the ISP upon deprotonation of the cluster histidines is considered [12,48,49]. This indicates that the pK_A value of 6.5 is not real, and that histidine-161 (and not a cytochrome *b* residue) of the ISP is probably the acceptor of the first proton from quinol. The finding that mutations in ISP residues that alter the redox potential of the Fe-S cluster also shift the pH profile of quinol oxidation [51] supports the conclusion that histidine-161 is responsible for quinol deprotonation. Furthermore, thermodynamical considerations suggest that electron transfer from quinol to the ISP cluster occurs simultaneously with the deprotonation of ubiquinol [51]. Finally, the pH dependence of the activation energy is not reproducible in the bacterial bc_1 complex in single turnover experiments [47].

c) The displacement of the redox potential of the Fe-S cluster (250 mV more positive) in the presence of stigmatellin is supposed to indicate that this inhibitor binds tightly to the Q_O site only when the ISP is reduced [33]. As the

pK_A value of histidine-161 rises from 7.6 to >11 upon reduction of the ISP cluster [48], the hydrogen bond between protonated histidine-161 and stigmatellin is considered as essential for the binding of this inhibitor and for fixing the ISP in the *b* position. If stigmatellin is considered as an analogue of semiquinone, then this intermediate would also establish a strong interaction with protonated histidine-161 upon reduction of ISP. However, stigmatellin binding to the Q_O site seems to be possible even when the ISP is oxidized [35] and is not dependent on pH [52]. Moreover, the more positive redox potential of the Fe-S cluster has been achieved by mutating the neck region of the ISP, fixing it in the *b* position [53]. This indicates that the effect of stigmatellin on the redox properties of the ISP are not due to an exclusive binding when the Fe-S cluster is reduced or histidine-161 is protonated. Instead, it is a consequence of the electronic environment sensed by the Fe-S cluster when the ISP is docked at the cytochrome *b* interface.

3. *Fixed-loose state model* [54] (Figure 6). Based on their own crystal structures from bovine heart bc_1 complex, Kim *et al.* [20] do not find the ISP soluble domain in a well defined position except in crystals soaked with stigmatellin or UHDBT, where the ISP appears fixed in the position nearest to the Q_O site (the “*b* position” in the above models). Therefore, this mechanism proposes that quinol binding to the Q_O site brings the oxidized ISP to the fixed state (reaction 1), possibly through a conformational change in cytochrome *b*. ISP is reduced (reaction 2), and is released after heme b_L oxidation (reaction 3). The switch from the fixed to the loose state is caused either by semiquinone occupation of the domain proximal to heme b_L , or by conformational changes caused by oxidation of this heme. In this loose state, the ISP head can approach cytochrome c_1 forming a transient complex not stabilized by any conformational or redox constraint, from which electron

transfer to heme c_1 occurs (reaction 4). This model assumes single occupancy of the Q_O site.

The three conformational change models described to this point vary in the degree of conformational influence of the Q_O site occupant and/or the redox state of heme b_L on the ISP movement. An important question concerns the molecular link between the Q_O site and the ISP head through which conformational changes can be sensed. Information coming from crystallographic structures is limited because of the need to extrapolate inhibitor-bound structures of oxidized bc_1 complexes to infer the binding of quinol, semiquinone and quinone (not yet observed in the Q_O site of crystallized complexes), and their effect on ISP position. Although functional studies using ISP mutants have demonstrated that the mobility of the “neck” region connecting the ISP head with its membrane anchor is required for catalysis [55-57], this flexible segment does not establish contacts with any other subunit. In addition, the transmembrane anchor that is in contact with cytochrome b and c_1 shows no discernible changes in residue position when structures with different ISP head configurations are compared [58]. In contrast, some of the cytochrome b residues (Ile-147, Ile-269, Tyr-279 and Lys-288), which form part of the interface with the ISP head, experience changes in their position of up to 2.3 Å when the fixed position structure (stigmatellin bound in the Q_O site) is compared to the loose structure from native or MOA-bound crystals [16,34,44]. Therefore, an interesting possibility is that this interface is the vehicle for transmitting the Q_O site state to the ISP soluble domain.

4. *Constrained diffusion model* [22,59] (Figure 7). In contrast with the three previous models, this mechanism does not postulate ISP positions stabilized by redox state or specific conformations. Considering ISP head

occupancies of the interfaces with cytochrome *b* and cytochrome *c*₁ as seen in native and MOA-bound crystal structures, association constants have been calculated to be too small to justify fixed positions of the ISP soluble domain during the catalytic cycle [59]. This domain is thought to be stochastically moving between cytochrome *b* and *c*₁, transiently establishing weak hydrogen bonds with residues in these subunits. Rapid reaction is possible by constraining the ISP head diffusion near to cytochrome *b* and *c*₁ through its anchoring to the rest of the complex, maintaining a high ISP head local concentration. The ISP position close to Q_o site, evidenced in stigmatellin [18,41,59] and to lesser extent, in UHDBT [20] containing crystals, is proposed to resemble a transient *cyt b*-QH₂-ISP complex (reaction 1) from which reduction of the ISP cluster occurs (reaction 2). This ternary complex is not stabilized by conformational changes caused by QH₂ binding (contrary to the fixed-loose state model), but through a hydrogen bond between histidine-161 of ISP in the deprotonated state and one of the hydroxyl groups of quinol [60]. This histidine is thought to be one of the protonatable residues affecting the ISP cluster midpoint redox potential, with a pK_A of 7.6 [12,48,49]. The exclusive binding of this histidine in the deprotonated state to form the ternary complex with QH₂ in cytochrome *b* would lower its apparent pK_A, and this could explain why the pH profile of quinol oxidation can be fitted using a lower pK_A value of ~6.5 when QH₂ is saturating [47]. However, our analysis of the Q_o site affinity towards quinol has shown that the binding of the substrate is not modified by the protonation state of the pK_A = 7.5 residue which probably corresponds to histidine-161 [50]. Instead, this same work demonstrated that an acidic group with a pK_A of 5.2-5.7 is very sensitive to quinol and quinone binding, suggesting that this residue corresponds to glutamate-272, which undergoes significant changes in position between

native and stigmatellin containing crystals [21]. This residue is probably implicated in proton transport from quinol to the positive side of the membrane through an aqueous channel. Therefore, the pK_A value of 6.5 is not real, and arises from not considering the effect of the deprotonation of histidine-161 on the redox potential of the Fe-S cluster in the pH dependence of catalysis [50].

According to the constrained diffusion model, the reduced ISP soluble domain would diffuse in a very short time scale (~25 ns) toward the cytochrome *c*₁ interface becoming reoxidized within 10 μs (reaction 3) and being able to diffuse back to the Q_O site [59]. The second reduction of the ISP center by semiquinone would be prevented by the shifting of SQ to the volume proximal to heme *b*_L within the Q_O site (not accessible for the ISP), corresponding to the position occupied by MOA inhibitors (reaction 3). The movement of SQ to this volume would prevent reaction with oxygen to form damaging superoxide radicals and, according to electron transfer rate simulations, would allow rapid reduction of heme *b*_L (reaction 4) even assuming a SQ concentration below EPR detection limits [47]. As SQ movement is essential for the obliged bifurcation of quinol electrons in this model, modifications in order to incorporate the double occupancy assumption are not possible.

An important observation in crystal structures not explained by the constrained diffusion model is the lack of ISP occupancy at the *b* interface in MOA or myxothiazol containing crystals [20,59], which implies that occupancy of the Q_O site domain proximal to heme *b*_L completely abolishes ISP head docking. Different native crystals present a highly variable ISP occupancy at the cytochrome *b* interface, ranging from 0.03 to 40% of the total ISP cluster electronic density, probably reflecting differences in crystal

contacts and crystallization procedure [59]. However, residues conforming the cytochrome *b* interface with ISP do not experience large-scale positional change when native and MOA-bound structures are compared, contrasting with the notable differences seen in the stigmatellin containing crystals [22, 41]. Nevertheless, Q_O site experiences an expansion in the proximal domain upon MOA binding, which could influence the association constant of ISP docking onto cytochrome *b* [41,59].

CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

The main aspects in which existing models explaining quinol oxidation in the *bc*₁ complex differ are quinone occupancy, semiquinone accumulation, and ISP soluble domain movement. Current crystallographic and mutational evidence is more consistent with the assumption that the Q_O site can be occupied by a single hydrophobic-tailed occupant at a time, although this is still a subject of debate. A freely diffusional movement of the extrinsic domain of ISP, with weak and transient binding at the cytochrome *b* and *c*₁ interfaces is more probable than the existence of highly stable ISP positions switched through discrete conformational changes caused by electron transfer events. The redox state of the ISP and cytochrome *b*, together with the position of the quinol/semiquinone ligand of the Q_O site, could influence the conformation of the interface between these two subunits. This in turn could prevent the reduction of the ISP before heme *b*_L has received an electron from semiquinone by impeding the interaction of ISP with the Q_O site. However, contradictory results have been obtained regarding the position preferentially occupied by the ISP in the reduced complex. Experimental evidence concerning semiquinone stability and the position from which this

intermediary reduces heme b_L is still inconclusive, but any of these two mechanisms can readily explain the obliged electron bifurcation central for energy conservation in the bc_1 complex. Important information is expected to come from crystallographic structures of partially or completely reduced bc_1 complexes, together with competition studies between quinol/quinone and Q_o site inhibitors in different redox states of the enzyme.

REFERENCES

- [1] Fisher, N., and Meunier, B. 2001, *Eur. J. Biochem.*, 268, 1155.
- [2] Hansford, R.G., Hogue, B.A., and Mildaziene, V. 1997, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 29, 89.
- [3] Guille, L., and Nohl, H. 2001, *Arch. Biochem. Biophys.*, 388, 34.
- [4] Finkel, T., and Holbrook, N.J. 2000, *Nature*, 408, 239.
- [5] Halestrap, A.P. 1999, *Biochem. Soc. Symp.*, 66, 181.
- [6] Green, R.D. and Reed, J.C. 1998, *Science*, 281, 1309.
- [7] Gudz, T.I., Tserng, K., and Hoppel, C.L. 1997, *J. Biol. Chem.*, 272, 24154.
- [8] Brandt, U., and Trumpower, B.L. 1994, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 29, 165.
- [9] Brandt, U. 1998, *Biochim. Biophys. Acta*, 1365, 261.
- [10] Erecinska, M., and Wilson, D.F. 1976, *Biochim. Biophys. Acta*, 174, 143.
- [11] Howell, N., and Robertson, D.E. 1993, *Biochemistry*, 32, 11162.
- [12] Link, T.A., Hagen, W.R., Pierik, A.J., Assmann, C., and von Jagow, G. 1992, *Eur. J. Biochem.*, 208, 685.
- [13] Reddy, K.V., and Hendler, R.W. 1986, *Biophys. J.*, 49, 693.
- [14] Salamon, Z., and Tollin, G. 1997, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 29, 211.
- [15] De Vries, S. 1986, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 18, 195.

- [16] Ding, H., Robertson, D.E., Daldal, F., and Dutton, P.L. 1992, *Biochemistry*, 31, 3144.
- [17] Ding, H., Moser, C.C., Robertson, D.E., Tokito, M.K., Daldal, F., and Dutton, P.L. 1995, *Biochemistry*, 34, 15979.
- [18] Zhang, Z., Huang, L.S., Shulmeister, V.M., Chi, Y.I., Kim, K.K., Hung, L.W., Crofts, A.R., Berry, E.A., and Kim, S.H. 1998, *Nature*, 392, 677.
- [19] Iwata, S., Lee, J.W., Okada, K., Lee, J.K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T.A., Ramaswamy, S., and Jap, B.K. 1998, *Science*, 281, 64.
- [20] Kim, H., Xia, D., Yu, C.A., Xia, J.Z., Kachurin, A.M., Zhang, L., Yu, L., and Deisenhofer, J. 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95, 8026.
- [21] Hunte, C., Koepke, J., Rossmann, T., and Michel, H. 2000, *Structure*, 8, 669.
- [22] Crofts, A.R., Barquera, B., Gennis, R.B., Kuras, R., Guergova-Kuras, M., and Berry, E.A. 1999, *Biochemistry*, 38, 15807.
- [23] Sharp, R.E., Palmitessa, A., Gibney, B.R., White, J.L., Moser, C.C., Daldal, F., and Dutton, P.L. 1999, *Biochemistry*, 38, 3440.
- [24] Sharp, R.E., Gibney, B.R., Palmitessa, A., White, J.L., Dixon, J.A., Moser, C.C., Daldal, F., Dutton, P.L. 1999, *Biochemistry*, 38, 14973.
- [25] Brandt, U. 1996, *Biochim. Biophys. Acta*, 1275, 41.
- [26] Brandt, U., and Okun, J.G. 1997, *Biochemistry*, 36, 11234.
- [27] Sharp, R.E., Moser, C.C., Gibney, B.R., and Dutton, P.L. 1999, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 31, 225.
- [28] Thierbach, G., Kunze, B., Reichenbach, H., and Höfle, G. 1984, *Biochim. Biophys. Acta*, 765, 227.
- [29] von Jagow, G., and Ohnishi, T. 1985, *FEBS Lett.*, 185, 311.
- [30] Mansfield, R.W., and Wiggins, T.E. 1990, *Biochim. Biophys. Acta*, 1015, 109.

TESTES CON
FALTA DE ORIGEN

- [31] Brandt, U., Schägger, H., and von Jagow, G. 1988, *Eur. J. Biochem.*, 173, 499.
- [32] Crofts, A.R., Barquera, B., Gennis, R.B., Kuras, R., Guergova-Kuras, M., and Berry, E.A. 1999, *The Phototrophic Prokaryotes*, Peschek, G. A., Loeffelhardt, W., and Schmetterer, G. (Eds.), Plenum, New York, 229.
- [33] Link, T. A. 1997, *FEBS Lett.*, 412, 257.
- [34] Sharp, R.E., Palmitessa, A., Gibney, B.R., Moser, C.C., Daldal, F., and Dutton, P.L. 1998, *FEBS Lett.*, 431, 423.
- [35] Bartoschek, S., Johannson, M., Geierstanger, B.H., Okun, J.G., Lancaster, C.R.D., Humpfer, E., Yu, L., Yu, C.A., Griesinger, C., and Brandt, U. 2001, *J. Biol. Chem.*, 276, 35231.
- [36] Brandt, U., and Djafarzadeh-Andabili, R. 1997, *Biochim. Biophys. Acta*, 1321, 238.
- [37] Baum, H., Rieske, J.S., Silman, H.I., and Lipton, S.H. 1967, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 57, 798.
- [38] Palmer, G., and Degli-Esposti, M. 1994, *Biochemistry*, 33, 176.
- [39] Brandt, U., and von Jagow, G. 1991, *Eur. J. Biochem.*, 195, 163.
- [40] Brandt, U., Haase, U., Schägger, H., and von Jagow, G. 1991, *J. Biol. Chem.*, 266, 19958.
- [41] Crofts, A.R., Guergova-Kuras, M., Huang, L.S., Kuras, R., Zhang, Z., and Berry, E.A. 1999, *Biochemistry*, 38, 15791.
- [42] Brandt, U. 1999, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 31, 243.
- [43] Iwata, M., Björkman, J., and Iwata, S. 1999, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 31, 169.
- [44] De Vries, S., Albracht, S.P.J., Berden, J.A., and Slater, E.C. 1981, *J. Biol. Chem.*, 256, 11996.
- [45] Crofts, A.R., and Wang, Z. 1989, *Photosynth. Res.*, 22, 69.

- [46] Jünneman, S., Heathcote, P., and Rich, P. 1998, *J. Biol. Chem.*, 273, 21603.
- [47] Hong, S., Ugulava, N., Guergova-Kuras, M., and Crofts, A. R. 1999, *J. Biol. Chem.*, 274, 33931.
- [48] Link, T.A. 1994, *Biochim. Biophys. Acta*, 1185, 81.
- [49] Ugulava, N.B. and Crofts, A.R. 1998, *FEBS Lett.*, 440, 409.
- [50] Covián, R., and Moreno-Sánchez, R. 2001, *Eur. J. Biochem.*, 268, 5783.
- [51] Crofts, A.R., Guergova-Kuras, M., Kuras, R., Ugulava, N., Li, J., and Hing, S. 2000, *Biochim. Biophys. Acta*, 1459, 456.
- [52] Zhang, L., Snyder, C., Trumpower, B.L., Yu, L., and Yu, C.A. 1999, *FEBS Lett.*, 460, 349.
- [53] Darrouzet, E., Valkova-Valchanova, M., Moser, C.C., Dutton, P.L., and Daldal, F. 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97, 4567.
- [54] Yu, C.A., Xia, D., Deisenhofer, J., Zhang, L., Kachurin, A.M., and Yu, L. 1998, *Biochim. Biophys. Acta*, 1365, 151.
- [55] Tian, H., White, S., Yu, L., and Yu, C.A. 1999, *J. Biol. Chem.*, 274, 7146.
- [56] Crofts, A. R., Berry, E. A., Kuras, R., Guergova-Kuras, M., Hong, S., and Ugulava, N. 1999, *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*, Garab, G. (Ed.), Kluwer, Dordrecht, 1481.
- [57] Beattie, D.S., Wang, Y., and Obungu, V.H. 1999, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 31, 215.
- [58] Berry, E.A., Huang, L.S., Zhang, Z., and Kim, S.,H. 1999, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 31, 177.
- [59] Crofts, A.R., Hong, S., Zhang, Z., and Berry, E.A. 1999, *Biochemistry*, 38, 15827.

[60] Crofts, A.R., Hong, S., Ugulava, N., Barquera, B., Gennis, R., Guergova-Kuras, M., and Berry, E.A. 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 96, 10021.

Table 1. Oxidoreduction potentials (E_{m7}) of prosthetic metal centers and substrates of the mammalian bc_1 complex.

Redox group	E_{m7} (mV)	Reference
QH ₂	+65	10
Heme b_L	-30	11
Heme b_H	+90	11
Fe-S cluster	+290	12
Heme c_1	+250	13
Heme c	+265	14

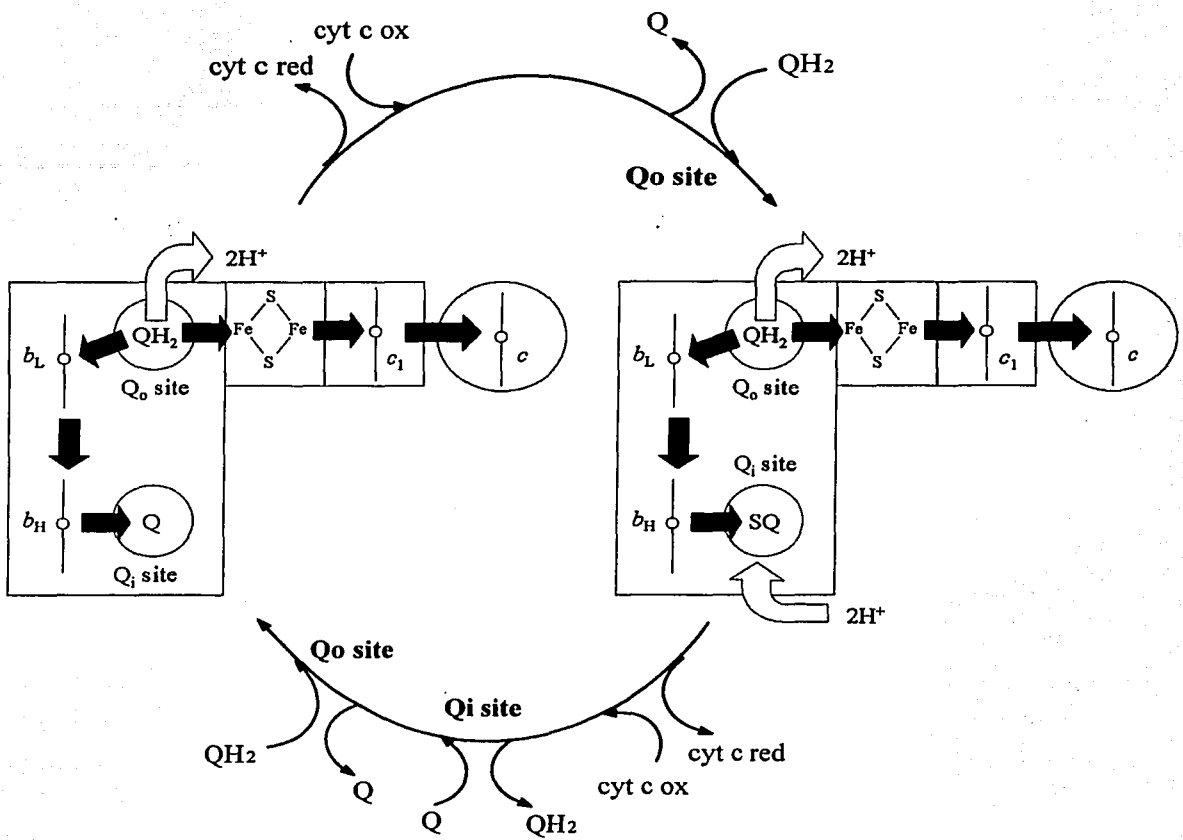
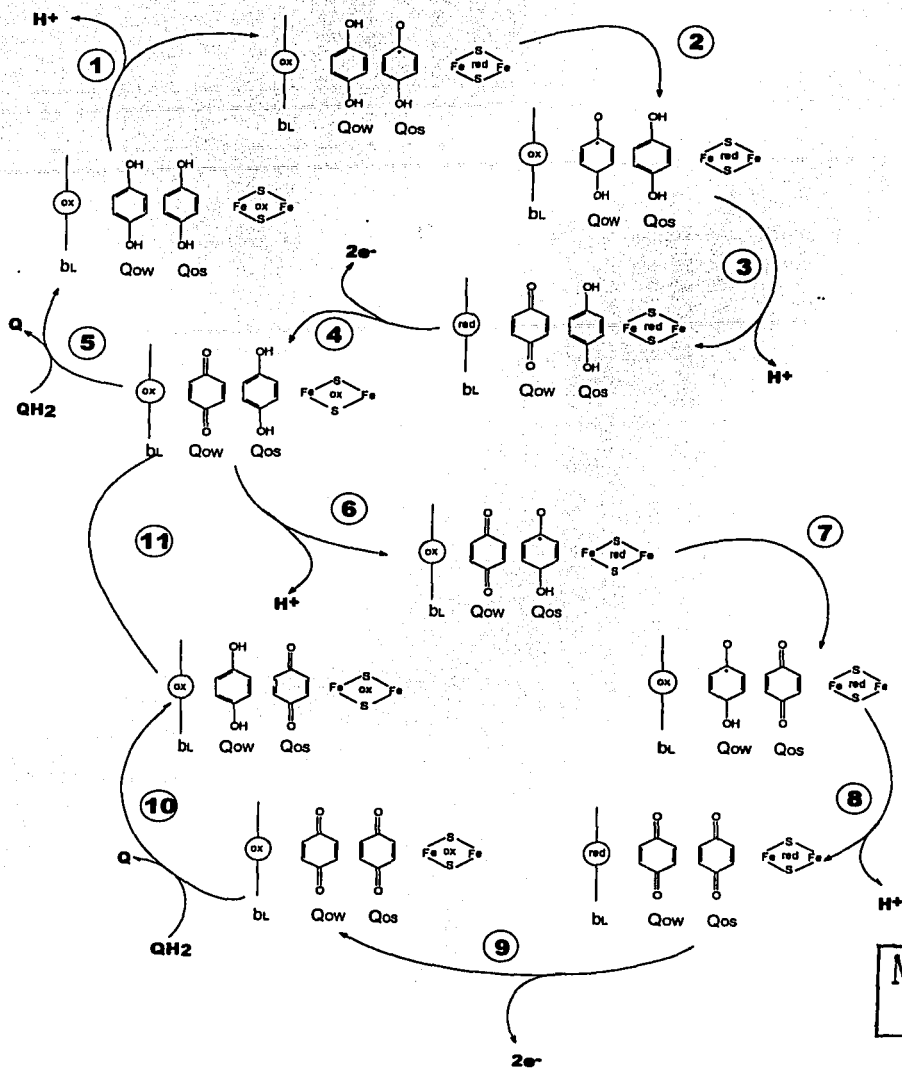


Figure 1. The Q-cycle [7]. Electron transfer steps through the redox centers are shown as thick black lines. Proton uptake or release is shown as hollow lines. See text for details.

NEGRO ED VIVA
FESIS CON
NO C ORIGEN



FALTA DE ORIGEN
TESIS CON

Figure 2. Semiquinone barrier model [16,17]. The reaction steps shown are: 1) reduction of ISP cluster, 2) transhydrogenation from Q_{ow} to Q_{os} , 3) reduction of heme b_L , 4) ISP cluster and heme b_L oxidation, 5) exchange of Q for QH_2 in the Q_{ow} site, 6) ISP cluster reduction, 7) transhydrogenation from Q_{os} to Q_{ow} , 8) heme b_L reduction, 9) ISP cluster and heme b_L oxidation, 10) exchange of Q for QH_2 in the Q_{ow} site, 11) double transhydrogenation from Q_{ow} to Q_{os} . See text for details.

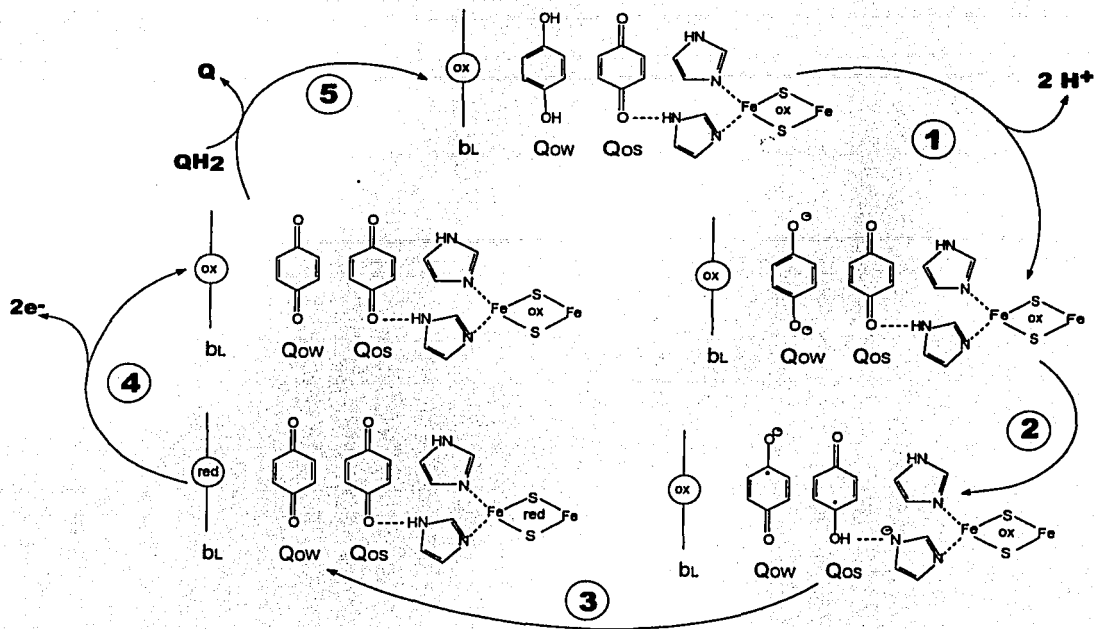


Figure 3. Proton-gated charge-transfer model. The steps of quinol oxidation in this mechanism are as follows: 1) QH_2 deprotonation, 2) symproportionation, 3) ISP cluster and heme b_L reduction, 4) ISP cluster and heme b_L oxidation, 5) exchange of Q for QH_2 in the Q_{ow} site. See text for details. Modified from reference 25.

TESTIS CON
FALTA DE ORIGEN

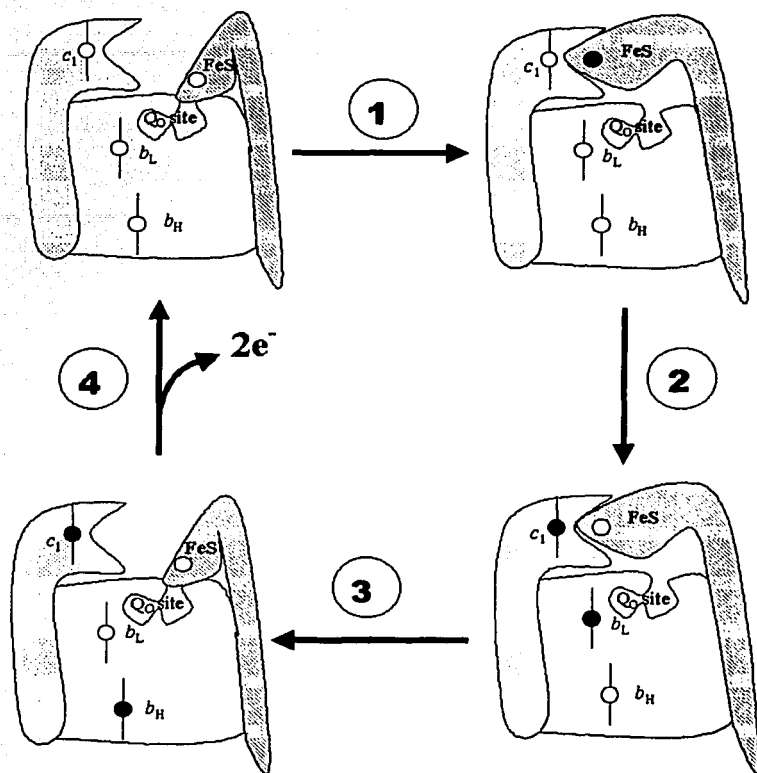


Figure 4. Catalytic-switch model. The hollow and filled circles indicate oxidized and reduced redox centers, respectively. Reaction steps are: 1) ISP cluster reduction and shift from b - to c_1 - position, 2) reduction of hemes b_L and c_1 , 3) electron transfer from heme b_L to heme b_H and shift from c_1 - to b -position, 4) oxidation of heme b_H and c_1 . See text for details. Modified from reference 9.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

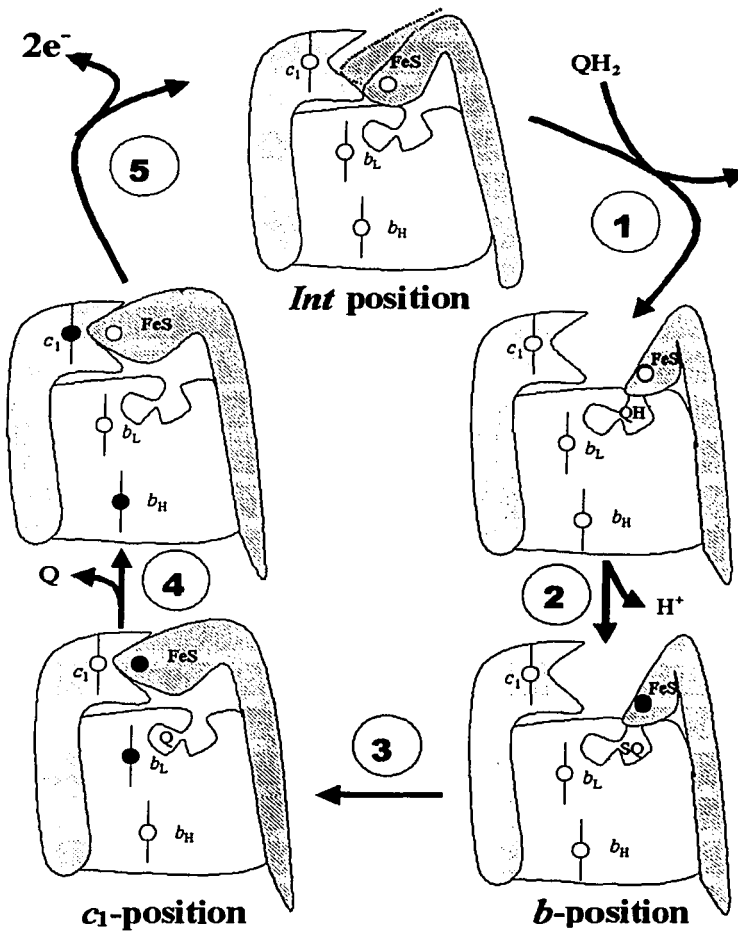


Figure 5. Three-state model. Reaction steps are as follows: 1) Quinol binding and deprotonation, ISP movement from the intermediate (*Int*) to the *b* position, 2) ISP reduction and semiquinone formation, 3) reduction of heme b_L , quinone movement to the proximal domain of the Q_O site and ISP movement to the c_1 position, 4) reduction of heme b_H and c_1 , 5) oxidation of heme b_H and c_1 . See text for discussion. Modified from references 19 and 43.

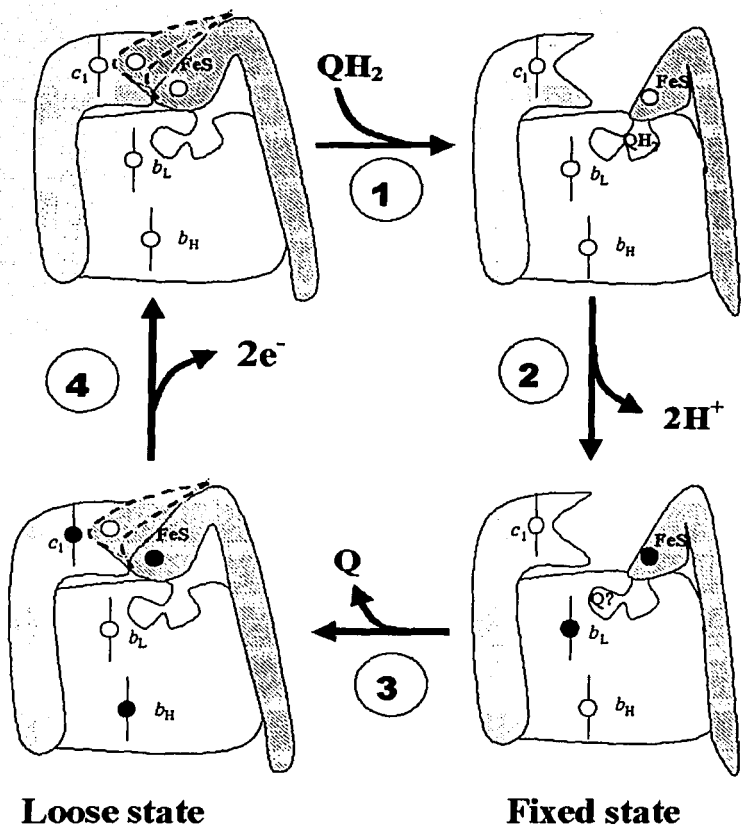


Figure 6. Fixed-loose state model. The four principal steps in this mechanism are: 1) quinol binding and ISP fixation, 2) ISP cluster and heme b_L reduction, 3) electron transfer from heme b_L to heme b_H and release of ISP to the loose state, 4) oxidation of ISP cluster, heme c_1 and heme b_H . See text for further details. Modified from reference 54.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

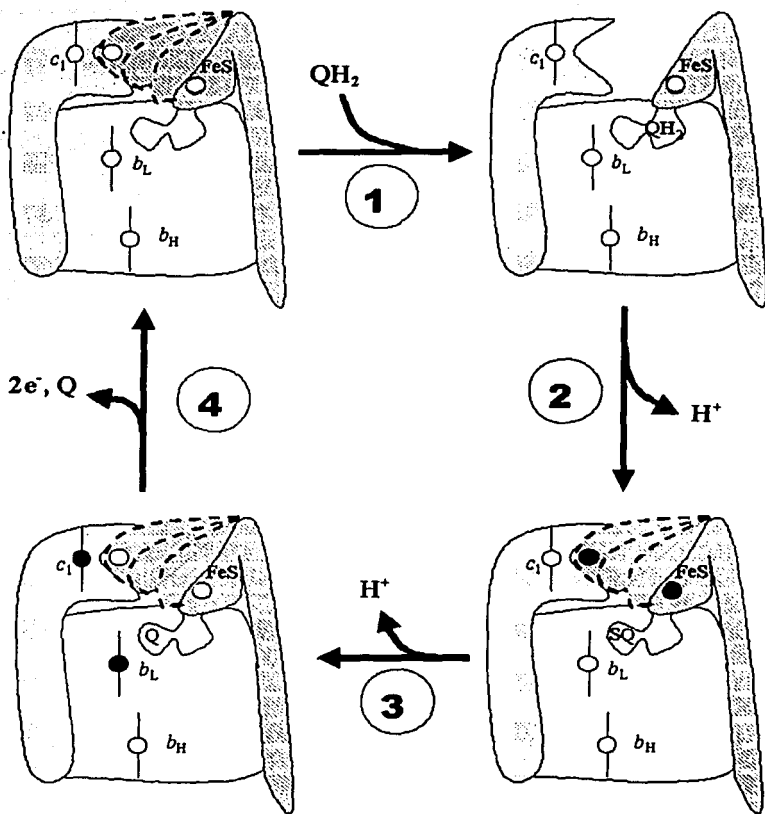


Figure 7. Constrained diffusion model [22,59]. Except for the quinol-bound intermediary, the ISP soluble domain diffuses freely between cytochrome *b* and *c*₁ during the reaction steps shown: 1) quinol binding and formation of transient ternary complex, 2) ISP cluster reduction and semiquinone movement to the proximal domain in Q_o site, 3) reduction of heme *b*_L by the proximal semiquinone and reduction of heme *c*₁, 4) oxidation of heme *c*₁, *b*_L and *b*_H. See text for discussion.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

14 March, 2002

Ref. No. RT/CBP/123

Dr. Raúl Covián
Departamento de Bioquímica
Instituto Nacional de Cardiología
Juan Badiano 1, Colonia Sección XVI
Tlalpan 14080, Mexico City
Mexico

Dear Dr. Raúl Covián,

Your article entitled "Mechanism of quinol oxidation in cytochrome *bc₁* complex" is found suitable for publication and we look forward to including it in the forthcoming issue of our review series, 'Trends in Comparative Biochemistry & Physiology'. As the manuscript was not prepared according to our format requirements, we reformatted it into single columns of the required width. A proof of the same is attached with this, which may please be returned indicating any minor corrections required. Once you return the proof, our pre-press personnel will prepare the camera-ready double-column format. An invoice for the purchase of 100 reprints of the article is enclosed herewith. Hope you will please expedite the payment.

The US \$ 335 quoted in item number 1 covers the cost of 100 reprints and the shipping and handling charges by surface-mail. Payment of the US \$ 21 and US \$ 10 quoted in item numbers 2 & 3 is optional. You need pay these amounts only if you require the reprints and the complimentary volume to be shipped to you by air-mail. Please note that surface-mail could take anywhere between two to five months to reach Mexico from here.

Apart from the complimentary volume that we will be sending you for personal use, we are also arranging to supply an additional complimentary volume carrying your article to your institutional library. This comes as a part of our promotional programme. At this point could you please suggest the appropriate address to which this additional copy may be mailed?

Sincerely yours,

Robert Richard
Publications Executive

NB:1) Cheques/bank drafts are to be made payable to "RESEARCH TRENDS PVT LTD".

INBOX: 58 de 59

Mover | Copiar **este mensaje a:** ▾

[Eliminar](#) | [Responder](#) | [Responder a todos](#) | [Reenviar](#) | [Redirigir](#) | [Reanudar](#) | [Guardar como](#)


[Regresar a INBOX](#) ◀ ▶

Fecha Thu, 03 Oct 2002 16:33:42 +0530

De [Research Trends <rtrends@md2.vsnl.net.in>](mailto:rtrends@md2.vsnl.net.in)

Para "[Dr. Raul Covian](mailto:covianraul@correo.unam.mx)" <covianraul@correo.unam.mx>

Asunto Research Trends

Partes  (fuente)

3 October, 2002

Ref. No. RT/CBP/123

Dear Dr. Raul Covian,

This refers to your fax message dated 27 September, 2002. The pre-press work of your article entitled "Mechanism of quinol oxidation in cytochrome bcl complex" is complete and it would be sent to press soon. The 100 reprints would be mailed to you as soon as the printing is over.

Sincerely yours,

Robert Richard
Publications Executive

[Eliminar](#) | [Responder](#) | [Responder a todos](#) | [Reenviar](#) | [Redirigir](#) | [Reanudar](#) | [Guardar como](#)

[Regresar a INBOX](#) ◀ ▶

Mover | Copiar **este mensaje a:** ▾

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Una importante conclusión de la revisión anterior es que, debido a que no ha sido posible determinar la posición del quinol o la quinona en el sitio Q_o a través de la cristalografía, se requieren estudios cinéticos que permitan determinar los siguientes puntos propuestos en los distintos modelos de oxidación de quinol:

1) Si existen cambios de afinidad importantes en el sitio Q_o hacia el sustrato (quinol) y el producto (quinona) al variar el estado de protonación de la histidina 161 de la proteína hierro-azufre y del glutámico 272 del citocromo *b*, residuos que unen por puentes de hidrógeno a la estigmatelina.

2) Si el estado desprotonado de estos residuos es necesario para que exista catálisis, lo cual apoyaría su papel como aceptores primarios de protones.

3) Si el estado redox de la proteína hierro-azufre estabiliza a los ligandos del sitio Q_o , incluyendo a la estigmatelina, como proponen los mecanismos que sugieren que el intermediario de la oxidación de quinol es una semiquinona muy estable.

1.3 El complejo bc_1 en el contexto de las cadenas ramificadas de organismos protistas

El estudio de las relaciones entre estructura y función complejo bc_1 adquiere mayor relevancia cuando se considera que en organismos protistas, varios de ellos parásitos del ser humano, esta enzima presenta características distintas a la de mamíferos. Estas diferencias estructurales se manifiestan como resistencia a la estigmatelina y/o al mixotiazol, y en algunos casos, como hipersensibilidad a análogos de algunos de estos inhibidores [5]. Así pues, el sitio de oxidación de quinol de varios protistas patógenos pudiera ser un blanco para el diseño racional de fármacos. Sin embargo, el flujo de

electrones en la cadena respiratoria de la mayoría de estos organismos no es lineal, como en mamíferos, sino ramificada. Esto implica la necesidad de bloquear varias enzimas simultáneamente para inhibir por completo la fosforilación oxidativa de estos organismos. Un resumen de la relación del complejo bc_1 con los demás complejos respiratorios en organismos protistas se presenta en el siguiente artículo de revisión, publicado en la ahora *Revista de Educación Bioquímica*.

CADENAS RESPIRATORIAS EN PROTISTAS

Raúl Covián. Departamento de Bioquímica. Instituto Nacional de Cardiología. Juan Badiano 1, Col. Sección XVI, Tlalpan, México, D.F. 14080 México. Teléfono: 5573-2911 ext. 1298, Fax: 5573-0926; correo electrónico: raulcov@hotmail.com

RESUMEN

Las mitocondrias de la mayoría de los protistas presentan cadenas respiratorias ramificadas en las que existe, además de la citocromo oxidasa; una quinol oxidasa terminal alterna, al parecer homóloga a la existente en plantas; pero con un mecanismo de activación mediado por nucleótidos monofosfatados. Varios géneros presentan NADH deshidrogenasas no translocadoras de protones con su sitio activo hacia el citosol o hacia la matriz mitocondrial. En los tripanosomátidos y euglénidos, representantes de los primeros protistas con mitocondrias, se han encontrado evidencias de una quinol:citocromo *c* oxidoreductasa distinta del complejo *bc*; así como de una fumarato reductasa, ambas posiblemente específicas para rodoquinona. Estas complejas redes de transporte de electrones, que en el caso de protistas parásitos han sido objeto de estudios con enfoque clínico, contrastan con las cadenas respiratorias lineares de los vertebrados superiores por tener varias enzimas que no participan en la generación de un gradiente electroquímico de protones. Su función parece ser el evitar la acumulación de equivalentes reductores bajo condiciones en las que la concentración de oxígeno y de sustratos oxidables es muy variable.

PALABRAS CLAVE: Cadena respiratoria, protistas, respiración resistente al cianuro, mitocondria.

ABSTRACT

Most protist mitochondria exhibit branched respiratory chains containing, besides cytochrome oxidase, an alternative terminal quinol oxidase; apparently homologous to that of plants, but possessing an unique activation mechanism by nucleotide monophosphates. Several genera have non-electrogenic NADH dehydrogenases with their active site facing either the cytosol or the mitochondrial matrix. In trypanosomatids and euglenids, representatives of the first mitochondriate eukaryotes,

evidence has been found for a quinol:cytochrome *c* oxidoreductase different from the *bc*₁ complex and for a fumarate reductase, both possibly specific for rodoquinone. These complex electron transfer networks, which have been studied for medical reasons in the case of parasite protists, differ sharply from the linear respiratory chains of superior vertebrates; having several enzymes not involved in generating an electrochemical proton gradient. Their function is probably to avoid the accumulation of reducing equivalents in conditions where oxygen and oxidizable substrate concentrations are highly variable.

KEY WORDS: Respiratory chain, protists, cyanide-resistant respiration, mitochondria.

INTRODUCCIÓN

Las cadenas respiratorias mejor estudiadas desde el punto de vista funcional y estructural son las de mitocondrias de vertebrados superiores. Estas poseen cuatro complejos enzimáticos: la NADH deshidrogenasa (NADH:ubiquinona oxidoreductasa), la succinato deshidrogenasa (succinato:ubiquinona oxidoreductasa), el citocromo *bc*₁ (ubiquinol:ferricitocromo *c* oxidoreductasa) y la citocromo oxidasa (ferrocitocromo *c*:oxígeno oxidoreductasa); de los cuales sólo la succinato deshidrogenasa no acopla su reacción redox al bombeo de protones. La primera transferencia de electrones se realiza desde el NADH intramitocondrial, el succinato, el glicerol-3-fosfato o el acil-coenzima A, hacia la ubiquinona por la correspondiente deshidrogenasa. Desde el ubiquinol formado hasta el oxígeno, los electrones son transferidos por una sola ruta a través del complejo *bc*₁, el citocromo *c* y la citocromo oxidasa. En las mitocondrias de algunos tejidos, en particular de hígado, el NADH citosólico puede donar sus electrones a la cadena respiratoria por medio de la NADH:citocromo *b*₅ oxidoreductasa de la membrana externa mitocondrial y del citocromo *b*₅ encontrado en el espa-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

cio intermembranal, el cual reduce al citocromo *c* (1). Hay dos características notables de las cadenas respiratorias en vertebrados: 1) Existen varias entradas posibles de electrones pero sólo una salida y 2) Todos los electrones pasan por al menos un complejo que acopla la oxidorreducción al bombeo de protones, por lo que la respiración está siempre acoplada a la generación de un gradiente electroquímico sin importar cuál sea el sustrato oxidable (Fig. 1).

Las cadenas respiratorias de otros eucariontes, como las plantas y algunos hongos, no poseen las dos características antes mencionadas. Las mitocondrias de los protistas presentan las cadenas respiratorias más complejas de todos los eucariontes por sus múltiples ramificaciones. El estudio de estas cadenas se basa principalmente en el uso de compuestos que inhiben específicamente a los dis-

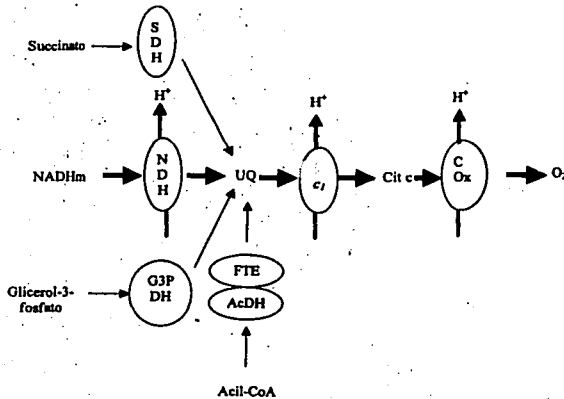


Figura 1. Cadena respiratoria mitocondrial de mamíferos. Se muestran formando parte de la cadena a la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) y a la acil-coenzima A deshidrogenasa (AcDH) junto con la flavoproteína transferidora de electrones (FTE), aunque estas enzimas se consideran tradicionalmente como parte de otras vías metabólicas (glucólisis y β -oxidación). Se omite la vía de oxidación de NADH citosólico para reducir al citocromo *c* por vía del citocromo *b₂* por ser una particularidad de los hepatocitos. Las demás enzimas e intermediarios del transporte electrónico mostrados son: NADH de la matriz mitocondrial (NADHm), NADH deshidrogenasa sensible a rotenona (NDH), succinato deshidrogenasa (SDH), ubiquinona (UQ), complejo *bc*, (*bc*₁), citocromo *c* (cit *c*), y citocromo *c* oxidasa (COx). Con trazos gruesos se indica la vía preferentemente usada. La translocación de protones se señala con flechas verticales gruesas.

tintos complejos respiratorios. Mientras que la respiración en las mitocondrias de vertebrados es totalmente abatida por compuestos como la rotenona, la antimicina o el cianuro (inhibidores de la NADH deshidrogenasa, del complejo *bc*₁ y de la citocromo oxidasa, respectivamente), en las mitocondrias de muchos protistas el consumo de oxígeno se inhibe sólo de manera parcial en presencia de cualquiera de estos compuestos. Esto se debe a la presencia de otras enzimas que permiten a los electrones seguir vías alternas hasta el oxígeno o algún otro aceptor terminal. En particular las oxidasas terminales distintas de la citocromo oxidasa, resistentes al cianuro en protistas, se denominan oxidasas alternas. Además, al encontrar una resistencia a la antimicina en segmentos de la cadena respiratoria de algunos protistas, como el que va desde las deshidrogenasas hasta el citocromo *c*, se ha obtenido evidencia de que existen enzimas alternas al complejo *bc*₁. Puesto que las enzimas de estas diferentes vías alternas no están presentes en mamíferos, se ha intentado diseñar y utilizar inhibidores específicos con la intención de combatir enfermedades causadas por protistas parásitos que tienen cadena alterna. Por otra parte, dentro de los protistas se encuentran representantes de los eucariontes más primitivos, por lo que es interesante el estudio de las cadenas respiratorias en estos organismos desde el punto de vista evolutivo.

El objetivo de esta revisión es discutir los modelos propuestos para las cadenas respiratorias en los diferentes grupos de protistas estudiados, así como su posible función, relevancia clínica e implicaciones evolutivas, con especial énfasis en las diferencias que presentan con respecto a la cadena respiratoria de los vertebrados.

CADENAS RESPIRATORIAS DE PROTISTAS PARÁSITOS

1. APICOMPLEXA

La mayoría de los estudios sobre cadenas respiratorias en protistas se centra en aquellos que tienen importancia médica, ya que ciertos fármacos parecen tener como uno de sus blancos a ciertas enzimas mitocondriales. En el caso de *Plasmodium falciparum*, agente causante de la malaria, los estudios sobre su cadena respiratoria (2) se han efectuado solamente en la etapa, asexual del parásito en la que infecta los eritrocitos del hospedero. Se

ignora si se expresan otras enzimas respiratorias en las demás etapas del ciclo de vida. La respiración de las células intactas de *P. falciparum* sin sustrato añadido es baja, siendo sólo del 10% con respecto a la de los glóbulos blancos, células que sirven de punto de comparación por estar bajo la misma concentración de oxígeno y, de sustratos oxidables que el parásito en la sangre. Sin embargo, se ha comprobado la presencia de la succinato deshidrogenasa, del complejo bc_1 y de la citocromo oxidasa, así como la formación de un gradiente transmembranal de protones. Aparentemente no existe una NADH deshidrogenasa que participe en el bombeo de protones, debido a la insensibilidad de la respiración a rotenona.

Una característica notable es que un 25% de la respiración es resistente al cianuro, pero sensible a salicilhidroxamato (SHAM) y n-propilgalato (nPG). Estos dos compuestos son inhibidores específicos de la ubiquinol oxidasa terminal de plantas, enzima que no participa en la generación del potencial transmembranal por ser incapaz de bombear protones. Es de interés que esta respiración resistente a cianuro, no acoplada a la fosforilación, parece ser indispensable para *P. falciparum*, ya que concentraciones inferiores a 10 μM de algunos derivados sustituidos de SHAM y nPG en el medio de cultivo inhiben el crecimiento del parásito a menos de la mitad. Se ha propuesto que, debido a su baja actividad, la función principal de la cadena respiratoria en *P. falciparum* no es la producción de energía, sino el proveer una vía de salida para los electrones provenientes de reacciones de deshidrogenación que forman parte de vías como la síntesis de pirimidinas. Sin embargo, no está clara la razón por la cual los inhibidores de la respiración resistente al cianuro son capaces por sí solos de detener el crecimiento del parásito en ausencia de algún otro inhibidor de la porción generadora de gradiente; al inhibir únicamente a la ubiquinol oxidasa alterna, los electrones deberían seguir libremente hasta el oxígeno por la citocromo oxidasa. Es posible que los derivados de SHAM y nPG inhiban otros procesos celulares extramitochondriales. La fuerte inhibición del crecimiento de *P. falciparum* a bajas concentraciones de nPG y sus derivados es de importancia clínica, ya que este compuesto es poco tóxico para el ser humano, al grado que se utiliza como aditivo para alimentos.

Existe la posibilidad de tratar la malaria utilizando inhibidores de la oxidasa alterna en combinación con la atovacuona, un análogo de la ubiquinona que actúa específicamente sobre el complejo bc_1 del parásito sin afectar el de los mamíferos (2).

En cuanto a otros organismos del orden Apicomplexa, también se ha encontrado respiración resistente al cianuro en *Babesia bovis*, aunque no así en *Toxoplasma gondii*, cuya velocidad de respiración es además más elevada (2). Probablemente *T. gondii* tiene mayores requerimientos de energía, por lo que su cadena respiratoria funciona, no solamente como una salida de electrones, sino principalmente para sostener la síntesis de ATP, a diferencia de lo que ocurre en *P. falciparum* y *B. bovis*.

2. CINETOPLASTIDA

Este orden abarca a los organismos que poseen cinetoplastos, los cuales son mitocondrias con su DNA organizado en cadenas circulares entrelazadas que le confieren a estos organelos una apariencia característica al observarse al microscopio. Dentro de este orden se han estudiado las cadenas respiratorias de *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Crithidia fasciculata* y *Leishmania donovani*. El caso de *T. brucei* es especial por expresar distintas enzimas respiratorias dependiendo de la parte del ciclo de vida en el que se encuentre (3). En la etapa de tripomastigote en el torrente sanguíneo, la mitocondria no presenta ningún complejo enzimático que contenga citocromos, sino únicamente una glicerol-3-fosfato:ubiquinona oxidoreductasa y una ubiquinol oxidasa sensible a SHAM (Fig. 2A). No existe bombeo de protones, por lo que todo el ATP sintetizado proviene de la glucólisis, siendo necesaria la regeneración continua del NAD^+ a través de la lanzadera de glicerol-3-fosfato. Por lo tanto, al inhibir a la ubiquinol oxidasa, la glucólisis se detiene por acumulación de NADH, lo que sugiere que compuestos como el nPG podrían utilizarse de manera terapéutica contra *T. brucei*, así como se ha propuesto para combatir a *P. falciparum*. La ubiquinol oxidasa de *T. brucei* es más parecida a la encontrada en hongos como *Neurospora crassa* y *Hansenula anomala* que a las existentes en plantas, tanto en la secuencia de aminoácidos como en su punto isoeléctrico (3). Por otra parte, en la etapa proclicca

se expresan la succinato deshidrogenasa, el complejo bc₁ y la citocromo oxidasa, aunque la oxidasa sensible a SHAM sigue presente, ya que la respiración sigue siendo resistente entre un 5 y 10% al cianuro (4).

Los demás cinetoplástidos estudiados presentan una cadena que contiene citocromos junto con la oxidasa resistente al cianuro durante todo su ciclo de vida (Fig. 2B), incluso en la etapa en la que viven en la sangre del hospedero mamífero, por lo que no dependen únicamente de la glucólisis para sintetizar ATP en esta etapa (5). Esto podría dificultar el uso de inhibidores de la oxidasa resistente al cianuro de manera terapéutica, pues la cadena respiratoria seguiría funcionando a través de la citocromo oxidasa.

La oxidasa alterna en *Leishmania* parece no ser del tipo presente en las plantas, como la de *Trypanosoma*, ya que es insensible a SHAM, aunque se inhibe por concentraciones micromolares de orto-hidroxi-difenilo (6). Este compuesto inhibe las oxidases resistentes al cianuro de parásitos pluricelulares como *Ascaris*, aunque por sí solo es capaz de bloquear también la respiración sensible al cianuro, quedando claro que no es un inhibidor específico. Adicionalmente, el gen para la oxidasa del tipo de las plantas parece estar ausente en el genoma de *L. donovani* y *L. mexicana*, por lo que permanece la interrogante sobre la identidad de la oxidasa alterna en este género (6). El orto-hidroxi-difenilo pudiera ser potencialmente un agente terapéutico contra la leishmaniasis, aunque por su poca especificidad podría resultar tóxico para el hospedero.

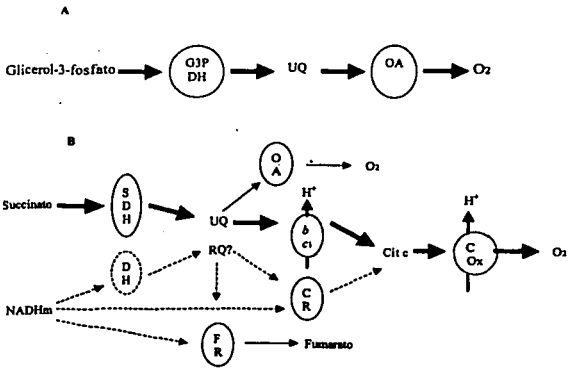


Figura 2. Cadena respiratoria de cinetoplástidos. (A) *Trypanosoma brucei* presenta en la etapa de tripomastigote una cadena con sólo dos enzimas: la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH), y una oxidasa alterna (OA). (B) *T. brucei* presenta en la etapa procíclica, así como los demás cinetoplástidos durante todo su ciclo de vida, una cadena con múltiples ramificaciones. En esta cadena no existe NADH deshidrogenasa translocadora de protones; el NADH es oxidado por una deshidrogenasa insensible a rotenona (DH). Se ha propuesto que esta enzima reduce directamente al citocromo c, pero es más probable que esta reacción esté mediada por la rodoquinona (RQ) y por una citocromo c reductasa insensible a antimicina (CR). El fumarato puede ser como aceptor terminal de electrones en lugar del oxígeno a través de la actividad de una fumarato reductasa (FR) para formar succinato. El succinato es el sustrato principalmente oxidado en estas cadenas respiratorias, como se indica con flechas gruesas. Las demás abreviaturas se explican en la figura 1. Las vías o componentes hipotéticos se indican con flechas o líneas punteadas, o con signo de interrogación. Para simplificar, se ha omitido la conexión entre la b-oxidación y la cadena respiratoria.

El sustrato preferencialmente oxidado por las mitocondrias de los cinetoplástidos es el succinato, el cual se forma a partir de la degradación de la prolina (muy activa en estos organismos) y de la glucólisis; que se encuentra modificada de tal modo que el fosfoenolpiruvato se transforma a malato, el cual entra a la mitocondria para ser hidratado a fumarato; este a su vez se reduce a succinato (4). El complejo translocador de protones de la NADH deshidrogenasa está ausente ya que en todos los cinetoplástidos estudiados la respiración con este sustrato es insensible a la rotenona, mientras que en *Crithidia fasciculata* y *Leishmania tarentolae* no es posible detectar ningún ARN mensajero que corresponda a alguna de las subunidades de este complejo (7). Los electrones que provienen del NADH pueden reducir el fumarato a succinato. El succinato puede ser reoxidado por la succinato deshidrogenasa o puede ser excretado al exterior de la célula en condiciones de baja concentración de oxígeno. De esta manera el fumarato es utilizado como aceptor final de electrones en lugar del oxígeno, permitiendo que las vías metabólicas formadoras de NADH no se detengan por la acumulación de su producto en condiciones anaerobias (4).

Se desconocen las enzimas que intervienen en la transferencia de electrones entre el NADH y el fumarato en cinetoplástidos. Se ha propuesto la existencia de una NADH:fumarato oxidorreductasa independiente de quinonas (6). Sin embargo,

recientemente se ha caracterizado en eucariontes que resisten a la anaerobiosis, como helmintos parásitos y moluscos, una rodoquinol:fumarato oxidoreductasa llamada comúnmente fumarato reductasa la cual es una isoenzima de la succinato deshidrogenasa. La fumarato reductasa utiliza como sustrato una quinona con un grupo amino en lugar del metóxido en la posición 3 de la ubiquinona que le confiere un potencial redox de -63 mV (la ubiquinona tiene un valor de $+100$ mV) haciendo termodinámicamente posible la reducción del fumarato (8). Se ha encontrado además una correlación estrecha entre la existencia de fumarato reductasa y la presencia de rodoquinona en los organismos pluricelulares mencionados. Sin embargo, en *Trypanosoma rhodesiense*, *Crithidia fasciculata* y *Crithidia oncopelti* se ha reportado únicamente la presencia de ubiquinona (9), por lo que no es posible afirmar que la fumarato reductasa exista en cinetoplástidos. No se ha podido determinar tampoco la identidad de la NADH deshidrogenasa que reduce a la poza de quinonas ni su especificidad hacia la ubiquinona o la supuesta rodoquinona (Fig. 2B).

En cinetoplástidos, el NADH es oxidado por fracciones enriquecidas de membranas totales, pero no por células parcialmente permeabilizadas donde las mitocondrias permanecen intactas (el aislamiento de mitocondrias en estos organismos es técnicamente muy difícil), lo que indica que no existe una NADH deshidrogenasa externa como la que presentan las mitocondrias de plantas (6). En fracciones membranales se ha determinado que no todos los electrones del NADH se utilizan para la formación de succinato; ya que existe reducción de citocromo *c* al añadir este sustrato, incluso mayor a la que se encuentra con succinato en el caso de *Leishmania*. Esta actividad disminuye un 50% en *T. brucei* al añadir superóxido dismutasa o catalasa (4), por lo que se ha propuesto que hay formación de H_2O_2 en el sitio activo de la fumarato reductasa en ausencia de su sustrato. Sin embargo, la reducción de citocromo *c* dependiente de NADH existe aun en presencia de altas concentraciones de fumarato, por lo que parece ser una actividad genuinamente enzimática. Además, la insensibilidad total de esta actividad a la antimicina, compuesto que bloquea casi por completo la actividad de succinato:citocromo *c* oxidoreductasa,

indica la existencia de una enzima que cataliza la transferencia de electrones al citocromo *c*, distinta del complejo *bc*₁.

CADENAS RESPIRATORIAS EN PROTISTAS DE VIDA LIBRE

1. EUGLENIDA

En *Euglena gracilis* existen los cuatro complejos clásicos, junto con una NADH deshidrogenasa no sensible a rotenona que no transloca protones y cuyo sitio activo parece estar orientado hacia el citosol, como en las mitocondrias de plantas (10). Las mitocondrias de *Euglena* también son capaces de oxidar D- y L-lactato por medio de una enzima que no depende de NAD, y que por lo tanto no genera NADH (11). Con L-lactato, existe un 40% de respiración resistente a antimicina que sostiene el 25% de la velocidad de síntesis de ATP presente en ausencia de inhibidor (12). La actividad de reducción de citocromo sostenida por L-lactato es resistente en un 45% a la antimicina, lo cual indica que una fracción de los electrones llega a la citocromo oxidasa por una vía distinta a la del complejo *bc*₁ (Fig. 3). Puesto que tanto la respiración

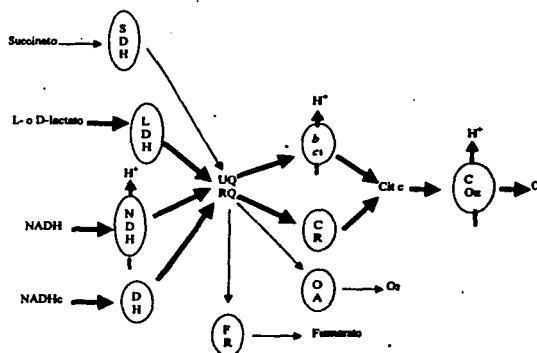


Figura 3. Cadena respiratoria de *Euglena gracilis*. Esta cadena oxida L- y D- lactato a través de una o dos lactato deshidrogenasas membranales independientes de NAD (LDH). La rodoquinona (RQ) posiblemente acepta parte de los electrones de estas enzimas y de las NADH deshidrogenasas, en particular de la insensible a rotenona (DH), que oxida NADH citosólico (NADHc). La succinato deshidrogenasa (SDH) reduce exclusivamente a la ubiquinona (UQ). La fumarato reductasa (FR), la citocromo *c* reductasa insensible a antimicina (CR) y probablemente la oxidasa alterna (OA) reciben electrones preferentemente del rodoquinol; mientras que el complejo *bc*₁ oxida sólo al ubiquinol. Los demás símbolos se explican en las figuras previas.

como la reducción de citocromo *c* se inhiben alrededor del 85% por antimicina cuando el sustrato es succinato, parece ser que en *E. gracilis* existe, lo mismo que en cinetoplástidos, una quinol:citocromo *c* oxidorreductasa distinta del complejo *bc*₁, posiblemente con mayor especificidad para rodoquinol que para ubiquinol (Tabla I). En las mitocondrias de *E. gracilis* la rodoquinona se encuentra en concentraciones equimolares con respecto a la ubiquinona (9). La participación de alguna de estas quinonas en la oxidación de lactato está apoyada por los siguientes datos: 1) la reducción de citocromo *c* resistente a antimicina con L-lactato se inhibe por completo con mixotiazol o estigmatelina (compuestos que inhiben a enzimas que utilizan quinonas como sustrato) a concentraciones inferiores a 1 μ M; 2) la localización de la L-lactato deshidrogenasa independiente de NAD parece ser membranaral, como las de bacterias que reducen quinonas, ya que las partículas submitocondriales de *E. gracilis* también oxidan lactato y 3) la extracción o destrucción parcial de las quinonas mitocondriales con solventes orgánicos o luz ultravioleta inhibe la respiración y la reducción de citocromo *c* con L-lactato y succinato de modo semejante, siendo reactivadas al añadir quinonas sintéticas (12). La presencia de rodoquinona en este organismo, por otra parte, armoniza con el hallazgo de una actividad de fumarato reductasa como ocurre en los tripanosomátidos (8).

Las mitocondrias de *Euglena* también poseen un 90% de respiración resistente al cianuro con D-

lactato, la cual disminuye a 40% con NADH y a menos del 10% con succinato (10, 11). Como ocurre en *Leishmania* (6), los inhibidores de la quinol oxidasa semejante a la de plantas como SHAM, nPG y disulfiram, sólo ejercen una inhibición parcial sobre este componente respiratorio resistente al cianuro (13). No está claro si el sustrato de esta oxidasa es el ubiquinol o el rodoquinol, aunque la baja actividad de quinol oxidasa cuando se utilizan como sustratos análogos sintéticos del ubiquinol favorece la segunda opción. Aunque la síntesis de ATP se abate por completo con cianuro; la cadena resistente al cianuro genera suficiente potencial transmembranaral, sensible a desacoplante, como para sostener la entrada de calcio a la mitocondria (11). Esto deja abierta la posibilidad de que esta oxidasa alterna también sea capaz de bombear protones, aunque a una velocidad baja que no permite la generación de un gradiente suficiente para sintetizar ATP. En las mitocondrias aisladas de células de *E. gracilis* cultivadas en presencia de succinato y antimicina o de etanol, esta actividad respiratoria resistente al cianuro es estimulada siete veces por AMP con succinato como sustrato, mas no así cuando las células son cultivadas en succinato (sin antimicina) o glutamato y malato (14). La estimulación del componente resistente al cianuro por AMP depende tanto de las condiciones de cultivo como del sustrato oxidable añadido a las mitocondrias aisladas, por lo que se ha sugerido incluso que existen dos oxidasas alternas. Este efecto es atribuible en parte al ADP formado por la actividad de la adenilato cinasa al añadir AMP,

TABLA I

REDUCCIÓN DE CITOCROMO *c* Y RESPIRACIÓN RESISTENTE A ANTIMICINA

ORGANISMO	SUSTRATO	REDUCCIÓN DE CITOCROMO C RESISTENTE A ANTIMICINA (%)	RESPIRACIÓN RESISTENTE A ANTIMICINA (%)
<i>Trypanosoma brucei</i>	NADH	24-95 ^a	100
<i>Trypanosoma cruzi</i>	NADH	50-100 ^a	100
<i>Leishmania donovani</i>	NADH	87.5	80
<i>Euglena gracilis</i>	NADH	49	30
<i>Euglena gracilis</i>	D-lactato	55	90
<i>Euglena gracilis</i>	L-lactato	45	45

a: el valor inferior es en presencia de fumarato

lo que se confirma por la sensibilidad parcial de esta activación hacia la oligomicina, compuesto que al inhibir a la ATP sintetasa impide que la adenilato cinasa tenga ATP para transformar el AMP a ADP (11). De hecho, el ADP por sí solo estimula en igual grado que el AMP, aunque con menor afinidad. Sin embargo, el IMP es incluso ligeramente mejor activador, por lo que parece ser que la oxidasa alterna tiene una especificidad amplia por varios nucleótidos.

La identidad de esta oxidasa alterna se desconoce, aunque se ha propuesto que pudiera ser un citocromo *b* cuya cantidad aumenta a la par que la resistencia al cianuro cuando se cultiva a las células en presencia de este inhibidor (15). Existe la posibilidad de que esta oxidasa sea del tipo planta, a pesar de la falta de inhibición por SHAM, ya que se han aislado mutantes funcionales de esta enzima en *Arabidopsis thaliana* que son resistentes a este compuesto (13). La capacidad de formar al menos cierto potencial transmembranal no es congruente con la presencia de una oxidasa alterna no electrogénica, aunque la estimulación por nucleótidos monofosfatados es característica de las oxidasas sensibles a SHAM en ciliados y amebas, que claramente son del tipo presente en las plantas, como se mostrará más adelante.

La presencia de una fumarato reductasa, una quinol:citocromo *c* oxidorreductasa distinta del complejo *bc*₁, y de una quinol oxidasa resistente al cianuro tanto en cinetoplastidos como en euglenidos es relevante desde el punto de vista evolutivo, ya que estos dos órdenes constituyen uno de los linajes eucariontes más primitivos (16). Es razonable suponer que estas dos enzimas de la cadena alterna aparecieron junto con los primeros eucariontes con mitocondrias.

2. CILIADOS

Los estudios sobre las cadenas respiratorias en este grupo de protistas se refieren principalmente a *Paramecium tetraurelia*. En este organismo se ha identificado la presencia de la NADH deshidrogenasa generadora de gradiente de protones, así como de la succinato deshidrogenasa, el complejo *bc*₁ y la citocromo oxidasa (17). Adicionalmente, se ha encontrado una respiración resistente al cianuro y sensible a SHAM, lo que indica la presencia

de una quinol oxidasa del tipo de las plantas (17; Fig. 4). Esta vía alterna corresponde al 40-50% del consumo de oxígeno total en ausencia de ADP (estado 4) con piruvato y malato como sustrato, y del 15 al 20% en estado 3, incrementándose cinco veces al añadir AMP. Aunque esta estimulación podría deberse a la formación de ADP por la actividad de la adenilato cinasa, como ocurre en *E. gracilis*, se ha encontrado que en presencia de carboxiatractilósido (inhibidor del transporte de ADP a la matriz mitocondrial) o de EDTA como quelante del magnesio necesario para la actividad de la cinasa, sigue existiendo una estimulación de 2.5 veces de la respiración resistente al cianuro con AMP. El GMP y el IMP también estimulan, aunque solo un 65% con respecto al AMP. Estos resultados sugieren un efecto directo de estos nucleótidos sobre la oxidasa alterna de *Paramecium*. Un análogo fotoactivable del AMP, el NAP₄-AMP (3'-{4-[N-(4-azido-2-nitrofenil)amino]butiril}-AMP), se comporta como un inhibidor competitivo de la estimulación de la respiración resistente al

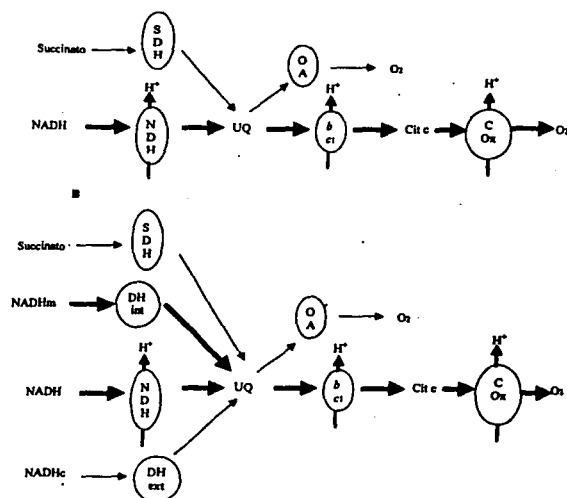


Figura 4. Cadena respiratoria de ciliados (A) y de protistas cercanos filogenéticamente a plantas como *Acanthamoeba castellanii* y *Chlamydomonas* (B). En estos últimos, las vías de entrada de los electrones provenientes del NADH son múltiples, existiendo dos NADH deshidrogenasas insensibles a rotenona: una externa (DH ext) que oxida el NADH citosólico (NADHc) y otra interna (DH int) que utiliza el NADH de la matriz. El resto de los símbolos se explican en las figuras anteriores.

cianuro. Al incubar a las mitocondrias con este análogo marcado radiactivamente e irradiar con pulsos de luz, se marcan tres proteínas de masa molecular de 50, 35 y 30 kDa. Las dos últimas pierden la marca radiactiva al preincubar a las mitocondrias con AMP, por lo que alguna de ellas probablemente corresponde a la oxidasa alterna (18).

Debido al hallazgo de dos constantes de inhibición para el cianuro y para SHAM, se ha propuesto la existencia de una tercera oxidasa terminal que se inhibe por ambos compuestos, relacionada con una disminución en la reducción de un citocromo *b* (18). Sin embargo, las dos constantes encontradas para el cianuro son muy cercanas entre sí (10 y 50 μ M), por lo que pudiera corresponder en ambos casos a la citocromo *c* oxidasa. La segunda constante para SHAM es tan alta (0.7 mM) que podría explicarse como un efecto inhibitorio inespecífico sobre cualquier enzima de la cadena respiratoria; no necesariamente sobre una oxidasa terminal alterna.

Otro ciliado estudiado es *Tetrahymena pyriformis*, en cuya cadena respiratoria se encuentran los tres complejos generadores de gradiente además de la succinato deshidrogenasa. La citocromo *c* oxidasa tiene la particularidad de carecer de hemo A, ya que el máximo de absorción alrededor de los 605 nm está ausente, presentando en su lugar un grupo hemo no identificado hasta el momento que tiene su máximo de absorción en 620 nm (19). Las mitocondrias aisladas de este organismo son incapaces de oxidar NADH citosólico y toda la actividad de reducción de citocromo *c* con sustratos generadores de NADH en la matriz, como el α -cetoglutarato, es totalmente sensible a rotenona. Esto indica que no existen otras NADH deshidrogenasas aparte de la clásica. Por otra parte, se ha reportado una considerable variación en la sensibilidad al cianuro entre distintas cepas de *Tetrahymena*, desconociéndose la naturaleza de la oxidasa terminal alterna.

3. AMIBAS DE VIDA LIBRE Y CLOROFITAS

Se ha caracterizado con detalle la cadena respiratoria mitocondrial de la ameba *Acanthamoeba castellanii*. Sobresalen sus semejanzas con la cadena mitocondrial de plantas al presentar, además

de los tres complejos enzimáticos electrogénicos y de la succinato deshidrogenasa, una NADH deshidrogenasa externa; otra interna insensible a rotenona (ambas sin actividad de bombeo de protones) y la quinol oxidasa alterna sensible a SHAM (Fig. 4) la cual reacciona de manera cruzada con anticuerpos contra la oxidasa de plantas (20). Sin embargo, la respiración resistente al cianuro en *A. castellanii* es activada por AMP, GMP e IMP, como ocurre en *E. gracilis* y en *P. tetraurelia* pero no en plantas, donde la oxidasa alterna es activada por oxoácidos como el piruvato. Esto sugiere que una gran variedad de protistas poseen una quinol oxidasa del tipo de las plantas con modificaciones que le confieren un mecanismo diferente de activación. Por ejemplo, la respiración resistente al cianuro representa sólo un 10% del control en estado 3 en ausencia de nucleótidos monofosfatados, pero la adición de GMP la estimula ocho veces. Otra diferencia importante entre esta oxidasa alterna y la de plantas radica en el estado de agregación: experimentos de entrecruzamiento e identificación con anticuerpos revelan que esta enzima es dimérica en plantas, pero monomérica en *A. castellanii*. Los mismos estudios sugieren que la oxidasa alterna en este protista es una proteína de 35 kDa. Aunque hay otros dos péptidos de 38 y 32 kDa que también reaccionan con el anticuerpo contra la oxidasa de planta, sólo la de 35 kDa disminuye en su concentración junto con el porcentaje de respiración insensible al cianuro a medida que el cultivo aumenta de edad (20).

Dentro de los protistas fotosintéticos, únicamente algunas clorofitas se han estudiado con el fin de caracterizar sus cadenas respiratorias. El género más estudiado es *Chlamydomonas*, en donde, además de los cuatro complejos respiratorios clásicos, se ha identificado una quinol oxidasa resistente al cianuro que reacciona con anticuerpos contra la oxidasa alterna de plantas (21). En condiciones normales de cultivo, el cianuro no tiene efecto inhibitorio sobre la velocidad de respiración sensible a SHAM medida en células intactas, incluso la estimula en un 40%; mientras que en ausencia de cianuro, el SHAM tiene un efecto estimulador de casi 30% (22). Esto significa que la capacidad de consumo de oxígeno de ambas vías, clásica y alterna, es muy semejante, por lo que al bloquear una de ellas la otra puede alcanzar una

velocidad mayor que cuando ambas están funcionando y compitiendo por la poza de quinol. Resultados semejantes se han reportado para el género *Chlorella*. En este aspecto, las clorofitas parecen ser diferentes a los demás protistas, en donde la vía sensible al cianuro tiene una capacidad de cuatro a diez veces superior a la de la vía alterna (Tabla II). Cuando *Chlamydomonas* se cultiva en presencia de 2 a 5% de CO₂, la actividad de la oxidasa alterna disminuye, pues la respiración resistente al cianuro es de solo el 10% del control. Por otra parte, aunque la resistencia al cianuro se ha encontrado en otras clorofitas como *Nitella* y *Dunalie*, no puede decirse que sea común para todas las algas verdes, ya que la respiración de *Selenastrum minutum* es totalmente sensible al cianuro. Por otra parte, se ha encontrado una actividad de NADH deshidrogenasa interna insensible a rotenona (no electrogénica) en mutantes que carecen de las subunidades codificadas en la mitocondria de la deshidrogenasa translocadora de protones (23). Estas mutantes no son viables en ausencia de luz, lo que indica la incapacidad de esta vía alterna para sostener la síntesis de ATP. No es sorprendente la semejanza de los componentes respiratorios de *A. castellanii* y *Chlamydomonas* con aquellos de los organismos fotosintéticos multicelulares

en vista de los estudios filogenéticos que sitúan a estos protistas cerca de la rama que conduce al reino de las plantas (16). Sin embargo, como se mencionó antes, la presencia de una oxidasa terminal resistente al cianuro está extendida aún en protistas alejados filogenéticamente de las plantas, como los cinetoplásticos.

CONCLUSIONES

A diferencia de la llamada cadena respiratoria clásica de vertebrados, con su única oxidasa terminal, la gran mayoría de los protistas estudiados poseen cadenas respiratorias ramificadas en las que hay al menos dos vías para llegar al oxígeno. La vía alterna a la que pasa por la citocromo oxidasa se manifiesta por la respiración resistente al cianuro que existe aún en protistas parásitos como *Plasmodium falciparum*, en donde las funciones mitocondriales están muy reducidas y la respiración es muy baja. Existe evidencia de que es posible inhibir el crecimiento de este parásito utilizando compuestos que actúan específicamente sobre la oxidasa resistente al cianuro. La misma estrategia podría utilizarse contra *Trypanosoma brucei*, organismo que en la etapa infectiva en el humano depende por completo de esta oxidasa alterna. En la mayoría de los protistas, las oxidasas terminales

TABLA II

RESPIRACIÓN RESISTENTE AL CIANURO EN PROTISTAS

ORGANISMO	RESISTENCIA AL CIANURO (%)	INHIBICIÓN POR SHAM	ESTIMULACIÓN POR AMP O GMP (VECES)
<i>Plasmodium falciparum</i>	25	Sí	N.D.
<i>Trypanosoma brucei</i> (etapa eritrocítica)	100	Sí	N.D.
<i>Trypanosoma brucei</i> (etapa procíclica)	5-10	Sí	N.D.
<i>Trypanosoma cruzi</i>	5-10	Sí	N.D.
<i>Leishmania donovani</i>	20	No	N.D.
<i>Euglena gracilis</i>	10-90 ^a	Parcial	0-7
<i>Paramecium tetraurelia</i>	15-20	Sí	5
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	0-10	N.D.	N.D.
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	10	Sí	8
<i>Chlamydomonas</i> spp.	10 ^b -140	Sí	N.D.

a: dependiendo de las condiciones de cultivo y el sustrato

b: en cultivos crecidos con 2-5% de CO₂

N.D. no determinado

alternas son semejantes a las que existen en plantas, presentando la característica particular de ser estimuladas por nucleótidos monofosfatados como AMP, GMP e IMP (Tabla II). Por otra parte, existen incluso aceptores alternativos de electrones, como el fumarato; así como enzimas que permiten "saltar" segmentos de la vía típica, como la quinol:citocromo *c* oxidorreductasa distinta del complejo *bc₁*, que al parecer existe en cinetoplastidos y *E. gracilis* (Tabla I). Los segmentos de la cadena respiratoria que no participan en la generación de un gradiente de protones probablemente cumplen la función de mantener el flujo de electrones aun en condiciones donde existe suficiente ATP. Esto permite mantener oxidado el ambiente citosólico de manera que las reacciones metabólicas que acumulan equivalentes reductores no se detengan.

La existencia de estas redes de transportes de electrones puede relacionarse con la necesidad que tienen estos organismos unicelulares de adaptarse a condiciones en las que la concentración de oxígeno y sustratos es muy variable. Esto no ocurre en organismos pluricelulares en donde los cambios físicos y químicos en el seno de una estructura aislada del ambiente como un tejido u órgano están reducidos al mínimo. Esta idea se apoya en el hecho de que las cadenas respiratorias de muchas bacterias y hongos unicelulares también son ramificadas y poseen múltiples aceptores, donadores e intermediarios del transporte de electrones. Incluso en el caso de organismos pluricelulares que viven en ambientes cambiantes, como los moluscos de las zonas intermareales sometidos a periodos regulares de anoxia, las cadenas respiratorias poseen ramificaciones que conducen a aceptores alternos como el fumarato. En sentido evolutivo, las redes de transporte de electrones son una característica primitiva de los organismos, encontrándose a partir de los procariontes. En cuanto a los primeros eucariontes, es válido suponer que tenían cadenas ramificadas semejantes a las descritas para cinetoplastidos y euglenidos. Por lo tanto, la cadena respiratoria clásica lineal de eucariontes superiores, que es la mejor caracterizada hasta el momento; es una excepción a lo que existe en la mayoría de los organismos y probablemente constituye una adaptación posterior al modo de vida pluricelular donde se mantiene constante el aporte de oxígeno a las células.

REFERENCIAS

1. Rodriguez-Marañon M J, Qiu F, Stark R E, White S P, Zhang Z, Foundling S I, Rodriguez, V, Schilling C L, Bunce R A y Rivera M (1996) 13C NMR spectroscopic and X-ray crystallographic study of the role played by the mitochondrial *b₃* heme propionates in the electrostatic binding to cytochrome *c*. *Biochemistry* 35: 16378-16390.
2. Murphy A D, Doeller J E, Hearn B y Lang-Unnasch N (1997) *Plasmodium falciparum*: cyanide-resistant oxygen consumption. *Exp Parasitol* 87: 112-120.
3. Chaudhuri M, Ajayi W y Hill G C (1998) Biochemical and molecular properties of the *Trypanosoma brucei* alternative oxidase. *Mol Biochem Parasitol* 95: 53-68.
4. Turrens J (1989) The role of succinate in the respiratory chain of *Trypanosoma brucei* procyclic trypomastigotes. *Biochem J* 259: 363-368.
5. Van Hellemond J J, Simons B, Millenaar F F, y Tielens A G M (1998) A gene encoding the plant-like alternative oxidase is present in *Phytomonas* but absent in *Leishmania* spp. *J Euk Microbiol* 45: 426-430.
6. Santhamma K R y Bhaduri A (1995) Characterization of the respiratory chain of *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 75: 43-53.
7. Speijer D, Breek C K D, Muijsers A O, Hartog A F, Berden J A, Albracht S P J, Samyn B, Van Beeumen J y Benne R (1997) Characterization of the respiratory chain from cultured *Criethidia fasciculata*. *Mol Biochem Parasitol* 85: 171-186.
8. Tielens A G M y Van Hellemond J J (1998) The electron transport chain in anaerobically functioning eukaryotes. *Biochim Biophys Acta* 1365: 71-78.
9. Hutson K G y Threlfall D R (1980) Biochemistry of Terpenoid Quinones and Chromanols. En: *Biochemistry and Physiology of Protozoa*. Editores: Levandowsky M y Hutner S H. Academic Press pp 255-286.
10. Sharpless T K y Butow R A (1970) Phosphorylation sites, cytochrome complement, and alternate pathways of coupled electron transport in *Euglena gracilis* mitochondria. *J Biol Chem* 245: 50-57.
11. Uribe A y Moreno-Sánchez R (1992) Energy-dependent reactions supported by several substrates in coupled *Euglena gracilis* mitochondria. *Plant Sci* 86: 21-32.
12. Moreno-Sánchez R, Covián R, Jasso-Chávez R, Rodríguez-Enríquez S, Pacheco-Moisés F y Torres-Márquez M E (2000) Oxidative phosphorylation supported by

- an alternative respiratory pathway in mitochondria from *Euglena*. *Biochim Biophys Acta* 1457: 200-210.
13. Berthold D A (1998) Isolation of mutants of the *Ara-bidopsis thaliana* alternative oxidase (ubiquinol : oxygen oxidoreductase) resistant to salicylhydroxamic acid. *Biochim Biophys Acta* 1364: 73-83.
 14. Sharpless T K, y Butow R A (1970) An inducible alternate terminal oxidase in *Euglena gracilis* mitochondria. *J Biol Chem* 245: 58-70.
 15. Devars S, Hernández R, Covián R, García-Horsman A, Barquera B y Moreno-Sánchez R (1998) The content of alternative oxidase of *Euglena* mitochondria is increased by growth in the presence of cyanide and is not cytochrome *o*. *J Euk Microbiol* 45: 122-130.
 16. Patterson D J (1994): Protozoa: Evolution and Systematics. En: Hausmann K y Hulsmann N (eds.): Progress in Protozoology, (Proceedings of the IX International Congress of Protozoology, Berlin 1993), pp 1-14. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York USA
 17. Doussièrè J, Sainsard-Chanet A y Vignais P V (1979) The respiratory chain of *Paramecium tetraurelia* in wild type and the mutant Cl1. I. Spectral properties and redox potentials. *Biochim Biophys Acta* 548: 224-235.
 18. Doussièrè J y Vignais P V (1984) AMP-dependence of the cyanide-insensitive pathway in the respiratory chain of *Paramecium tetraurelia*. *Biochem J* 220: 787-794.
 19. Inokuchi A y Fukumori Y (1993) Purification and characterization of membrane-bound CO-reactive hemoprotein from *Tetrahymena pyriformis* mitochondria. *FEMS Microbiol Lett* 112: 55-60.
 20. Jarmuszkiewicz W, Wagner A M, Waner M J y Hryniewiecka L (1997) Immunological identification of the alternative oxidase of *Acanthamoeba castellanii* mitochondria. *FEBS Lett* 411: 110-114.
 21. Derzaph T L M y Weger H G (1996) Immunological identification of the alternative oxidase in *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta). *J Phycol* 32: 621-623
 22. Weger H G, Guy R D y Turpin D H (1990) Cytochrome and alternative pathway respiration in green algae. Measurements using inhibitors and $^{18}\text{O}_2$ discrimination. *Plant Physiol* 93: 356-360.
 23. Duby F, Matagne R F (1999) Alteration of dark respiration and reduction of phototrophic growth in a mitochondrial DNA deletion mutant of *Chlamydomonas* lacking *cob*, *nd4*, and the 3' end of *nd5*. *Plant Cell* 11: 115-126.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

De acuerdo con esta revisión, la cadena respiratoria de *Euglena gracilis* presenta muchas similitudes con la de tripanosomátidos, con la ventaja de que *Euglena* puede cultivarse fácilmente por ser de vida libre. Además el aislamiento de las mitocondrias de este organismo es relativamente sencillo, obteniéndose altos rendimientos para la purificación de los complejos respiratorios en estado activo.

El complejo bc_1 de *E. gracilis*, así como el de tripanosomátidos, presenta resistencia al mixotiazol [5,6]. En el caso de los tripanosomas, se ha propuesto que los residuos involucrados en la resistencia a dicho compuesto son la treonina 137 y la serina 256 del citocromo *b*, los cuales corresponden a glicina y asparagina, respectivamente, en organismos sensibles al mixotiazol [5]. Adicionalmente, en los tripanosomátidos se ha reportado resistencia a estigmatelina, atribuyéndose esto a la sustitución de isoleucina por fenilalanina en la posición 147 del citocromo *b*, además de a las dos sustituciones ya mencionadas (Figura 3).

Como puede observarse en la figura 3, los residuos en posición 137 y 256 involucrados en la resistencia al mixotiazol en tripanosomátidos no se encuentran en contacto con el inhibidor. Esto implica que son importantes para la conformación global del sitio Q_o , o bien, que intervienen en la movilidad del dominio extramembranal de la proteína hierro-azufre. Esta segunda posibilidad está apoyada por simulaciones de dinámica molecular que sugieren que la proteína hierro-azufre debe desplazar un asa transmembranal compuesta por los residuos 263 al 268 del citocromo *b* para moverse hacia el citocromo c_1 [7]. Puesto que la estigmatelina estabiliza la conformación en que la proteína hierro-azufre está en contacto con el citocromo *b*, y el mixotiazol la desestabiliza, existe la posibilidad de que el movimiento de la proteína hierro-azufre se altere al substituir residuos que se encuentran cerca

de la base de la mencionada asa del citocromo *b*, como es el caso de los residuos en posición 137 y 256. Al alterar el movimiento de la proteína fierro-azufre, posiblemente se modifique la afinidad del sitio Q_0 hacia la estigmatelina y el mixotiazol. Por lo tanto, la determinación de la cinética de unión de estos inhibidores en los sitios Q_0 modificados de *Euglena* (como modelo de los tripanosomátidos) es importante, no solo para el desarrollo de fármacos específicos contra tripanosomas, sino también para el entendimiento del efecto recíproco entre el movimiento de la proteína fierro-azufre y la afinidad hacia los ligandos de sitio de oxidación de quinol.



Figura 3. Residuos del citocromo *b* cuya mutación induce resistencia a estigmatelina (naranja), a mixotiazol (amarillo) o a ambos inhibidores (verde). El mixotiazol se muestra en blanco (panel derecho) y la estigmatelina en azul (panel izquierdo). La proteína fierro-azufre se muestra como listones amarillos, mientras que el citocromo *b* como listones azules. Tomado de la referencia [8].

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Como puede observarse en la figura 3, los residuos en posición 137 y 256 involucrados en la resistencia al mixotiazol en tripanosomátidos no se encuentran en contacto con el inhibidor. Esto implica que son importantes para la conformación global del sitio Q_o , o bien, que intervienen en la movilidad del dominio extramembranal de la proteína fierro-azufre. Esta segunda posibilidad está apoyada por simulaciones de dinámica molecular que sugieren que la proteína fierro-azufre debe desplazar un asa transmembranal compuesta por los residuos 263 al 268 del citocromo *b* para moverse hacia el citocromo c_1 . Puesto que la estigmatelina estabiliza la conformación en que la proteína fierro-azufre está en contacto con el citocromo *b*, y el mixotiazol la desestabiliza, existe la posibilidad de que el movimiento de la proteína fierro-azufre se altere al substituir residuos que se encuentran cerca de la base de la mencionada asa del citocromo *b*, como es el caso de los residuos en posición 137 y 256. Al alterar el movimiento de la proteína fierro-azufre, posiblemente se modifique la afinidad del sitio Q_o hacia la estigmatelina y el mixotiazol. Por lo tanto, la determinación de la cinética de unión de estos inhibidores en los sitios Q_o modificados de *Euglena* (como modelo de los tripanosomátidos) es importante, no solo para el desarrollo de fármacos específicos contra tripanosomas, sino también para el entendimiento del efecto recíproco entre el movimiento de la proteína fierro-azufre y la afinidad hacia los ligandos de sitio de oxidación de quinol.

CAPITULO 2

OBJETIVO E HIPÓTESIS DEL PROYECTO

2.1 Objetivo General

Establecer el papel de residuos protonables y apolares, así como del estado redox de la proteína fierro-azufre, en la unión y catálisis de ligandos en el sitio de oxidación de quinol del complejo bc_1 mitocondrial. Conocer las diferencias estructurales que determinan la resistencia a inhibidores en el complejo bc_1 de *Euglena gracilis*.

2.2 Objetivos Particulares

- a) Determinar los cambios en la afinidad hacia el quinol y la quinona producidos al variar el estado de protonación de la histidina 161 de la proteína fierro-azufre y del glutámico 272 del citocromo *b*.
- b) Determinar el efecto del estado de protonación de estos residuos sobre la velocidad de oxidación del quinol.
- c) Calcular las constantes de velocidad de unión de inhibidores fuertemente unidos del sitio Q_o en función del estado redox de la proteína fierro-azufre y del estado de protonación de la histidina 161.
- d) Determinar el tipo de inhibición que ejercen estos inhibidores con respecto a la unión de sustrato y producto.
- e) Caracterizar el tipo de inhibición que ejercen la estigmatelina y el mixotiazol en el complejo bc_1 atípico de *Euglena gracilis*.
- f) Correlacionar la resistencia hacia la estigmatelina y/o hacia el mixotiazol en el complejo bc_1 de *E. gracilis* con la estructura del citocromo *b* y la proteína fierro-azufre.

2.3 Hipótesis

Los residuos protonables del sitio Q_o , en particular la histidina 161 de la proteína fierro-azufre y el glutámico 272 del citocromo *b*, son esenciales para la oxidación del quinol. Sin embargo, la unión de sustrato, producto e inhibidores depende a mayor grado de la conformación global del sitio Q_o determinada por otros residuos del citocromo *b* y por la posición del dominio extramembranal de la proteína fierro-azufre. La resistencia a inhibidores en el complejo bc_1 de *Euglena gracilis* se debe a sustituciones similares a las encontradas en el citocromo *b* de tripanosomátidos.

CAPITULO 3

RESULTADOS

3.1 Papel de grupos protonables del complejo bc_1 de corazón de bovino en la unión y oxidación de quinol

En este trabajo obtuvimos por primera vez evidencia cinética de que la histidina 161 de la proteína hierro-azufre y el glutámico 272 del citocromo *b* son los aceptores primarios de los protones donados por el quinol al ser oxidado, lo cual había sido propuesto anteriormente sólo en base a las estructuras cristalográficas del complejo bc_1 en presencia de estigmatelina.

Tras determinar la actividad del complejo purificado de bovino variando el pH y la concentración de sustrato, los datos se ajustaron a una ecuación en la que se considera la disminución de la catálisis al disminuir el potencial redox de la proteína hierro-azufre debido a la desprotonación de las dos histidinas que unen al centro metálico de esta subunidad. El modelo utilizado consideraba también que la desprotonación de una de estas histidinas (la 161) favorecía la catálisis al recibir uno de los protones del quinol. El ajuste de los datos a la ecuación resultó en un pK_a de 7.5, muy semejante al reportado por métodos electroquímicos para la histidina 161 (7.6-7.7). Se concluyó además que los datos se ajustaban mejor a una ecuación que implicaba a un grupo protonable adicional con un pK_a de entre 5.2 y 5.7, cuya protonación inhibía por completo la actividad enzimática. Puesto que la protonación de este residuo incrementó la afinidad del complejo bc_1 por la quinona más de 20 veces, es probable que este residuo sea el glutámico 272 del citocromo *b*, el cual forma un puente de hidrógeno con un hidroxilo de la estigmatelina según las estructuras cristalográficas. La protonación de este grupo también incrementó la

afinidad hacia quinol unas 3 veces. Esto se interpretó como un incremento en la afinidad del glutámico 272 hacia el protón cuando el quinol ocupa el sitio Q_o . Esto es consistente con los estudios de difracción de rayos X que muestran que el glutámico 272 cambia su orientación desde un canal de agua (cuando la enzima no tiene ligando) hacia el dominio hidrofóbico donde se une la estigmatelina (en presencia de este inhibidor). Este cambio de un ambiente polar a uno apolar debería de reflejarse como un cambio hacia un pK_a mayor, como observamos para el residuo con pK_a de 5.2-5.7.

Aunque nuestros resultados apuntaron hacia un papel importante de la histidina 161 de la proteína fierro-azufre en la oxidación de quinol, el estado de protonación de este residuo no tuvo efecto sobre la afinidad hacia el quinol. Sorpresivamente, la desprotonación de este residuo incrementó la afinidad hacia la quinona en casi tres veces, lo cual no puede deberse a la formación de un puente de hidrógeno. Por lo tanto, la unión del sustrato y el producto dependen mayormente de la conformación del sitio Q_o , determinada principalmente por residuos hidrofóbicos del citocromo *b*, y de la interacción con el glutámico 272 (en especial en el caso de la quinona). Además, la conformación de la proteína fierro-azufre parece variar en función del estado de protonación de las histidinas que unen al centro redox, lo cual puede influir en la conformación del sitio Q_o a través de la interacción que transitoriamente establece el dominio extramembranal de la proteína fierro-azufre con el citocromo *b*.

Este trabajo se publicó en el *European Journal of Biochemistry*, y se reproduce a continuación.

Role of protonatable groups of bovine heart bc_1 complex in ubiquinol binding and oxidation

Raúl Covián and Rafael Moreno-Sánchez

Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, México

The pH dependence of the initial reaction rate catalyzed by the isolated bovine heart ubiquinol-cytochrome *c* reductase (bc_1 complex) varying decylbenzoquinol (DBH) and decylbenzoquinone (DB) concentrations was determined. The affinity for DBH was increased threefold by the protonation of a group with $pK_a = 5.7 \pm 0.2$, while the inhibition constant (K_i) for DB decreased 22 and 2.8 times when groups with $pK_a = 5.2 \pm 0.6$ and 7.7 ± 0.2 , respectively, were protonated. This suggests stabilization of the protonated form of the acidic group by DBH binding. Initial rates were best fitted to a kinetic model involving three protonatable groups. The protonation of the $pK_a \approx 5.7$ group blocked catalysis, indicating its role in proton transfer. The kinetic model assumed that the deprotonation of two

groups (pK_a values of 7.5 ± 0.03 and ≈ 9.2) decreases the catalytic rate by diminishing the redox potential of the iron-sulfur (Fe-S) cluster. The protonation of the $pK_a \approx 7.5$ group also decreased the reaction rate by 80–86%, suggesting its role as acceptor of a proton from ubiquinol. The lack of effect on the K_m for DBH when the pK_a 7.5–7.7 group is deprotonated suggests that hydrogen bonding to this residue is not the main factor that determines substrate binding to the Q_o site. The possible relationship of the pK_a 5.2–5.7 and pK_a 7.5–7.7 groups with Glu272 of cytochrome *b* and His161 of the Fe-S protein is discussed.

Keywords: cytochrome bc_1 complex; proton transfer; ubiquinol; Q_o site.

The cytochrome bc_1 complex catalyzes electron transfer from ubiquinol to cytochrome *c* coupled to proton translocation. In the Q-cycle mechanism [1], the two electrons derived from ubiquinol oxidation in the Q_o site follow different routes within the complex. One electron is transferred to cytochrome *c* through the Fe-S cluster of the Rieske protein and the heme group of cytochrome c_1 , while the second electron reduces a ubiquinone molecule in the Q_i site after reduction of hemes b_L and b_H of cytochrome *b*. Crystallographic structures [2–5] show that at least 14 residues in the Q_o site establish interactions with stigmatellin, an inhibitor of ubiquinol oxidation that is supposed to occupy the position where ubiquinol binds, and that stabilizes the soluble domain of the Rieske protein in a position where the Fe-S cluster is close to the inhibitor. His161 of the Rieske protein and Glu272 of cytochrome *b* are the only residues that establish hydrogen bonds with stigmatellin. By structural analogy, His161 and Glu272 have been proposed to also bind ubiquinol, accepting the two protons released from substrate oxidation [6].

His161, together with His141, are ligands of the Fe-S cluster and are located in the tip of the Rieske protein. The pH dependence of the Fe-S cluster redox midpoint potential involves two groups with pK_a values of ≈ 7.6 and 9.2, which

are probably His161 and His141, respectively [7,8]. Steady state measurements of the rate of ubiquinol-cytochrome *c* reduction at different pH values in yeast and bovine heart bc_1 complex [9], and in the chloroplast counterpart, the b_6f complex [10], have revealed that the protonation of a group with a pK_a value of ≈ 6.5 abolishes the reaction. Pre-steady state determination of the rate of ubiquinol oxidation in the bc_1 complex from *Rhodobacter sphaeroides* yielded a similar pH profile [11], indicating that the residue with the pK_a value of 6.5 belongs to the Q_o site. To explain the last results, one proposal states that His161 is stabilized in its deprotonated form by hydrogen bonding to one of the hydroxyl groups of ubiquinol [11]. In this mechanism, His161 would have an apparent pK_a value of 6.5 at saturating ubiquinol concentrations [9–11], which is over one unit lower than the pK_a of ≈ 7.6 obtained through redox potential determinations in the absence of substrate [7,8]. In consequence, if the affinity for protons of His161 increases > 10-fold when ubiquinol binds to the Q_o site, then the affinity of the bc_1 complex for ubiquinol should also decrease by the same magnitude when His161 is changed from the fully dissociated to the protonated state. This would also imply that the single hydrogen bond with His161 is considerably stronger than the sum of the ≈ 12 hydrophobic interactions and the hydrogen bond with Glu272 that ubiquinol (by analogy with stigmatellin) establishes with cytochrome *b* residues lining the Q_o site [5]. However, there are no kinetic studies that show that the pK_a value of 6.5 in the ubiquinol-saturated enzyme progressively shifts towards the value of 7.6 of the free enzyme by decreasing the substrate concentration. Neither is there functional evidence showing that His161 of the Rieske subunit and Glu272 of cytochrome *b* must be deprotonated in order to allow ubiquinol oxidation to proceed. Such data would strongly support the proposed roles of these residues as primary proton acceptors and substrate ligands.

Correspondence to R. Covián, Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Juan Badiano 1, Col. Sección XVI, Tlalpan 14080, México, D.F. Mexico. Fax: + 52 5 573 0926.

Tel.: + 52 5 573 2911 ext. 1422.

E-mail: covianraul@correo.unam.mx

Abbreviations: DBH, decylbenzoquinol; DB, decylbenzoquinone;

MOA, methoxyacrylate.

Enzymes: ubiquinol-cytochrome *c* reductase (EC 1.10.2.2).

(Received 23 May 2001, revised 5 September 2001, accepted

17 September 2001)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

In the present work, we studied the effect of the protonation state of bovine heart bc_1 complex residues on the affinity of the isolated enzyme for short-chain ubiquinol and ubiquinone analogues, and their contribution to the catalytic rate. Our results indicate that, when the pH dependence of the redox potential of the Fe-S cluster is considered, the protonation of a group with a pK_a value of 7.5–7.7 (identical to that of His161) sharply decreases catalysis and diminishes ubiquinone binding affinity, without affecting the affinity for ubiquinol. In addition, we found that the protonation of an acidic group with pK_a of 5.2–5.7 abolishes catalysis and is stabilized by ubiquinol and (more importantly) by ubiquinone binding; this residue is likely Glu272.

MATERIALS AND METHODS

DB, horse heart cytochrome c , antimycin and Tween-20 were purchased from Sigma Chemical Co. β -D-Laurylmaltoside was from Boehringer-Mannheim, DEAE-Bio Gel A from Bio-Rad, and stigmatellin from Fluka. All other chemicals of analytical grade were from standard suppliers.

Isolation of the bc_1 complex

Bovine heart mitochondria were prepared by differential centrifugation after mechanical disruption of minced heart in a blender. The bc_1 complex was purified by anionic exchange chromatography as described by Ljungdahl *et al.* [12], using DEAE-Bio Gel A. The enzyme ($3\text{--}16\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) was stored in 50% (v/v) glycerol and 0.01% β -D-laurylmaltoside at -70°C . Concentrations of 7.1–7.6 and 3.6–4.1 $\text{nmol}\cdot\text{mg protein}^{-1}$ of hemes b and c_1 , respectively, were determined spectrophotometrically using extinction coefficients of 28.5 for heme b [13] and $17.5\text{ mm}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ for heme c_1 [14]. Contaminating cytochrome c oxidase activity was not found in the preparations.

Initial rate assays at different pH values

Purified bc_1 complex was diluted to a concentration of $1\ \mu\text{M}$ cytochrome c_1 in a buffer containing 50 mM Tris/HCl (pH 8.0), 0.01% (v/v) Tween-20 and 50% (v/v) glycerol and incubated for 2 h before use to eliminate excess of β -D-laurylmaltoside; this increased the activity threefold. The initial rate of reduction of 30 μM horse heart cytochrome c ($\epsilon = 19.1\text{ mm}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ at 550–540 nm) was measured at 30°C using a double beam SLM-Aminco DW-2000 spectrophotometer (scanning speed of 1 point per 0.18 s). The assay medium contained 0.01% Tween-20, 1 mM EGTA, and 20 mM each of the following buffers: citric acid (pK_{a2} 4.8 and pK_{a3} 6.8), Mes (pK_a 6.1), HEPES (pK_a 7.5), and Tris (pK_a 8.4). The pH of the solution was adjusted with KOH from 5 to 9.5 with intervals of 0.25 units. DBH was obtained from DB as described by Trumpower and Edwards [15] and added from an ethanolic solution of 56.8 mM. Nonenzymic activity was determined in the presence of cytochrome c and DBH under each condition for ≈ 30 s before adding 0.5–5 nM of bc_1 complex, and subtracted from the total rate. This nonenzymic rate was negligible below pH 7, but comprised over 30% of the total rate at pH values above 9.5. For product inhibition determinations, five different fixed concentrations

of DB were added from a 10 mM ethanolic solution at variable DBH concentrations. The addition of the bc_1 complex immediately before recording the initial rate prevented the problem of correcting for pH-induced denaturation of the bc_1 complex, which was significant below pH 6. Initial rates were linear for at least 5 s (30 points) and over 95% inhibited by $1\ \mu\text{M}$ of antimycin or stigmatellin at each pH value. The bc_1 complex activity was stable for up to 3.5 h. Data were plotted and fitted using the program ORIGIN 5.0 (OriginLab Corp.).

The UV spectrum maxima of DBH (289 nm) and DB (278 nm) up to concentrations of 120 μM and 50 μM , respectively, did not change in the different pH solutions. This indicated that the two compounds were completely soluble at all concentrations and pH values used, as a 4-nm red shift of the spectral maxima would indicate the formation of multimeric ubiquinol/ubiquinone aggregates [16]. DBH and DB were assumed to be present in mixed micelles of Tween-20, as the concentration of the detergent in the assays (90 μM) is above its critical micelle concentration (60 μM), which is insensitive to pH and ionic strength [17].

RESULTS

Protonatable groups involved in DBH and DB binding

The effect of pH on the initial ubiquinol-cytochrome c reduction rate catalyzed by the isolated bovine heart bc_1 complex was determined at variable DBH concentrations and different fixed DB concentrations. Representative experiments at four pH values where changes in the rate and affinities toward DBH and DB were more evident are shown in Fig. 1. Under the conditions used, the difference of ≈ 200 mV between the redox potentials of ubiquinol and the Fe-S cluster makes DBH oxidation an essentially irreversible reaction. The inhibition of ubiquinol oxidation by DB was fitted to the following simple competitive inhibition equation:

$$\frac{v}{[E]_i} = \frac{k_{cat}[S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + [S]} \quad (1)$$

$[E]_i$ is the total enzyme concentration, k_{cat} is the catalytic constant of the reaction, and K_m is the Michaelis-Menten constant for DBH, which is not necessarily equal to the dissociation constant (K_d) of the DBH-enzyme complex (K_s), unless the value of k_{cat} is much smaller than the release rate constant of DBH from the enzyme. K_i is the inhibition constant of the inhibitor, corresponding in this case to the K_d of the DB-enzyme complex because of the irreversibility assumption. Using mixed or noncompetitive inhibition models resulted in poor fitting. The derived K_m and K_i values obtained were plotted as a function of pH (Fig. 2). The variation in K_m or K_i was fitted to the following equation for an enzyme with two protonatable groups that affect substrate binding:

$$K_{obs} = K \left(\frac{1 + \frac{[H^+]}{K_{a1}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a1}K_{a2}}}{1 + \frac{[H^+]}{\alpha K_{a1}} + \frac{[H^+]^2}{\alpha \gamma K_{a1}K_{a2}}} \right) \quad (2)$$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

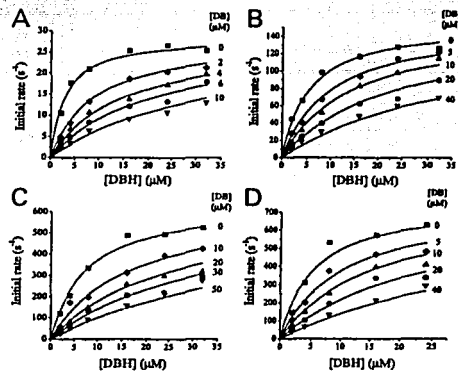


Fig. 1. Competitive inhibition of DBH-cytochrome *c* reductase activity by DB at different pH values. Representative experiments at pH 5.25 (A), 6.25 (B), 7.25 (C), and 9 (D) were fitted to Eqn (1) (solid lines). Parameters with standard error of the fitting are: (A) $k_{cat} = 28.6 \pm 0.62 \text{ s}^{-1}$, $K_m = 2.84 \pm 0.3 \text{ }\mu\text{M}$, $K_i = 0.94 \pm 0.09 \text{ }\mu\text{M}$; (B) $k_{cat} = 155.7 \pm 3.6 \text{ s}^{-1}$, $K_m = 5.34 \pm 0.45 \text{ }\mu\text{M}$, $K_i = 6 \pm 0.5 \text{ }\mu\text{M}$; (C) $k_{cat} = 655.9 \pm 26.8 \text{ s}^{-1}$, $K_m = 7.6 \pm 0.9 \text{ }\mu\text{M}$, $K_i = 8.1 \pm 0.8 \text{ }\mu\text{M}$; (D) $k_{cat} = 756.7 \pm 39.5 \text{ s}^{-1}$, $K_m = 5.4 \pm 0.9 \text{ }\mu\text{M}$, $K_i = 5.5 \pm 0.8 \text{ }\mu\text{M}$.

K_{obs} is the apparent K_m (Fig. 2A) or K_i (Fig. 2B) value obtained at each pH, K is the K_m or K_i value when both protonatable groups are deprotonated (reference state), α and γ are the factors modifying K when the respective protonatable groups with proton dissociation constants K_{a1} and K_{a2} are protonated.

$K_{m,obs}$ changed slightly above pH 9 and markedly below pH 7 (Fig. 2A). It was necessary to fix the value of pK_{a1} to 9.2 during the fitting process (Table 1) in order to avoid excessive error in the determination of this parameter caused by the lack of data points beyond pH 9.5. The protonation of this group decreased the affinity for DBH by only 60% ($\alpha = 1.6$, Table 1), changing $K_{m,obs}$ from 6.7 μM at pH 9.5 to 9.5 μM at pH 8. In contrast, a threefold increase in the affinity for DBH ($\gamma = 0.3$) was found when a residue with $pK_{a2} = 5.7$ became protonated. There was no change in the affinity for DBH between pH 7 and 9. The pH profile of DB binding (Fig. 2B) showed that the protonation of a group with a pK_{a1} of 7.7 decreased the affinity of the *bc₁* complex for DB almost threefold ($\alpha = 2.8$), while that of a group with $pK_{a2} \approx 5.2$ increased DB binding affinity over 20-fold ($\gamma = 0.045$).

Protonatable groups involved in catalysis

Initial velocities obtained from varying DBH concentrations as a function of pH were fitted to two different kinetic models (Schemes 1 and 2). As previously explained, the substrate dissociation constant (K_s) shown in the schemes is not necessarily equal to the K_m values obtained experimentally, although it is included in the definition of K_m , together with k_{cat} . In both models, the catalytic constant (k_{cat}) of the

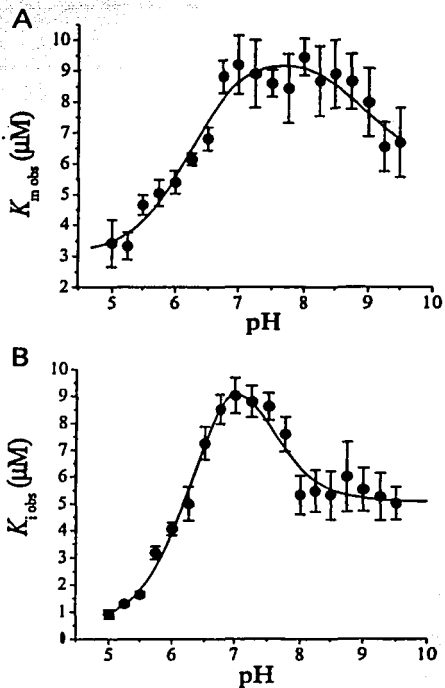


Fig. 2. Effect of pH on the affinity for DBH (A) and DB (B). $K_{m,obs}$ and $K_{i,obs}$ values were obtained by fitting the average of 3–5 separate experiments at each proton concentration to Eqn (1) as shown in Fig. 1. The error bars are the standard error of each fitting. The solid line represents the best fit to Eqn (2). See Table 1 for fixed and fitted values.

reaction is considered to decrease when the redox potential (E_m) of the Fe–S cluster is lowered by the deprotonation of two groups [7,11]. This effect is defined by the following two equations:

$$\Delta k_{cat} = k_{cat}(10^{m\Delta E_m}) \tag{3}$$

$$\Delta E_m = \frac{RT}{F} \left[\ln \left(\frac{[H^+]^2}{([H^+]^2 + K_{a2}[H^+] + K_{a1}K_{a2})} \right) \right] \tag{4}$$

where the proportionality constant m represents the slope of the line in the $\log k_{cat}$ vs ΔE_m plot [11].

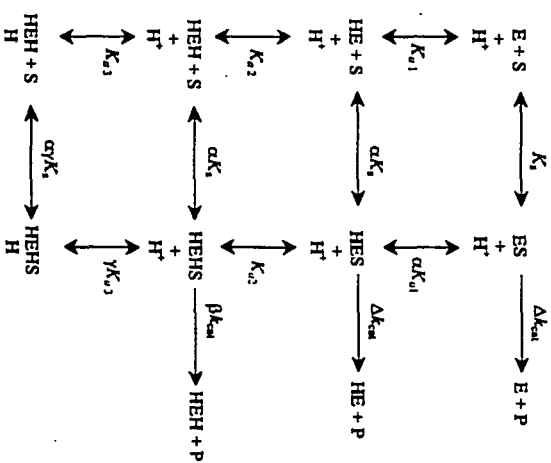
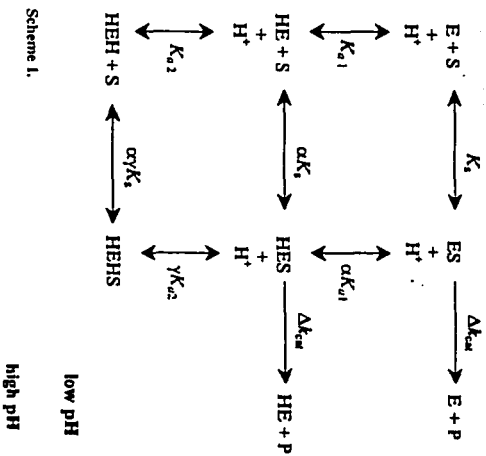
The first kinetic model (Scheme 1) includes only two protonatable groups, and assumes that the residue corresponding to pK_{a2} completely blocks catalysis in the protonated state. In their deprotonated forms, both residues lower k_{cat} according to Eqns (3) and (4). The equation

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Table 1. Values derived from data fitting in Figs 2,3 and 4. Values \pm SE

Figure (equation)	k_{cat} (s^{-1}) or k_{cat}/K_m ($s^{-1}\mu M^{-1}$)	m (mV^{-1})	β	K_m or K_i (μM)	pK_{a1}	α	pK_{a2}	γ	pK_{a3}
2A (2)	-	-	-	5.9 ± 0.4	9.2^a	1.6 ± 0.1	5.7 ± 0.2	0.32 ± 0.04	-
2B (2)	-	-	-	5.1 ± 0.2	7.7 ± 0.2	2.8 ± 0.4	5.2 ± 0.6	0.045 ± 0.02	-
3A (5)	1813 ± 127	0.0029 ± 0.0002	-	6.5 ± 0.6	9.2^a	1.6^a	7.1 ± 0.06	0.66 ± 0.16	-
3C (6)	1866 ± 55	0.0038 ± 0.0001	0.14 ± 0.01	6.2 ± 0.3	9.2^a	1.6^a	7.5 ± 0.03	0.32^a	5.7^a
4A (9)	1658 ± 256	0.0033 ± 0.0005	-	-	9.0^{ab}	-	7.05 ± 0.12^c	-	-
4A (10)	1570 ± 156	0.0033 ± 0.0003	0.17 ± 0.04	-	9.0^{ab}	-	7.5^a	-	6.23 ± 0.14^d
4B (15)	270 ± 42	0.003^a	-	-	9.2^a	1.6^a	6.75 ± 0.07	-	-
4B (16)	250 ± 58	0.003^a	0.2 ± 0.09	-	9.2^a	1.6^a	7.52 ± 0.07	-	5.8 ± 0.18

^a Fixed values. ^b Value corresponds to pK_{a1} . ^c Value corresponds to pK_{a2} . ^d Value corresponds to pK_{a3} .



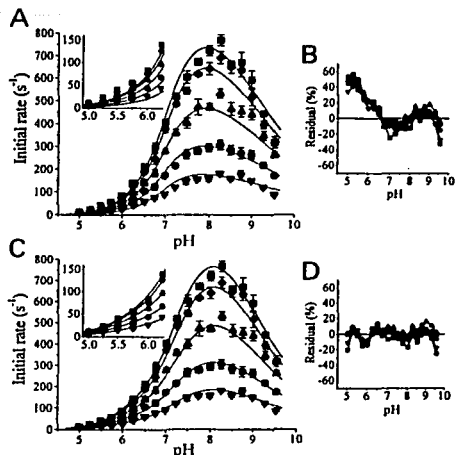


Fig. 3. pH dependence of initial rates of cytochrome *c* reduction varying DBH concentration. The averages of 4–5 separate experiments with their corresponding standard error were fitted to Eqn (5) (A) or Eqn (6) (C). The inset in each figure shows the experimental points and fitted curves in the pH 5–6.5 region. The solid lines are the best fit for each of the DBH concentrations used: 2 (▼), 4 (●), 8 (▲), 16 (◆) and 24 (■) μM. See Table 1 for values. (B) Residual plot of the fit shown in A. (D) Residual plot of the fit shown in C.

derived from the model in Scheme 1 is:

$$\frac{v}{[E]_t} = \frac{\Delta k_{cat}[S] \left(1 + \frac{[H^+]}{\alpha K_{a1}} \right)}{K_m \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{a1}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a1}K_{a2}} \right) + [S] \left(1 + \frac{[H^+]}{\alpha K_{a1}} + \frac{[H^+]^2}{\alpha \gamma K_{a1}K_{a2}} \right)} \quad (5)$$

data fitting to Eqn (5) (Fig. 3A, Table 1) resulted in a $pK_{a2} = 7.07$ that increased the affinity for DBH by only 33% ($\gamma = 0.66$). These values were different from those obtained from the analysis of the pH dependence of K_m ($pK_{a2} = 5.7$ and $\gamma = 0.32$; Fig. 2A). In Fig. 3A, pK_{a1} had to be fixed to 9.2 and α to 1.6; otherwise, pK_{a1} became ≈ 8 and $\alpha > 10$, inconsistent with the data shown in Fig. 2A. Fitting

$$\frac{v}{[E]_t} = \frac{\Delta k_{cat}[S] \left(1 + \frac{[H^+]}{\alpha K_{a1}} \right) + k_{cat}[S] \left(\frac{\beta [H^+]^2}{\alpha K_{a1}K_{a2}} \right)}{K_m \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{a1}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a1}K_{a2}} + \frac{[H^+]^3}{K_{a1}K_{a2}K_{a3}} \right) + [S] \left(1 + \frac{[H^+]}{\alpha K_{a1}} + \frac{[H^+]^2}{\alpha K_{a1}K_{a2}} + \frac{[H^+]^3}{\alpha \gamma K_{a1}K_{a2}K_{a3}} \right)} \quad (6)$$

to Eqn (5) was poor in the pH range 5–6.5 (Fig. 3A, inset), showing a systematic deviation of the simulated curves from the data points; this is clearly evident in a residual plot (Fig. 3B). Consequently, the kinetic model of Scheme 1 was modified by the addition of another protonatable group, as

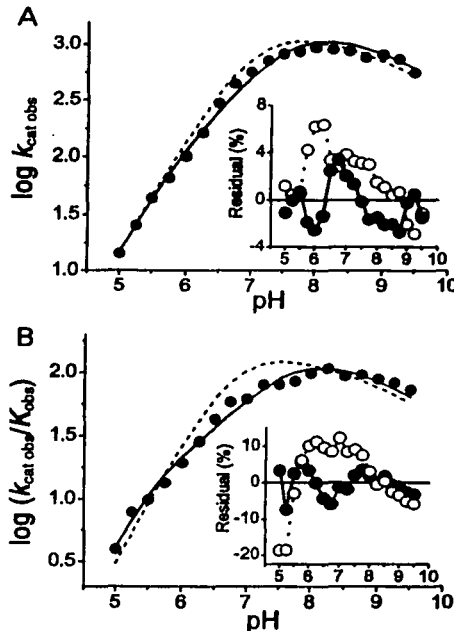


Fig. 4. Dixon-Webb plots of initial rates of cytochrome *c* reduction. The $\log k_{cat\ obs}$ plot (A) was fitted to Eqn (7) (dashed line) and Eqn (8) (solid line). The inset shows the residual plot of both fits (dashed line, open circles and solid line, solid circles, respectively). The $\log (k_{cat\ obs}/K_{m\ obs})$ plot (B) was fitted to Eqn (9) (dashed line) and Eqn (10) (solid line), with their respective residual plots shown in the inset (dashed line, open circles and solid line, solid circles). See Table 1 for fixed and fitted values. $k_{cat\ obs}$ and $K_{m\ obs}$ were calculated by fitting the data shown in Fig. 3 for each pH to the Michaelis–Menten equation.

shown in Scheme 2. This model implies that the third (more acidic) group can become evident because the deprotonation of the pK_{a2} group does not completely block catalysis. This property is expressed by the β factor, which is assumed to have a value > 0 and modifies k_{cat} . The equation for this three pK_a model is:

Figure 3C shows the best fit to Eqn (6). The values of some parameters were maintained constant according to the results shown in Fig. 2A (Table 1). pK_{a1} was fixed to 9.2 and α to 1.6 because their variation caused excessive error in their values, which nevertheless oscillated around 9.1 and 2,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

respectively. It was also necessary to fix the values of pK_{a3} (5.7) and γ (0.32) because their codependence with pK_{a2} and β increased considerably the error in all four parameters. After this reduction in the number of variable parameters, the fitting revealed a group with $pK_{a2} = 7.5$ that strongly decreased k_{cat} , although not completely ($\beta = 0.14$), as was expected from the model (Scheme 2). The addition of a substrate interaction factor for the pK_{a2} group in Eqn (6) did not alter the quality of the fit, as its value was ≈ 1 , in agreement with the lack of change in K_m around pH 7.5 (Fig. 1A). The inclusion of the pK_{a3} group with its γ interaction factor resulted in a good fit of the initial rates in the acidic pH range (Fig. 3C, inset), resulting in a more homogeneous distribution of data points around the theoretical curves (Fig. 3D). Protonation of the pK_{a3} group completely blocked catalysis.

The presence of two groups that decrease catalysis in their protonated forms also became evident in the Dixon-Webb plots [18] shown in Fig. 4. The values of $k_{cat\ obs}$ and $K_m\ obs$ correspond to the constants calculated at each pH using the data in Fig. 2A. The $\log k_{cat\ obs}$ plot (Fig. 4A) can be used to calculate the apparent pK_a values of protonatable groups in the presence of saturating substrate concentration [18]. The definition of $k_{cat\ obs}$ derived from Eqn (5) (two pK_a model) is:

$$k_{cat\ obs} = \frac{\Delta k_{cat} \left(1 + \frac{[H^+]}{\alpha K_{a1}}\right)}{1 + \frac{[H^+]}{\alpha K_{a1}} + \frac{[H^+]^2}{\alpha \gamma K_{a1} K_{a2}}} \quad (7)$$

Using Eqn (6) (three pK_a model), $k_{cat\ obs}$ is defined as:

$$k_{cat\ obs} = \frac{\Delta k_{cat} \left(1 + \frac{[H^+]}{\alpha K_{a1}}\right) + k_{cat} \left(\frac{\beta [H^+]^2}{\alpha K_{a1} K_{a2}}\right)}{1 + \frac{[H^+]}{\alpha K_{a1}} + \frac{[H^+]^2}{\alpha K_{a1} K_{a2}} + \frac{[H^+]^3}{\alpha \gamma K_{a1} K_{a2} K_{a3}}} \quad (8)$$

The logarithmic forms of Eqns (7) and (8) are:

$$\log k_{cat\ obs} = \log \left[\Delta k_{cat} \left(1 + \frac{[H^+]}{\alpha K_{a1}}\right) \right] - \log \left(1 + \frac{[H^+]}{\alpha K_{a1}} + \frac{[H^+]^2}{\alpha \gamma K_{a1} K_{a2}} \right) \quad (9)$$

$$\log k_{cat\ obs} = \log \left[\Delta k_{cat} \left(1 + \frac{[H^+]}{\alpha K_{a1}}\right) + k_{cat} \left(\frac{\beta [H^+]^2}{\alpha K_{a1} K_{a2}}\right) \right] - \log \left(1 + \frac{[H^+]}{\alpha K_{a1}} + \frac{[H^+]^2}{\alpha K_{a1} K_{a2}} + \frac{[H^+]^3}{\alpha \gamma K_{a1} K_{a2} K_{a3}} \right) \quad (10)$$

Although the fitting to Eqns (9) and (10) yielded curves which were close to each other (Fig. 4), the residual plot (Fig. 4A, inset) showed that the two pK_a model (Eqn 9) resulted in a systematic deviation from the data points which peaked around pH 6. In contrast, the three pK_a model curve (Eqn 10) was more homogeneously distributed around the experimental points. The pK_{a3} value obtained of 6.23 (Table 1) agreed with the values of $pK_a = 5.7$ and $\gamma = 0.32$ calculated from Fig. 2A. The value of 0.17 for β was also close to the one obtained from Fig. 3C. The pK_{a2} value had

to be fixed to 7.5 to avoid excessive error in the fitting, but its value oscillated between 7.4 and 7.6.

The true pK_a values (in the absence of substrate) can be obtained by plotting the $\log (k_{cat\ obs}/K_m\ obs)$ values against pH [18] (Fig. 4B). $K_m\ obs$ is defined using equations 5 and 6 for the two pK_a or three pK_a models, respectively, as follows:

$$K_m\ obs = K_m \left(\frac{1 + \frac{[H^+]}{K_{a1}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a1} K_{a2}}}{1 + \frac{[H^+]}{\alpha K_{a1}} + \frac{[H^+]^2}{\alpha \gamma K_{a1} K_{a2}}} \right) \quad (11)$$

$$K_m\ obs = K_m \left(\frac{1 + \frac{[H^+]}{K_{a1}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a1} K_{a2}} + \frac{[H^+]^3}{K_{a1} K_{a2} K_{a3}}}{1 + \frac{[H^+]}{\alpha K_{a1}} + \frac{[H^+]^2}{\alpha K_{a1} K_{a2}} + \frac{[H^+]^3}{\alpha \gamma K_{a1} K_{a2} K_{a3}}} \right) \quad (12)$$

Using the definitions of $k_{cat\ obs}$ in Eqns (7) and (8), the catalytic efficiency ($k_{cat\ obs}/K_m\ obs$) for each model is expressed as:

$$\frac{k_{cat\ obs}}{K_m\ obs} = \frac{\Delta k_{cat}}{K_m} \left(\frac{1 + \frac{[H^+]}{\alpha K_{a1}}}{1 + \frac{[H^+]}{K_{a1}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a1} K_{a2}}} \right) \quad (13)$$

$$\frac{k_{cat\ obs}}{K_m\ obs} = \frac{\Delta k_{cat} \left(1 + \frac{[H^+]}{\alpha K_{a1}}\right) + k_{cat} \left(\frac{\beta [H^+]^2}{\alpha K_{a1} K_{a2}}\right)}{K_m \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{a1}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a1} K_{a2}} + \frac{[H^+]^3}{K_{a1} K_{a2} K_{a3}}\right)} \quad (14)$$

Taking logarithms of both equations:

$$\log \left(\frac{k_{cat\ obs}}{K_m\ obs} \right) = \log \left[\frac{\Delta k_{cat}}{K_m} \left(1 + \frac{[H^+]}{\alpha K_{a1}}\right) \right] - \log \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{a1}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a1} K_{a2}} \right) \quad (15)$$

$$\log \left(\frac{k_{cat\ obs}}{K_m\ obs} \right) = \log \left[\frac{\Delta k_{cat}}{K_m} \left(1 + \frac{[H^+]}{\alpha K_{a1}}\right) + \frac{k_{cat}}{K_m} \left(\frac{\beta [H^+]^2}{\alpha K_{a1} K_{a2}}\right) \right] - \log \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{a1}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a1} K_{a2}} + \frac{[H^+]^3}{K_{a1} K_{a2} K_{a3}} \right) \quad (16)$$

The biphasic behaviour of the curve in the acidic pH range is more clearly visible in this $\log (k_{cat\ obs}/K_m\ obs)$ plot, where only the lowest pH values yielded a straight line with a slope of 1 (Fig. 4B). Fitting to Eqn (16) (three pK_a model) resulted in values almost identical to the ones calculated in Figs 2A and 3C ($pK_{a2} = 7.52$, $pK_{a3} = 5.8$, $\beta = 0.2$; Table 1). The two pK_a model (Eqn 15) could not account for the decrease in the slope of the curve between pH 6 and 7, significantly deviating from the experimental data (Fig. 4B, inset).

DISCUSSION

Our results show that catalysis by the bc_1 complex occurs only when a residue with $pK_a \approx 5.7$ is deprotonated. The effect of the protonation state of this residue was observed in

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ubiquinol/ubiquinone binding (Fig. 1) and in catalysis (Fig. 3). The increased affinity towards ubiquinol resulting from the protonation of this residue cannot be explained by stabilization of the ligand through a hydrogen bond. Instead, there are two possible interpretations for the decrease in the K_m value when this residue is protonated. First, as k_{cat} is included in the definition of K_m , the lowering of the catalytic rate when this group is progressively protonated could diminish K_m in a manner independent of the K_d for DBH. Although the rapid equilibration of DBH was not examined in this work, comparison of Figs 2A and 3A,C show that between pH 6.75 and 8.75 the value of K_m was almost constant, while k_{cat} changed over twofold. This suggests that the contribution of k_{cat} to the value of K_m is small.

The second interpretation is that the protonated form of this residue is probably stabilized upon binding of a ligand to the domain distal to heme *b*_L in the Q_o site. The preferential protonation of this residue when the substrate is bound would displace the equilibrium constant K_s , included in the definition of K_m , towards the formation of the DBH-enzyme complex at low pH values. Dixon-Webb plots (Fig. 4) show that this residue has an apparent pK_a ($p\gamma K_a$) of ≈ 6.2 when ubiquinol concentration is saturating, which is not far from the values found in previous kinetic studies of the effect of pH on *bc*₁/*b*_L/*f* complex catalysis [9–11], where only one protonatable group in the acidic pH range was assumed. Regarding the identity of this acidic residue, crystal structures [5,19] have shown that in the presence of stigmatellin, an inhibitor that binds to the domain of the Q_o site which is closest to the Fe-S cluster [2,4,5], Glu272 of cytochrome *b* is oriented towards the hydrophobic pocket of the Q_o site. In contrast, in the inhibitor-free crystal structure, Glu272 is rotated towards a channel accessible to the aqueous medium which contains crystallographic water molecules. Hence, it is conceivable that ubiquinol binding has an effect similar to that induced by stigmatellin on the orientation of Glu272, shifting its carboxylate to a less polar environment, thereby increasing its affinity for protons. This movement of Glu272, together with its shift to a higher pK_a value, would favour the deprotonation and oxidation of semiubiquinone, which has a pK_a value of 4.9 in aprotic solvents [20]. After the distal domain of the Q_o site is abandoned by the oxidized ubiquinone, Glu272 would move towards the hydrophilic channel where it would lose affinity for the proton, releasing it to the medium. The role of this residue as a primary proton acceptor is supported by the observation that its protonation completely inhibits catalysis (Scheme 2, Fig. 3C).

In the case of ubiquinone, the stabilization of the protonated Glu272 could be amplified by the possible formation of a hydrogen bond between one of the carbonyl groups of the ligand and the protonated carboxyl group [6]. This interpretation explains the larger increase in the affinity for DB than for DBH upon protonation of the pK_a 5.2–5.7 residue (Fig. 2). Nevertheless, DB can still bind to the Q_o site when this group is deprotonated, explaining why the characteristic EPR spectra signal between ubiquinone and the Fe-S cluster is still visible when this residue is mutated to a nonacidic residue [6].

The affinity of the *bc*₁ complex towards ubiquinol has been proposed to be much higher than for ubiquinone, based on the finding that a 30% reduction level of the ubiquinone pool results in maximal activity of ubiquinol oxidation [11]. In contrast, the K_m and K_i values shown in Fig. 2 were

similar, particularly above pH 6. However, these values are referred to added concentrations of DBH and DB, without considering the actual concentrations of these compounds accessible to the enzyme in the detergent micelles. As ubiquinol is less hydrophobic than ubiquinone [16], a higher concentration of DB than of DBH is expected to be available to the enzyme at the same added amount of both compounds. This would support the proposal that ubiquinol binds to the Q_o site with a higher affinity than ubiquinone [11]. Nevertheless, pH does not influence the solubility of DBH and DB [16], so the changes in K_m and K_i reported can not be attributed to different partition coefficients of these compounds between the aqueous and detergent phases at different proton concentrations; instead, these changes can only be attributed to the protonation states of residues in the *bc*₁ complex.

The group with $pK_a = 7.5$ –7.7 may be identified as His161 of the Rieske protein because of the similar pK_a value determined in redox studies of the Fe-S cluster [7,8] and the one kinetically determined in this work. The pH dependence of the catalytic rate yielded such a pK_a value only when the modification of the E_m value of the Fe-S cluster by the protonation state of residues in the Rieske protein was taken into account [7]; this is further evidence that this residue is His161. The 86% decrease in the catalytic rate when the residue with $pK_a = 7.5$ is protonated supports the proposed role of His161 as the acceptor of one of the protons released when ubiquinol is oxidized [6]. However, the residual activity (14–20%; β -values in Table 1) suggests the existence of other, less efficient pathways for proton transfer.

An essential protonatable group in cytochrome *b* with $pK_a \approx 7.2$ has been reported, which constitutes a high affinity binding site for zinc ions in bovine heart *bc*₁ complex [21]. Furthermore, crystal structures of the chicken heart complex have allowed to identify several cytochrome *b* histidines located in the aqueous channel leading to the positive side of the membrane as possible ligands for zinc ions [22]. We also fitted the experimental data shown in Fig. 3A,C to a three pK_a group equation in which the pH dependence of the Fe-S cluster redox potential and its effect on k_{cat} were not included. Such equation assumed that the deprotonation of the group corresponding to pK_{a1} completely abolishes catalysis. The quality of the fitting to this last model (not shown) was similar to that using the model in Scheme 2, resulting in a pK_{a2} of 7.1, similar to the value obtained from zinc inhibition studies [21]. Nevertheless, it should be noted that the binding of protons to the zinc high affinity site does not inhibit catalysis; instead, it relieves inhibition by the metal ion [21], indicating that the protonation state of the residues involved in this site does not affect catalysis *per se*. The evidence that mutations in the Rieske protein that alter the redox potential of the Fe-S cluster change the pH profile and the maximal rate of ubiquinol oxidation [6,11] argues in favour of assigning the identity of the pK_a 7.5 and 9.2 groups to residues in the Rieske protein, most probably to His161 and His141, respectively [23]. The values of 0.0033–0.0038 mV^{-1} obtained for the change of k_{cat} with respect to the E_m of the Fe-S cluster (m -values in Table 1) are close to the 0.0059 mV^{-1} determined experimentally in the yeast *bc*₁ complex with mutations in the Rieske protein [11]. This also supports the inclusion of the Δk_{cat} term defined in Eqn (3) in our kinetic analysis.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

We found that the bc_1 complex was able to bind ubiquinol with an affinity that was independent of the protonation state of the residue with the pK_a value of 7.5–7.7. In consequence, the $pK_a \approx 6.5$ obtained in previous works, using saturating ubiquinol concentrations [9–11], is not due to the preferential binding of ubiquinol to the deprotonated His161 [6,11]; instead, it corresponds to the $pK_a \approx 5.7$ residue which is stabilized in its protonated form by substrate binding, as discussed above. Assuming that the pK_a value of 7.5–7.7 corresponds to His161 of the Rieske protein, the lack of change in substrate affinity upon protonation of this residue indicates that ubiquinol binding is more strongly dependent on interactions with cytochrome b residues that are part of the Q_o site than on the single proposed hydrogen bond between ubiquinol and deprotonated His161 [6,11]. Moreover, the increased affinity of the bc_1 complex towards the ubiquinone product when the residue with pK_a of 7.7 is deprotonated is the opposite to what would be expected from hydrogen bonding to protonated His161 [6]. The binding of methoxyacrylate (MOA) inhibitors, which do not establish interactions with any residue of the Rieske protein [19], is also favoured by the deprotonation of a residue in the Rieske subunit with a pK_a of 7.7 [24]; this suggests that the conformation of the Q_o site is modified by pH-induced changes in the Rieske subunit. Further evidence for this last proposal is our observation that the deprotonation of the group probably corresponding to His141 (pK_a 9.2) slightly increases the affinity for DBH, even though this residue is not in direct contact with any of the Q_o site ligands [2–5]. These intersubunit conformational changes might be transmitted through the residues in the interface between the Rieske subunit and cytochrome b , some of which are part of the ef loop that covers the Q_o site [25].

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially supported by grant 102312 from Programa de Apoyo a Estudiantes de Posgrado de Universidad Nacional Autónoma de México (PAEP-UNAM). The authors thank Dr A. Gómez-Puyou for his suggestions and critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Brandt, U. & Trumpower, B.L. (1994) The proton motive Q cycle in mitochondria and bacteria. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **29**, 165–197.
- Zhang, Z., Huang, L.-S., Shulmeister, V.M., Chi, Y.-I., Kim, K.-K., Hung, L.-W., Crofts, A.R., Berry, E.A. & Kim, S.-H. (1998) Electron transfer by domain movement in cytochrome bc_1 . *Nature* **392**, 677–684.
- Iwata, S., Lee, J.W., Okada, K., Lee, J.K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T.A., Ramaswamy, S. & Jap, B.K. (1998) Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc_1 complex. *Science* **281**, 64–71.
- Kim, H., Xia, D., Yu, C.A., Xia, J.Z., Kuchurin, A.M., Zhang, L., Yu, L. & Deisenhofer, J. (1998) Inhibitor binding changes domain mobility in the iron-sulfur protein of the mitochondrial bc_1 complex from bovine heart. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 8026–8033.
- Hunte, C., Koepke, J., Lange, C., Rossmannith, T. & Michel, H. (2000) Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome bc_1 complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment. *Structure* **8**, 669–684.
- Crofts, A.R., Hong, S., Ugulava, N., Barquera, B., Gennis, R., Guergova-Kuras, M. & Berry, E.A. (1999) Pathways for proton release during ubihydroquinone oxidation by the bc_1 complex. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 10021–10026.
- Link, T.A., Hagen, W.R., Pierik, A.J., Assmann, C. & von Jagow, G. (1992) Determination of the redox properties of the Rieske cluster of bovine heart bc_1 complex by direct electrochemistry of a water-soluble fragment. *Eur. J. Biochem.* **208**, 685–691.
- Link, T.A. (1994) Two pK values of the oxidized Rieske cluster observed by CD spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1185**, 81–84.
- Brandt, U. & Okun, J.G. (1997) Role of deprotonation events in ubihydroquinone: cytochrome c oxidoreductase from bovine heart and yeast mitochondria. *Biochemistry* **36**, 11234–11240.
- Bendall, D.S. (1982) Photosynthetic cytochromes of oxygenic organisms. *Biochim. Biophys. Acta* **683**, 119–151.
- Hong, S., Ugulava, N., Guergova-Kuras, M. & Crofts, A.R. (1999) The energy landscape for ubihydroquinone oxidation at the Q_o site of the bc_1 complex in *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biol. Chem.* **274**, 33931–33944.
- Ljungdahl, P., Pennoyer, J.D. & Trumpower, B.L. (1986) Purification of cytochrome bc_1 complexes from phylogenetically diverse species by a single method. *Methods Enzymol.* **126**, 181–191.
- Berden, J.A. & Slater, E.C. (1970) The reaction of antimycin with a cytochrome b preparation active in reconstitution of the respiratory chain. *Biochim. Biophys. Acta* **216**, 237–249.
- Yu, C.A., Yu, L. & King, T.E. (1972) Preparation and properties of cardiac cytochrome c_1 . *J. Biol. Chem.* **247**, 1012–1019.
- Trumpower, B.L. & Edwards, C.A. (1979) Purification of reconstitutively active iron-sulfur (oxidation factor) from succinate: cytochrome c reductase complex of bovine heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* **254**, 8697–8706.
- Battino, M., Fahmy, T. & Lenaz, G. (1986) Determination of the critical micelle concentration of short-chain ubiquinones in model systems. *Biochim. Biophys. Acta* **851**, 377–384.
- le Maire, M., Champeil, P. & Moller, J.V. (2000) Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim. Biophys. Acta* **1508**, 86–111.
- Tipton, K.F. & Dixon, B.F. (1979) Effects of pH on enzymes. *Methods Enzymol.* **63**, 183–234.
- Crofts, A.R., Barquera, B., Gennis, R.B., Kuras, R., Guergova-Kuras, M. & Berry, E.A. (1999) Mechanism of ubiquinol oxidation by the bc_1 complex: different domains of the quinol binding pocket and their role in mechanism and binding of inhibitors. *Biochemistry* **38**, 15807–15826.
- Rich, P.R. (1984) Electron and proton transfers through quinones and cytochrome bc complexes. *Biochim. Biophys. Acta* **768**, 53–79.
- Link, T.A. & von Jagow, G. (1995) Zinc ions inhibit the Q_p center of bovine heart mitochondrial bc_1 complex by blocking a protonatable group. *J. Biol. Chem.* **270**, 25001–25006.
- Berry, E.A., Zhang, Z., Bellamy, H.D. & Huang, L. (2000) Crystallographic location of two Zn^{2+} -binding sites in the avian cytochrome bc_1 complex. *Biochim. Biophys. Acta* **1459**, 440–448.
- Link, T.A. (1997) The role of the Rieske iron sulfur protein in the hydroquinone oxidation (Q_p) site of the cytochrome bc_1 complex: the 'proton-gated affinity change' mechanism. *FEBS Lett.* **412**, 257–264.
- Brandt, U. & Djafarzadeh-Andabili, R. (1997) Binding of MOA-silbene to the mitochondrial cytochrome bc_1 complex is affected by the protonation state of a redox-Bohr group of the Rieske iron-sulfur protein. *Biochim. Biophys. Acta* **1321**, 238–242.
- Crofts, A.R., Guergova-Kuras, M., Huang, L.S., Kuras, R., Zhang, Z. & Berry, E.A. (1999) Mechanism of ubiquinol oxidation by the bc_1 complex: role of the iron sulfur protein and its mobility. *Biochemistry* **38**, 15791–15806.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

European Journal of Biochemistry

10 July 2001

Dr. Raúl Covián
Departamento de Bioquímica
Instituto Nacional de Cardiología
Juan Badiano 1, Col. Sección XVI
Tlalpan, 14080 Mexico

Fax: 0052 +52 5 573 0926

No. of pages [**3**]

Reference no.: 01-0604

Title: Role of protonatable groups of bovine heart bc1 complex in ubiquinol binding and oxidation

Authors: Raúl Covián, Rafael Moreno-Sánchez

Editor: Westerhoff

Dear Dr. Covián,

Thank you for submitting your paper for publication in the *European Journal of Biochemistry*.

The Editor responsible for the evaluation of your paper considers that it may become acceptable for publication in the Journal if revised according to the referees' reports, copies of which are enclosed. The Editor emphasizes that the authors should take the comments concerning Figure 4 very seriously.

When you return the revised version, please indicate in an accompanying letter the changes you have made or justify your position with respect to the reviewers' comments. This information will be essential for the re-evaluation of the paper. Black vertical lines must be marked in the margins of all copies where alterations have been made or where new information has been added; do not underline in red. You will of course appreciate that no guarantee of acceptance can be given in advance. If accepted, the dates of receipt of both the original and revised papers will be printed.

Please send three copies of the revised version as soon as possible, but within four weeks at the latest, otherwise it will be treated as a new submission. A copy of the revised version must be provided on disk, and all figures should be provided on disk as TIFF or EPS files. Please complete the enclosed file description form. Original photographs should be provided if used in the paper.

Please note that the original manuscript will be returned only on request.

Yours sincerely,

Louise Sanders

Louise Sanders
Editorial Manager

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Encl.: 2 reports, file description form

cc: Editor

Editorial Office: 98 Regent Street
Cambridge
CB2 1DP
UK

Tel: +44 1223 369020
Fax: +44 1223 369090
e-mail: ejb@camfebs.co.uk

66p

Report on 01-0604

Report No. 1

The manuscript by Covián and Moreno-Sánchez reports on careful analysis of the steady-state kinetics of mitochondrial bc_1 complex. The authors derive a consistent kinetic model from their experimental data. They offer a plausible interpretation and assignment of the parameters in the light of previous work and the information available from the molecular structures of the complex. The paper is concisely written and illustration by figures is appropriate.

The authors should consider amending the manuscript according to the following minor comments:

1. Statements in the Summary referring to the assignment of parameters from the kinetic analysis to specific residues of cytochrome *b* should be weakened somewhat to account for the indirect nature of the presented evidence.
2. The dissociation constant of the substrate K_S rather than the more commonly used Michaelis-Menten constant K_M is used in the present study. This is only justified if k_{cat} is assumed to be much smaller than k_{off} . As important aspects of the interpretation are based on changes to K_S , the authors should make clear why they hold this simplification to be justified.
3. pp8: Scheme 1 and 2 were missing from the evaluated copy of the manuscript.

Report No. 2

This paper describes the study of pH effects on the binding and oxidation of ubiquinol by the bc_1 complex. Unfortunately there are a number of problems with the paper and some questions which need to be addressed.

1. The most worrying aspect is the analysis of the data shown in Figure 4. No fitting has been applied to this data; a join-the-dots approach seems to have been adopted. The pKa values determined by extrapolation are said to be different. However, in Fig. 4B my conclusion is that the pKa values are the same (within error). What is actually plotted on the y-axis of Fig. 4B? The figure says $\log k_{cat}/\log K_S$, but on page 11 this is referred to as $\log(k_{cat}/K_S)$ -these are not equivalent.
2. Does the mathematical model assume that substrate binding is rapidly reversible? Might product dissociation not be rate-determining? In which case K_S would not be the same as K_i .
3. Why is the data which would show competitive inhibition not shown?
4. How soluble are the substrates DB/DBH at the different pH values studied-could this be an issue?



August 1st, 2001

Editorial Office
European Journal of Biochemistry
98 Regent Street
Cambridge, CB2 1DP
UK

Reference no.: 01-0604

Title: Role of protonatable groups of bovine heart bc1 complex in ubiquinol binding and oxidation.

Authors: Raúl Covián, Rafael Moreno-Sánchez

Dear Editorial Manager:

Please find enclosed the three copies of the revised version of our paper, together with a floppy disk containing this version (file: 01-0604.doc, Microsoft Word 97) and the four figures and two schemes in EPS format named as indicated in the accompanying file description form. We hope the following corrections made according to the reviewers' comments will be satisfactory and allow the manuscript to be accepted for publication:

Report No.1:

1. The Summary has been modified according to the reviewer's suggestion.
2. K_s has been replaced by K_m throughout the text, explaining the difference between the two terms on pp.7 (last line) and 8 (first 4 lines), and in p. 9 (lines 2-4, first paragraph of the first subtitle). In the first paragraph of the Discussion (p. 15), an explanation of why rapid-equilibrium conditions probably exist in the conditions used has been included.
3. Schemes 1 and 2 have been included in all copies.

Report No. 2:

1. Figure 4 has been modified according to the reviewer's comments. Fitting to equations 9 and 10 (deduced and shown in p. 12) has been applied to figure 4A, and figure 4B was fitted to equations 15 and 16 (deduced in pp. 13,14 and shown in p. 14). The values derived from these fittings have been included in Table 1, and residual plots comparing

the goodness of fit to each equation have been included in both figures as insets. The Y-axis legend in figure 4B has been corrected to $\log (k_{\text{cat obs}}/K_m \text{ obs})$.

2. K_m is now used instead of K_s throughout the text, with additional explanations on pp. 7, 8, and 9 regarding the difference between the two constants. The probability of rapid equilibration of the substrate is explained in the first paragraph of the Discussion (p.15). We believe that the reason why K_m and K_i values appear to be similar is not related to the rapid equilibrium assumed in the mathematical model, but to the relative partition of DBH and DB to the detergent micelles, as discussed in the last paragraph of p. 16.
3. Figure 1 shows the competitive inhibition exerted by DB on DBH oxidation at 4 representative pH values.
4. A paragraph explaining the evidence that indicates that DB/DBH are fully soluble at all pH values in the detergent-containing solutions has been included in Materials and Methods (p. 6, last paragraph). This is also mentioned in the Discussion (lines 7-11 of p. 17). Two references (16 and 17) concerning this issue have been added.

Yours sincerely,



Raúl Covián
Departamento de Bioquímica
Instituto Nacional de Cardiología
Juan Badiano 1, Col. Sección XVI
Tlalpan 14080, México, D.F., Mexico
Phone: +52-5573-2911 ext.1422
Fax: +52-5573-0926
E-mail: covianraul@correo.unam.mx

3.2 La estigmatelina y el mixotiazol se unen fuertemente al sitio de oxidación de quinol (Q_o), de manera independiente del estado redox de la proteína fierro-azufre.

En este trabajo, se determinaron las constantes de velocidad de unión (k_1) de la estigmatelina y el mixotiazol en el complejo bc_1 aislado de bovino con la proteína fierro-azufre en estado oxidado o reducido. El valor de k_1 para la estigmatelina aumentó en 50% cuando se redujo la proteína fierro-azufre, mientras que la k_1 para el mixotiazol no cambió. Sin embargo, en ambas condiciones la constante de velocidad de disociación del complejo enzima-inhibidor (k_{-1}) fue muy cercano a cero, lo que implica que la K_d fue inferior a 1 nM y 5 nM para la estigmatelina y el mixotiazol, respectivamente. Además, en el complejo oxidado, la variación en el estado de protonación de la histidina 161 ($pK_a \sim 7.6$) no modificó las constantes cinéticas de ninguno de los dos inhibidores. Estos resultados contradicen a los modelos que proponen que la estigmatelina se une con alta afinidad (K_d subnanomolar) exclusivamente cuando la proteína fierro-azufre está reducida, debido a la formación de un puente de hidrógeno anormalmente fuerte entre la histidina 161 de la proteína fierro-azufre y un carbonilo del inhibidor. Dichos modelos consideran que el complejo fierro azufre reducida-estigmatelina es análogo al que se forma al ocurrir la primera oxidación del quinol, lo que implica que la semiquinona es fuertemente estabilizada al reducirse la proteína fierro-azufre.

Por otra parte, se determinó la variación en los valores de k_1 de los inhibidores en presencia de distintas concentraciones de quinol (con la proteína fierro-azufre reducida) o de quinona (en ambos estados redox) para obtener valores de K_d para el sustrato y el producto. La K_d para el quinol cuando la proteína fierro-azufre estaba reducida (y por tanto, la histidina 161 estaba protonada) fue semejante a la K_m calculada en el

trabajo anterior, la cual puede considerarse como una aproximación de la K_d para el sustrato en la enzima completamente oxidada. Este resultado indica que ni el estado de protonación de la histidina 161 ni el estado redox de la proteína fierro-azufre son determinantes para la unión del quinol al siti Q_o . Al igual que en el caso de la estigmatelina, la reducción de la proteína fierro-azufre indujo un incremento en la afinidad hacia el producto de alrededor del 50%. La K_d para la quinona fue semejante a pH 6.5 y 9, lo que indica que la unión del producto tampoco depende del estado de protonación de la histidina 161 ($pK_a \sim 7.6$).

En conjunto, estos resultados armonizan con los modelos que proponen que la semiquinona formada tras la primera oxidación del quinol es altamente inestable o incluso inexistente, como en los mecanismos que sugieren una oxidación concertada del sustrato por parte de la proteína fierro-azufre y el hemo b_L . También sugieren que el quinol y la quinona se mueven rápidamente entre los dos subdominios del sitio Q_o , correspondientes a los sitios de unión de la estigmatelina y el mixotiazol.

El fundamento teórico para la determinación de los valores de k_1 y k_{-1} para inhibidores fuertemente unidos, y de K_d para sustrato y producto por competencia con los inhibidores se describe con mayor detalle en el siguiente artículo publicado en la *Revista de Educación Bioquímica*.

PROBLEMA BIOQUÍMICO

Raúl Covián

Correo E: covianraul@correo.unam.mx

TEMA: Cinética enzimática. Inhibidores fuertemente unidos (pseudo-irreversibles).

La estigmatelina es un inhibidor del complejo bc_1 (quinol: citocromo c oxidoreductasa) mitocondrial. Su K_d es inferior a 0.1 nM, por lo que se le considera

un inhibidor fuertemente unido. Se determinaron las velocidades iniciales de reducción de citocromo c tras incubarlo a distintos tiempos al complejo bc_1 purificado (1 nM) en presencia de distintas concentraciones de estigmatelina y quinol, de acuerdo con la siguiente tabla:

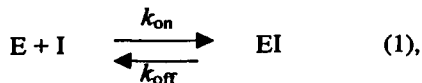
Tiempo (s)	Velocidad inicial (nmol citocromo c reducido(nmol bc_1) ⁻¹ (s) ⁻¹)											
	Quinol (μ M)											
	5			10			20			40		
	Estigmatelina (nM)											
	15	22.5	30	20	30	40	30	45	60	40	60	80
0	70	70	70	110	110	110	150	150	150	185	185	185
5	55.6	49.6	44.1	85.7	75.6	66.7	111	95.6	82.3	152	137	124
10	44.2	35	27.9	66.7	52	40.5	82.3	61	45.2	124	102	83.1
15	35.1	24.9	17.6	52	35.7	24.5	61	38.9	24.8	101	75.2	55.7
23	24.3	14.2	8.3	34.8	19.6	11	37.7	18.9	9.5	73.7	46.5	29.4
30	17.6	8.8	4.4	24.5	11.6	5.5	24.8	10.1	4.1	55.7	30.6	16.8

Calcular la constante de velocidad de unión de la estigmatelina (k_{on}), y el tipo de inhibición de este compuesto con respecto al quinol.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESPUESTAS AL PROBLEMA BIOQUÍMICO

La unión de un inhibidor (I) a una enzima (E) puede representarse de la siguiente manera:



donde k_{on} es la constante de velocidad de unión del inhibidor, y k_{off} es la constante de velocidad de liberación. Considerando que el valor de K_d para la estigmatelina es muy pequeño (<0.1 nM), k_{off} puede despreciarse. Entonces, la ecuación de velocidad de unión del inhibidor es:

$$v = k_{on}[E][I] \quad (2)$$

Considerando que $[I] \gg [E]$, de manera que $[I]$ permanece constante durante el curso temporal de unión del inhibidor, la ecuación anterior puede expresarse como:

$$v = k^*[E] \quad (3)$$

donde

$$k^* = k_{on}[I] \quad (4)$$

A medida que el inhibidor se une, el cambio en la concentración de enzima activa $[E_a]$ en función del tiempo se expresa como:

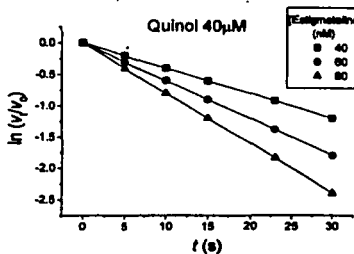
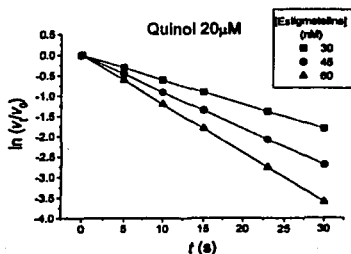
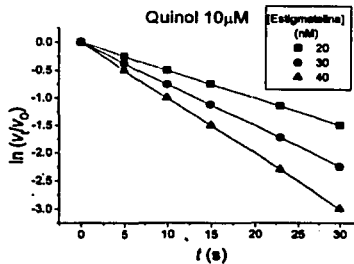
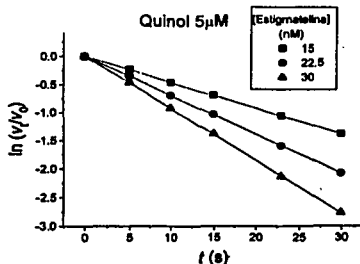
$$-d[E_a]/dt = k^*[E_a] \quad (5)$$

La integración de esta última ecuación con respecto a $[E_a]$ entre los tiempos 0 y t resulta en la siguiente expresión:

$$\ln([E_a]_t/[E_a]_0) = -k^*t \quad (6)$$

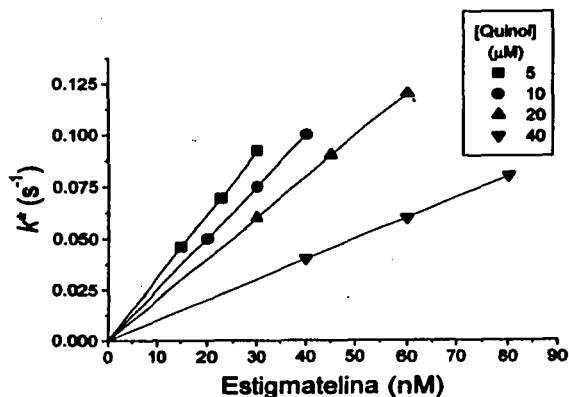
La concentración de enzima activa puede seguirse midiendo la velocidad inicial de la reacción, como se muestra en la tabla de datos. Podemos entonces sustituir la velocidad inicial al tiempo cero (v_0) en lugar de $[E_a]_0$ y la velocidad inicial a cada tiempo de incubación (v_t) en vez de $[E_a]_t$ en la ecuación 6.

Por lo tanto, se grafica $\ln(v_t/v_0)$ contra tiempo tomando los valores de la tabla de datos, y con una regresión lineal se obtiene la pendiente para cada concentración de inhibidor, la cual corresponde a $-k^*$.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

A continuación se grafican los valores de k^* obtenidos de las pendientes contra la concentración de inhibidor para cada concentración de quinol. De acuerdo con la ecuación 4, la pendiente de cada una de las rectas obtenidas corresponde al valor de k_{on} para cada concentración de quinol.



Puede observarse que la pendiente (es decir k_{on}) cambia en función de la concentración de quinol, lo que excluye un tipo de inhibición no competitiva por parte de la estigmatelina respecto al quinol. Esto además indica que para cada concentración de quinol, la pendiente que se obtiene corresponde en realidad a una constante de velocidad de unión aparente (k'_{on}), cuya definición depende de si la estigmatelina es un inhibidor de tipo mixto o competitivo.

Al graficar el inverso de k'_{on} contra la concentración de quinol es posible distinguir entre una inhibición competitiva y una inhibición mixta. En el caso de la competitiva, existe el complejo enzima-sustrato [ES], que se define a partir de su constante de disociación (K_s):

$$K_s = [E][S]/[ES];$$

$$[ES] = [E][S]/K_s \quad (7)$$

También existe el complejo enzima-inhibidor [EI], cuya formación en este caso se considera irreversible por tratarse de un inhibidor fuertemente unido, por lo que se define basándose en la ecuación 1 como:

$$[EI] = k_{on} [E][I] \quad (8)$$

La fracción de enzima acomplejada con inhibidor [EI] con respecto a la enzima total $[E]_T$ se define como:

$$\frac{[EI]}{[E]_T} = \frac{k_{on}[E][I]}{[E] + k_{on}[E][I] + \frac{[E][S]}{K_s}} \quad (9)$$

Eliminando [E] y dividiendo numerador y denominador entre k_{on} se llega a la expresión:

$$\frac{[EI]}{[E]_T} = \frac{[I]}{\frac{1}{k_{on}} + [I] + \frac{[S]}{k_{on}K_s}} \quad (10)$$

Al factorizar en el denominador obtenemos:

$$\frac{[EI]}{[E]_T} = \frac{[I]}{\frac{1}{k_{on}} \left(1 + \frac{[S]}{K_s}\right) + [I]} \quad (11)$$

Otra manera de expresar la ecuación 11 es:

$$\frac{[EI]}{[E]_T} = \frac{[I]}{\frac{1}{k'_{on}} + [I]} \quad (12),$$

donde:

$$\frac{1}{k'_{on}} = \frac{1}{k_{on}} + \frac{1}{K_s k_{on}} [S] \quad (13),$$

Esta expresión (ec. 13) corresponde a la ecuación de una recta, donde el inverso del valor de la ordenada al origen corresponde a la constante de velocidad de unión real del inhibidor (en ausencia de sustrato), y el intercepto en el eje de las abscisas corresponde a $-K_s$.

En una inhibición de tipo mixto existe, además de [ES] y [EI], la especie enzima-sustrato-inhibidor [ESI], en cuya definición se contempla un factor α que describe el cambio en afinidad por el sustrato en presencia de inhibidor y viceversa. Una deducción semejante a la mostrada en las ecuaciones 7 a 13 para una inhibición mixta resulta en la siguiente definición:

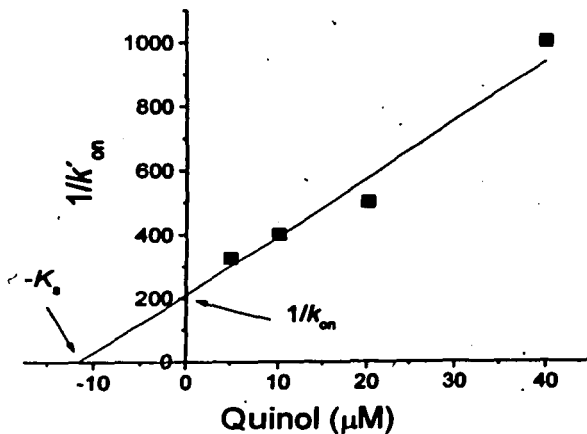
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

$$\frac{1}{k'_{on}} = \frac{1}{k_{on}} \left(\frac{1}{1 + \frac{[S]}{\alpha K_s}} \right) + \left(\frac{1}{k_{on}} \right) \left(\frac{1}{K_s + \frac{[S]}{\alpha}} \right) [S] \quad (14)$$

La ecuación 14 muestra que al graficar el inverso de k'_{on} contra el sustrato, la pendiente no es una constante, sino una función del propio sustrato, de manera que cuando $[S] \gg K_s$ la pendiente tenderá a cero.

Una inhibición mixta, por lo tanto, resulta en una hipérbola que no parte del origen. Ver gráfica de la derecha, donde se muestran los datos del presente ejercicio.

La linealidad en la gráfica indica que la estigmatelina es un inhibidor competitivo pseudoirreversible respecto al quinol. La constante real de velocidad de unión del inhibidor (k_{on}) resultó ser de $4.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, y el valor de K_s para el quinol fue de $11.7 \mu\text{M}$.

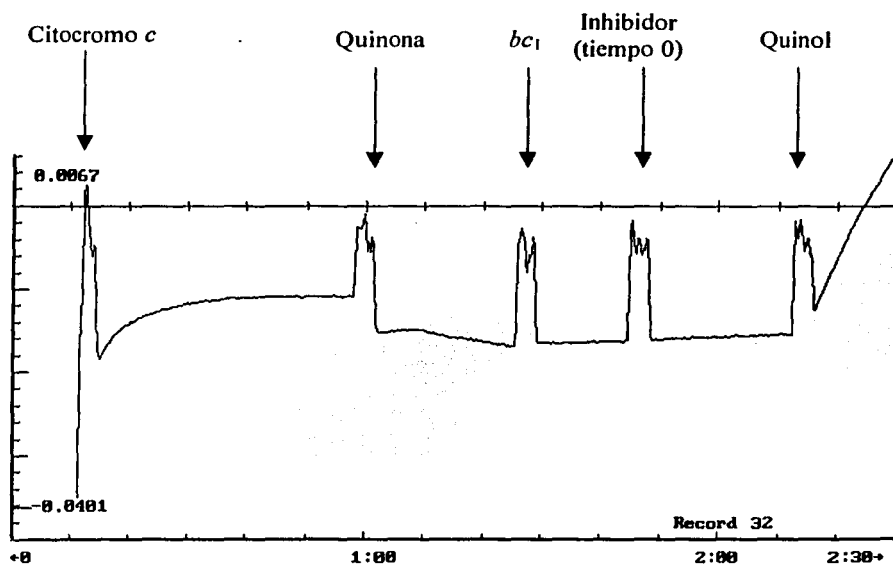


REFERENCIAS

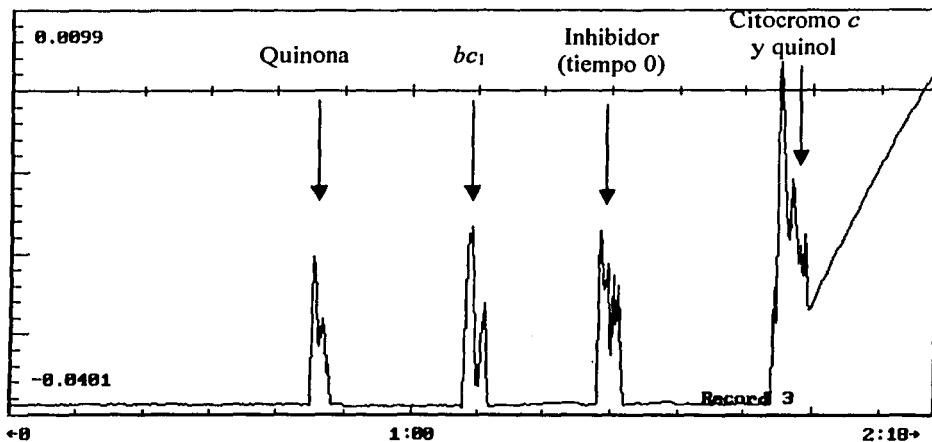
1. Cardemil E (1987) Kinetics of the chemical modification of enzymes. En: Chemical modification of enzymes: active site studies, Editor Eyzaguirre J. John Wiley and Sons, New York, pp. 23-34.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En este trabajo se controló el estado redox del complejo bc_1 mediante añadir en un orden determinado los diferentes reactivos. Por ejemplo, para determinar las constantes cinéticas en la enzima oxidada en presencia de quinona, el orden de adición se muestra en la siguiente figura:

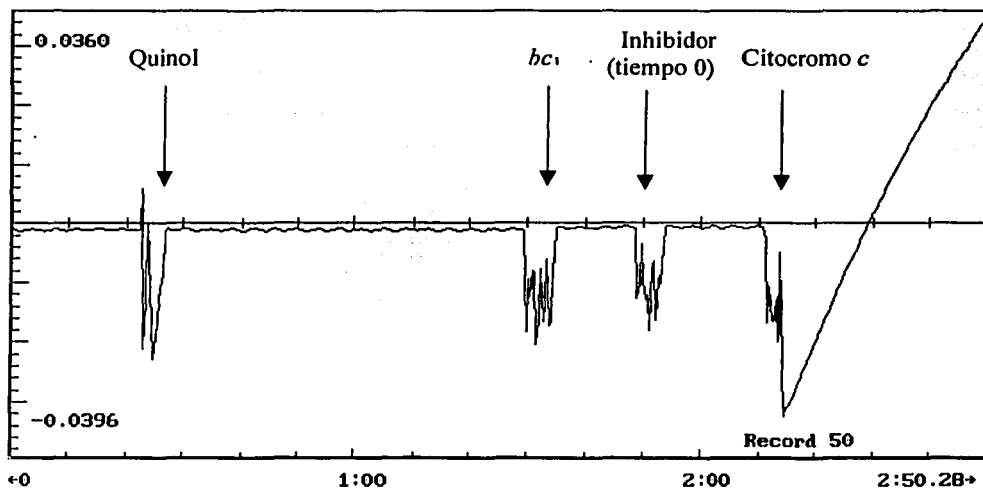


En el caso de la enzima reducida previamente con ascorbato, el orden de adición de los reactivos fue el siguiente:



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Por último, al usar la enzima reducida con quinol, los reactivos se añadieron como se indica a continuación:



Este trabajo se encuentra en prensa en el *Journal of Biological Chemistry*.
A continuación se reproduce el manuscrito aceptado.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**Tight binding of inhibitors to bovine bc_1 complex is independent of the
Rieske protein redox state**

CONSEQUENCES FOR SEMIQUINONE STABILIZATION IN THE QUINOL
OXIDATION SITE

Raúl Covián*, Juan Pablo Pardo¹, and Rafael Moreno-Sánchez

Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Juan Badiano 1, Sección
XVI, Tlalpan 14080, Mexico City, Mexico

¹ Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de
México, Mexico City, Mexico

* To whom all correspondence should be addressed. Phone: (525) 5573-2911 ext. 1422

Fax: (525) 5573-0926

E-mail: covianraul@correo.unam.mx

Running title: stigmatellin binds tightly to the oxidized bc_1 complex

SUMMARY

To determine the effect of the redox state of the Rieske protein on ligand binding to the quinol oxidation site of the bc_1 complex, we measured the binding rate constants (k_1) for stigmatellin and myxothiazol, at different concentrations of decylbenzoquinone or decylbenzoquinol, in the bovine bc_1 complex with the Rieske protein in the oxidized or reduced state. Stigmatellin and myxothiazol bound tightly and competitively with respect to quinone or quinol, independently of the redox state of the Rieske protein. In the oxidized bc_1 complex, the k_1 values for stigmatellin ($\sim 2.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) and myxothiazol ($\sim 8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), and the dissociation constant (K_d) for quinone, were similar between pH 6.5 and 9, indicating that ligand binding is independent of the protonation state of histidine 161 of the Rieske protein ($pK_a \sim 7.6$). Reduction of the Rieske protein increased the k_1 value for stigmatellin and decreased the K_d value for quinone by 50%, without modifying the k_1 for myxothiazol. These results indicate that reduction of the Rieske protein and protonation of histidine 161 do not induce a strong stabilization of ligand binding to the quinol oxidation site, as assumed in models that propose the existence of a highly stabilized semiquinone as a reaction intermediate during quinol oxidation.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

INTRODUCTION

The key reaction which allows energy conservation in ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase (*bc*₁ complex¹) is the bifurcation of electrons from quinol towards the iron-sulfur cluster of the Rieske protein and heme *b*_L of cytochrome *b* (1,2). Several models have been proposed to explain the mechanism that prevents the thermodynamically favorable (but energetically wasteful) reduction of the iron-sulfur cluster by both electrons from quinol. These proposals differ, among other aspects, in the stability constant and the role assigned to semiquinone as a reaction intermediate in the quinol oxidation site (*Q*_o site). Crofts and Wang (3) originally proposed a highly unstable semiquinone, which according to recent modifications of this mechanism (4,5), would move from the *Q*_o site subdomain occupied in crystal structures by inhibitors such as stigmatellin to the pocket occupied by myxothiazol and methoxyacrylate inhibitors. Since no EPR-detectable semiquinone is observed in the *Q*_o site (6), and the redox potentials of the iron-sulfur cluster and the *b* hemes exert a reciprocal control on their reduction rates by quinol, Snyder *et al.* (7) proposed a concerted mechanism in which the rapid oxidation of semiquinone by heme *b*_L of cytochrome *b* drives the thermodynamically unfavorable one electron reduction of the iron-sulfur cluster by quinol.

Place footnote #1 here.

In contrast to these models, Link (8) suggested that reduction of the iron-sulfur cluster by quinol leads to a stabilization of semiquinone through a strong hydrogen bond between this intermediate and one of the histidines that binds to the redox cluster (histidine 161 in the bovine *bc*₁ complex). This unusually strong interaction between semiquinone and the reduced Rieske protein would prevent the hydrophilic domain of this subunit to diffuse away from the interface with cytochrome *b* towards cytochrome *c*₁ until semiquinone reduces heme *b*_L (9). This would ensure the recycling of the second electron from quinol through cytochrome *b*.

The stable semiquinone intermediary would not be detected by EPR because of magnetic coupling between the reduced iron-sulfur cluster and semiquinone (8). The basis for assuming the existence of this stable semiquinone is the 250 mV shift in the redox potential of the iron-sulfur cluster induced by binding of stigmatellin (considered as an analogue of semiquinone) to the bc_1 complex (10). This effect has been interpreted as indicating a $\sim 10^5$ higher binding constant of the inhibitor to the iron-sulfur cluster-reduced bc_1 complex compared to the fully oxidized enzyme. In apparent agreement with this interpretation, removal of the Rieske protein from the bc_1 complex changes stigmatellin inhibition from tightly-bound ($K_d < 0.1$ nM) to weak and reversible ($K_d \sim 50$ μ M) (11). However, there is no direct evidence that binding of stigmatellin or quinone is stabilized by reduction of the Rieske protein. Moreover, we have recently shown (12) that quinone binding is not stabilized by protonation of histidine 161 of the Rieske cluster, nor is quinol binding stabilized by deprotonation of this residue, suggesting that the putative hydrogen bond formed between histidine 161 and Q_o site ligands is not essential for binding of substrate and product.

In order to obtain evidence on the stabilization of ligands at the Q_o site upon reduction of the Rieske protein, we determined the binding rate constants of the tightly-bound inhibitors stigmatellin and myxothiazol to the purified bovine heart bc_1 complex with the Rieske protein in the oxidized and reduced state, and as a function of the protonation state of histidine 161, which has a pK_a of ~ 7.6 (13). The affinity towards quinone or quinol in these conditions was also determined through competition with the inhibitors. Our results indicate that the effect of the reduction of the iron-sulfur cluster, or the protonation of histidine 161, on the binding of ligands to the Q_o site is much more weaker than that required by models that consider stabilization of semiquinone through a hydrogen bond to the reduced iron-sulfur cluster.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chemicals. Decylbenzoquinone, horse heart cytochrome *c*, L-ascorbic acid, and Tween-20 were purchased from Sigma Chemicals Co. Stigmatellin was from Fluka, and myxothiazol from ICN Biomedicals Co. All other reagents of analytical grade were from standard suppliers. Decylbenzoquinol was prepared as described in (14). UV-spectrophotometric quantification of decylbenzoquinone and decylbenzoquinol was performed in ethanol using extinction coefficients reported in (15), and solubility in the aqueous detergent-containing reaction media was verified as described before (12). Stigmatellin and myxothiazol quantification was performed using wavelengths and extinction coefficients previously reported (16).

Purification of bovine heart bc₁ complex. The isolation procedure and quantification of heme content was done as previously described (12). The purified bc₁ complex contained 7.1 and 3.6 nmol of hemes *b* and *c*₁/mg of protein, respectively (no heme *a* was spectrophotometrically detected), and was stored at a concentration of 6-10 μM in 50% (v/v) glycerol and 0.01% β-D-laurylmaltoside at -20 °C, and diluted to 1 μM before the assay.

Determination of inhibitor rate constants and K_d values for quinone and quinol. Rate constants were determined by using the following equation which describes the time-dependent binding of an inhibitor (I) to the enzyme (E):

$$\frac{[E_a]_t}{[E_a]_0} = e^{-k_1 [I] t + k_{-1} t} \quad [1],$$

where [E_a]_t is the active enzyme remaining at time *t*, [E_a]₀ is the active enzyme before the addition of inhibitor (time 0), *k*₁ is the second order rate constant for the binding of the inhibitor to the enzyme, and *k*₋₁ is the first order rate constant for the dissociation of the enzyme-inhibitor complex. The complete derivation of equation 1 can be found in (17). When

$[I] \gg [E_s]_0$, the amount of free inhibitor can be considered constant throughout the time course of inhibitor binding. Under this condition, the initial rate of cytochrome *c* reduction is a measure of the amount of active enzyme. Therefore, the time-dependent decrease of the initial rate at each inhibitor concentration was fitted to a single exponential decay function to obtain a pseudo-first order rate constant (k'_1) that depended only on the concentration of $[I]$. k'_1 is defined as:

$$k'_1 = k_1[I] + k_{-1} \quad [2]$$

According to equation 2, the value of the second order rate constant (k_1) for the binding of the inhibitor to the enzyme was obtained by plotting k'_1 as a function of $[I]$ and fitting the data to a straight line, where the slope is k_1 and the ordinate is k_{-1} . During the fitting procedure, k_{-1} was constrained to positive values. The variation of the binding rate constants as a function of the concentration of either decylbenzoquinone or decylbenzoquinol ($k_{1 \text{ obs}}$) was fitted to a competitive binding model according to the following equation:

$$k_{1 \text{ obs}} = \frac{k_1}{1 + \frac{[Q]}{K_d}} \quad [3],$$

where k_1 is the second order rate constant describing the binding of the inhibitor to the enzyme in the absence of quinone or quinol (Q), and K_d is the equilibrium dissociation constant of the bc_1 -Q complex. Mixed or non-competitive kinetic models resulted in poor fitting. All fitting procedures were performed using the Origin 5.0 program (OriginLab Corp.).

Determination of inhibitor binding to the bc_1 complex with oxidized or reduced Rieske protein. The assay medium contained 0.01% Tween-20, 1 mM EGTA, and 20 mM of citric acid (pK_{a3} 6.8), Hepes (pK_a 7.5) and Taps (pK_a 8.4) in order to efficiently buffer the pH in the range of 6.5 to 9. All measurements were performed at 30 °C. No difference was found between the spectra of the air-oxidized complex at pH 7.5, where the Rieske protein is more

oxidizing than cytochrome c_1 , and at pH 9, where the redox potential of the Rieske protein decreases below that of cytochrome c_1 (13), indicating that the Rieske protein was fully oxidized (Fig. 1, traces a and b). Comparison with the ferricyanide-oxidized bc_1 complex (Fig. 1, trace c) indicated that >97% of cytochrome c_1 in the complex was in the oxidized state. 1 nM of air-oxidized enzyme was added to the reaction medium adjusted to the desired pH in a 1 ml cuvette containing 30 μM of horse heart cytochrome c and the appropriate concentration of decylbenzoquinone. After a 20 s preincubation, the inhibitor was added (time 0) followed by the addition at different times (8,15, 23, 30, 45 or 60 s) of 16 μM decylbenzoquinol. The initial rate of cytochrome c reduction was measured at 550-540 nm ($\epsilon = 19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) in a SLM-Aminco DW-2000 dual wavelength spectrophotometer (scanning speed of 1 point/ 0.24 s) during the first 3-5 s of the reaction. Correction for non-enzymic reduction was described previously (12). Initial rates were measured without the inhibitor at each of the incubation times, and no decrease in the activity was found up to the maximum time (60 s), indicating that the enzyme is stable and the decrease in activity is only due to the interaction with the inhibitor. In order to discard the possible reduction of the Rieske protein by endogenous reducing equivalents during the activity assay, binding of stigmatellin as a function of pH was also determined with the ferricyanide-oxidized bc_1 complex. In this case, 1 μM of air-oxidized bc_1 complex was incubated with 1 mM of potassium ferricyanide. 1 nM of this ferricyanide-oxidized complex was added to the reaction media described above. Final concentration of ferricyanide in the reaction cuvette was 1 μM . Since ferricyanide oxidizes cytochrome c , one of the substrates of the reaction, a short lag of up to 5 s was observed after adding decylbenzoquinol before a linear rate could be achieved.

Reduction of the Rieske protein was achieved by adding 1 mM of freshly prepared potassium ascorbate (pH 7.5), to 1 μM bc_1 complex. Complete cytochrome c_1 (and hence Rieske protein) reduction was confirmed spectrophotometrically (Fig. 1, trace d), showing

1.06 μM of reduced cytochrome c_1 . Cytochrome b was completely oxidized, as observed in the dithionite minus ascorbate-reduced spectra (Figure 1, trace g), with 2.3 μM of b hemes not reduced by ascorbate. Ascorbate-reduced enzyme (1 nM) was added to 1 ml of reaction medium (pH 7.5) containing the indicated concentration of decylbenzoquinone. After 20 s of preincubation, the inhibitor was added, and after the desired time, 30 μM of horse heart cytochrome c and 16 μM of decylbenzoquinol were added simultaneously. The initial rates of cytochrome c reduction were used to obtain the kinetic constants as explained above.

Alternatively, reduction of the Rieske protein was achieved by adding different concentrations of decylbenzoquinol to 1 nM of the oxidized enzyme in the assay medium at pH 7.5. After 20 s, the inhibitor was added, and 30 μM of oxidized horse heart cytochrome c was used to start the reaction at different times. Experimental data were treated as explained above to obtain the inhibitor binding and dissociation rate constants, and the K_d for decylbenzoquinol. Even the lowest concentration of decylbenzoquinol (4 μM) allowed immediate full reduction of cytochrome c_1 when added to 1 μM (Fig. 1, trace e) or 10 nM of bc_1 complex (not shown). The decylbenzoquinol minus ascorbate-reduced spectrum showed that the same full reduction of cytochrome c_1 (and therefore of the Rieske protein) was attained by adding ascorbate or decylbenzoquinol (Fig. 1, trace i). In addition, decylbenzoquinol reduced 28% of cytochrome b , mostly heme b_H (peak at 562 nm, see Fig. 1, trace i). *Place Figure 1 here.*

RESULTS

Binding and dissociation rate constants for stigmatellin and myxothiazol in the fully oxidized bc_1 complex. The time-dependent inhibition of the initial rate of the air-oxidized bc_1 complex by stigmatellin and myxothiazol at four different concentrations of inhibitor and in the absence of decylbenzoquinone is shown in Figure 2A and 2B at pH 7.5. The second order rate constants for the binding of each inhibitor were obtained from the slope of the pseudo-first order rate constants as a function of inhibitor concentration (Fig. 2C). The binding rate of stigmatellin was three times higher than for myxothiazol (Table 1). Interestingly, the dissociation rate constant for both inhibitors (k_{-1}), which corresponds to the ordinate value, was close to zero, resulting in a K_d value in the nanomolar range (Table 1). This indicates tight binding of myxothiazol and, notably, of stigmatellin to the Q_o site when the Rieske protein is oxidized. Both the binding and release rate constants for stigmatellin in the air-oxidized enzyme were very similar to those obtained in the ferricyanide-oxidized bc_1 complex (where 1 μ M of ferricyanide was present in the reaction medium during the preincubation with the inhibitor), indicating that even in the air-oxidized condition the Rieske protein was fully oxidized (Fig. 2C). *Place Figure 2 and Table 1 here.*

The iron-sulfur cluster of the Rieske protein is bound to two histidines (161 and 141), with pK_a values of ~ 7.6 and 9.2 when the cluster is oxidized (13). Histidine 161 is within hydrogen-bonding distance of a carbonyl group of stigmatellin, and quinone and quinol have been proposed to bind to the Q_o site in a similar position to that occupied by stigmatellin (4). In contrast, myxothiazol does not establish any interactions with iron-sulfur residues (5). Therefore, binding rate constants for both inhibitors were determined at different protonation states of histidine 161, from a $>90\%$ (at pH 6.5) to a $<4\%$ (at pH 9.0) protonation, in the absence of decylbenzoquinone (Fig. 3). The results showed that binding rates were

independent of the protonation state of this residue, and that dissociation rate constants remained below 0.005 s^{-1} at all pH values (Table 1). The same results for stigmatellin were observed if the assays were performed in the presence of ferricyanide (Fig. 3), demonstrating that the Rieske protein was oxidized in the air-oxidized enzyme.

The K_d values for decylbenzoquinone, calculated by fitting the variation in the observed k_1 for both inhibitors as a function of decylbenzoquinone concentration (Fig. 4), showed a similar value at the extreme pH values of 6.5 and 9, and a slightly higher value at pH 7.5 (Table 1). This result agrees with our previous finding that the protonation state of histidine 161 does not affect the binding of substrate and product (12). These experiments were performed with the air-oxidized bc_1 complex to avoid the lag in the onset of linear rate produced by the presence of ferricyanide, which was more pronounced at high concentrations of decylbenzoquinone. Nevertheless, full oxidation of the Rieske protein in the air-oxidized complex has already been demonstrated according to the results of Figure 2. *Place Figure 3 and Figure 4 here.*

Effect of Rieske protein reduction on ligand binding. Reduction of the bc_1 complex with ascorbate or decylbenzoquinol slightly increased the affinity of the Q_o site towards stigmatellin without affecting myxothiazol binding. (Fig. 5, Table 1). In turn, the affinity towards decylbenzoquinone, estimated by using either inhibitor, was increased 2-fold in the ascorbate-reduced bc_1 complex (Table 1). Decylbenzoquinol affinity was slightly decreased upon reduction of the Rieske protein as compared to the K_m value for this substrate ($8 \mu\text{M}$) under steady-state conditions (12), which can be taken as an approximation of the K_d for decylbenzoquinol in the oxidized bc_1 complex. The K_d for decylbenzoquinol was not modified when ascorbate was used to reduce the Rieske protein instead of quinol (not shown). These results indicate that ligand binding to the Q_o site is only moderately affected by the reduction of the Rieske protein. *Place Figure 5 and Figure 6 here.*

DISCUSSION

Stigmatellin binds tightly to all redox forms of the bc₁ complex. Our finding that stigmatellin binds tightly to the Q_o site independently of the redox state of the Rieske protein (Table 1) indicates that the 250 mV increase in the redox potential of the iron-sulfur cluster induced by this inhibitor (10) cannot be attributed to a 10⁵-fold tighter binding to the reduced Rieske protein (9). In consequence, the proposal of a stabilized, EPR invisible semiquinone as a reaction intermediate that prevents the transfer of the second electron of quinol to the iron-sulfur cluster is unsupported. The dissociation rate constant in all conditions was close to zero, indicating a K_d value in the nanomolar range (Table 1). The same results were obtained when the bc₁ complex was oxidized with ferricyanide prior to the binding assay, and with this oxidant present during the incubation with stigmatellin (Fig. 2C), discarding the possibility of reduction of the Rieske protein by endogenous reductants when the enzyme was diluted to 1 nM. Assuming a constant value for k_1 in all redox states of the enzyme, the 50% increase in k_1 upon reduction of the iron-sulfur cluster would only account for 10 mV of the 250 mV increase induced by stigmatellin, according to the equations relating the change in redox potential, ΔG , and K_d (8).

We consider that the effect of stigmatellin on the redox potential of the iron-sulfur cluster is the result of the stabilization of a conformation, in agreement with recent studies in which mutations in the hinge region of the Rieske protein restrain the soluble domain of this subunit from moving away from the interface with cytochrome *b* (18, 19). Some of these mutations increase the redox potential of the iron-sulfur cluster up to 150 mV (in the absence of stigmatellin or any other ligand). Therefore, it seems likely that the environment surrounding the iron-sulfur cluster when the soluble domain of the Rieske protein is in contact with cytochrome *b*, a conformation which is also stabilized by stigmatellin according to

crystal structures (20,21), is the cause of the increase in the redox potential of the iron-sulfur cluster. This conclusion is also supported by the observation of a stigmatellin-induced increase of only 90 mV in the redox potential of the Rieske protein in some of the immobilized-Rieske protein mutants (19). Our results (Table 1) also imply that, rather than changing the redox dependence of stigmatellin binding, mutations in the hinge region of the Rieske protein stabilize a conformation on which the binding of stigmatellin has little further effect. The condition in which the Rieske protein has been removed from the bc_1 complex, causing the K_d for stigmatellin to increase to 50 μ M (10), may resemble the position observed in crystal structures in which the soluble domain of the Rieske protein is at the c_1 interface (20, 21), where stigmatellin binding would be unfavorable. The 50% tighter binding of stigmatellin upon reduction of the Rieske protein found in the present work suggests a slight shift of the equilibrium between the different positions of the soluble domain of this subunit towards the cytochrome b interface. Thus, tight binding of stigmatellin to the Q_o site occurs when the soluble domain of the Rieske protein (oxidized or reduced) is in contact with cytochrome b (5, 21). Therefore, an important conclusion derived from our results is that the redox potential of the oxidized iron-sulfur cluster of the wild-type Rieske protein increases 250 mV when this subunit is in the "b position", as has been observed in the Rieske protein mutants that constrain the movement of this subunit (18, 19).

By measuring the oxidation of cytochrome c_1 caused by the stigmatellin-induced increase in the redox potential of the Rieske protein at alkaline pH values, Zhang *et al.* (22) estimated binding rate constants which were almost 30 times lower than the values reported in the present work. These differences cannot be attributed to the different concentration and type of detergent used (which could in principle modify the effective concentration of inhibitor in the bc_1 complex micelles), since the k_1 value for stigmatellin assayed in 0.05% of

lauryl maltoside (22) under our experimental conditions was $1.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (not shown), 15 times higher than the values calculated by Zhang *et al.* (22).

Two factors could explain the lower k_1 values obtained from cytochrome c_1 oxidation induced by stigmatellin: 1) Cytochrome c_1 oxidation induced by stigmatellin is only possible when the Rieske protein is oxidized. The bc_1 complex preparation used by Zhang *et al.* (22) contained only 17% of Rieske protein in the oxidized state. Thus, most of the stigmatellin binding occurred to the larger fraction of enzyme with the Rieske protein in the reduced state, which is undetected by the methodology used, resulting in underestimated k_1 values. 2) Electron transfer between heme c_1 and the iron-sulfur cluster is not possible when the Rieske protein is at the cytochrome b interface (21); therefore, the binding rate constants obtained from cytochrome c_1 oxidation measurements correspond to the rate of stigmatellin binding to bc_1 complex molecules where the Rieske protein is at a position in which its redox potential is already higher than that of cytochrome c_1 , but still in a sufficiently close distance from heme c_1 to allow electron transfer. In contrast, the binding rate constants determined in the present work involve binding to all conformations of the bc_1 complex, including that where the Rieske protein is close to cytochrome b , a position in which the redox potential of the iron-sulfur cluster is 250 mV higher than at the interface with cytochrome c_1 . This high redox potential conformation in the b position can represent up to 50% of the total unbound enzyme, according to some crystal structures (20), and is more accessible to stigmatellin binding, since it is stabilized by this inhibitor (21).

Hydrogen bonding to histidine 161 is not the main stabilizing force for the binding of quinone, quinol, and inhibitors. The protonation state of the histidine with $\text{p}K_a$ 7.5 that binds the iron-sulfur cluster did not affect significantly the binding rate constant of stigmatellin in the oxidized bc_1 complex (Fig. 3). Zhang *et al.* (22) also found little effect of pH between 7.5 and 9.2 on stigmatellin k_1 values, which are probably underestimated for the reasons

discussed above. We have proposed that this pK_a 7.5 residue corresponds to histidine 161 of the Rieske protein, since our previous kinetic analysis suggested that this group is a primary acceptor of a proton from quinol (12). Electron transfer calculations and simulations also point to deprotonated histidine 161 as the residue that receives a proton from quinol simultaneously to the iron-sulfur cluster reduction (23, 24). Even though this residue is in hydrogen-bonding distance to the carbonyl of stigmatellin (5), our observation of pH and redox independent binding of stigmatellin suggests a more important role for the interactions between the hydrophobic side chain of the inhibitor and cytochrome *b* residues in determining the tight binding behavior of stigmatellin. In agreement with this last proposal, Ohnishi *et al.* (25) found that modifications of the side chain of stigmatellin (displacement or removal of methoxy groups and saturation of double bonds) decrease the affinity towards this inhibitor several orders of magnitude. Moreover, some of these derivatives, with a higher hydrophobicity than stigmatellin, induced a shift in the redox potential of the Rieske protein of only 80-90 mV, despite having the same carbonyl that is in hydrogen-bonding distance to histidine 161. Hydroxydioxobenzothiazoles (26) and hydroxynaphthoquinones (27) cause redox potential shifts similar to those induced by stigmatellin derivatives with modified side chains (~70 mV), even though they also possess the carbonyl group.

Genetic evidence also points to an important role of cytochrome *b* residues in determining the tight binding of stigmatellin (28). Several residues at which mutations confer resistance to this inhibitor, such as methionine 125, phenylalanine 129, isoleucine 147, and leucine 295, are within 3-4 angstroms from side chains atoms of stigmatellin (5). Glutamate 272 hydrogen bonds to a hydroxyl group from the chromone moiety of stigmatellin, while other residues, such as glycine 137, asparagine 256, and tryptophan 273 appear to be important for determining the overall conformation of the stigmatellin binding pocket. These findings indicate that tight binding of stigmatellin (and its associated conformational and

redox potential changes in the Rieske protein) cannot be attributed to a single strong hydrogen bond between the inhibitor and histidine 161 of the Rieske protein. However, since crystal structures clearly show a hydrogen bond between stigmatellin and histidine 161 (4,5), it is probable that the inhibitor recruits a proton to establish the hydrogen bond once it has bound to its site.

It was previously shown that the protonation state of the $pK_a \sim 7.5$ residue, probably histidine 161 of the Rieske protein, affected slightly the affinity of the bc_1 complex towards quinone without affecting the K_m value for quinol (12). Instead, quinone binding was modified by groups with pK_a of 5.7 and 9.2 (probably glutamate 272 of cytochrome *b* and histidine 141 of the Rieske protein). In agreement with previous work, the K_d values obtained for quinone (Fig. 4, Table 1) showed a maximum at pH 7.5, slightly decreasing towards more acidic and basic pH values, probably as a result of the influence of other protonatable groups. Furthermore, the K_d value of 10-15 μM (Fig. 6) obtained for quinol with the reduced Rieske protein, where histidine 161 is expected to be fully protonated because of the shift in its pK_a from 7.6 to >11 (13), was similar to the previously reported K_m values obtained from measuring the steady-state activity between pH 6.7 and 9 (12). Since these K_m values are an approximation of the K_d for quinol in the oxidized enzyme (where histidine 161 has a pK_a of 7.6), it follows that the affinity towards the substrate is not affected by the redox state of the bc_1 complex. Therefore, our present results support the proposal that a particular protonation state of histidine 161 is not essential for ligand binding to the Q_o site, even though ligands could recruit or eliminate a proton in this residue after binding.

The insensitivity of myxothiazol binding to both the redox state of Rieske protein and the protonation state of the pK_a 7.5 histidine of the Rieske protein was expected, considering that crystal structures show no interaction between this inhibitor and any Rieske protein residues (5). In contrast, methoxyacrylate inhibitors, which bind to the Q_o site subdomain

proximal to heme b_L like myxothiazol (5), undergo a decrease in their K_d values as the redox centers of the bc_1 complex are sequentially reduced (29). In addition, the binding of these reversible inhibitors is favored by the deprotonation of histidine 161 (29). Notably, we found that myxothiazol is a purely competitive inhibitor with respect to quinone and quinol, in contrast with the mixed-type inhibition pattern found for methoxyacrylates (30). These differences may be attributed to the smaller size of the methoxyacrylate compounds, which allows the simultaneous binding of quinone and methoxyacrylate to the Q_o site. Moreover, the weaker interaction of methoxyacrylates with cytochrome b might additionally cause their binding to be more sensitive to subtle conformational changes derived from either the reduction of redox centers or the deprotonation of residues in the Rieske protein. According to mutational studies (28) and crystal structures (5), some residues which also interact with stigmatellin, such as methionine 125, phenylalanine 129 and leucine 295, are within 3-4 angstroms of myxothiazol side chain atoms. Other residues which specifically confer sensitivity to myxothiazol, such as alanine 126 and glycine 143, are also at close distance from side chain atoms. Two other residues (tyrosine 132 and phenylalanine 275) surround the amide group of the methoxyacrylate moiety (5), and their mutation confers resistance to both myxothiazol and methoxyacrylates. (28). Therefore, as is the case with stigmatellin, the tightly-bound nature of myxothiazol inhibition results mainly from interactions between cytochrome b residues and the inhibitor side chain.

Implications for the mechanism of quinol oxidation. Contrary to proposals that question the binding of quinone to the Q_o site (31), our kinetic analysis directly demonstrates that quinone and quinol, despite being undetectable in crystal structures, bind to the Q_o site in competition with stigmatellin and myxothiazol. However, our results indicate that there is no basis for the assumption that the hydrogen bond between histidine 161 and the Q_o site ligand is involved in a strong ligand stabilization upon reduction of the iron-sulfur cluster (8).

Furthermore, tight binding of inhibitors to the Q_o site should be attributed to the structure of the hydrophobic side chains of stigmatellin and myxothiazol, which are considerably different from the isoprenoid chain of ubiquinone or the aliphatic tail of decylbenzoquinone. Thus, stigmatellin and myxothiazol should not be considered as analogues of a highly stabilized semiquinone with respect to their tightly-bound nature. Our results are consistent with models of quinol oxidation that propose a highly unstable semiquinone (3,7), which is rapidly oxidized by heme b_L , thereby ensuring the bifurcation of electrons required to translocate protons in the bc_1 complex. If a single quinol molecule binds to the Q_o site (4), the unstable semiquinone formed after Rieske protein reduction could rapidly move to the Q_o site subdomain proximal to heme b_L to be oxidized. It is likely that such movement also occurs with quinol and quinone, as suggested by the finding that substrate and product binding is not dependent on hydrogen bonding to histidine 161 of the Rieske protein (12, see also Table 1), explaining why quinone is not detected in the Q_o site of crystallized bc_1 complexes (5). Moreover, in the light of mutational studies which constrain the Rieske protein to the cytochrome b interface (18,19), the tight binding of stigmatellin to the bc_1 complex, independently of the redox state of the Rieske protein, indicates that the redox potential of the iron-sulfur cluster is 250 mV more oxidant in the b position as compared to the freely moving subunit. This implies that the Rieske protein facilitates the first oxidation of quinol by becoming more oxidant when in contact with the Q_o site, and becomes more reducing at the cytochrome c_1 interface in order to efficiently transfer electrons to this subunit.

REFERENCES

1. Brandt, U., and Trumpower, B. L. (1994) *CRC Crit. Rev. Biochem.* **29**, 165-197
2. Brandt, U. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1365**, 261-268
3. Crofts, A. R., and Wang, Z. (1989) *Photosynth. Res.* **22**, 69-87
4. Crofts, A. R., Hong, S., Ugulava, N., Barquera, B., Gennis, R., Guergova-Kuras, M., and Berry, E. A. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 10021-10026
5. Crofts, A. R., Barquera, B., Gennis, R. B., Kuras, R., Guergova-Kuras, M., and Berry, E. A. (1999) *Biochemistry* **38**, 15807-15826
6. Jünneman, S., Heathcote, P., and Rich, P. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 21603-21607
7. Snyder, C. H., Gutierrez-Cirlos, E. B., and Trumpower, B. L. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 13535-13541
8. Link, T. A. (1997) *FEBS Lett.* **412**, 257-264
9. Iwata, M., Björkman, J., and Iwata, S. (1999) *J. Bioenerg. Biomembr.* **31**, 169-175
10. von Jagow, G., and Ohnishi, T. (1985) *FEBS Lett.* **185**, 311-315
11. Brandt, U., Haase, U., Schägger, H., and von Jagow, G. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 19958-19964
12. Covián, R., and Moreno-Sánchez, R. (2001) *Eur. J. Biochem.* **268**, 5783-5790
13. Link, T. A. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1185**, 81-84
14. Ljungdahl, P., Pennoyer, J. D., and Trumpower, B. L. (1986) *Methods Enzymol.* **126**, 181-191
15. Rich, P. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **768**, 53-79

16. von Jagow, G., and Link, T. A. (1986) *Methods Enzymol.* **126**, 253-271
17. Eyzaguirre, J. (1987) *Chemical Modification of Enzymes: Active Site Studies*, John Wiley and Sons, New York, NY
18. Darrouzet, E., Valkova-Valchanova, M, Moser, C. C., Dutton, P. L., and Daldal, F. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 4567-4572
19. Darrouzet, E., Valkova-Valchanova, M, and Daldal, F. (2002) *J. Biol. Chem.* **267**, 3464-3470
20. Kim, H., Xia, D., Yu, C. A., Xia, J. Z., Kachurin, A. M., Zhang, L., Yu, L., and Deisenhofer, J. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 8026-8033
21. Crofts, A. R., Hong, S., Zhang, Z., and Berry, E. A. (1999) *Biochemistry* **38**, 15827-15839
22. Zhang, L., Snyder, C., Trumpower, B. L., Yu, L., and Yu, C. A. (1999) *FEBS Lett.* **460**, 349-352
23. Hong, S., Ugulava, N., Guergova-Kuras, M., and Crofts, A. R. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 33931-33944
24. Crofts, A. R., Guergova-Kuras, M., Kuras, R., Ugulava, N., Li, J., and Hong, S. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1459**, 456-466
25. Ohnishi, T., Brandt, U., and von Jagow, G. (1988) *Eur J. Biochem.* **176**, 385-389
26. Bowyer, J. R., Edwards, C. A., Ohnishi, T., and Trumpower, B. L. (1982) **257**, 8321-8330
27. Matsuura, K., Bowyer, J. R., Ohnishi, T., and Dutton, P. L. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 1571-1579
28. Brasseur, G., Sami Saribas, A., and Daldal, F. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1275**, 61-69

29. Brandt, U., and Djafarzadeh-Andabili, R. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* **1321**, 238-242
30. Brandt, U., Schägger, H., and von Jagow, G. (1988) *Eur. J. Biochem.* **173**, 499-506
31. Matsuno-Yagi, A., and Hatefi, Y. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 19006-19011

FOOTNOTES

¹**Abbreviations:** bc_1 complex, ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase; EPR, electron paramagnetic resonance; k'_1 , pseudo-first order rate constant; k_1 , second order binding rate constant; k_{-1} , first order release rate constant; K_d , dissociation constant; K_m , Michaelis-Menten constant; heme b_L , low-potential b -type heme; heme b_H , high-potential b -type heme.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Spectra of purified bovine heart bc_1 complex 1 μM with different reductants. (a) Air-oxidized, pH 7.5; (b) air-oxidized, pH 9; (c) potassium ferricyanide (1mM)-oxidized; (d) ascorbate (1mM)-reduced; (e) decylbenzoquinol (4 μM)-reduced; (f) dithionite-reduced; (g) dithionite- minus ascorbate-reduced; (h) dithionite- minus decylbenzoquinol-reduced; (i) decylbenzoquinol- minus ascorbate-reduced. Spectra were carried out in the reaction medium described under Experimental Procedures. All spectra, except (b), were obtained at pH 7.5.

Figure 2. Determination of kinetic rate constants for stigmatellin and myxothiazol binding to the oxidized bc_1 complex at pH 7.5. Pseudo-first order rate constants (k'_1) for various concentrations of stigmatellin (A) and myxothiazol (B) in the air-oxidized bc_1 complex were obtained by fitting each time-dependent inhibition of the initial rate to a first-order decay function. The slopes (\pm standard error of the fitting) obtained by linear fitting of the k'_1 vs. inhibitor concentration data (C) correspond to the second order binding rate constants (k_1) for stigmatellin in the air-oxidized complex ($2.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, filled squares), in the ferricyanide-oxidized enzyme ($2.9 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, open squares), and for myxothiazol in the air-oxidized complex ($8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). The ordinate values correspond to the dissociation rate constants (k_{-1}), which were 0 for stigmatellin in both air- and ferricyanide-oxidized conditions (values of -0.004 were obtained if the ordinates were not constrained to positive values), and 0.00037 ± 0.001 for myxothiazol.

Figure 3. Binding rate constants for stigmatellin and myxothiazol binding to the oxidized bc_1 complex as a function of pH. Determination of binding rate constants at each pH value was determined as shown in Figure 2. In the case of stigmatellin, filled symbols correspond to values obtained in the air-oxidized enzyme, and open symbols to those determined in the ferricyanide-oxidized complex.

Figure 4. Determination of K_d for decylbenzoquinone in the oxidized bc_1 complex as a function of pH. Observed binding rate constants (k_1 obs) for stigmatellin (left panels) and myxothiazol (right panels) as a function of decylbenzoquinone concentration at pH 6.5 (upper panels), pH 7.5 (middle panels), and pH 9 (lower panels) were fitted to equation 3 (Experimental Procedures). Inserts: pseudo-first order rate constants (k'_1) at different inhibitor concentrations from which k_1 and k_{-1} values were obtained as shown in Figure 2. See Table 1 for fitted values. All determinations were performed in the air-oxidized complex.

Figure 5. Binding of stigmatellin, myxothiazol and decylbenzoquinone to the ascorbate-reduced bc_1 complex. Observed binding rate constants (k_1 obs) for stigmatellin (left panel) and myxothiazol (right panel) as a function of decylbenzoquinone concentration were fitted to equation 3 (Experimental Procedures). See Table 1 for fitted values. Insert: pseudo-first order rate constants (k'_1) at different inhibitor concentrations from which k_1 and k_{-1} values were obtained as shown in Figure 2.

Figure 6. Binding of stigmatellin, myxothiazol and decylbenzoquinol to the decylbenzoquinol-reduced bc_1 complex. Observed binding rate constants (k_1 obs) for stigmatellin (left panel) and myxothiazol (right panel) as a function of decylbenzoquinol

concentration were fitted to equation 3 (Experimental Procedures). See Table 1 for fitted values. Inserts: pseudo-first order rate constants (k'_1) at different inhibitor concentrations from which k_1 and k_{-1} values were obtained as shown in Figure 2.

Table 1: Kinetic parameters of stigmatellin, myxothiazol, quinone, and quinol binding to fully oxidized and Rieske protein reduced bovine bc_1 complex.

Redox state	Stigmatellin				Myxothiazol			
	k_1 ($\times 10^6 M^{-1}s^{-1}$)	k_{-1} (s^{-1})	$K_d I^b$ (nM)	$K_d Q^c$ (μM)	k_1 ($\times 10^6 M^{-1}s^{-1}$)	k_{-1} (s^{-1})	$K_d I^b$ (nM)	$K_d Q^c$ (μM)
Oxidized pH 6.5	2.6 ± 0.2^a	<0.005	<1	36 ± 6	0.88 ± 0.01	<0.004	<5	26 ± 1
Oxidized pH 7.5	2.5 ± 0.1^a	<0.001	<0.4	46 ± 4	0.78 ± 0.04	<0.003	<3	40 ± 4
Oxidized pH 9	2.2 ± 0.1^a	<0.002	<0.9	32 ± 3	0.74 ± 0.04	<0.003	<4	23 ± 3
Ascorbate-reduced	4 ± 0.14	<0.004	<1	16 ± 1	0.83 ± 0.02	<0.003	<3	22 ± 2
Decylbenzoquinol- reduced	3.5 ± 0.2	<0.004	<1	15 ± 2	0.81 ± 0.02	<0.004	<4	10 ± 4

Data \pm standard error of the fitting.

^a Data obtained from fitting data in Figure 4.

^b K_d value for the inhibitor, corresponding to k_{-1}/k_1 .

^c K_d value for decylbenzoquinone in the oxidized and ascorbate-reduced bc_1 complex, and for decylbenzoquinol in the decylbenzoquinol-reduced complex. Values were obtained by fitting the observed k_1 values of each inhibitor at different concentrations of quinone or quinol to equation 3 (Experimental Procedures).

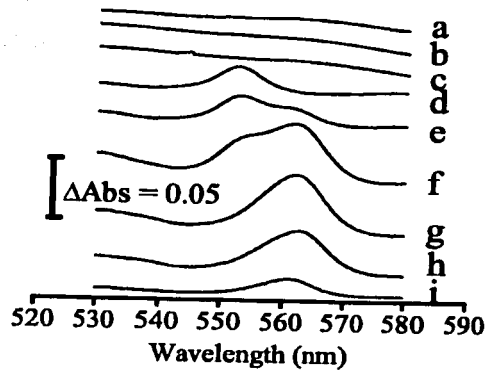


Figure 1

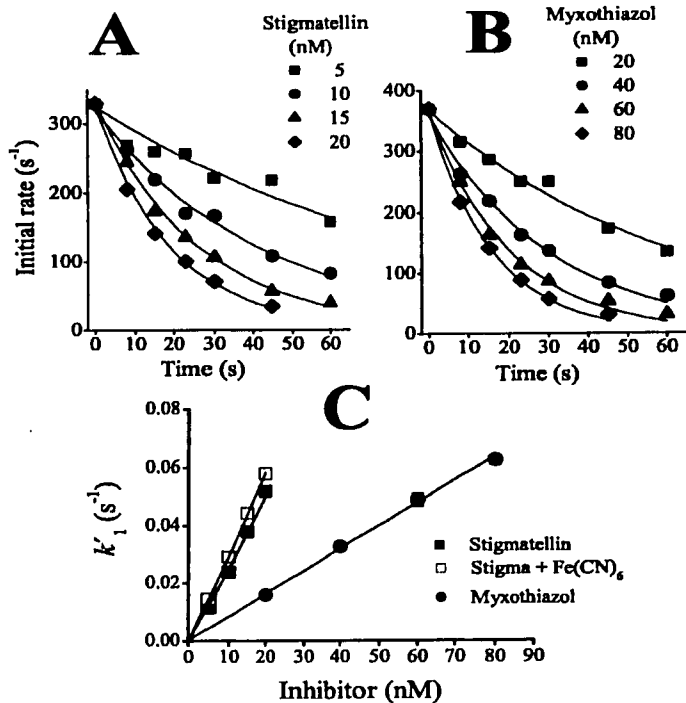


Figure 2

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

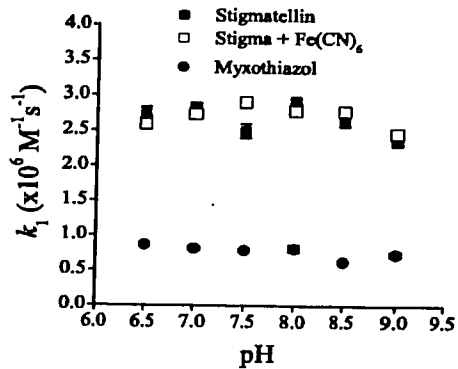


Figure 3

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

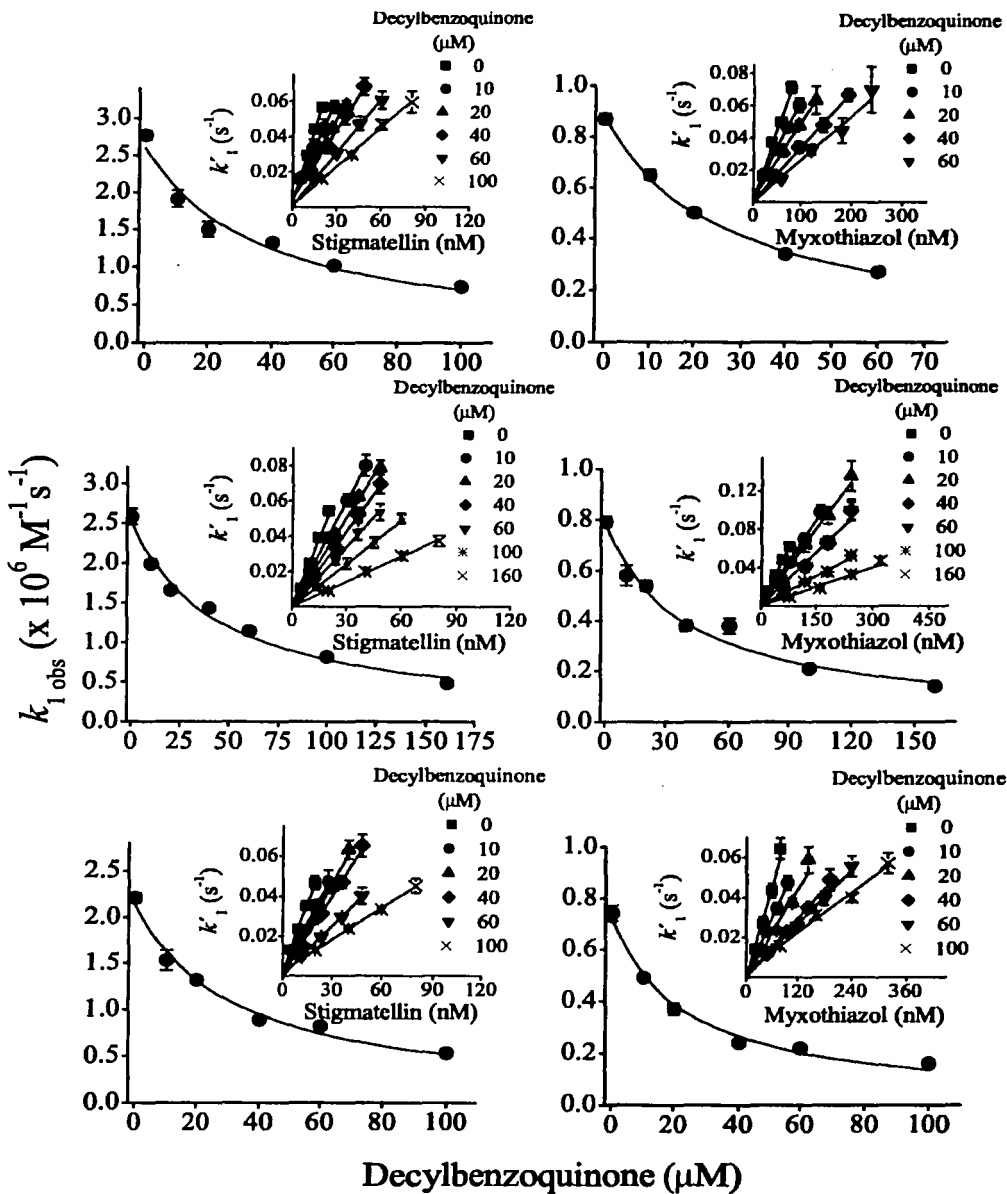


Figure 4

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

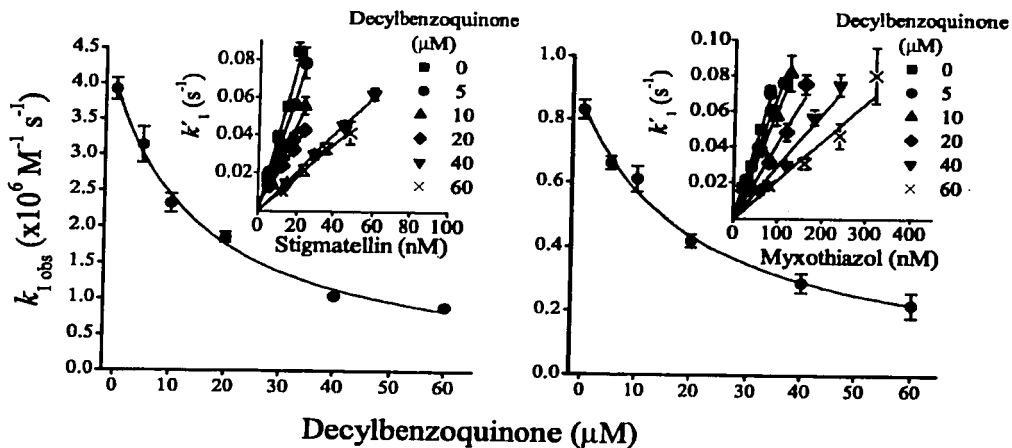


Figure 5

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

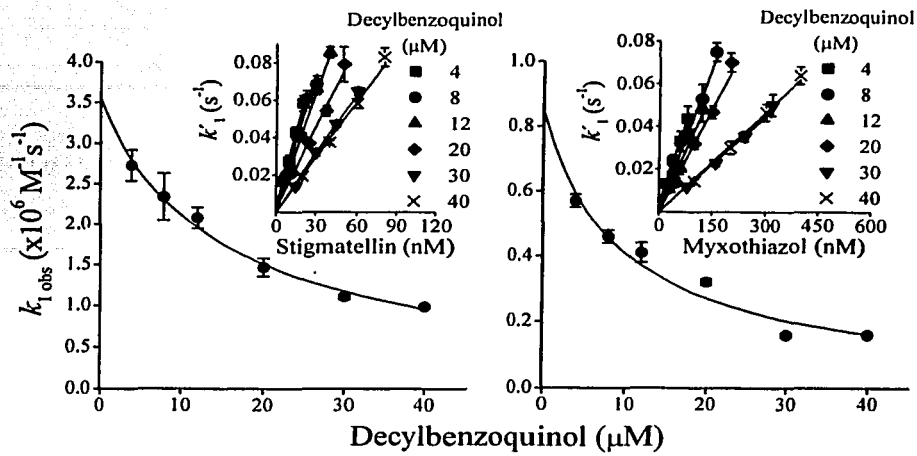


Figure 6

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INBOX: 50 de 59

Mover | Copiar este mensaje a: ▾

[Eliminar](#) | [Responder](#) | [Responder a todos](#) | [Reenviar](#) | [Redirigir](#) | [Reanudar](#) | [Guardar como](#)


[Regresar a INBOX](#) ◀ ▶

Fecha Fri, 13 Sep 2002 06:36:31 -0400

De dhodmer@asbmb.faseb.org

Para covinnraul@correo.unam.mx

Asunto From the JBC re: Manuscript M2:08060

Partes  (fuente)

M2:08060

Dear Dr. Covián:

Your manuscript entitled "Tight binding of inhibitors to bovine bcl complex is independent of the Rieske protein redox state. Consequences for semiquinone stabilization in the quinol oxidation site" has been reviewed by a member of the Editorial Board. I am pleased to report that the reviewer's overall evaluation was positive. The reviewer asks that you conduct one additional control to establish that the Rieske protein is fully oxidized in the "air oxidized" enzyme. Other suggestions are provided for revising the text (see attached reviewer comments). The concerns must be addressed before the manuscript can be accepted for publication.

We welcome a revised manuscript that addresses the concerns of the reviewer. Please return your revised manuscript via the JBC Electronic Submission site (<http://www.jbc.org/submit>). The manuscript must be accompanied by a cover letter in which you provide a point-by-point discussion of the changes made. Please note that the revised manuscript must be submitted within four months or it will be considered a new manuscript.

You may submit the revised manuscript as a single PDF file or as individual source files for text and figures. However, source files will be required if the manuscript is accepted for publication. If you submit only a PDF file for the revised manuscript, there may be a delay in time to print publication due to the additional submission and processing of source file. Therefore you are encouraged to submit source files for the revised manuscript. The following points should be considered when preparing these source files:

- *Your text files must be created in Microsoft Word version 6.0 or later.
- *Graphic files must be in high resolution TIFF or EPS format.
- *Complete instructions of preparation of text and graphic files can be found at www.jbc.org/misc/itoa.shtml

It is crucial that you review the revised version of your manuscript with great care before submission. If your paper is accepted, we will publish your manuscript in JBC Papers in Press on the day of acceptance. A description of JBC Papers in Press can be found at <http://www.jbc.org>.

To save time, I am sending you this letter and the reviewer's comments by email. Thank you for giving us the opportunity to consider your work. I look forward to receiving your revised manuscript.

Yours sincerely,

Judith S. Bond
Associate Editor

Attachment:

Comments for author:

This is a carefully conducted study that comes to two provocative conclusions regarding the binding of inhibitors, especially stigmatellin, to the Qp pocket on the yeast bcl complex. By examining the pH dependence of inhibition the authors conclude that the binding of

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

stigmatellin is largely independent of hydrogen bonding to His-161 of the Rieske protein. By examining the dependence of inhibition on redox-state of the Rieske protein they conclude that the binding is not dependent on the Rieske protein being reduced. Although contrary to the most widely accepted current views, both of these conclusions are feasible, provided that the authors' data is solid.

In order to solidify their argument and make their conclusions fully consistent with their data, some additional experimentation and revisions are required as follows.

- The optical spectra demonstrating that the bcl complex is oxidized were obtained at 1 micromolar enzyme, while the enzyme assays were performed with 1 nanomolar enzyme. Although the optical spectra show that the enzyme is oxidized, there is a good possibility that the Rieske protein in the "air oxidized" enzyme under the conditions of their assay has become spontaneously reduced by endogenous reducing equivalents in the enzyme. To exclude this possibility these experiments need to be repeated with ferricyanide oxidized enzyme; otherwise the conclusion regarding the Rieske redox-state is not convincing.

- Assuming that the ferricyanide oxidized enzyme yields the same results as the "air oxidized" enzyme, the authors should then explicitly state that the redox potential of the Rieske cluster is increased ~250 mV when the Rieske protein is in the "b position." This is an important conclusion should be emphasized more in their discussion.

- It is an over-simplification to state that "binding of stigmatellin is independent of the protonation state of histidine 161." The crystal structures of both bovine and yeast enzyme show quite clearly that there is stigmatellin in hydrogen bonded to this histidine. It is most likely that the hydrophobic interactions of the sidechain provide most of the binding energy, as indicated by the authors, but that stigmatellin then recruits as proton to form the hydrogen bond as it binds. The authors should reword this section of their Discussion appropriately.

- The discussion about double occupancy on p16 should be dropped. It is not possible to compare the NMR results, which were obtained with >100 micromolar enzyme concentration, with the currents results, which were obtained with enzyme at concentrations 5 orders of magnitude less.

- There is a substantial body of genetic evidence regarding binding of stigmatellin and myxothiazol that should be reconciled with the authors' interpretation of their current results. In that regard the authors should show in the crystal structure of the yeast enzyme the location of the mutations that confer resistance to stigmatellin and myxothiazol and rationalize the location of those mutations with their conclusions regarding the structural determinants of inhibitor binding. The relevant mutations are compiled in Ref. 1 and Brasseur et al, (1996) Biochim. Biophys. Acta. 1275, 61-69 and the crystal structure and pdb accession number of the yeast enzyme are described in Hunte et al, (2000) Structure, 8, 669-684.

A revised manuscript that addresses these criticisms could be reconsidered for publication.

[Eliminar](#) | [Responder](#) | [Responder a todos](#) | [Reenviar](#) | [Redirigir](#) | [Reanudar](#) | [Guardar como](#)

[Regresar a INBOX](#) ◀ ▶

[Mover](#) | [Copiar](#) | [este mensaje a:](#) ▼

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

October 1st, 2002

Judith S Bond, PhD
Department of Biochemistry & Molecular Biology, H171
The Pennsylvania State University
Hershey PA 17033-0850

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Dear Dr. Bond:

Thank you for your letter of September 12 concerning the evaluation of our manuscript number M2:08060 entitled "Tight binding of inhibitors to bovine bc1 Complex is independent of the Rieske protein redox state. Consequences for semiquinone stabilization in the quinol oxidation site". We were invited to resubmit the paper after attending the points raised by a member of the Editorial Board. In the enclosed revised manuscript, we have carefully addressed the reviewer suggestions. A point-by-point description of the changes made is detailed below:

1. The additional experiment suggested by the reviewer was carried out. The determination of stigmatellin binding between pH 6.5 and 9 was repeated using 1 μ M bc1 complex oxidized with 1 mM ferricyanide. The spectrum of this ferricyanide oxidized enzyme is now shown in Figure 1, trace c. The concentration of this oxidant after diluting the enzyme in the reaction media was 1 μ M, a 1000-fold excess with respect to the final enzyme concentration (1nM). This is now described in the Experimental Procedures section, on page 7, second paragraph. The binding rates for stigmatellin with the ferricyanide-oxidized enzyme were essentially the same to those estimated with the air-oxidized enzyme. These new data are shown in Figures 2C and 3; in consequence, the text was modified in the Results and Discussion sections on page 9, lines 11-15; page 10, lines 2-4; and on page 11, lines 8-12. In addition, the spectrum of the air oxidized enzyme at pH 9 (where all the electrons present in the Rieske protein are expected to reduce cytochrome c1 because of the sharp decrease of the iron-sulfur redox potential at alkaline pH values) is shown in Figure 1, trace c. This spectrum shows that over 97% of the enzyme is oxidized in the air oxidized condition.
2. According with the reviewer, the conclusion that the redox potential of the Rieske protein is increased by 250 mV in the b position has been emphasized in the Discussion section on page 12, lines 16-19; page 13, lines 16-17; and in the last 7 lines of page 17.
3. The section concerning the dependence of ligand binding with respect to the protonation state of His 161 has been reworded, as suggested by the reviewer. Thus, the Discussion subtitle at the end of page 13 was changed, lines 2-5 of page 15 were added, and lines 19-21 of the same page were modified to emphasize that hydrogen recruiting probably occurs upon ligand binding.
4. The discussion about double occupancy, along with one reference, was deleted from the text.
5. Genetic and mutational evidence supporting our conclusions was added to the discussion on page 14, lines 18-24 (concerning stigmatellin resistance

mutations), and on page 16, lines 10-17 (regarding myxothiazol). One new reference (28) was added.

Except for the changes specified in this letter, the rest of the text was unaltered. We would like to thank the reviewer for his (her) suggestions, which have certainly strengthened the conclusions of our paper. We hope the revised manuscript may be found acceptable for publication.

Yours truly,

Raúl Covián
Department of Biochemistry
Instituto Nacional de Cardiología

INBOX: 57 de 59

Mover | Copiar | **este mensaje a:** ▾

[Eliminar](#) | [Responder](#) | [Responder a todos](#) | [Reenviar](#) | [Redirigir](#) | [Reanudar](#) | [Guardar como](#)

Regresar a INBOX ◀ ▶

Fecha Wed, 2 Oct 2002 07:40:12 -0400

De dhodmer@asbmb.faseb.org

Para covianraul@correo.unam.mx

Asunto From the JBC re: Manuscript M2:08060

Partes  **HTML** (fuente)

M2:08060 Revised

Dear Dr. Covian:

Your revised manuscript entitled "Tight binding of inhibitors to bovine bcl complex is independent of the Rieske protein redox state. Consequences for semiquinone stabilization in the quinol oxidation site" has been accepted for publication and is tentatively scheduled for a December/January issue. You will receive page proofs in approximately six weeks; please return promptly to expedite publication. You will be billed after publication for page charges, reprints you order, half-tone, electron micrographs and authors' alterations as applicable. The current charge for half-tone figures is \$20.00 each plus \$120.00 if you order special paper. Color figures, if any, will be charged at a rate of \$300.00 per figure.

Your paper will first be published on the day it was accepted as a JBC Papers in Press and can be seen at www.jbc.org.

Sincerely,

Judith S. Bond
Associate Editor

Attachment:

JBC publishes a colored illustration relevant to an article in the same issue. The cover illustration should be scientifically interesting and visually attractive and should NOT be a complex, data laden figure. The illustration submitted need not be a figure in the paper but should be closely related to the subject of the paper. To submit an illustration for consideration please send a high quality color PRINT (we cannot accept electronic figures). The print must be at least 7 inches wide by 6 inches tall to be considered. The figure can be larger but must be in the same proportion as 7 inches wide by 6 inches tall or it will not be considered. Include also an explanatory caption of 50-60 words as well as the manuscript number. Send to; Kristine Quinn, Dept. of Biological Sciences, 371 Serra Mall, Stanford University, Stanford CA, 94305-5020 (650-725 4819)

[Eliminar](#) | [Responder](#) | [Responder a todos](#) | [Reenviar](#) | [Redirigir](#) | [Reanudar](#) | [Guardar como](#)

Regresar a INBOX ◀ ▶

Mover | Copiar | **este mensaje a:** ▾

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

3.3 Caracterización de la resistencia a mixotiazol en el complejo bc_1 de *Euglena gracilis*.

En este trabajo, se determinó el tipo de inhibición que ejercen la estigmatelina y el mixotiazol sobre la actividad del complejo bc_1 de *Euglena gracilis*. Se encontró que, a diferencia de lo que ocurre en el complejo bc_1 de los tripanosomátidos (los organismos más cercanos filogenéticamente a *E. gracilis*), la estigmatelina es un inhibidor fuertemente unido ($K_d < 1$ nM). El mixotiazol, en cambio, mostró ser un inhibidor competitivo simple ($K_i = 2$ μ M), lo que implica que su unión es reversible. En consecuencia, la resistencia a mixotiazol en *Euglena* se traduce como la pérdida del carácter fuertemente unido de este inhibidor.

Puesto que los residuos que confieren resistencia al mixotiazol en tripanosomátidos (Thr 137 y Ser 256 del citocromo *b*) también confieren resistencia a la estigmatelina, se concluye que probablemente el citocromo *b* de *Euglena* tiene en estas posiciones los residuos conservados en organismos sensibles a estigmatelina (Gly 137 y Asn 256). Además, el citocromo *b* de *Euglena* probablemente tiene isoleucina en la posición 147, en vez de la fenilalanina que también contribuye a la resistencia a la estigmatelina en tripanosomátidos. Probablemente *Euglena* presente sustituciones en alguno o en varios de los residuos cuya mutación confiere resistencia sólo a mixotiazol (Ala 126, Tyr 132, Gly 143, y Phe 275). Sin embargo, otra posibilidad es que el citocromo *b* de *Euglena* sí comparta los mismos residuos con los tripanosomátidos en estas posiciones, pero que otras mutaciones hayan revertido el fenotipo a uno sensible a estigmatelina, pero resistente a mixotiazol.

Para concluir este trabajo, se busca identificar las subunidades que corresponden al citocromo *b* y a la proteína fierro-azufre en el complejo *bc*₁ aislado de *Euglena*. Con este fin se han realizado inmunoensayos utilizando anticuerpos generados contra estas subunidades en el complejo de bovino y se están empezando a obtener secuencias de aminoácidos del extremo amino terminal o de regiones internas de las subunidades identificadas con los anticuerpos. Los resultados que se han obtenido hasta ahora sugieren que la proteína fierro-azufre es una subunidad con mayor peso molecular (30 kDa) que el de la mayoría de los complejos *bc*₁ (20-25 kDa), como ocurre en tripanosomátidos. Por otra parte, se ha identificado tentativamente con anticuerpos contra el citocromo *b* de bovino a una subunidad de 17 kDa, bloqueada en el amino terminal. Esto implicaría que el citocromo *b* de *Euglena* se encuentra fragmentado en más de una subunidad, lo cual podría afectar la estructura del sitio Q_o, y por tanto la unión de inhibidores como el mixotiazol.

A continuación se presenta la primera versión del manuscrito en preparación conteniendo estos resultados.

CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA A MIXOTIAZOL EN EL COMPLEJO bc_1 DE *Euglena gracilis*

INTRODUCCIÓN

El complejo bc_1 (quinol-citocromo c oxidorreductasa) de varios organismos protistas presenta resistencia a inhibidores clásicos tales como la antimicina (ciliados), el mixotiazol (ciliados y tripanosomas), o la estigmatelina (triplanosomas) [1]. Este comportamiento anómalo se ha relacionado con el bajo grado de conservación que presenta a nivel de secuencia el citocromo b de los protistas con respecto a animales plantas, y hongos [2]. Esta alta divergencia del citocromo b de protistas es un reflejo de las grandes distancias evolutivas que separan a los organismos agrupados en este reino, Este hecho hace del citocromo b un blanco potencial de drogas que actúen como antagonistas de la quinona y que sean específicos para las mitocondrias de protistas parásitos [1]. Por otra parte, las substituciones inusuales que confieren resistencia a inhibidores permiten utilizar al complejo bc_1 de estos organismos como mutantes naturales que pueden ayudar a dilucidar aspectos mecanísticos de la oxidación de quinol, reacción clave en la conservación de energía en este complejo respiratorio.

El complejo bc_1 del protista *Euglena gracilis* comparte características poco usuales con la enzima de tripanosomas, como lo es la presencia de un solo enlace tioéter entre el hemo y el apocitocromo c_1 [3]. Esto produce un desplazamiento de 9 nm hacia el rojo del máximo de absorción de esta subunidad en la banda α del espectro visible. Por otra parte, se ha reportado que en membranas mitocondriales de *Euglena* el mixotiazol inhibe sólo parcialmente la actividad de quinol-citocromo c oxidorreductasa [4,5], aunque

los intentos previos que se han hecho por purificar el complejo bc_1 de este organismo en estado activo han fracasado [4]. Además, la secuencia del citocromo b en este organismo es desconocida, ya que no ha sido posible clonar el gen para esta subunidad ni aún utilizando sondas de ADN del citocromo b de tripanosomas, con quienes *Euglena* está más cercano filogenéticamente [6]. Esto sugiere que el citocromo b de este organismo es poco usual, incluso dentro de los protistas.

En este trabajo hemos obtenido una preparación pura y activa del complejo bc_1 de mitocondrias de *Euglena gracilis*. Hemos caracterizado cinéticamente la unión de la estigmatelina y el mixotiazol, encontrando que sólo este último se une al complejo de *Euglena* de manera diferente a como lo hace en complejos bc_1 típicos de mamíferos. Además hemos identificado tentativamente al citocromo b de este organismo como una subunidad de 17 kDa, lo cual sugiere una partición del gen para esta subunidad.

MATERIAL Y METODOS

*Purificación del complejo bc_1 de *Euglena gracilis*.* Se cultivaron células de *Euglena gracilis* cepa Z en medio Hutner modificado [7], y se cosecharon los cuatro días de cultivo (fase estacionaria temprana). Las mitocondrias se obtuvieron por sonicación y centrifugación diferencial como se ha descrito anteriormente [8], y se congelaron a -70 °C. Para obtener el complejo bc_1 purificado, se siguió el método descrito en [9], consistente en solubilizar las mitocondrias con β -D-lauril-maltósido (en este caso se usaron 1.5 mg de detergente/mg de proteína) y aplicar el sobrenadante del solubilizado a una columna de DEAE Bio Gel A (Bio Rad). Tras un gradiente de NaCl de 100 mM a 300 mM, las fracciones de color rojo se aplicaron a una columna de

DEAE Sefarosa (Sigma), de la cual se eluyó el complejo bc_1 tras aplicar un gradiente de NaCl de 100 mM a 400 mM. Tras concentrar en membrana de Amicon de 30 kDa, se diluyó la muestra con 50% de glicerol (v/v) y se guardó a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. La preparación contenía 3.1 y 2 nmol de hemo b y c_1 /mg de proteína, respectivamente, utilizando coeficientes de extinción reportados para otros organismos [10,11]. No se detectó hemo a espectrofotométricamente, ni actividad de citocromo c oxidasa utilizando 30 μM de citocromo c reducido de caballo.

Determinación de la actividad del complejo bc_1 y del tipo de inhibición de la estigmatelina y el mixotiazol. Se diluyó el complejo purificado a una concentración de 1 μM en un medio con 50 mM de Tris (pH 8.0), 50 % de glicerol (v/v), y 0.01% de Tween 20. El medio de actividad contenía 50 mM de Hepes, 20 mM de citrato de sodio, y 0.01% de Tween 20, pH 7.4. Se añadió 2 nM del complejo puro a 1 ml de medio de actividad que contenía 30 μM de citocromo c oxidado de caballo y la concentración deseada de decilbenzoquinol. Los datos se ajustaron a la siguiente ecuación de inhibición por sustrato:

$$v = \frac{V_m [S] \left(\frac{1}{1 + \frac{[S]}{K_{is}}} \right)}{K_m + [S]} \quad (1),$$

en donde v es la velocidad inicial, V_m es la velocidad máxima, K_m es la constante de Michaelis para el quinol ($[S]$), y K_{is} es la constante de inhibición que indica al afinidad de un segundo sitio hacia el quinol y donde éste actúa como inhibidor no competitivo de la reacción.

Para la determinación del tipo de inhibición de la estigmatelina, se añadieron a 1 ml de medio de actividad 30 μM de citocromo c oxidado de

caballo y la concentración deseada de decilbenzoquinona. Entonces, se añadió 2 nM de la enzima purificada, y tras 20 s, la concentración indicada de estigmatelina (tiempo cero). Tras el tiempo deseado, se añadió 16 μM de decilbenzoquinol (reducido según se ha reportado en [12]), y se midió la velocidad inicial de reducción de citocromo *c* por 4 s en un espectrofotómetro de doble haz utilizando la diferencia entre 550 y 540 nm. El tratamiento de los datos para obtener las constantes de velocidad de unión (k_1) y de disociación (k_{-1}) es como se ha descrito anteriormente para la enzima de bovino [13]. La ecuación utilizada para ajustar la variación de k_1 en función de la concentración de quinona fue la siguiente:

$$k_{1 \text{ obs}} = \frac{k_1}{1 + \frac{[Q]}{K_d}} \quad (2)$$

En esta ecuación, $k_{1 \text{ obs}}$ corresponde a la constante de velocidad de unión a cada concentración de quinona ($[Q]$), k_1 es la constante de velocidad de unión a cero de quinona, y K_d es la constante de disociación del complejo enzima-quinona.

Para caracterizar la inhibición por mixotiazol, se añadieron al medio de actividad 30 μM de citocromo *c* oxidado de caballo, la concentración deseada de decilbenzoquinol, y de mixotiazol. La actividad no enzimática se midió en estas condiciones por 20 s antes de añadir 2 nM de complejo bc_1 purificado para obtener la velocidad inicial de reducción de citocromo *c*. La actividad no enzimática (que se incrementó en función de la concentración de mixotiazol) se restó de esta pendiente inicial para obtener la actividad enzimática. Los datos se ajustaron a la siguiente ecuación para una inhibición competitiva simple con inhibición no competitiva por sustrato:

$$v = \frac{V_m [S] \left(\frac{1}{1 + \frac{[S]}{K_{is}}} \right)}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + [S]} \quad (3),$$

donde, además de las variables y constantes contempladas en la ecuación 1, se añade la concentración de inhibidor ([I]) y la constante de inhibición de éste (K_i).

Caracterización estructural e identificación de subunidades. El complejo bc_1 purificado de *Euglena gracilis* y de corazón de bovino se sometió a electroforesis desnaturalizante en el sistema de Tris-tricina descrito en [14], variando la concentración de acrilamida entre 12% y 20%. El logaritmo de la migración relativa contra el peso molecular de estándares comerciales (10 kDa a 200 kDa) se utilizó para calcular el peso molecular de las subunidades del complejo bc_1 teñidas con azul de Coomassie.

Las inmunorréplicas tipo Western [15,16] se realizaron tras transferir a nitrocelulosa las subunidades separadas en un gel al 16% de acrilamida. Se utilizaron anticuerpos policlonales generados en conejo contra el citocromo *b* (dilución 1:1000) y la proteína hierro-azufre (dilución 1:5000) del complejo de bovino. El segundo anticuerpo estaba conjugado a fosfatasa alcalina para el revelado.

Para obtener secuencias de aminoácidos de las subunidades del complejo de *Euglena*, se transfirieron geles al 12% a membrana de PVDF (Bio Rad), la cual se tiñó con rojo de Ponceau al 7.5%. Las bandas de proteína separaron con SDS y los extremos amino terminales se secuenciaron con la reacción de Edman acoplada a un sistema de HPLC, como se ha reportado [17].

RESULTADOS Y DISCUSION

*Obtención del complejo bc_1 de *Euglena gracilis* en forma activa.* La preparación obtenida en este trabajo de complejo bc_1 resultó tener una actividad superior a los 100 nmol de citocromo *c* reducido/nmol bc_1 s (Figura 1), muy semejante a la encontrada en membranas mitocondriales [5], y sensible en un 95% a la antimicina (dato no mostrado). La conservación de la actividad puede atribuirse al uso del detergente no iónico lauril maltósido, el cual ha sido utilizado con éxito en el aislamiento del complejo bc_1 activo de una variedad de organismos [9]. El uso de Tritón X-100 para solubilizar las mitocondrias en el primer intento de purificar la complejo bc_1 de *E.gracilis* [4], es capaz de disociar a la proteína hierro-azufre [18]. El uso de CHAPS en la solubilización de mitocondrias del tripanosomátido *Crithidia fasciculata* resultó también en la inactivación del complejo bc_1 desde el primer paso de purificación [11].

La titulación de la actividad del complejo bc_1 de *E. gracilis* con decilbenzoquinol se ajustó mejor a un modelo de inhibición por sustrato que a uno hiperbólico simple (Fig. 1). El sitio en el que el quinol inhibe es probablemente el que corresponde al sitio de reducción de quinona (Q_i), donde también se une la antimicina. De acuerdo con el modelo del ciclo Q [19], en el sitio Q_i el sustrato es la quinona, mientras que el producto es el quinol. Al acercarse a la saturación del sitio Q_o , donde el quinol es sustrato, este compuesto posiblemente desplaza a la quinona que está en el sitio Q_i , la cual probablemente permanece en el complejo durante el proceso de purificación [20]. El ajuste a un modelo de inhibición por sustrato implica que la velocidad máxima alcanzada en el sitio Q_o es de 270 s^{-1} , en el mismo orden de magnitud

que lo observado en el complejo de bovino, al igual que la afinidad por quinol ($K_m \sim 8 \mu\text{M}$) [21].

Tipo de inhibición de la estigmatelina y el mixotiazol en el complejo bc_1 de Euglena gracilis. La inhibición por estigmatelina en la enzima de *Euglena* resultó ser de tipo pseudoirreversible o fuertemente unido. Como se muestra en la Figura 2, el valor de k_{-1} fue muy cercano a cero, mientras que el valor de k_1 fue de $1.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, aproximadamente la mitad de lo encontrado en el complejo de bovino [13]. La K_d calculada a partir de estos datos se halla en el rango subnanomolar, en contraste con lo observado en tripanosomas, donde la IC_{50} para la estigmatelina en membranas mitocondriales es cercano a $1 \mu\text{M}$ [1]. Esto implica que los residuos responsables de la resistencia a la estigmatelina en tripanosomas (Thr 137, Phe 147, y Ser 256 del citocromo *b* [1,22]) no son los mismos en el caso de *Euglena*, o bien, que existen otras substituciones que permiten la unión fuerte de la estigmatelina. Al igual que en bovino [13], la estigmatelina fue un ligando competitivo con respecto a la quinona, lo cual sugiere que existe espacio para un solo ligando del sitio Q_o a la vez.

En contraste, la inhibición por mixotiazol en el complejo bc_1 de *Euglena* no fue dependiente del tiempo a las concentraciones usadas, lo que significa que su unión no es de tipo fuerte o pseudoirreversible. Por lo tanto, no fue posible determinar los valores de k_1 y k_{-1} , sino que directamente se determinó el valor de K_i al medir la velocidad inicial variando las concentraciones tanto de sustrato como de inhibidor (Fig. 3). El modelo cinético que resultó en un mejor ajuste de los datos fue uno competitivo simple donde se considera la inhibición por sustrato. En el caso del complejo de bovino, anteriormente demostramos que el mixotiazol es un inhibidor competitivo fuertemente unido, lo que significa que en *Euglena* existen cambios estructurales que

modifican el grado de reversibilidad del inhibidor, mas no el espacio accesible para la unión de ligandos en el sitio Q_o . En cuanto a la naturaleza de estos cambios estructurales, se han reportado substituciones en los residuos conservados Ala 126, Tyr 132, Gly 143, y Phe 275 que confieren resistencia al mixotiazol, pero no a la estigmatelina [22], por lo que es posible que en el citocromo *b* de *Euglena* alguna de estos residuos sea diferente. Sin embargo, otra posibilidad es que existan cambios más drásticos en la estructura del citocromo *b* en *Euglena*.

Patrón electroforético e identificación del citocromo b y la proteína fierro-azufre. El patrón de subunidades del complejo bc_1 de *E. gracilis* en el sistema de Tris-tricina (Fig. 4) mostró algunas diferencias con respecto al reportado previamente [4], en el cual se utilizaron los sistemas de Laemmli [23], y el de Kadenbach [24] que contiene urea. Por ejemplo, a diferencia del reporte anterior [4], en el presente trabajo se distinguen claramente tres distintas subunidades de alto peso molecular (las llamadas proteínas *core*), tal como ocurre en el complejo de papa [25], *Crithidia* [11], y en algunas preparaciones de levadura [26]. Por otra parte, una proteína de 37 kDa fue identificada como el citocromo *b* por Mukai *et al.* [4] en base a una tenue tinción de esta banda con la técnica para detección de grupos hemo [27]. Sin embargo, puesto que dicha tinción se hizo en gel desnaturalizante, es poco probable que los hemos *b* (no covalentemente unidos) se retengan en el apocitocromo desnaturalizado. En nuestra preparación (Fig. 4), sólo se observan tres proteínas contaminantes tenuemente teñidas en la región alrededor de los 37 kDa, que probablemente corresponden a la citocromo *c* oxidasa al comparar con el patrón electroforético ya reportado para este complejo [28].

El citocromo *b* de varios organismos, incluyendo el de tripanosomas, muestra una migración relativa que depende de la concentración de acrilamida en el gel [29]. Esto puede observarse en el caso del complejo de bovino (Fig. 4), donde dicha subunidad migra más rápidamente que el citocromo *c*₁ en un gel al 12%. Sin embargo, ninguna subunidad del complejo de *Euglena* mostró cambios significativos en su peso molecular aparente en función de la concentración de acrilamida (Fig. 4).

Las inmunodetecciones utilizando anticuerpo contra el citocromo *b* y la proteína fierro-azufre de bovino (Fig. 5) identificaron a la banda de 17 kDa como el posible citocromo *b* de *Euglena*, y a la de 32 kDa como la proteína fierro-azufre. La secuencia amino terminal de la subunidad de 32 kDa (Fig. 6) no mostró identidad significativa en alineamientos con otras proteínas fierro-azufre, lo cual no es sorprendente en vista del bajo grado de conservación de esta subunidad en el extremo amino terminal [30]. La proteína fierro-azufre de la mayoría de los organismos oscila entre 20 y 25 kDa [30], mientras que en tripanosomas es anormalmente grande (35 kDa), siendo mayor incluso que el citocromo *c*₁ [29]. Por lo tanto, al parecer en *Euglena* esta subunidad comparte una estructura global más parecida al de los tripanosomas. La subunidad de 17 kDa se encontró bloqueada en su extremo amino terminal, lo cual concuerda con lo que ocurre en otros citocromos *b*, donde la maquinaria traduccional de la mitocondria inicia los polipéptidos con formilmetionina.

Si la subunidad de 17 kDa efectivamente es homóloga a cierta región de los citocromos *b* típicos, surge la interrogante de si el resto de la proteína corresponde a otra de las subunidades. En el complejo *b₆f* del cloroplasto, el equivalente al citocromo *b* mitocondrial se encuentra fragmentado en dos proteínas, el citocromo *b*₆ y la subunidad IV, de 23 kDa y 17 kDa, respectivamente [30]. Puesto que el patrón electroforético del complejo de

Euglena muestra también una subunidad de 24 kDa, se obtuvo la secuencia amino terminal de esta proteína (Fig. 6). Sin embargo, no fue posible alinear esta secuencia con la de alguna región conservada de los citocromos *b*. Actualmente se están efectuando esfuerzos por obtener secuencias internas de las subunidades de 32, 24 y 17 kDa para permitir una identificación mas confiable de estas subunidades como la proteína hierro-azufre, y las dos mitades del citocromo *b*, respectivamente.

REFERENCIAS

- [1] Ghelli, A., Crimi, M., Orsini, S., Grandow, L., Zannotti, M., Lenaz, G., y Degli Esposti, M. 1992. *Comp. Biochem. Physiol.* 103B:329-338.
- [2] Degli Esposti, M., De Vries, S., Crimi, M., Ghelli, A., Patarnello, T., y Meyer, A. 1993. *Biochim. Biophys. Acta* 1143:243-271.
- [3] Mukai, K., Wakabayashi, S., y Matsubara, H. 1989. *J. Biochem.* 106:479-482.
- [4] Mukai, K., Yoshida, M., Joyosoki, H., Yao, Y., Wakabayashi, S., y Matsubara, H. 1989. *Eur. J. Biochem.* 178:649-656.
- [5] Moreno-Sánchez, R., Covián, R., Jasso-Chávez, R., Rodríguez-Enríquez, S., Pacheco-Moisés, F., y Torres-Márquez, M.E. 2000. *Biochim. Biophys. Acta* 1457:200-210.
- [6] Yasushira, S., y Simpson, L. 1997. *J. Mol. Evol.* 44:341-347.
- [7] Schiff, J.A., Lyman, H., y Russel, G.K. 1971. *Methods Enzymol.* 23:143-162.
- [8] Moreno-Sánchez, R., y Raya, J.C. 1987. *Plant Sci.* 48:151-157.
- [9] Ljungdahl, P.O., Pennoyer, J.D., Robertson, D.E., y Trumpower, B.L. 1987. *Biochim. Biophys. Acta* 891:227-241.

- [10] Degli Esposti, M., y Lenaz, G. 1991. *Arch. Biochem. Biophys.* 289:303-312.
- [11] Priest J.W. y Hajduk, S.L. 1992. *J. Biol. Chem.* 267:20188-20195.
- [12] Trumpower, B.L., y Edwards, C.A. 1979. *J. Biol. Chem.* 254:8697-8706.
- [13] Covián, R., Pardo, J.P., y Moreno-Sánchez, R. 2002. *J. Biol. Chem.* En prensa.
- [14] Schagger, H., Link, T.A., Engel, W.D., y von Jagow, G. 1986. *Methods Enzymol.* 126:224-237.
- [15] Towbin, H., Staehlin, T., y Gordon, J. 1979. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.
- [16] Blake, M.S., Johnston, K.H., Russell-Jones, G.J., y Gotschlich, E.C. 1984. *Anal. Biochem.* 136:175-179.
- [17] González, R., Mendoza-Hernández, G., y Plancarte, A. 2002. *Parasitol. Res.* 88:881-887.
- [18] Engel, W.D., Michalski, C., y von Jagow, G. 1983. *Eur. J. Biochem.* 132:395-407.
- [19] Trumpower, B.L., y Gennis, R.B. 1994. *Ann. Rev. Biochem.* 63:675-716.
- [20] Zhang, Z., Huang, L., Shulmeister, V.M., Chi, Y.I., Kim, K.K., Hung, L.W., Crofts, A.R., Berry, E.A., y Kim, S.H. 1998. *Nature* 392:677-684.
- [21] Covián, R., y Moreno-Sánchez, R. 2001. *Eur. J. Biochem.* 268:5783-5790.
- [22] Brasseur, G., Sami Saribas, A., y Daldal, F. 1996. *Biochim. Biophys. Acta* 1275:61-69.
- [23] Laemmli, U.K. 1970. *Nature* 227:680-685.
- [24] Kadenbach, B., Jaraus, J., Hartmann, R., y Merle, P. 1983. *Anal. Biochem.* 129:517-521.

- [25] Berry, E.A., Huang, L., y De Rose, J. 1991. *J. Biol. Chem.* 266:9064-9077.
- [26] Trumppower, B.L. 1990. *Microbiol. Rev.* 54: 101-129.
- [27] Thomas, P., Ryan, D., y Levin, W. 1976. *Anal. Biochem.* 75:168-176.
- [28] Bronstrup, V., y Hatchel, W. 1989. *J. Bioenerg. Biomembr.* 21:359-373.
- [29] Horvath, A., Berry, E.A., y Maslov, D.A. 2000. *Science* 287:1639-1640.
- [30] Berry, E.A., Guergova-Kuras, M., Huang, L.S., Crofts, A.R. 2000. *Ann. Rev. Biochem.* 69:1005-1075.

PIES DE FIGURA

Figura 1. Titulación de la actividad del complejo bc_1 purificado de *Euglena gracilis* con decilbenzoquinol. La línea sólida muestra el ajuste a la ecuación 1 (ver Materiales y Métodos) con los siguientes valores: $V_{\max} = 271 \text{ s}^{-1}$, $K_m = 8.3 \text{ }\mu\text{M}$, $K_{is} = 27.5 \text{ }\mu\text{M}$. La línea punteada muestra el ajuste a una función hiperbólica simple, y la línea segmentada indica la velocidad inicial en función de la concentración de sustrato eliminando el componente de inhibición por sustrato.

Figura 2. Determinación del tipo de inhibición de la estigmatelina. (A) Las constantes de pseudoprimer orden (k'_1) obtenidas a partir de la inhibición de la actividad tras incubar a diferentes tiempos en presencia de las concentraciones indicadas de estigmatelina y de quinona se grafican contra la concentración del inhibidor. Los valores de las ordenadas (correspondientes a k_1) fueron inferiores a 0.003. Los valores de las pendientes (k_1) se graficaron contra la concentración de quinona (B). La línea indica el ajuste a la ecuación 2 (ver Materiales y Métodos). El valor de k_1 en ausencia de quinona fue $1.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, y la K_d para quinona fue de $40 \text{ }\mu\text{M}$.

Figura 3. Tipo de inhibición del mixotiazol. Las velocidades iniciales en presencia de las concentraciones indicadas de quinol y mixotiazol se ajustaron a la ecuación 3 (ver Materiales y Métodos). Los valores del ajuste fueron: $V_{\max} = 158 \text{ s}^{-1}$, $K_m = 3.4 \text{ }\mu\text{M}$, $K_{is} = 40 \text{ }\mu\text{M}$, $K_i = 2.3 \text{ }\mu\text{M}$.

Figura 4. Patrón electroforético del complejo bc_1 de *Euglena gracilis* y de bovino en diferentes concentraciones de acrilamida. Las subunidades del complejo de bovino (bov) y de *E. gracilis* (Eug) se muestran al lado de los marcadores de peso molecular para cada concentración de acrilamida. La flecha indica la posición del citocromo b de bovino, cuyo peso molecular aparente es de 28.5 kDa (12%), 33 kDa (16%), y 37.2 kDa (20%).

Figura 5. Inmunodetección de la proteína hierro-azufre y del citocromo b de *Euglena gracilis*. Se muestran las tiras de nitrocelulosa conteniendo las subunidades del complejo de bovino (bov) y de *E. gracilis* (Eug) a los que se añadieron anticuerpos policlonales contra la proteína hierro-azufre (izquierda) y contra el citocromo b de bovino (derecha). En medio se muestra la tinción de las subunidades con azul de Coomassie.

Figura 6. Secuencias de los extremos amino terminales de algunas subunidades del complejo bc_1 de *Euglena gracilis*. Se muestran las secuencias obtenidas para la banda de 30 y 24 kDa. La subunidad de 17 kDa resultó estar bloqueada en su extremo amino terminal (X).

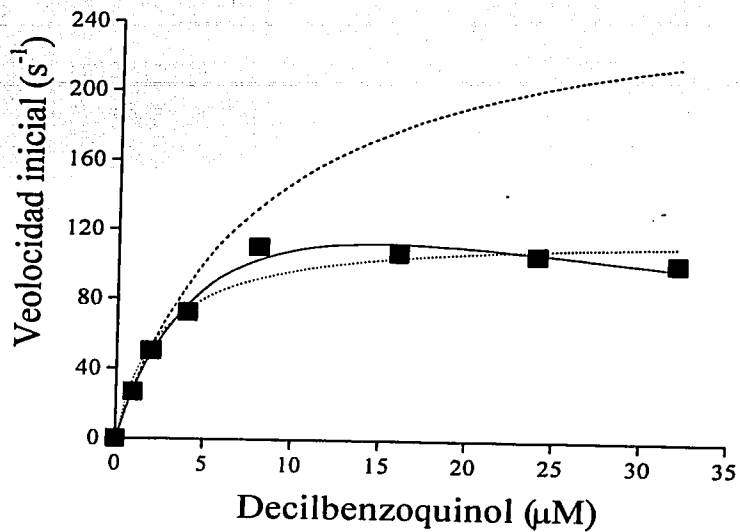


Figura 1

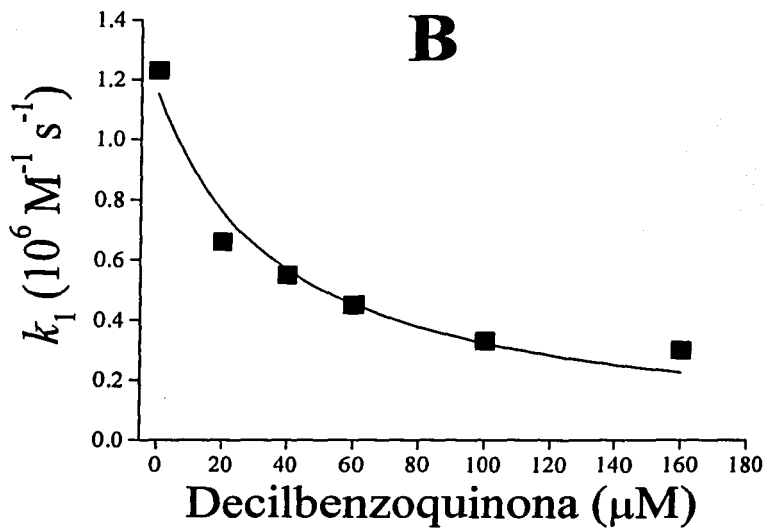
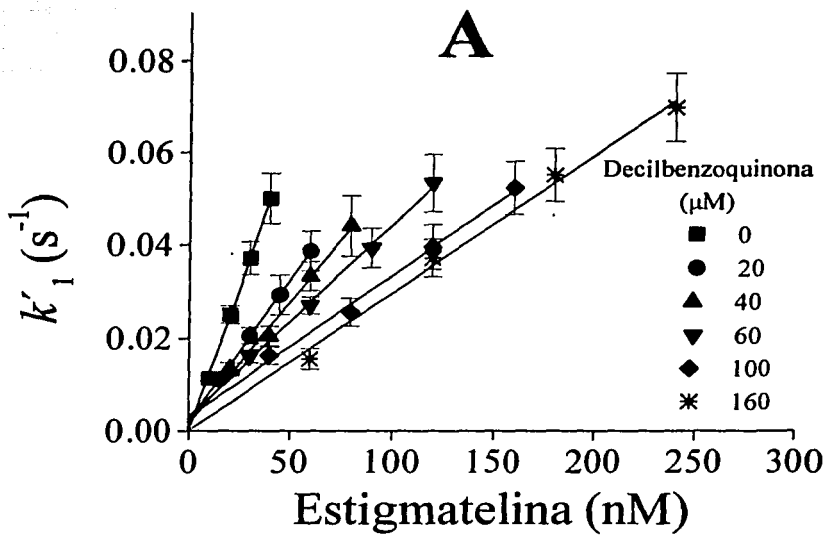


Figura 2

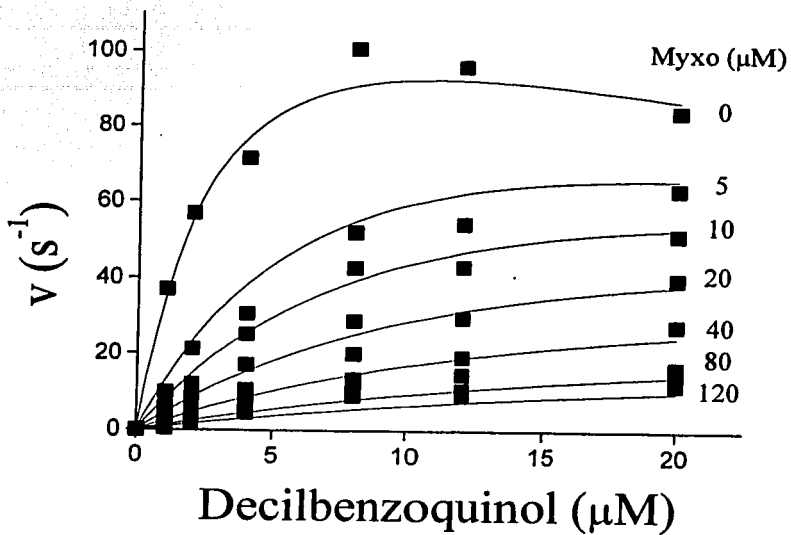


Figura 3

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

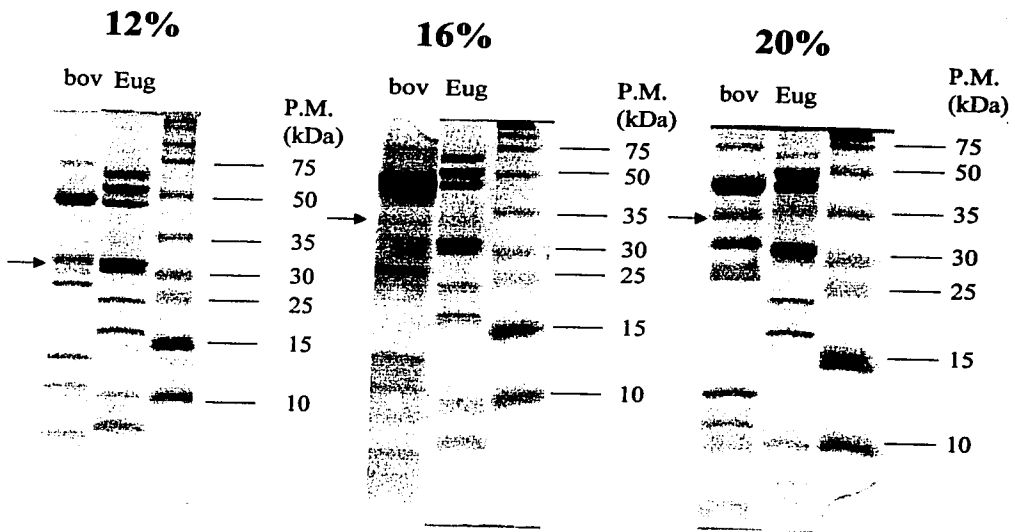


Figura 4

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

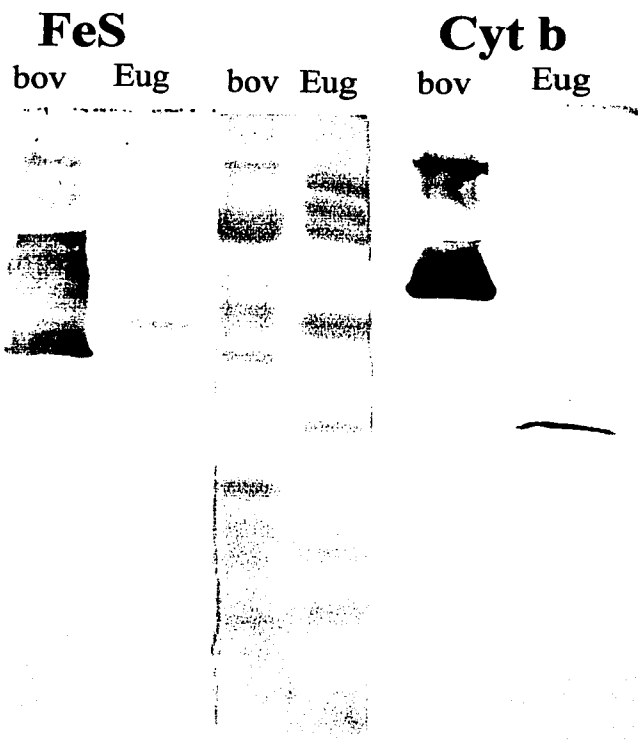


Figura 5

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

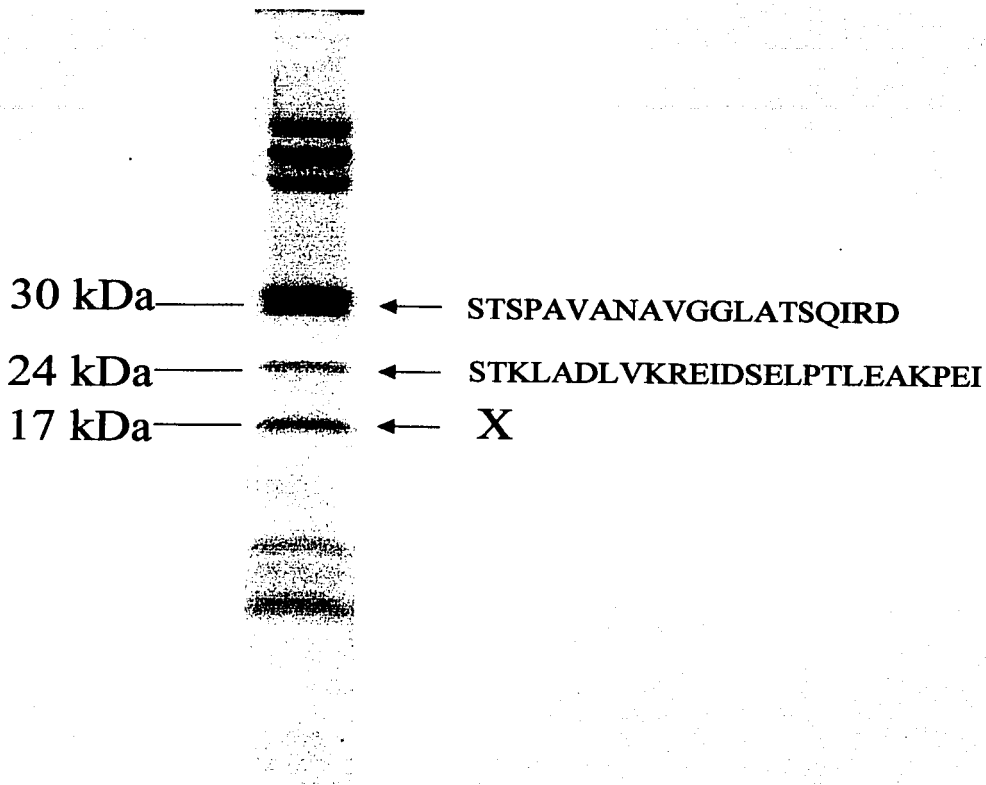


Figura 6

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPITULO 4

DISCUSION GENERAL

La relevancia de los resultados obtenidos en esta tesis radica en esclarecer el mecanismo de oxidación de quinol en tres aspectos:

- 1) Participación de grupos protonables como aceptores primarios de los protones provenientes de la oxidación de quinol.
- 2) Función de estos residuos en la unión del sustrato, el producto y los inhibidores fuertemente unidos, considerando a estos como posibles análogos de la semiquinona, la cual se ha postulado como intermediario de la reacción.
- 3) Efecto del estado redox de la proteína fierro-azufre sobre la unión de los inhibidores fuertemente unidos, considerados como análogos de la semiquinona.

Respecto a los primeros dos puntos, las estructuras cristalográficas del complejo bc_1 en presencia y ausencia de inhibidores [2-4] permitieron sugerir por primera vez que la histidina 161 de la proteína fierro-azufre y el glutámico 272 del citocromo *b* (ambos en forma desprotonada) eran los aceptores primarios de los protones que dona el sustrato al ser oxidado [8]. Puesto que la estigmatelina establece puentes de hidrógeno con ambos residuos, se simuló la posible ubicación del quinol en una configuración semejante a la del inhibidor, en donde los hidroxilos del sustrato se unen por puente de hidrógeno a estos residuos. Se propuso entonces que el complejo productivo se forma cuando el dominio extramembranal de la proteína fierro-azufre está en contacto con la interfase del citocromo *b*, y con su histidina 161 desprotonada [9]. El pK_a de este residuo cambia de 7.6 a más de 11 cuando el centro fierro-azufre se reduce [10], por lo que parecía razonable proponer que esta histidina acepta el

protón del quinol a la vez que ocurre la reducción de la proteína hierro-azufre. Al moverse esta subunidad hacia el citocromo c_1 , el centro hierro-azufre cedería su electrón, lo cual induciría el cambio de pK_a de la histidina 161 de 11 a 7.6 para liberar el protón al medio acuoso del exterior de la membrana.

Por otra parte, se observó en el complejo cristalizado que el glutámico 272 del citocromo b apunta hacia el sitio Q_o únicamente en presencia de la estigmatelina, mientras que en ausencia de este inhibidor este residuo se orienta hacia una canal donde se encuentra una cadena de moléculas de agua que comunica con el espacio que correspondería al lado externo de la membrana [4,8]. Estos datos sugerían que este residuo podría protonarse al oxidarse el quinol, y dirigirse hacia el canal acuoso para liberar el protón tras la salida del producto (quinona) del sitio Q_o .

Sin embargo, los estudios sobre la dependencia de la actividad del complejo bc_1 [9, 11] no parecían concordar con lo que sugerían las estructuras de difracción de rayos X. En condiciones de velocidad máxima, se encontró que la desprotonación de un grupo con pK_a de 6.5 era esencial para la catálisis. Algunos autores propusieron que este grupo correspondía a un residuo no identificado del citocromo b que desprotonaba al quinol antes de su oxidación [11]. Otros sugirieron que la histidina 161 tiene un pK_a aparente de 6.5 cuando el quinol está en concentraciones saturantes, debido a la desestabilización del protón de esta histidina para formar un puente de hidrógeno con el sustrato [9].

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta tesis, el pK_a de 6.5 no corresponde en realidad a ningún grupo protonable, sino que es el resultado de haber pasado por alto dos factores importantes. En primer lugar, no se había considerado el efecto que tiene sobre el potencial redox del centro hierro-azufre la desprotonación de las histidinas que coordinan a este centro. Puesto

que se ha demostrado en mutantes que la disminución del potencial del centro fierro-azufre disminuye la velocidad de catálisis [12,13], es necesario contemplar este fenómeno para disectar correctamente el perfil de actividad a distintos valores de pH. En segundo lugar, al no haber determinado la velocidad en función del pH a concentraciones no saturantes de sustrato, en los trabajos anteriores se pasó por alto que existen dos grupos protonables (pK_a de 7.5 y 5.7, respectivamente) que necesitan estar desprotonados para que exista catálisis. El cambio de afinidad hacia el protón que se observó para el residuo ácido concuerda además con la propuesta de que el glutámico 272 establece un puente de hidrógeno con la quinona, y que se mueva hacia un ambiente apolar en presencia de quinol. Por lo tanto, al considerar todos estos factores en el análisis cinético, los resultados concuerdan con lo sugerido en base a las estructuras cristalográficas.

Adicionalmente, en esta tesis se proporciona evidencia de que la interacción que establecen los ligandos del sitio Q_o con la histidina 161 de la proteína fierro-azufre no es el principal factor que determina su unión a este sitio. Esto indica que la conformación del sitio Q_o dada por los residuos del citocromo *b* es lo que influye en la afinidad del sustrato, el producto y los inhibidores fuertemente unidos. Puesto que está demostrado que la unión de la estigmatelina y el mixotiazol modifica la posición del dominio extramembranal de la proteína fierro-azufre [14], es posible que se transmitan cambios conformacionales hacia el sitio Q_o a través de la interfase del citocromo *b* con la fierro-azufre. Sin embargo, la reducción del centro fierro-azufre no altera la afinidad por estigmatelina ni por quinona más allá de un factor de 2, por lo que no hay base para sugerir que dicha reducción estabiliza la unión de la semiquinona en varios ordenes de magnitud [15].

Por lo tanto, los datos aquí presentados sugieren que el mecanismo de oxidación de quinol ocurre sin un intermediario estable. Puesto que el potencial redox para la primera oxidación de quinol (+800 mV [16]) es muy superior al del centro fierro-azufre (aún suponiendo que en la posición cercana al citocromo *b* este potencial es de +540 mV [17]), es necesario que la segunda oxidación ocurra muy rápidamente, o incluso de manera simultánea con respecto a la primera.

Aunque nuestros datos no apoyan directamente a los modelos que suponen que el sitio Q_o está ocupado por solo una molécula de quinol o quinona, el hecho de que la K_d obtenida para estas moléculas utilizando ya sea estigmatelina o mixotiazol fue muy semejante, esto implica que si existen dos quinonas simultáneamente, la afinidad por ambas es muy cercana. Esto es difícil de visualizar considerando el estrecho túnel hidrofóbico de acceso hacia el sitio Q_o que ocupan las cadenas laterales de los ligandos [8]. Por esta razón, se puede proponer más bien un modelo en el que una sola molécula de quinol o quinona cambia de posición entre los dos subdominios del sitio Q_o , coordinadamente con la posición de la proteína fierro-azufre. Así pues, la ocupación del subdominio correspondiente a la estigmatelina favorecería la posición de la fierro-azufre cercana al citocromo *b*, mientras que al moverse el quinol o la quinona hacia el subdominio ocupado por el mixotiazol, se desfavorece dicha posición de la proteína fierro-azufre. Esta propuesta de una quinona móvil en el sitio Q_o podría explicar la razón por la cual no se ha observado en los cristales la posición del sustrato o el producto [2,3].

Extendiendo esta propuesta al ciclo catalítico, tras la reducción de la proteína fierro-azufre en la interfase con el citocromo *b* por el quinol, el movimiento rápido de una semiquinona muy inestable hacia el subdominio del mixotiazol favorecería su oxidación a la vez que promovería el acercamiento

de la proteína fierro-azufre hacia el citocromo c_1 . Esto aseguraría la bifurcación de los electrones del quinol hacia las dos vías (fierro-azufre y hemo b_L), y aparecería como una reacción concertada [18]. Este modelo también permite prescindir de algún mecanismo especial (para el cual no hay evidencia) para mover a la semiquinona del dominio de la estigmatelina al mixotiazol. Este movimiento no sería favorable en caso de suponer que el puente de hidrógeno con la histidina 161 es muy importante para la unión, lo cual los resultados de esta tesis descartan. Más bien, este movimiento parece ocurrir simplemente como una difusión entre dos subdominios de afinidad semejante hacia la quinona o la semiquinona.

Los datos obtenidos con el complejo bc_1 de *Euglena gracilis* son de interés desde el punto de vista evolutivo al sugerir que un citocromo b mitocondrial pudiera encontrarse fragmentado a semejanza de lo que ocurre en los cloroplastos [1]. Además, la resistencia al mixotiazol, pero no a la estigmatelina, muestran que esta subunidad presenta diferencias importantes con respecto a la de los tripanosomas, con quienes *Euglena* comparte características únicas como son una proteína fierro-azufre de mayor peso molecular y un citocromo c_1 con un solo enlace covalente uniendo al grupo hemo [6,19,20]. Se sabe que en tripanosomas el mayor tamaño de la proteína fierro-azufre se debe a diferencias en el procesamiento del precursor de esta subunidad que se importa a la mitocondria, lo cual deja en estos parásitos una extensión en el amino terminal que no está presente en otros eucariontes [20]. Sin embargo, puesto que el dominio extramembranal de la proteína fierro-azufre está formada por la mitad carboxilo terminal [1], es poco probable que esta extensión en el extremo amino conlleve cambios en el mecanismo de oxidación de quinol. Algo similar pudiera decirse de la proteína fierro-azufre de *Euglena*, aunque se necesitaría la secuencia completa de esta subunidad en

este organismo para entender si también existe esta extensión en el amino terminal.

Por otra parte, el tipo de inhibición competitivo de la estigmatelina y el mixotiazol con respecto a la quinona y el quinol sugiere que, aunque la unión de alta afinidad de alguno de estos inhibidores no se conserva en varios complejos bc_1 de protistas, el espacio disponible para los ligandos en el sitio Q_o es aproximadamente el mismo. Por lo tanto, el mecanismo de oxidación de quinol debe estar muy conservado a lo largo de la escala filogenética. Incluso la posible fragmentación del citocromo b de *Euglena* debe de tener pocas repercusiones mecánicas, pues tanto en el complejo b_6f de cloroplasto [1], como en el complejo bc_1 de bacterias donde artificialmente se ha cortado en dos el gen del citocromo b [21], la oxidación de quinol ocurre con semejantes constantes cinéticas. Sin embargo, el estudio de la particularidades estructurales y mecánicas de los complejos bc_1 de protistas como *Euglena* puede aportar detalles interesantes respecto a la flexibilidad de las relaciones estructura-función en este complejo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

1. La oxidación de quinol en el complejo bc_1 se lleva a cabo cuando dos grupos que probablemente corresponden a la histidina 161 de la proteína fierro-azufre (pK_a 7.5) y al glutámico 272 del citocromo b (pK_a 5.7) están desprotonados. Esto sugiere que ambos residuos son los primeros aceptores de los protones que libera el quinol al oxidarse.
2. El residuo con pK_a de entre 5.2 y 5.7, (posiblemente el glutámico 272), aumenta su afinidad por el protón en presencia de quinona y quinol. Esto sugiere que este residuo, al protonarse, forma un puente de hidrógeno con la quinona, y que la unión del sustrato lo orienta hacia un espacio menos polar.
3. La afinidad del sitio Q_o hacia el quinol, la quinona y los inhibidores estigmatelina y mixotiazol no depende de la formación de un puente de hidrógeno entre el ligando y la histidina 161 de la proteína fierro-azufre. Esto indica que los residuos del citocromo b son los determinantes para la unión de estos ligandos.
4. La estigmatelina y el mixotiazol se unen fuertemente al sitio Q_o aún cuando la proteína fierro-azufre está oxidada. La reducción de esta subunidad aumenta moderadamente la afinidad hacia la estigmatelina y la quinona. Esto sugiere que la proteína fierro-azufre no estabiliza significativamente a la semiquinona formada tras la primera oxidación del quinol.
5. El mixotiazol es un inhibidor competitivo reversible del complejo bc_1 de *Euglena gracilis*. La unión fuerte de la estigmatelina a este complejo indica

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

diferencias estructurales en el citocromo *b* de *Euglena* con respecto al de los tripanosomátidos.

6. La proteína hierro-azufre de *Euglena* es de un tamaño más semejante al de los tripanosomátidos que al de los demás organismos, mientras que el citocromo *b* posiblemente esté fragmentado en más de una subunidad.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPITULO 6

PERSPECTIVAS

A pesar el gran avance en el entendimiento del mecanismo de oxidación de quinol que trajeron las estructuras de alta resolución por cristalografía, éstas no lograron mostrar la manera como se unen el quinol o la quinona al sitio Q_o . Por esta razón, aún se desconoce si en este sitio se pueden unir una o dos moléculas de sustrato o producto a la vez en concentraciones semejantes a las que se utilizan para medir la actividad enzimática. La determinación de la estequiometría de unión al sitio Q_o es una importante pieza que hace falta para adquirir un cuadro completo del mecanismo que permite dirigir por dos vías separadas a los electrones del quinol, lo cual permite la translocación de protones. Una cuestión estrechamente relacionada con el número de quinonas en el sitio Q_o es la función que tiene el subdominio más próximo al hemo b_L , donde se une el mixotiazol. En caso de que exista una sola molécula de quinol o quinona, los factores que determinan el desplazamiento del sustrato o de una semiquinona inestable hacia este sitio no son claros. Aunque en esta tesis se propone que este movimiento entre los subdominios del sitio Q_o podría ocurrir espontáneamente, el papel que desempeña la interacción de la proteína fierro-azufre con el citocromo b pudiera ser determinante. Sería interesante determinar los cambios de afinidad de esta interfase hacia la proteína fierro-azufre en presencia de ligandos de este subdominio del sitio Q_o , como los metoxiacrilatos, o en mutantes resistentes a inhibidores, en particular los que tengan cambios en la estructura del asa del citocromo b que interactúa con la proteína fierro-azufre durante su movimiento.

Por otra parte, la relevancia de la naturaleza dimérica del complejo bc_1 aún no se entiende completamente, aunque comienzan a surgir evidencias en

algunos organismos de que existe una cooperatividad hacia ciertos ligandos [22]. El papel que tiene esta dimerización en las reacciones que ocurren en el otro sitio de interacción con quinonas del citocromo *b*, el sitio Q_i , también parece evidenciarse por la unión cooperativa de la antimicina [23], la cual podría estudiarse con mayor facilidad con el enfoque experimental utilizado en esta tesis para determinar las constantes de velocidad de unión de inhibidores fuertemente unidos. Otro aspecto de gran interés para estudios futuros es la posible comunicación entre el sitio Q_o de un monómero con el Q_i de otro, así como la transferencia directa de electrones entre los hemo b_L de ambos monómeros [24].

El estudio del complejo bc_1 resulta importante no solo dentro del campo de la bioenergética, sino también en el contexto de la generación de especies reactivas de oxígeno involucradas en la apoptosis y el envejecimiento celular. El estudio de la inhibición de la cadena respiratoria a nivel del complejo bc_1 por moléculas que forman parte vías de señalización proapoptóticas como la ceramida [25,26], y de las reacciones que ocurren con el oxígeno en el complejo bc_1 inhibido [27], han permitido comenzar a entender el papel de este complejo en otros procesos celulares distintos al de la fosforilación oxidativa. El tratamiento de enfermedades metabólicas en las que el complejo bc_1 no es funcional mediante drenar los electrones de la poza de quinonas a través reacciones no enzimáticas [28] pudiera servir de base para tratar el daño por isquemia y reperfusión, e incluso para tratar de enlentecer el proceso del envejecimiento celular. Mediante introducir los genes para quinol oxidasas o citocromo *c* reductasas distintas al bc_1 [29] en células animales, se pudiera disminuir el daño causado por la continua fuga de electrones de la poza de quinonas al oxígeno.

Esta perspectiva de ramificar la cadena respiratoria linear de las células animales con fines terapéuticos se relaciona con el estudio de la regulación del flujo de electrones en las mitocondrias de plantas, hongos y protistas. En la cadenas respiratorias de estos organismos, el complejo bc_1 comparte como sustrato a la poza de quinonas con otras enzimas que no participan en generar un gradiente de protones, pero que son importantes en condiciones de exceso de equivalentes reductores. Por lo tanto, el estudio de la estructura de control de flujo en estas vías ramificadas permitirá entender los mecanismos que permiten a otros organismos contender con cambios drásticos en la disponibilidad de sustratos, concentración de oxígeno, temperatura, y otras condiciones del medio. Además, el estudio del papel del complejo bc_1 en el control del flujo en las cadenas ramificadas de parásitos es indispensable si se piensan utilizar las diferencias estructurales de este complejo como blanco para el diseño racional de fármacos específicos para estos organismos patógenos.

CAPITULO 7

BIBLIOGRAFIA

1. Berry, E.A., Guergova-Kuras, M., Huang, L.S., y Crofts, A.R. 2000. Structure and function of cytochrome bc complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 69:1005-1075.
2. Zhang, Z., Huang, L.S., Shulmeister, V.M., Chi, Y.I., Kim, K.K., Hung, L.W., Crofts, A.R., Berry, E.A., y Kim, S.H. 1998. Electron transfer by domain movement in cytochrome bc_1 . *Nature* 392:677-684.
3. Iwata, S., Lee, J.W. Okada, K., Lee, J.K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T.A., Ramaswamy, S., y Jap, B.K. 1998. Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc_1 complex. *Science* 281:64-71.
4. Hunte, C., Koepke, J., Lange, C., Rossmanith, T., y Michel, H. 2000. Structure at 2.3 Å resolution of cytochrome bc_1 complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment. *Structure* 8:669-684.
5. Ghelli, A., Crimi, M., Orsini, S., Grandow, L., Zannotti, M., Lenaz, G., y Degli Esposti, M. 1992. Cytochrome b of protozoan mitochondria: relationships between function and structure. *Comp. Biochem. Physiol.* 103B:329-338
6. Mukai, K., Yoshida, M., Joyosoki, H., Yao, Y., Wakabayashi, S., y Matsubara, H. 1989. An atypical heme-binding structure of cytochrome c_1 of *Euglena gracilis* mitochondrial complex III. *Eur. J. Biochem.* 178:649-656.
7. Izrailev, S., Crofts, A.R., Berry, E.A., y Schulten, K. 1999. Steered molecular dynamics simulation of the Rieske subunit motion in the cytochrome bc_1 complex. *Biophys. J.* 77:1753-1768.

8. Crofts, A.R., Barquera, B., Gennis, R.B., Kuras, R., Guergova-Kuras, M., y Berry, E.A. 1999. Mechanism of ubiquinol oxidation by the bc_1 complex: different domains of of the quinol binding pocket and their role in mechanism and binding of inhibitors. *Biochemistry* 38:15807-15826.
9. Crofts, A.R, Hong, S., Ugulava, N., Barquera, B., Gennis, R.B., Guergova-Kuras, M., y Berry, E.A. 1999. Pathways for proton release during ubihydroquinone oxidation by the bc_1 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:10021-10026.
- 10.Link, T.A. 1994. Two pK values of the oxidized Rieske cluster observed by CD spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1185:81-84.
- 11.Brandt, U., y Okun, J.G. 1997. Role of deprotonation events in ubihydroquinone: cytochrome c oxidoreductase from bovine heart and yeast mitochondria. *Biochemistry* 36:11234-11240.
- 12.Hong, S., Ugulava, N., Guergova-Kuras, M., y Crofts, A.R. 1999. The energy landscape for ubihydroquinone oxidation at the Q_o site of the bc_1 complex in *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Biol. Chem.* 274:33931-33944.
- 13.Snyder C.H., Merbitz-Zahradnik T., Link T.A., y Trumpower B.L. 1999. Role of the Rieske iron-sulfur protein midpoint potential in the protonmotive Q-cycle mechanism of the cytochrome bc_1 complex. *J. Bioenerg. Biomembr.* 31:235-242.
- 14.Crofts, A.R, Guergova-Kuras, M., Huang, L.S., Kuras, R., Zhang, Z., y Berry, E.A. 1999. Mechanism of ubiquinol oxidation by the bc_1 complex: role of the iron sulfur protein and its mobility. *Biochemistry* 38:15791-15806.
- 15.Link, T.A. 1997. The role of the Rieske iron sulfur protein in the hydroquinone oxidation (Q_p) site of the cytochrome bc_1 complex. *FEBS Lett.* 412:257-264.

16. Rich, P.R. 1984. Electron and proton transfers through quinones and cytochrome *bc* complexes. *Biochim. Biophys. Acta* 768:53-79.
17. Darrouzet, E., Valkova-Valchanova, M, y Daldal, F. 2002. The [2Fe-2S] cluster E_m as an indicator of the iron-sulfur subunit position in the ubihydroquinone oxidation site of the cytochrome *bc_1* complex. *J. Biol. Chem.* 277:3464-70.
18. Snyder, C.H., Gutierrez-Cirlos, E.B., y Trumpower, B.L. 2000. Evidence for a concerted mechanism of ubiquinol oxidation by the cytochrome *bc_1* complex. *J. Biol. Chem.* 275:13535-13541.
19. Priest J.W. y Hajduk, S.L. 1992. Cytochrome *c* reductase purified from *Crithidia fasciculata* contains an atypical cytochrome *c_1*. *J. Biol. Chem.* 267:20188-20195.
20. Horvath, A., Berry, E.A., y Maslov, D. 2000. Translation of the edited mRNA for cytochrome *b* in trypanosome mitochondria. *Science* 287:1639-1640.
21. Kuras, R., Guergova-Kuras, M., y Crofts, A.R. 1998. Steps toward constructing a cytochrome *b₆f* complex in the purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides*: an example of the structural plasticity of a membrane cytochrome. *Biochemistry* 37:16280-16288.
22. Gutierrez-Cirlos, E.B, y Trumpower, B.L. 2002. Inhibitory analogs of ubiquinol act anti-cooperatively on the yeast cytochrome *bc_1* complex. Evidence for an alternating, half-of-the-sites mechanism of ubiquinol oxidation. *J. Biol. Chem.* 277:1195-202.
23. Bechmann, G., Weiss, H., y Rich, P.R. 1992. Non-linear inhibition curves for tight-binding inhibitors of dimeric ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductases. Evidence for rapid inhibitor mobility. *Eur. J. Biochem.* 208:315-325.

24. Kim, H., Xia, D., Yu, C.A., Xia, J.Z., Kachurin, A.M., Zhang, L., Yu, L., y Deisenhofer, J. 1998. Inhibitor binding changes domain mobility in the iron-sulfur protein of the mitochondrial *bc₁* complex from bovine heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:8026-8033.
25. Guduz, T.I., Tserng, K.Y., y Hoppel, C.L. 1997. Direct inhibition of mitochondrial respiratory chain complex III by cell-permeable ceramide. *J. Biol. Chem.* 272:24154-24158.
26. Guidarelli A., Clementi E., De Nadai C., Bersacchi R., y Cantoni O. 2001. TNF α enhances the DNA single-strand breakage induced by the short-chain lipid hydroperoxide analogue tert-butylhydroperoxide via ceramide-dependent inhibition of complex III followed by enforced superoxide and hydrogen peroxide formation. *Exp. Cell. Res.* 270:56-65.
27. Muller, F., Crofts, A.R., y Kramer, D.M. 2002. Multiple Q-cycle bypass reactions at the Q_o site of the cytochrome *bc₁* complex. *Biochemistry* 41:7866-7874.
28. Argov, Z., Bank, W.J., Maris, J., Eleff, S., Kennaway, N.G., Olson, R.E., y Chance, B. 1986. Treatment of mitochondrial myopathy due to complex III deficiency with vitamins K3 and C: A ³¹P-NMR follow-up study. *Ann. Neurol.* 19:598-602.
29. Moreno-Sánchez, R., Covián, R., Jasso-Chávez, R., Rodríguez-Enríquez, S., Pacheco-Moisés, F., y Torres-Márquez, M.E. 2000. Oxidative phosphorylation supported by an alternative respiratory pathway in mitochondria from *Euglena*. *Biochim. Biophys. Acta* 1547:200-210.

CAPITULO 8

APÉNDICE

Colaboración en otros artículos

The Content of Alternative Oxidase of *Euglena* Mitochondria is Increased by Growth in the Presence of Cyanide and is not Cytochrome *c*.

SILVIA DEVARAS,* ROSA HERNANDEZ,* RAUL COVIAN,* ARTURO GARCIA-HORSMAN,** BLANCA BARQUERA** and RAFAEL MORENO-SANCHEZ*¹

*Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Juan Badiano # 1, Col. Sección XVI, Tlalpan, México, D. F. 14080 México, and

**Helsinki Bioenergetics Group, University of Helsinki, Finland

ABSTRACT. A study of the effect of respiratory inhibitors on O₂ uptake of *Euglena gracilis* mitochondria, isolated from cells grown in the presence of cyanide or with ethanol as carbon source, was undertaken. The contents of cytochrome *c* oxidase and alternative oxidase were also determined. Inhibition of respiration by antimycin and cyanide was only partial and it was dependent on the oxidizable substrate used. Succinate oxidation was the most sensitive to cyanide whereas lactate oxidation was the most resistant. Cell growth in the presence of cyanide or with ethanol as carbon source brought about an enhanced content of alternative oxidase without a concomitant increase in cytochrome *aa* content. However, a correlation between cyanide-resistant respiration and alternative oxidase content was not found. Analysis of heme types in mitochondrial membranes revealed the absence of heme O. The data suggest the presence of an inducible alternative oxidase in *Euglena* mitochondria which has high resistance to cyanide and contains heme B. A close relationship between *Euglena* alternative oxidase and bacterial quinol oxidases containing B-type heme is proposed.

Supplementary key words. Cyanide-resistant respiration, ethanol, heme, quinol oxidase.

MITOCHONDRIA isolated from the unicellular protist *Euglena gracilis* have a respiratory component that is resistant to antimycin and cyanide [4, 9, 37, 38]. A b-type cytochrome, able to react with carbon monoxide, has been identified in *Euglena* mitochondria [9, 31, 36, 37], which is very likely related to the alternative respiratory chain. The cyanide-insensitive pathway is blocked by diphenylamine [37, 41], preferentially oxidizes lactate [41], is able to generate a small, uncoupler-sensitive membrane potential [22, 41] and may drive an active Ca²⁺ transport [42]. Based on studies of antimycin and cyanide inhibition of respiration, a respiratory chain with two terminal oxidases and separate entries for oxidation of NADH, succinate and lactate has been proposed [4]. An alternative respiratory pathway has also been identified in other mitochondrial types such as fungi, green algae and in trypanosomatids [13, 21]. However, in these other eukaryotic systems, the alternative pathway does not seem engaged in the formation of a H⁺ gradient [13, 20, 21].

In a previous work [9] it was observed that the different cyanide-sensitivity of endogenous respiration of *Euglena* cells grown with different carbon sources did not correlate with an increase in the alternative oxidase (AO)/cytochrome *c* oxidase (CcO) ratio; however, an increase in the content of AO was found to correlate with increasing cyanide-resistant respiration. The alternative oxidase in *Euglena* mitochondria was defined as the slow CO-reacting component, with a peak at about 418 nm and troughs at 430 and 560 nm, in the CO-absorbance difference spectrum of dithionite-reduced mitochondria [9, 31, 36, 37]. In an effort to find experimental conditions which may enhance the participation of the alternative pathway in the oxidation of substrates, we have explored the effect of ethanol and glutamate + malate (in the presence of cyanide) as carbon sources in the growth medium on the antimycin and cyanide sensitivity of respiration rates and on the contents of AO and CcO of mitochondria isolated from such cells. For comparison, the effect of several respiratory inhibitors was also determined.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and growth conditions of wild-type *Euglena gracilis* Klebs (a Z-like strain) and isolation of mitochondria by sonication were described previously [9, 22, 41, 42]. This strain of *Euglena gracilis* has spontaneously lost the capacity for re-greening. The cells were grown in the dark in the following

culture media: (a) peptone plus acetate (p+a) medium [9]; (b) the acidic organotrophic medium with glutamate plus malate (G+M) as carbon source [15, 35]; (c) the ethanol medium where glutamate plus malate are replaced by 178 mM ethanol and (d) the G+M+CN medium where 0.2 mM cyanide was added to the G+M medium before the addition of the experimental cell inoculum.

Oxygen uptake of *Euglena* mitochondria was measured at 25° C with a Clark-type oxygen electrode in 1.85 ml of a medium containing 120 mM KCl, 20 mM MOPS (3-[N-morpholino] propanesulfonic acid), 2 mM EGTA (ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid), 5 mM K-phosphate of pH 7.2.

Carbon monoxide difference spectra of dithionite-reduced mitochondria were made in 50% (v/v) glycerol, 60 mM KCl, 10 mM MOPS, 1 mM EGTA, pH 8 at room temperature. The baseline was acquired from dithionite-reduced samples taken from the same mitochondrial suspension and placed in the reference and experimental cuvettes. The experimental sample was slowly bubbled with carbon monoxide in the dark for 30 s to reveal the cytochrome *aa*₃ signal and for 16 min to fully reveal the signal attributed to the alternative oxidase [9, 31, 37]; difference spectra between the untreated and CO-treated samples were obtained. Spectra were taken in a SLM-Aminco DW2000 spectrophotometer with a bandwidth set at 2 nm and a scanning speed of 2 nm s⁻¹.

Reduced *minus* oxidized difference spectra of *Euglena* mitochondria were taken in the 50% glycerol medium specified above. *Euglena* mitochondria were first incubated for 30 min at 25° C under shaking to induce full oxidation of endogenous substrates. The baseline (oxidized *minus* oxidized) was recorded after the mitochondrial samples were further vortexed and kept under 100% O₂ gassing during the acquisition of the spectrum. Addition of dithionite, to reduce the mitochondrial suspension in the experimental cuvette, allowed the measurement of the reduced *minus* oxidized spectrum.

Heme analysis of rat liver submitochondrial particles, *Euglena* mitochondrial membranes and inside-out membrane vesicles from *E. coli* and *Paracoccus denitrificans* was made after extraction of 50–100 mg protein with either acetone/NH₄OH or acetone/HCl and further treatment with ether as described elsewhere [29] with some modifications [14]. The hemes were separated and identified by reverse-phase HPLC (high pressure liquid chromatography) using a C18 column (Waters) equilibrated with 95% (v/v) ethanol/acetic acid/water (70:17:7, v/v).

The activity of TMPD (N,N,N',N'-tetramethyl-*p*-phenylene

¹ To whom correspondence should be addressed. Telephone: 525-573-2911 ext. 298; Fax: 525-573-0926.

Oxidative phosphorylation supported by an alternative respiratory pathway in mitochondria from *Euglena*

Rafael Moreno-Sánchez^{a,*}, Raúl Covián^a, Ricardo Jasso-Chávez^b,
Sara Rodríguez-Enríquez^a, Fermín Pacheco-Moisés^a, M. Eugenia Torres-Márquez^b

^a Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Juan Badiano # 1, Col. Sección XVI, Tlalpan, Mexico D.F. 14080, Mexico

^b Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico D.F., Mexico

Received 17 November 1999; received in revised form 3 February 2000; accepted 11 February 2000

Abstract

The effect of antimycin, myxothiazol, 2-heptyl-4-hydroxyquinoline-*N*-oxide, stigmatellin and cyanide on respiration, ATP synthesis, cytochrome *c* reductase, and membrane potential in mitochondria isolated from dark-grown *Euglena* cells was determined. With L-lactate as substrate, ATP synthesis was partially inhibited by antimycin, but the other four inhibitors completely abolished the process. Cyanide also inhibited the antimycin-resistant ATP synthesis. Membrane potential was collapsed (< 60 mV) by cyanide and stigmatellin. However, in the presence of antimycin, a H⁺ gradient (> 60 mV) that sufficed to drive ATP synthesis remained. Cytochrome *c* reductase, with L-lactate as donor, was diminished by antimycin and myxothiazol. Cytochrome *bc*₁ complex activity was fully inhibited by antimycin, but it was resistant to myxothiazol. Stigmatellin inhibited both L-lactate-dependent cytochrome *c* reductase and cytochrome *bc*₁ complex activities. Respiration was partially inhibited by the five inhibitors. The cyanide-resistant respiration was strongly inhibited by diphenylamine, *n*-propyl-gallate, salicylhydroxamic acid and disulfiram. Based on these results, a model of the respiratory chain of *Euglena* mitochondria is proposed, in which a quinol-cytochrome *c* oxidoreductase resistant to antimycin, and a quinol oxidase resistant to antimycin and cyanide are included. © 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: ATP synthesis; Antimycin; Cyanide-resistant respiration; *Euglena*

1. Introduction

Mitochondria isolated from dark-grown *Euglena gracilis* have respiratory components that are resistant to antimycin and cyanide [1–3]. The cyanide-resistant respiratory pathway is inhibited by diphenylamine (DPA) [2,4], preferentially oxidizes L-lactate [4,14], and builds up a small, uncoupler-sensitive

membrane potential [4,5], that supports the energy-dependent uptake of Ca²⁺ [6]. This pathway is partially inhibited by salicylhydroxamic acid (SHAM) [4,7], a potent inhibitor of alternative respiratory pathways in plant mitochondria [8]. Cell growth in the presence of antimycin [1,2,9], cyanide [10] or ethanol [10] as carbon source, induces an increase in the content of a *b*-type cytochrome, that reacts with carbon monoxide. This last observation has been interpreted in terms of an adaptable enhancement of an alternative oxidase, which is resistant to the stress conditions of the culture [1,2,10]. However,

* Corresponding author. Fax: +52-5-573-0926;
E-mail: morenosanchez@hotmail.com

PROBLEMA BIOQUÍMICO

TEMA: Cinética enzimática

Se determinó la actividad del complejo *bc* de las mitocondrias del protista *Euglena gracilis* titulando con antimicina, inhibidor de tipo no competitivo fuertemente unido. La actividad de esta enzima, que

forma parte de la cadena respiratoria, se determinó midiendo espectrofotométricamente la reducción de 30 μM de citocromo *c* de caballo añadido en presencia de 50 μM de decilbenzoquinol. A continuación se presentan las velocidades iniciales en presencia de las distintas concentraciones del inhibidor.

Antimicina ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	Velocidad inicial ($\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$)
0	210.6
10	189
20	193.5
50	181.5
100	111
150	91
200	48
250	31
300	16
400	16
500	10.6
1000	12

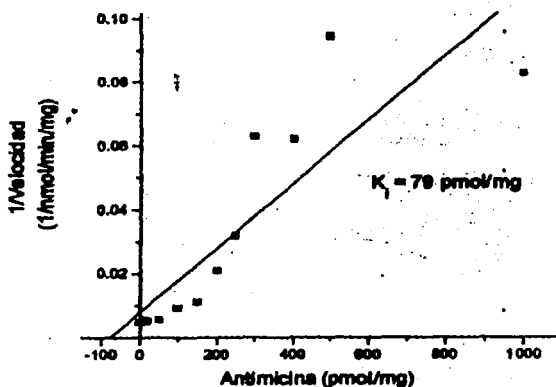
Determinar la K_i y la concentración de enzima.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PROBLEMA BIOQUÍMICO

RESPUESTA:

Los inhibidores fuertemente unidos son aquellos que se unen a la enzima con una afinidad muy grande; el valor de la constante de disociación del complejo enzima-inhibidor es cercano a la concentración de enzima (pM ó nM). Esto resulta en que una fracción considerable del total del inhibidor esté unida a la enzima y no en forma libre. Por estas razones, no es posible utilizar los métodos gráficos usuales para determinar la K_i , como el gráfico de Dixon para un inhibidor no competitivo simple, en el que se grafica el inverso de la velocidad contra la concentración de inhibidor total añadido para obtener una recta cuya abcisa es igual a $-K_i$. Los datos del problema graficados de esta manera clásica no se ajustan a una recta, por lo que la K_i calculada de este modo no es confiable, como se muestra a continuación:



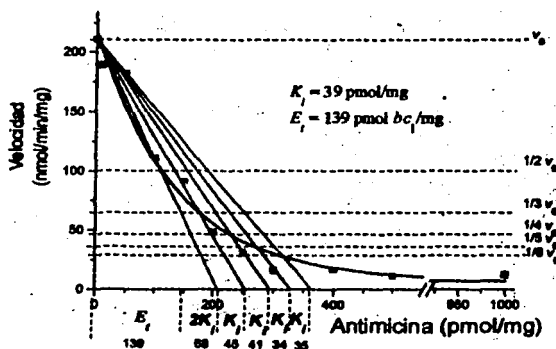
El propio Dixon ideó un método gráfico sencillo para determinar la K_i de inhibidores fuertemente unidos, el cual también permite calcular la concentración total de enzima. Para los inhibidores no competitivos fuertemente unidos, la ecuación que sirve de base para este método es la siguiente:

$$[I]_n = nK_i + [E]_t$$

en donde $[I]_n$ representa la concentración de inhibidor que corresponde a una fracción de la velocidad sin inhibidor (v_0/n), siendo n siempre un

número entero positivo; $[E]_t$ es la concentración de enzima.

Para calcular K_i y $[E]_t$, sobre la gráfica de inhibidor total añadido (expresado en moles por cantidad de enzima ó mg de proteína) contra velocidad, se trazan líneas rectas desde la velocidad sin inhibidor hasta el eje de las abcisas, haciendo pasar a cada recta por el punto de donde la velocidad es igual a v_0/n , dando a n el valor de 2, 3, 4, 5, etc., como se muestra:



La función matemática que une los puntos es la de decaimiento exponencial de primer orden (suponiendo una estequiometría de una molécula de inhibidor por molécula de enzima). Cada intercepto en el eje X corresponde al valor n de I ; por ejemplo, el primer intercepto que corresponde a $1/2$ de v_0 , es igual a $I_2 = 2K_i + [E]_t$. El intervalo entre el cruce de cada una de las rectas con el eje de las abcisas es igual a la K_i ; entonces se promedian los valores de cada uno de estos intervalos para obtener un valor único de la K_i , que en este caso resultó ser de 39 pmol/mg. Retrocediendo sobre el eje X el equivalente a $2K_i$ (68 pmol/mg), se obtiene el valor de $[E]_t$, que resultó ser de 139 pmol de complejo bc_1 /mg de proteína mitocondrial.

Bibliografía

Segel IH (1975). Enzyme Kinetics. John Wiley and Sons, New York. Cap. 3E, pp.150-159.

Raúl Covián y Rafael Moreno Sánchez

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PROBLEMA BIOQUÍMICO

Raúl Covián

Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología
Correo E: covianraul@correo.unam.mx

TEMA: Cinética Enzimática. Inhibición mixta parcial

El mixotiazol es un inhibidor de la actividad del complejo bc_1 (quinol: citocromo c oxidoreductasa) de mitocondrias de vertebrados superiores. No se ha determinado con precisión el tipo de inhibición que ejerce el mixotiazol sobre esta enzima en dichos organismos, pero su efecto se manifiesta a concentraciones nanomolares, lo cual implica que es un inhibidor del tipo fuertemente

unido. En cambio, en el complejo bc_1 de mitocondrias del protista *Euglena gracilis* se requieren añadir concentraciones micromolares de mixotiazol para observar inhibición de la actividad. Por tanto, para determinar la naturaleza de la inhibición, se determinaron las velocidades iniciales de reducción de citocromo c catalizadas por el bc_1 purificado de *E. gracilis* (3nM) en presencia de distintas concentraciones de mixotiazol y quinol, de acuerdo con la siguiente tabla:

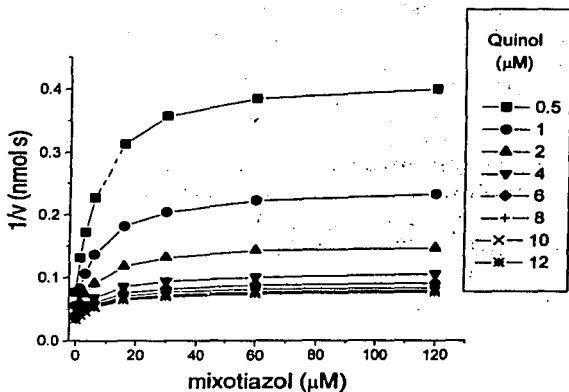
Mixotiazol (μM)	Velocidad inicial (nmol citocromo c reducido/(nmol $bc_1 \cdot \text{s}^{-1}$))							
	Quinol (μM)							
	0.5	1	2	4	6	8	10	12
0	13	18	23	26.4	27.8	28.5	29	29.3
1.5	7.6	12	16.4	20.3	22	23	23.8	24.2
3	5.8	9.4	13.5	17.4	19.2	20.3	21	21.5
6	4.4	7.3	11	14.6	16.4	17.4	18.1	18.7
16	3.2	5.5	8.5	11.7	13.3	14.3	15	15.5
30	2.8	4.9	7.6	10.6	12.2	13	13.8	14.3
60	2.6	4.5	7	10	11.4	12.3	13	13.5
120	2.5	4.3	6.8	9.5	11	12	12.6	13

Determinar el tipo de inhibición que ejerce el mixotiazol y los correspondientes parámetros cinéticos ($V_{\text{máx}}$, K_s , K_i , y los factores por los que se modifican $V_{\text{máx}}$ y la K_s en presencia del inhibidor).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

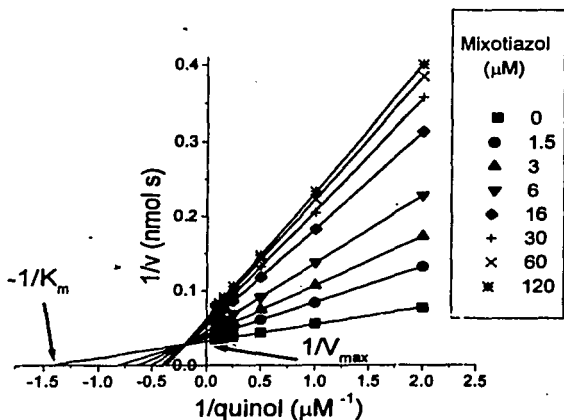
RESPUESTAS AL PROBLEMA BIOQUÍMICO

Para determinar el tipo de inhibición del mixotiazol, la primera aproximación consiste en graficar el inverso de las velocidades iniciales a cada concentración de quinol contra la concentración de mixotiazol (gráfico de Dixon):



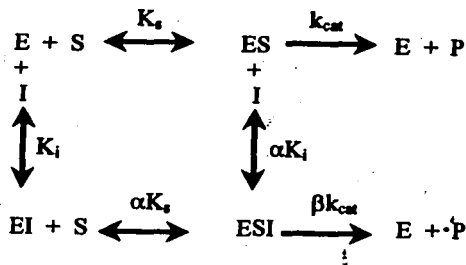
Puede observarse que en este caso el gráfico de Dixon muestra hipérbolas, lo cual indica una **inhibición parcial**, es decir, que el complejo enzima-inhibidor-sustrato es catalíticamente activo. La inhibición total debería mostrar líneas rectas en este tipo de gráfico.

A continuación se grafica el inverso de las velocidades iniciales contra el inverso de la concentración de sustrato (dobles recíprocos):



Se observa que el mixotiazol modifica tanto el valor de la ordenada (inverso de la velocidad máxima) como el de la abscisa (inverso negativo de la K_s), encontrándose el punto de intersección de todas las rectas en el segundo cuadrante, indicando una **inhibición de tipo mixto**.

El mixotiazol, por lo tanto actúa como un **inhibidor mixto parcial**. El esquema cinético de este tipo de inhibidores es el siguiente:



En este esquema, el factor α indica cuántas veces se modifica la K_s cuando la enzima está saturada con inhibidor. El factor β expresa el cambio en la constante catalítica en presencia de inhibidor saturante. En el caso del mixotiazol, la intersección en el segundo cuadrante indica que $\alpha > 1$ y $\beta < 1$. El carácter parcial de la inhibición indica adicionalmente que $\beta > 0$. La ecuación de velocidad para un inhibidor mixto parcial es:

$$v = \frac{V_{max} [S] \left(\frac{\beta [I] + \alpha K_i}{[I] + \alpha K_i} \right)}{K_s \left(\frac{[I] + K_i}{[I] + \alpha K_i} \right) + [S]} \quad (1)$$

El inverso de esta ecuación general es:

$$\frac{1}{v} = \frac{\alpha K_s}{V_{max}} \left(\frac{[I] + K_i}{\beta [I] + \alpha K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \left(\frac{[I] + \alpha K_i}{\beta [I] + \alpha K_i} \right) \quad (2)$$

Esta es la ecuación para cada recta del gráfico de dobles recíprocos mostrado arriba. La V_{max} corresponde al inverso de la ordenada de la recta sin inhibidor, que en este caso es de $1/0.032 = 31 \text{ s}^{-1}$. La K_s es el

valor negativo del inverso de la abcisa de la misma recta correspondiente a cero de inhibidor, en este caso, $-1/1.44 = 0.7 \mu\text{M}$.

Para calcular los valores de K_i , α y β , es necesario obtener el cambio en el valor de las ordenadas (Δb) y las pendientes (Δm) de las rectas con inhibidor con respecto a la ordenada y la pendiente de la recta sin inhibidor. Para, a cada ordenada de las rectas con inhibidor se le resta la ordenada de la recta de cero mixotiazol, y lo mismo se hace con las pendientes:

$$\Delta b = \frac{1}{V_{\max}} \left(\frac{[I] + \alpha K_i}{\beta [I] + \alpha K_i} \right) - \frac{1}{V_{\max}} \quad (3)$$

$$\Delta m = \frac{\alpha K_s}{V_{\max}} \left(\frac{[I] + K_i}{\beta [I] + \alpha K_i} \right) - \frac{K_s}{V_{\max}} \quad (4)$$

Los inversos de las ecuaciones 3 y 4 son:

$$\frac{1}{\Delta b} = \frac{\alpha K_i V_{\max}}{1 - \beta} \left(\frac{1}{[I]} \right) + \frac{\beta V_{\max}}{1 - \beta} \quad (5)$$

$$\frac{1}{\Delta m} = \frac{\alpha K_i V_{\max}}{K_s (\alpha - \beta)} \left(\frac{1}{[I]} \right) + \frac{\beta V_{\max}}{K_s (\alpha - \beta)} \quad (6)$$

Las ecuaciones 5 y 6 corresponden a rectas que se obtienen al graficar los inversos de los cambios en la ordenada y en la pendiente contra el inverso de la concentración de inhibidor, como se muestra a continuación:

A partir de los valores obtenidos en esta gráfica, y conociendo los valores de V_{\max} y K_s determinados en la

gráfica de dobles recíprocos, es posible calcular los demás parámetros cinéticos. El factor β se despeja de la definición de la ordenada (b) obtenida de la recta $1/\Delta b$ vs. $1/\text{mixotiazol}$:

$$\beta = \frac{b}{V_{\max} + b} = \frac{31.6}{31 + 31.6} = 0.5$$

A continuación se calcula el factor α utilizando el valor de la ordenada (b) de la recta $1/\Delta m$ vs. $1/\text{mixotiazol}$. Se despeja y se sustituye de la siguiente manera:

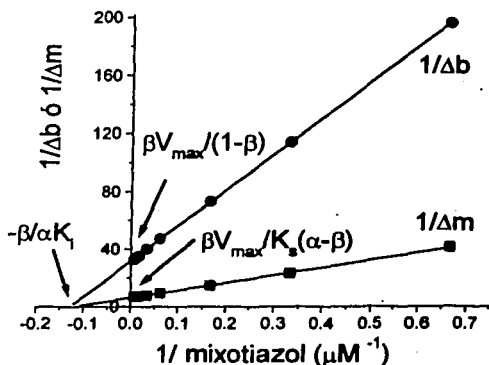
$$\alpha = \beta \left(1 + \frac{V_{\max}}{b K_s} \right) = 0.5 \left(1 + \frac{31}{6.2(0.7)} \right) = 4.1$$

Por último se calcula el valor de K_i a partir de la definición de la abcisa (a) de cualquiera de las dos rectas (debe ser el mismo para ambas) utilizando los valores ya determinados de α y β :

$$K_i = -\frac{\beta}{\alpha} = \frac{0.5}{0.12(4.1)} = 1 \mu\text{M}$$

REFERENCIAS

1. Segel, I.H (1975) Enzyme Kinetics. John Wiley and Sons, New York, pp. 168-196.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN