Rev. Med. Univ. Navarra, XVI: 127, 1972

UNIVERSIDAD DE NAVARRA. FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

Localización de componentes de la cadena respiratoria en partículas submitocondriales

N. López Moratalla y E. Santiago Calvo

RESUMEN

Los fragmentos derivados de la acción lítica del ácido ascórbico sobre la membrana interna mitocondrial son diferentes en cuanto a la concentración en componentes de la cadena transportadora de electrones.

Mediante centrifugación diferencial de membranas internas incubadas en presencia de ácido ascórbico se obtuvieron tres fracciones distintas: la fracción F_1, que sedimentó a 8.500 x g, contenía un 5 % del total de los componentes de la cadena respiratoria; la fracción F_2, que sedimentó a 100.000 x g, contenía el 50 % aproximadamente y el resto se recuperó en la fracción F_3, sobrenadante de 100.000 x g.

Las actividades enzimáticas NADH citocromo c reductasa, citocromo c oxidasa, succínico deshidrogenasa, succínico citocromo c reductasa y ATPasa, se encontraban disminuídas después de la acción del ascorbato, probablemente debido a las alteraciones producidas en los fosfolípidos.

En trabajos anteriores [16, 17, 18] se estudió el efecto del ascorbato sobre la membrana interna mitocondrial y se pudo comprobar que su presencia en el medio de incubación produce lisis de la membrana. Este proceso va acompañado de una disminución del fósforo lipídico, debido a un ataque selectivo del ascorbato sobre los fosfolípidos, principalmente la fosfatidil etanolamina y fosfatidil colina, rompiéndose sus ácidos grasos insaturados, probablemente por un mecanismo de peroxidación.

Los fragmentos derivados de la lisis de la membrana interna resultaron ser diferentes en su composición lipídica y proteica y en su aspecto morfológico e inmunológico.

Sobre la base de estos estudios se propuso [19] un modelo de membrana interna mitocondrial con dos tipos de estructura: un componente tubular recubierto por

las subunidades proyectantes y un componente lamelar desprovisto de subunidades.

En el presente trabajo se abordó el estudio de la distribución de algunas actividades enzimáticas en los fragmentos de la membrana interna, con el objeto de determinar la localización de los componentes de la cadena respiratoria en las distintas estructuras de la membrana interna mitocondrial.

Materiales y métodos

En todas las experiencias se utilizaron ratas machos Wistar. El hígado se homogeneizó en sacarosa 0,25 M y las mitocondrias se aislaron siguiendo el método de Hogeboom [10]; las membranas internas se separaron siguiendo el método de Parsons y col. [14], ligeramente modificado [19]. En algunas experiencias, con objeto de eliminar contaminaciones de membrana externa y matriz mitocondrial, se sometió una suspensión de membranas internas a centrifugación a 100.000 x g durante una hora, colocándola para ello sobre un gradiente de dos capas de sacarosa 1,32 M y 0,76 M. Se obtuvo un sedimento (MI_1), una banda en la interfase de las dos capas de sacarosa y una fracción soluble que permaneció en el medio que se colocó sobre las capas de sacarosa.

La incubación de las membranas internas se realizó en un medio 1 mM en ácido ascórbico, tampón tris-ClH 0,02 M a pH 7,4 y sacarosa 0,25 M, a 30° C. Se incubaron al mismo tiempo membranas como controles sin ascorbato en el medio de incubación. El tiempo de incubación fue en todos los casos de 60 minutos. La lisis se siguió por los cambios de la densidad óptica a 520 nm.

Una vez terminada la incubación las suspensiones de membranas internas se sometieron a centrifugación diferencial: primero a 8.500 x g durante diez minutos; el sedimento obtenido constituyó la fracción F_1; el sobrenadante se sometió a una nueva centrifugación a 100.000 x g durante una hora, obteniéndose un nuevo sedimento, fracción F_2 y un sobrenadante, fracción F_3.

Las proteínas se determinaron siguiendo el método de Lowry y col. [12]; los peróxidos de lípidos por el test de TBA siguiendo el método de Thiele y Hutt [22]; los fosfolípidos se extrajeron por el método de Folch [6], y el fósforo lipídico se determinó por el método de Bartlett [1].

Para las determinaciones cuantitativas de ubiquinona, citrocromos (a, b, c_1 y c), colesterol y ácido ascórbico se siguieron las técnicas descritas por Redfearn [15], Williams [26], Carr-Drekter [4] y Tillmans y Hirsch [23], respectivamente.

Para la determinación de las actividades enzimáticas citocromo c oxidasa y adenilato kinasa se siguieron los métodos descritos por Sottocasa y col. [20]. Las actividades enzimáticas succínico citocromo c reductasa, NADH citocromo c reductasa, succínico deshidrogenasa y ATPasa se determinaron según las técnicas de Tisdale [24], Hatefi-Rieske [8], Hiatt [9] y Kielley [11], respectivamente.

El enzima ascórbico oxidasa se aisló a partir de la calabaza *Cucurbita pepo condensa,* y se purificó según el método de Dawson y Magee [5].

Resultados

Composición de las preparaciones de membrana interna mitocondrial.

Aisladas las membranas internas, hemos observado, mediante medida de la actividad NADH citocromo c reductasa insensible a la rotenona, que existía una ligera contaminación de membranas externas. Igualmente determinamos la actividad málico deshidrogenasa y el valor encontrado mostró que existía matriz mitocondrial contenida en la membrana

TABLA I

ACTIVIDADES ESPECIFICAS DE ENZIMAS CARACTERISTICOS DE MEMBRANA INTERNA, MEMBRANA EXTERNA Y MATRIZ MITOCONDRIAL, PRESENTES EN LAS PREPARACIONES DE LA MEMBRANA INTERNA MITOCONDRIAL

Succínico citocromo c reductasa	400 μmol de cit. c red./mg proteína/minuto.
Citocromo c oxidasa	310 mmoles de cit. c oxidado/mg proteína/minuto.
Succínico deshidrogenasa	0,2 μmol de DCPIP/mg proteína/minuto.
NADH cit. c red. insensible a la rotenona	59 mμmol cit. c red./mg proteína/minuto.
Málico deshidrogenasa	2,4 μmol/mg proteína/minuto.
Adenilato kinasa	No se detectó ninguna actividad.

interna, mientras que la determinación de la actividad adenilato kinasa —enzima localizado en el espacio existente entre ambas membranas [20]— no dio ningún valor.

Los resultados se muestran en la tabla I, así como los valores de actividades enzimáticas propias de la membrana interna. La tabla II recoge el contendio de ubiquinona, citocromos a, b, c_1 y c, y colesterol por miligramo de proteína.

En cada una de estas fracciones obtenidas en el proceso de purificación de las membranas internas se determinaron algunas actividades enzimáticas —málico deshidrogenasa, citocromo oxidasa, succínico citocromo c reductasa y NADH citocromo c reductasa insensible a la rotenona—, la concentración en proteínas y el contenido en fósforo lipídico. Los resultados obtenidos se reflejan en la tabla III y muestran que la interfase estaba constituida por las membranas externas junto con algunos framentos de membrana interna que no llegaron a sedimentar; la fracción soluble estaba constituida por matriz mitocondrial, quedando un sedimento formado por la membrana interna libre de contaminación de externa y conteniendo aún parte de la matriz mitocondrial.

Con objeto de comprobar si la presencia de estas contaminaciones afecta a la heterogeneidad de las subfracciones de la membrana interna, sometimos a incubación en presencia de ascorbato estas membranas internas purificadas. En las fracciones separadas por centrifugación diferencial se determinaron las proteínas recuperadas de cada una de ellas y el

TABLA II

CONCENTRACIONES DE COLESTEROL, COENZIMA Q, CITOCROMOS Y FLAVOPROTEINAS EN LA MEMBRANA INTERNA MITOCONDRIAL

Colesterol	3,2 μgr/mg proteína
Coenzima Q	2,2 μmol/mg proteína
Citocromo a	0,3 mμmoles/mg proteína
Citocromo b	0,27 mμmoles/mg proteína
Citocromo c	0,185 mμmoles/mg proteína
Citocromo c_1	0,275 mμmoles/mg proteína

TABLA III

PURIFICACION DE LA MEMBRANA INTERNA MITOCONDRIAL

	MI	MI_1	Interfase	Fase soluble
Málico deshidrogenasa (μmol oxid./mg P/min)	2,4	2	—	5
Citocromo oxidasa (mμmol cit. c oxid./mg P/min)	310	380	400	—
Succínico citocromo c reductasa (mμmol cit. c reduc./mg P/min)	400	510	410	—
NADH cit. c red. insensible a la rotenona (mμmol cit. c red./mg P/min)	59	—	400	—
Proteínas (%)	100	68	12	20
μg P lipídico/mg proteína	5	4,5	15	0,04

MI: membrana interna obtenida según el método de Parsons y col.[14] modificado[19].
MI_1: membrana interna purificada mediante centrifugación en gradiente de sacarosa.

contenido en fósforo lipídico; los resultados obtenidos se recogen en la tabla IV. Las diferentes fracciones de la membrana interna seguían teniendo, después del proceso de purificación, una relación fósforo lipídico/proteína diferente y que va de mayor a menor de la F_1 a la F_3, sin que quede, por tanto, la heterogeneidad afectada por la ligera contaminación apuntada de membranas externas. Por otro lado, al haber conseguido eliminar una parte de la matriz mitocondrial, disminuye considerablemente el porcentaje de proteínas en la fracción F_3.

Composición enzimática de las fracciones de la membrana interna mitocondrial.

Hemos podido observar que la actividad de algunos componentes de la cadena transportadora de electrones se afecta por la acción del ascorbato, como se muestra en la tabla V.

TABLA IV

PROTEINAS Y FOSFORO LIPIDICO DE SUBFRACCIONES DE LA MEMBRANA INTERNA MITOCONDRIAL

	Proteína recuperada		Lípidos/proteína	
	%		μg/mg	
	MI	MI_1	MI	MI_1
Membrana interna control	—	—	5,03	4,5
Membrana interna ascorbato	—	—	3	3
Fracción F_1	4,6	14	10,3	9,5
Fracción F_2	15,2	22	3,12	5
Fracción F_3	81,5	64	1,27	0,7

MI: membrana interna obtenida según el método de Parsons y col.[14] modificado[19].
MI_1: membrana interna purificada mediante centrifugación en gradiente de sacarosa.

TABLA V

PORCENTAJES DE RECUPERACION DE COMPONENTES DE LA CADENA RESPIRATORIA EN MEMBRANAS INTERNAS SOMETIDAS A INCUBACION CON ASCORBATO

	%
Coenzima Q	70
Citocromos a, b, c_1 y c	100
Succínico citocromo c reductasa	16
Citocromo oxidasa	66
NADH citocromo c reductasa sensible a la rotenona	35
Succínico deshidrogenasa	10
ATPasa	20

En las condiciones de nuestras experiencias las membranas internas sólo alcanzan en el medio de incubación una concentración aproximada de proteínas de 1 mg/ml, y en la fracción F_3 de 0,8 mg/ml; dado que las técnicas empleadas para la determinación de coenzima Q y citocromos requieren una concentración de proteínas del orden de 15 y 8 mg/ml respectivamente, se hizo necesario la concentración de las muestras, lo que se llevó a cabo mediante evaporación en corriente de aire sobre un saco de diálisis.

Por otra parte, en el medio de incubación con ascorbato y en la fracción F_3 la presencia de ascorbato interfiere la medida de las actividades enzimáticas NADH citocromo c reductasa, succínico deshidrogenasa, citocromo oxidasa y succínico citocromo c reductasa. Esta interferencia pudo eliminarse sometiendo las fracciones en que está presente el ascorbato a un tratamiento previo con el enzima ascórbico oxidasa. Para ello, se añadió una cantidad de enzima suficiente para oxidar en tres minutos y a temperatura ambiente todo el ascorbato presente.

En el esquema de la figura 1 se refleja la distribución de componentes de la cadena transportadora de electrones, así como del colesterol, en cada una de las fracciones de la membrana interna mitocondrial derivadas de la lisis con ascorbato.

TABLA VI

DISTRIBUCION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS MALICO DESHIDROGENASA Y NADH CITOCROMO O REDUCTASA INSENSIBLE A LA ROTENONA EN FRACCIONES DE LA MEMBRANA INTERNA MITOCONDRIAL

	NADH cit. c red. insensible a la rotenona	Málico deshidrogenasa
Fracción F_1 Ascorbato	10 %	5 %
Fracción F_2 Ascorbato	20 %	12 %
Fracción F_3 Ascorbato	6 %	83 %
Fracción F_1 Control	55 %	95 %
Sobrenadante de F_1C	45 %	5 %

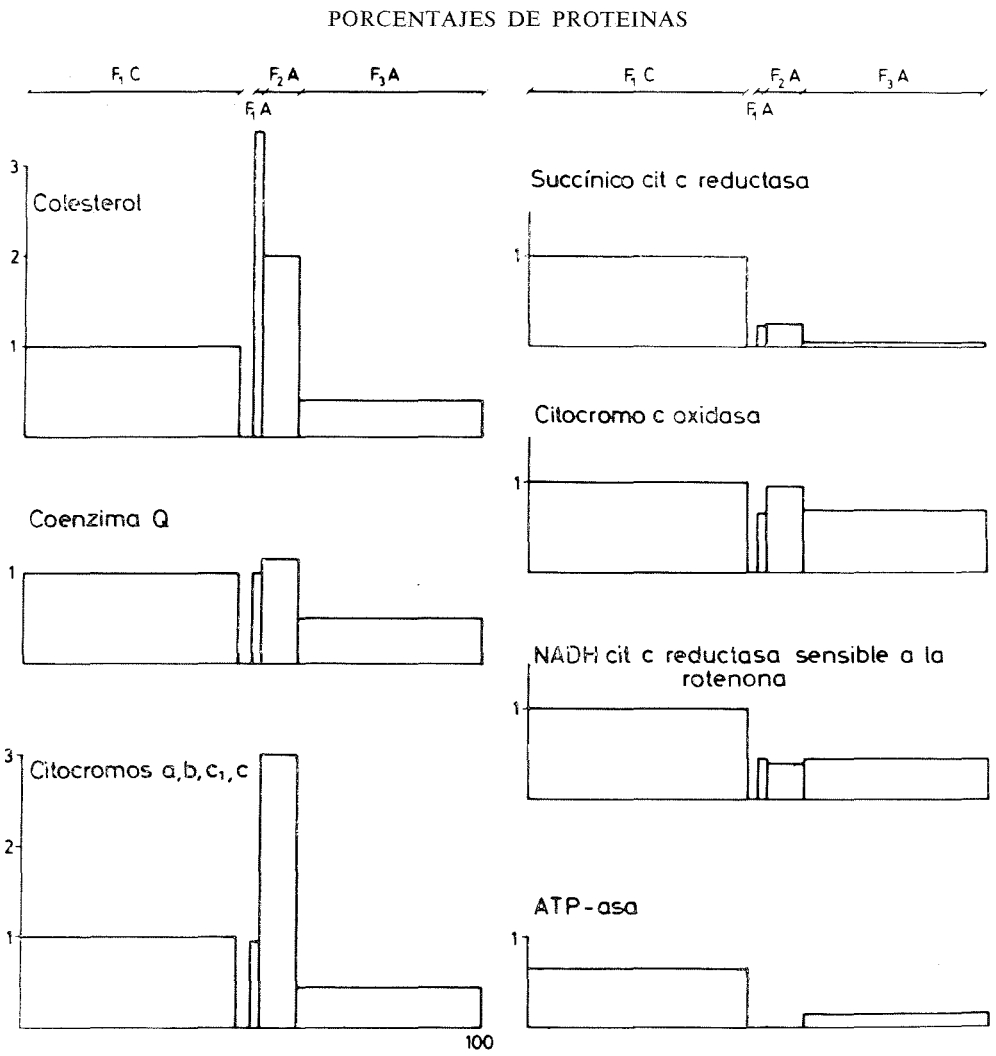

Fig. 1. Distribución de componentes de la cadena transportadora de electrones y colesterol en fracciones procedentes de la membrana interna.

En abscisas se ha representado el porcentaje de proteínas de las fracciones procedentes de la lisis con ascorbato y del sedimento de 8.500 x g de los controles (F_1 C). En ordenadas se han representado las actividades enzimáticas específicas y las cantidades de colesterol por miligramo de proteína de cada fracción relativas a las encontradas en la membrana interna incubada como control.

Se determinaron también en cada una de esas mismas fracciones, la actividad enzimática málico deshidrogenasa y NADH citocromo c reductasa insensible a la rotenona, con objeto de ver a cuál de las fracciones quedaban asociadas las conta-

minaciones de matriz mitocondrial y membrana externa presentes en la preparación de membrana interna. De la actividad NADH citocromo c reductasa insensible a la rotenona presente, que representa un 36 % del total, queda la mayor parte en la fracción F_2; mientras que la actividad málico deshidrogenasa, que no aparece afectada por la acción del ascorbato, se encuentra en un 83 % en el sobrenadante de 100.000 x g —fracción F_3—, lo cual indica que en esta fracción las proteínas de la membrana interna solubilizadas por la acción del ascorbato aparecen junto a las proteínas pertenecientes a la matriz mitocondrial.

Discusión

Los valores de colesterol encontrados en cada uno de los fragmentos de la membrana interna, producidos por la acción lítica del ascorbato, muestran que este no está uniformemente repartido en la membrana interna. Los tres fragmentos tienen muy diferente concentración que va de mayor a menor desde la fracción F_1 a la F_3; esta desigualdad no podría explicarse por una diferencia en el grado de desintegración de un primer material homogéneo, en el que la fracción F_3 estuviera constituida por pequeños fragmentos solubilizados del total de la membrana y que hubiera arrastrado muy poco colesterol, y que la fracción F_2 constituyera un paso intermedio de desintegración de la fracción F_1 a la F_3; si esto fuera así, la relación colesterol/proteína en la fracción F_2 debería ser superior, o al menos igual, a la de la fracción F_1.

De igual modo el coenzima Q y los citocromos a, b, c_1 y c no se presentan uniformemente distribuidos en la membrana interna, sino que aparecen en concentraciones superiores en la fracción F_2.

Hemos encontrado la actividad citocromo oxidasa muy disminuida en las membranas internas tratadas con ascorbato. Estos resultados son coherentes con los estudios realizados por Brierley y Merola [3], Hafkenscheid y col.[7] y Tzagaloff y Mac Lennan [25] que han demostrado que los fosfolípidos son esenciales para la actividad de la citocromo oxidasa.

De igual forma hemos encontrado disminuidas, después de la acción del ascorbato, las actividades enzimáticas NADH citocromo c reductasa, succínico citocromo c reductasa y succínico deshidrogenasa. Tappel y Zalkin [21], Bernheim y col.[2] y Ottolenghi y col.[13] han demostrado que la peroxidación de lípidos produce inhibición de las actividades enzimáticas NADH citocromo c reductasa, succínico oxidasa, colina oxidasa y citocromo oxidasa. Este hecho explicaría también las pérdidas de la actividad enzimática que hemos encontrado en las membranas mitocondriales después de la incubación con ascorbato.

Dado que la citocromo oxidasa tiene como componentes los citocromos a y a_3, y puesto que hemos encontrado un 50 % y un 40 % aproximadamente del citocromo a de la membrana interna en las fracciones F_2 y F_3, podemos suponer que la actividad citocromo oxidasa de la membrana interna no tratada con ascorbato se encontraría en estos mismos porcentajes en las zonas de la membrana a partir de las cuales se han originado esas fracciones.

Del mismo modo podemos suponer que los complejos enzimáticos succínico citocromo c reductasa, y NADH citocromo c reductasa sensible a la rotenona —de cuya composición forman parte los citocromos c, c_1 y b y el coenzima Q— se encontraría en las fracciones F_2 y F_3 predominantemente. Estas fracciones presentan disminuida la actividad enzimática debido a la alteración producida en los fosfolípidos. Sin embargo la fracción F_1 en la que no se acusan grandes pérdidas en los fosfolípidos y presenta un porcentaje de actividades enzimáticas paralelo al de citocromos y coenzima Q,

tendría solamente la actividad que le corresponde de acuerdo con su contenido en estos componentes.

Hemos encontrado también una gran pérdida de la actividad ATPasa en las membranas internas tratadas con ascorbato. La actividad presente la encontramos principalmente en la fracción sobrenadante de 100.000 x g.

Todos estos resultados concuerdan con la existencia de zonas distintas en la membrana interna a partir de las cuales se originan los fragmentos que constituyen las fracciones estudiadas. Los datos presentados apoyan el modelo de estructura de la membrana interna propuesta por Santiago y col. [19].

La fracción F_1 con una alta concentración de colesterol y una proporción muy baja de componentes de la cadena transportadora de electrones. El contenido en colesterol por miligramo de proteína en la fracción F_2 es bastante menor que en la F_1 y contiene el 50 % de los componentes de la cadena respiratoria. Por último, la fracción F_3 contiene una proporción de colesterol por miligramo de proteína muy escasa y un gran porcentaje —más de un 40 %— de los componentes de la cadena respiratoria. Junto a las proteínas de esta última fracción que han quedado solubilizadas se encuentran también las procedentes de la matriz.

Existen otros argumentos que nos hacen pensar que ninguna de las fracciones F_2 y F_3 procedan de la desintegración de la F_1; podría tal vez suponerse que la F_3 estuviera constituida por fragmentos de F_2 que, por una mayor pérdida de fosfolípidos, se convirtieron en pequeños conglomerados de proteínas que irían quedando solubilizados; y si bien por su composición en complejos de la cadena respiratoria ambas fracciones son semejantes, las proteínas de la fracción F_3 procederían siempre de zonas con un mayor grado de insaturación de los ácidos grasos, lo que hace posible que se produzcan mayores alteraciones en los fosfolípidos, llegándose así a solubilizar esa zona de la membrana y, por tanto, con características diferentes como para justificar el hecho de que pueda considerársele como una fracción procedente de una estructura sustancialmente distinta.

SUMMARY

Localization of components of the respiratory chain in submitochondrial particles

Differential centrifugation of inner mitochondrial membranes incubated in the presence of ascorbate led to the separation of three different fractions: fraction F_1, which sedimented at 8.500 g, contained 5 % of the components of the respiratory chain; fraction F_2, sedimenting at 100.000 g, contained approximately 50 % and the rest was recovered in fraction F_3, supernatant of the last centrifugation.

Enzyme activities of NADH cytochrome reductase, cytochrome c oxidase, succinate dehydrogenase, succinate cytochrome reductase and ATPase were affected by the incubation with ascorbate probably due to the alterations of the phospholipids. In all of them the activities were lower as compared to those in the controls.

BIBLIOGRAFÍA

1. BARTLETT, G. R. *J. Biol. Chem.*, 234: 466, 1959.
2. BERNHEIM, F., K. M. WILBUR y C. B. KENASTON. *Arch. Biochem. Biophys*, 38: 177, 1952.
3. BRIERLEY, G. P. y A. J. MEROLA. *Biochim. Biophys. Acta*, 64: 205, 1962.
4. CARR, J. J. y J. J. DREKTER. *Laboratory Manual of Pediatric micro and ultramicro Biochemicas Techniques*, O'Brien y F. A. Ibloft. Harper Row Publishers. New York, 1962.
5. DAWSON, C. R. y R. J. MAGEE. *Methods in Enzymology*, Vol. II, pág. 831. Academic Press. New York, 1955.
6. FOLCH, J., *Phosphorus Metabolism*. Vol. II, pág. 197. Editado por H. Mc Elroy y B. Blass. John Hopkins Press. Baltimore, 1952.
7. HAFKENSCHEID, L. M., J. LINKS y E. C. SLATER. *Biochim. Biophys. Acta*, 70: 202, 1963.
8. HATEFI, Y. y J. S. RIESKE. *Methods in Enzymology*, Vol. X, pág. 225. Academic Press, New York, 1967.
9. HIATT, A. J. *Plant Physiol.*, 36: 552, 1961.
10. HOGEBOOM, G. H. *Methods in Enzymology*, Vol. I, pág. 16, Academic Press. New York, 1955.
11. KIELLEY, W. *Methods in Enzymology*, Vol. II, pág. 593. Academic Press. New York, 1955.
12. LOWRY, O. H., N. J. ROSENBROUGH, A. L. FARR y R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193: 265, 1951.
13. OTTELENGHI, A., F. BERNHEIM y K. M. WILBUR. *Arch. Biochem. Biophys.*, 56: 157, 1955.
14. PARSONS, D. F., G. R. WILLIAMS, y B. CHANCE, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 137. 643, 1966.
15. REDFEARN, E. R. *Methods in Enzymology*, Vol. X, pág. 382, Academic Press. New York, 1967.
16. SANTIAGO, E., J. J. VÁZQUEZ, F. GUERRA y J. M. MACARULLA. *Rev. esp. Fisiol.*, 24: 31, 1968.
17. SANTIAGO, E., A. GANSER, J. M. MACARULLA y F. GUERRA. *Rev. esp. Fisiol.*, 24: 37, 1968.
18. SANTIAGO, E., F. GUERRA y J. M. MACARULLA. *Rev. esp. Fisiol.*, 24: 25, 1969.
19. SANTIAGO, E., J. J. VÁZQUEZ, J. EUGUI, J. M. MACARULLA y F. GUERRA. *FEBS Symposium*, 20: 17, 1970.
20. SOTTOCASA, G. L., B. KUYLENSTIERNE, L. ERNSTER y A. BERFSTARND. *J. Cell. Biol.*, 32: 415, 1967.
21. TAPPEL, A. L. y H. ZALKIN. *Arch. Biochem. Biophys.*, 80: 326, 1959.
22. THIELE, E. H. y J. W. HUFF. *Arch. Biochem Biophys.*, 88: 203, 1960.
23. TILLMANS, J. y P. HIRSCH. *Biochem. Ztschr.*, 250: 312, 1932.
24. TISDALE, H. D. *Methods in Enzymology*, Vol. X, pág. 213, Academic Press. New York, 1967.
25. TZAGOLOFF, A. y D. H. MAC LENNAN. *Biochim. Biophys. Acta*, 99: 476, 1965.
26. WILLIAMS, J. N. *Arch. Biochem. Biophys.*, 107: 537, 1964.