



# Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales  
I Z T A C A L A

**“CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE DOS MUTANTES  
RESPIRATORIO - DEFICIENTES DE LA LEVADURA  
Kluyveromyces lactis”**

**T E S I S**

Que para obtener el Título de  
**B I O L O G O**

p r e s e n t a

**ARMANDO MEJIA ALVAREZ**

México, D. F.

1983



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.

A mis padres:

Mariano Mejía M.

Rosalía Álvarez de M.

por su amor y comprensión.

A mi hermano Rafael

porque duplica mis éxitos y reduce a la mitad mis fracasos.

A mis tíos: Luis y Alicia

por su incondicional apoyo.

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
Y A LA ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS  
PROFESIONALES IZTACALA

A la Dra. Aurora Brunner Liebshard  
por sus enseñanzas y valiosa asesoría.

Al M.C. Valentín Mendoza Rodríguez  
por la ayuda desinteresada que siempre  
me brindó.

Al Dr. Antonio Peña Díaz

por las facilidades y equipo proporcionado

A los profesores:

M. en C. Sergio Vaca P.

M. en C. Sergio González M.

Q.B.P. Miguel A. Hernandez R.

Biol. Ignacio Peñaloza.

por la revisión crítica de este

trabajo de Tesis.

Finalmente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología  
por el apoyo proporcionado para la realización de este  
trabajo (PCCBBNA # 005239).

## C O N T E N I D O :

1. INTRODUCCION	1
2. GENERALIDADES	4
2.1. <u>Kluyveromyces lactis</u> COMO SISTEMA MODELO DE ESTUDIO	4
2.2. CLASIFICACION DE LAS MUTANTES RESPIRATORIO-DEFICIENTES	7
2.2.1. Segregación de Cruzas	7
2.2.2. Nomenclatura	9
2.3. ESTUDIO DE CITOCROMOS EN MUTANTES DE LEVADURA	10
2.4. GENERALIDADES SOBRE CITOCROMOS	12
2.4.1. Citocromo aa <sub>3</sub>	13
2.4.2. Citocromo b	15
2.4.3. Citocromo c	16
2.5. EL CIANURO COMO INHIBIDOR RESPIRATORIO	17
2.6. LA ANTIMICINA A, Y SU UNION AL CITOCROMO b	18
3. METODOLOGIA	20
3.1. DELINEAMIENTO DE LA ESTRATEGIA METODOLOGICA	20
3.2. REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO	20
3.2.1. Soluciones Amortiguadoras	20
3.2.2. Medios de Cultivo	22
3.3. PRUEBA DE CRECIMIENTO EN SUSTRATOS NO FERMENTABLES	25
3.4. DETERMINACION DE MARCADORES DE AUXOTROFIA	25
3.5. CRUZAS Y SEGREGACION	26
3.6. CURVAS DE CRECIMIENTO	27
3.7. MEDICION DE LA RESPIRACION	28
3.8. ESTUDIO ESPECTRAL DE CITOCROMOS	29
3.8.1. Espectro Absoluto	29
3.8.2. Espectro Diferencial	30
3.8.3. Espectro Derivativo	30

3.9	INHIBICION DEL CONSUMO DE OXIGENO POR CIANURO	33
3.10	COMPORTAMIENTO FRENTE AL INHIBIDOR RESPIRATORIO, ANTIMICINA	34
3.10.1.	Inhibición del Consumo de Oxígeno por Antimicina A	35
3.10.2	Captación de Antimicina A, por el Citocromo b	36
4.	PRESENTACION Y ANALISIS DE RESULTADOS	38
4.1.	PRUEBA DE CRECIMIENTO EN SUSTRATOS NO FERMENTABLES	38
4.2.	DETERMINACION DE MARCADORES DE AUXOTROFIA	38
4.3.	CRUZAS Y SEGREGACION	38
4.4.	CURVAS DE CRECIMIENTO	40
4.5.	MEDICION DE LA RESPIRACION	43
4.6.	ESTUDIO ESPECTRAL DE CITOCROMOS	44
4.6.1.	Espectro Absoluto	44
4.6.2.	Espectro Diferencial	46
4.6.3.	Espectro Derivativo	46
4.7.	INHIBICION DEL CONSUMO DE OXIGENO POR CIANURO	49
4.8.	COMPORTAMIENTO FRENTE AL INHIBIDOR RESPIRATORIO, ANTIMICINA	53
4.8.1.	Inhibición del Consumo de Oxígeno por Antimicina	53
4.8.2.	Captación de Antimicina A, por el Citocromo b.	55
5.	CONCLUSIONES	58
6.	ABREVIATURAS	61
7.	BIBLIOGRAFIA	62

## 1. INTRODUCCION :

Desde las primeras investigaciones sobre la obtención de energía a partir de glucosa, se creyó que había dos maneras mediante las cuales podía metabolizarse la glucosa para proporcionar energía en las células heterótrofas: una anaerobia, denominada ahora en general glucólisis, que permitía que la glucosa se metabolizara en ausencia de oxígeno, y otra aerobia, en la cual se utilizaba oxígeno y producía mucha más energía que la anaerobia. Conforme se aprendía más se puso de manifiesto que aunque existen células con ambas rutas catabólicas, no hay alternativas colaterales como se creyó al principio; más bien las dos vías están arregladas en serie, y la anaerobia precede a la aerobia. Ahora se acepta que todos los organismos heterótrofos obtienen fundamentalmente su energía de las reacciones de óxido-reducción; es decir, aquellas en las que los electrones son transferidos desde un compuesto, el donador electrónico, o agente reductor, a un aceptor electrónico, el agente oxidante. Los organismos aeróbicos obtienen la mayor parte de su energía de la respiración, que se define como la oxidación de los combustibles orgánicos por el oxígeno molecular; el oxígeno actúa, por tanto, como el aceptor electrónico final en la respiración. Los heterótrofos anaeróbicos obtienen también la mayor parte de su energía de las reacciones de óxido-reducción, pero en este caso, en el proceso de fermentación, los electrones pasan desde un intermediario orgánico producido en la degradación del azúcar, el donador electrónico, hasta otro intermediario orgánico, que actúa como aceptor electrónico. En los procesos de fermentación anaeróbica, sin embargo, no se produce una

oxidación total del combustible (19).

Los organismos anaeróbicos facultativos, por otra parte, pueden vivir bien, tanto en ausencia como en presencia de oxígeno. Cuando viven anaeróbicamente, obtienen energía de un proceso de fermentación. Cuando lo hacen aeróbicamente, degradan su combustible de igual modo mediante la ruta anaeróbica, pero después oxidan los productos de aquella a expensas del oxígeno molecular.

La capacidad de oxidación de las sustancias nutritivas, no es un atributo único del citoplasma; más bien es una función delegada a los organelos membranosos denominados mitocondrias. Se sabe actualmente que las mitocondrias, presentes en todas las células eucarióticas aeróbicas, son los centros donde se verifican; entre otras, las reacciones del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, del transporte electrónico y de la fosforilación oxidativa. Poseen una membrana externa lisa y otra interna con invaginaciones que forman pliegues llamados crestas, y una matriz interior rica en proteína. Ambas membranas difieren en composición química, permeabilidad y contenido enzimático. Las enzimas del transporte electrónico y de la fosforilación oxidativa se hallan localizadas en la membrana interna, mientras que las del ciclo de los ácidos tricarbóxicos se hallan en gran parte, en la matriz (17). Se sabe también, que las mitocondrias contienen DNA, RNA ribosomal y RNAs de transferencia que son un poco distintos a los encontrados en el citoplasma, de aquí que las mitocondrias posean medios para tener un grado considerable de existencia independiente.

Un tema de gran interés al respecto lo constituye la identidad de las proteínas sintetizadas por las mitocondrias, pues se dispone de muchos datos reveladores de que la gran mayoría de las enzimas y proteínas mitocondriales son especificadas por los genes de los cromosomas nucleares, y sintetizadas en los ribosomas

extramitocondriales. El DNA de las mitocondrias codifica al rRNA mitocondrial y a sus RNAs de transferencia, dejando solo a una pequeña cantidad de DNA mitocondrial la función de codificar para algunas proteínas. Se sabe que el DNA de las mitocondrias lleva la información para la síntesis de una o dos subunidades de la ATPasa, de tres subunidades del citocromo aa<sub>3</sub> y de una subunidad del citocromo b (31).

Dado que las células de levadura son anaeróbicas facultativas y pueden vivir fácilmente dependiendo solo de la fermentación si sus mitocondrias son defectuosas, la biosíntesis y la asociación de determinados componentes mitocondriales pueden ser estudiadas en mutantes de células de levadura en los que una u otra proteína mitocondrial específica sea defectuosa. De este modo Ephrussi en 1949 descubrió la herencia citoplásmica en mutantes "petite" de levadura (lesión pleiotrópica a nivel de DNA mitocondrial que provoca una deficiencia respiratoria), lo cual marcó el inicio de un período, en donde el DNA mitocondrial ha sido objeto de numerosas investigaciones. Durante los años subsiguientes al descubrimiento de Ephrussi, las mutantes respiratorio-deficientes de levadura y Neurospora fueron caracterizadas genéticamente y hasta cierto grado bioquímicamente; por otra parte, Rizet en Francia y Jinks en Inglaterra, trabajando con Podospora y Aspergillus respectivamente, descubrieron una variedad de nuevas formas de herencia citoplásmica. Desafortunadamente, el excelente análisis genético llevado a cabo por estos investigadores no estuvo acompañado de observaciones bioquímicas; así pues, en la mayor parte, continuamos ignorantes hoy en día de la naturaleza de los elementos genéticos citoplásmicos involucrados, aún cuando trabajos recientes sugieren que se deben a alteraciones en el DNA mitocondrial (16).

El DNA mitocondrial, sin embargo, es pequeño y solo puede a

lojar genes para un número limitado de proteínas. El citocromo b, la citocromo oxidasa y la adenosín trifosfatasa sensible a oligomicina, fueron desde un principio considerados como posibles candidatos de proteínas codificadas intramitocondrialmente. Se comprobó así que la causa de la deficiencia respiratoria, en mutantes de hongos, debida a la pérdida de estas enzimas, era heredada mitocondrialmente (31). Así pues, las mutantes respiratorio-deficientes ya sea, por una alteración a nivel de DNA nuclear o mitocondrial, pueden ser utilizadas eficazmente como herramienta en la dilucidación de los elementos genéticos involucrados en la síntesis de proteínas de origen bigenómico.

El objetivo de este trabajo de tesis es caracterizar bioquímicamente dos mutantes nucleares respiratorio-deficientes, aisladas de la levadura Kluyveromyces lactis por mutagénesis con N-metil-N'-nitro-N-nitroso guanidina (MNNG) con el fin de establecer su grado de lesión.

## 2. GENERALIDADES:

### 2.1. Kluyveromyces lactis COMO SISTEMA MODELO DE ESTUDIO:

El esfuerzo intenso que se ha dedicado al estudio de todos los aspectos, tanto genéticos como metabólicos del procarionte Escherichí coli, es una de las principales razones del progreso tan rápido en las últimas décadas, de la biología molecular. Actualmente se presta una atención semejante a uno o más tipos de células eucarióticas, principalmente a los más simples como la levadura. Hay varias razones que dictaminan este enfoque, siendo una de ellas, que estos organismos contienen ciertamente mu-

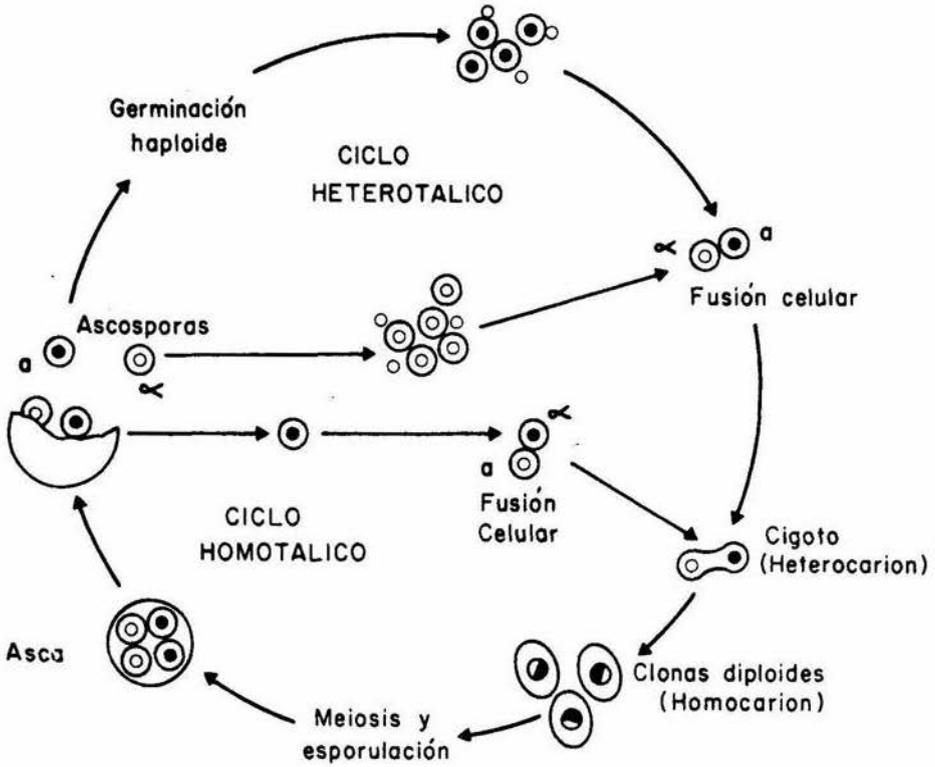
cho menos DNA que las células humanas, y al escalar filogenéticamente desde E. coli hasta levaduras o Aspergillus solo se advierte un relativo pequeño incremento en la complejidad genética (30). Una segunda razón, y tal vez la más importante, es la facilidad con la que se puede aplicar el análisis genético detallado en levaduras. Así pues, K. lactis puede ser manejada genéticamente con las técnicas establecidas para Saccharomyces cerevisiae, ya que tienen sistemas de compatibilidad similares.

Una diferencia importante entre estos dos organismos radica en la dificultad de obtener mutantes mitocondriales "petite" (denominada así, por el tamaño reducido de las colonias que origina en medio completo con glucosa) a partir de K. lactis por lo que se ha catalogado como "petite-negativa". Este carácter es atribuido a que la mitocondria probablemente codifica para una función absolutamente indispensable en este tipo de levaduras, dado que Bulder (1963) sugirió que estas especies de levadura no forman mutantes "petite" viables y que la pérdida del DNA mitocondrial resulta letal (1).

Una de las levaduras "petite-negativa" más estudiada en relación al DNA mitocondrial ha sido K. lactis, ya que es un organismo unicelular con un ciclo vital breve que comprende estadios haploide y diploide con una etapa de conjugación en la que dos células de sexo opuesto:  $\alpha$  y  $\sigma$ , se fusionan para dar un cigoto, a partir del cual emergen cuatro ascosporas, las cuales se pueden aislar fácilmente y mantenerse en su estado haploide (Figura 1.).

Por estas y otras características, Kluyveromyces lactis ha demostrado ser una herramienta muy útil en el estudio de la biogénesis de proteínas mitocondriales y del DNA mitocondrial.

FIGURA 1.



**Ciclo de vida de  
Kluyveromyces lactis**

(Adaptado de 13).

## 2.2. CLASIFICACION DE LAS MUTANTES RESPIRATORIO-DEFICIENTES:

Las mutantes "petite" de levadura poseen una velocidad de crecimiento disminuida, debido a la ausencia de diversas enzimas respiratorias esenciales y pigmentos asociados a la transferencia de electrones, incluyendo el sistema succinato oxidasa, el sistema citocromo oxidasa (asociado con los citocromos  $a$  y  $a_3$ ) y el citocromo  $b$ . Las células "petite" poseen mitocondrias con distintas clases de anormalidad dependiendo de la mutante, se ha visto también, que el DNA mitocondrial en estas mutantes está ausente o considerablemente alterado (15).

El análisis de tétradas procedentes de cruzas de las cepas "petite" con la silvestre, revela tres clases de comportamiento genético (15). El primer tipo, que presentan las llamadas "petite segregacionales", está caracterizado por la formación de un diploide respiratorio-competente, que da después de la meiosis una segregación de mutantes contra silvestre de 2:2 en cada tétrada (Figura 2.). El comportamiento que muestran estas cepas "petite" es debido a una mutación en cualquiera de 9 genes cromosómicos. Los otros dos tipos llamados "neutral" y "supresor", muestran herencia extranuclear (26).

En el caso de "petite neutrales", los diploides formados en la cruce con la silvestre, son nuevamente respiratorio-competentes, pero los productos de la meiosis son exclusivamente ascosporas respiratorio-competentes y el carácter "petite" no reaparece (excepto con la frecuencia de mutación espontánea usual), tanto durante la propagación vegetativa como después de generaciones sexuales. Tal comportamiento indica una alteración genética extracromosómica (15), y en la actualidad se sabe que las "petite neutrales" son aquellas que casi no tienen mtDNA.

En la mutación "petite supresora", los cigotos procedentes

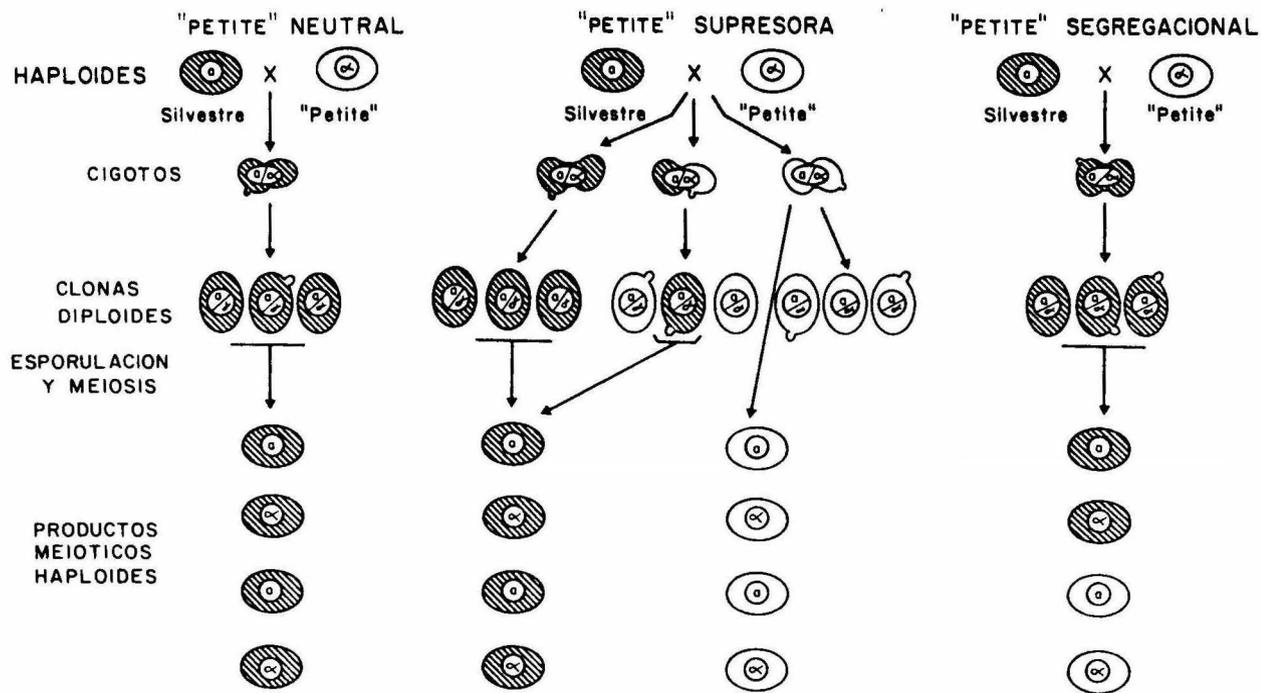


FIGURA 2. Comparación de la herencia paterna en cruces de la silvestre con "petite" neutral, supresora y segregacional. Fenotípicamente resulta progenie silvestre de las cruces entre "petite segregacionales recesivas y silvestre. En la esporulación, el fenotipo "petite" segrega 2:2 típicamente Ken deliano.

de la cruz con la cepa silvestre, puede originar, dependiendo del nivel de supresividad de la mutación, una progenie de tipo "petite" o una mezcla de células "petite" y normales, esto se debe a que pueden existir cigotos respiratorio-competentes y del tipo "petite", los primeros originarán diploides que esporulan segregando el carácter mutante 0:4, mientras que los segundos pueden producir esporas "petite" con segregación 4:0 (16).

TABLA 1. NOMENCLATURA Y HERENCIA DE LAS DIFERENTES MUTANTES "PETITE".

	GENOTIPO			HERENCIA
	NUCLEAR	MITOCONDRIAL	mtDNA	
SILVESTRE:	PET	$e^+$	Normal	- -
PETITE VEGETATIVA:				
NEUTRAL	PET	$e^0$	Ausente	No Mendeliana
SUPRESORA	PET	$e^-$	Alterado	No Mendeliana
PETITE SEGREGACIONAL:	pet	$e^+$	Normal	Mendeliana
DOBLE MUTANTE:	pet	$e^0$ o $e^-$	Ausente o alterado	

La obtención de mutantes respiratorio-deficientes con genotipos y fenotipos distintos, condujo a la necesidad de clasificarlas, valiéndose del término rho ( $\rho$ ), originalmente designado para representar el factor sitoplásmico requerido para la respiración. Las células normales; es decir, las respiratorio-competentes fueron designadas  $e^+$ , las "petite vegetativas"  $e^-$  y las cepas "petite", con un DNA mitocondrial ausente, las cuales son siempre neutrales, fueron designadas  $e^0$  por Linnane y colaborado

res. Todas las demás mutantes con un DNA mitocondrial normal ( $e^+$ ) pero con un fenotipo "petite" fueron denominadas "pet" (mutantes "petite" de origen nuclear)(16).

### 2.3. ESTUDIO DE CITOCROMOS EN MUTANTES DE LEVADURA:

Mutantes, específicamente de levadura, han sido usadas ampliamente en la investigación, no solo de la ruta biosintética sino también de la regulación diferencial de los citocromos(20).

Aparte de las mutantes que tienen lesiones bioquímicas específicas en la síntesis del anillo porfirínico que afecta la secuencia biosintética de todos los citocromos, han sido obtenidas otras mutantes con deficiencia o alteraciones en los componentes proteícos, o bien con una alteración en el sitio de unión a la membrana mitocondrial (21).

Típicamente existen mutantes respiratorio-deficientes de levadura, alteradas en los citocromos  $aa_3$ , b y aún en el c<sub>1</sub>, - sin considerar si se trata de mutaciones citoplásmicas o nucleares. Otras mutantes respiratorio-deficientes de levadura han sido reportadas con deficiencia en el citocromo a, pero no en los citocromos b y c, o bien con un decremento en el citocromo c, con una catidad normal de citocromos a y b (Sherman y Slnimski, 1964). No todas las mutantes respiratorio-deficientes tienen un sistema de citocromos alterado (20). Una mutante en fosforilación oxidativa puede tener un espectro de citocromos normal cuando se crece en medio completo con glucosa como fuente de carbono, pero en medio mínimo, el citocromo  $aa_3$  por ejemplo, está relativamente disminuido, no así el b o el c. La alteración en citocrcmos en mutantes respiratorio-deficientes, puede ser la consecuencia de otras deficiencias en la célula. Una mutante puede tener una mitocondria aberrante, deficiente tanto en organización de la membrana interna, como en la unión

de las enzimas de la cadena respiratoria a la membrana mitocondrial (20).

En levadura, algunas mutaciones sencillas en genes nucleares causan desaparición del pico de absorción del citocromo b y aa<sub>3</sub> acompañadas por otras deficiencias mitocondriales. Hace algunos años, Sherman y Slonimski reportaron la existencia de mutantes cromosómicas respiratorio-deficientes en Saccharomyces cerevisiae con múltiples deficiencias en citocromos. Subik y colaboradores describieron una mutante nuclear deficiente en los citocromos b y aa<sub>3</sub> en adición a la pérdida de la sensibilidad a la oligomicina de su ATPasa mitocondrial. Ellos propusieron que estos efectos pleiotrópicos fueron el resultado de una síntesis de proteínas mitocondriales deficiente. Mutantes similares fueron reportadas en Schizosaccharomyces pombe por Goffeau (1973), quien también describió otra clase de mutantes nucleares con deficiencia múltiple en citocromos, acompañadas por una pérdida total de la actividad de la ATPasa mitocondrial. Una mutante de S. cerevisiae con alteraciones similares, fue igualmente descrita por Ebner y Schatz (1973), quienes demostraron una síntesis proteica mitocondrial funcional pero anormal en esta cepa respiratorio-deficiente (21).

Todas las mutantes nucleares pleiotrópicas respiratorio-deficientes, han sido genéticamente analizadas, observándose que son producidas por mutaciones en un solo gen. De este modo, tendrían que ser el resultado de una modificación primordial en el proceso central del control de la expresión de diversas proteínas de la membrana interna mitocondrial. Las actividades modificadas en la mayoría de las mutantes nucleares pleiotrópicas respiratorio-deficientes son los citocromos aa<sub>3</sub> y b, así como la ATPasa sensible a oligomicina, lo cual resulta particularmente interesante, pues son exactamente las mismas actividades controladas por el DNA mitocondrial (21). Ya que las proteínas ribosomales parecen estar codificadas en su mayoría por el núcleo, la falta de alguna de estas

proteínas tendría que alterar forzosamente la síntesis de proteínas en la mitocondria.

#### 2.4. GENERALIDADES SOBRE CITOCROMOS:

Los citocromos son definidos como "hemoproteínas cuya principal función biológica es el transporte de electrones y/o hidrógenos en virtud de un cambio reversible de valencia de su grupo ferro-porfirina" (20). Algunas se hallan localizadas en la membrana mitocondrial interna, donde actúan secuencialmente para transportar los electrones originados en varios sistemas de deshidrogenasas, hasta el oxígeno molecular. Otros citocromos se encuentran en el retículo citoplásmico, en el que desempeñan un papel en las reacciones de hidroxilación especializadas. Todos ellos experimentan cambios reversibles de valencia Fe(II) - Fe(III) durante sus ciclos catalíticos. Sus formas reducidas no pueden ser oxidadas por el oxígeno molecular, con excepción del citocromo terminal de la respiración mitocondrial, es decir, el citocromo  $a_3$  o citocromo c oxidasa, que también contiene cobre íntimamente unido a él. En la membrana interna de las mitocondrias, cuya cadena respiratoria se ha estudiado de modo más completo, se han identificado, por lo menos, cinco citocromos: b,  $c_1$ , c, a y  $a_3$  (21).

Actualmente muchos bioquímicos sostienen que la principal función de los citocromos, es la transferencia de electrones hasta el oxígeno molecular en la cadena respiratoria, lo cual está estrechamente relacionado con la conversión del adenosín difosfato (ADP) más fósforo inorgánico a adenosín trifosfato (ATP) en el proceso llamado fosforilación oxidativa (20)(Figura 3.).

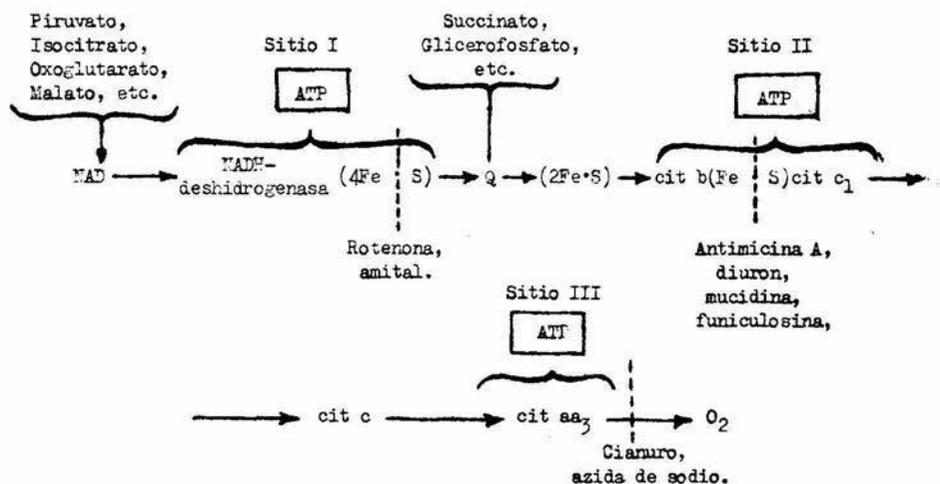


FIGURA 3. Cadena respiratoria en mitocondrias. Se muestran los puntos de entrada de electrones procedentes de varios sustratos, así como los centros de inhibición del transporte electrónico y los centros probables de conservación de la energía en forma de ATP (18; tomado parcialmente).

#### 2.4.1. Citocromo $aa_3$ :

La citocromo oxidasa juega una función fundamental en la vida aeróbica de los organismos; el 90 % de todo el oxígeno respirado actúa como sustrato para esta enzima. Se manifiesta como una mezcla de propiedades de diversas metaloproteínas, las cuales tienen funciones tanto de transporte como de óxido-reducción. El estudio de la biosíntesis, estructura y modo de acción de este complejo enzimático es atractivo para la bioquímica, biofísica y genética (7).

La función biológica fundamental de la citocromo oxidasa es relativa a su capacidad de activar el oxígeno molecular, el aceptor

tor electrónico terminal del metabolismo oxidativo (7).

La enzima cataliza la reacción:



Paso terminal en la serie de reacciones de óxido-reducción involucrada en la respiración celular para la síntesis de ATP. La enzima actúa como acoplador entre el donador de un electrón (cit. c) y el aceptor de 4 electrones ( $\text{O}_2$ ).

La enzima es también crucial en la producción de energía, - siendo un sitio tradicional de síntesis de ATP, como se observa en la figura 3.

La citocromo c oxidasa, es una proteína de membrana compuesta de diversas subunidades. La proteína purificada de eucariontes contiene 7 subunidades, con pesos moleculares desde 5 000 hasta 36 000 d. (20). La secuencia de aminoácidos de las subunidades muestra que algunas de las cadenas polipeptídicas están compuestas por restos muy hidrofóbicos seguidos por secciones de polipéptidos muy hidrofílicos. Pruebas químicas mediante solventes específicos, mostraron que algunos de los polipéptidos mayores cruzan la bicapa de la membrana mitocondrial interna, más de una vez (7).

Las 3 subunidades mayores son codificadas por el DNA mitocondrial y las otras 4 por el DNA nuclear. El mecanismo de transporte de las diferentes subunidades o sus precursores, y el ensamble de la oxidasa, está siendo estudiado.

La función de las subunidades pequeñas en eucariontes es incierta, particularmente en vista de que se ha encontrado que la citocromo oxidasa de Paracoccus denitrificans, está constituida de solo dos subunidades, análogas a las subunidades I y II (36 y 23000 d.), sin embargo es posible que la subunidad III (21000 d) se pierda durante la preparación (7). Se sabe que la citocromo oxidasa

contiene 4 centros metálicos por monómero, dos de los cuales son ferro-hemo y dos iones de cobre, situados muy probablemente en las subunidades mayores (I y II)(7).

#### 2.4.2. Citocromo b:

El citocromo b fue purificado por primera vez, en 1956, por Sekuzu y Okunuki, que encontraron que el monómero tiene un peso molecular que se aproxima a 28 000 d. Igual que los citocromos a y  $c_1$  (a diferencia del citocromo c), presenta una fuerte tendencia a polimerizarse espontáneamente y a formar complejos estequiométricos con la proteína "estructural" de Criddle (1962)(11).

La forma dimérica del citocromo b, consiste de dos polipéptidos de igual tamaño aproximadamente, cada uno de los cuales contiene un protohemo. Este carácter dimérico del citocromo b, ha sido muy discutido, debido a que en preparaciones purificadas solo es posible obtenerlo en estados altamente polimerizados (31).

La posible existencia de tres especies de citocromo b en mitocondria de eucariontes, ha sido sugerido por las diferencias observadas en la reducibilidad de componentes con bandas de absorción en tres regiones espectrales del citocromo b reducido, con una banda- $\alpha$  de máxima absorción en las regiones de 558, 562 y 566 nm. respectivamente, cuando se determinan a temperatura ambiente (5, 9, 22).

El citocromo b típico reducido por succinato, fue identificado con el pico de absorción a 562 nm.; mientras que las especies con picos de absorción a 558 y 566 nm. (ó 565 nm.) son reducibles por succinato solo en presencia de ATP o de antimicina (10), por lo que se concluyó que el ATP tiene un efecto específico en estos citocromos y se propuso que se les llamara  $b_T$  (Transducción de energía), distinguiéndose del citocromo b-562 llamado  $b_K$ , el cual

no está involucrado en las reacciones de energización (27).

La función de estas dos formas del citocromo b, no está clara todavía, aunque se ha postulado que el citocromo b<sub>T</sub> funciona en el mecanismo de transducción de la energía durante el transporte electrónico. Hanns Weiss en 1976 (31), sugiere que la hemo--proteína dimérica puede proporcionar las bases moleculares para las dos especies, funcionalmente diferentes, de citocromo b.

Ya que el citocromo b, representa el punto de contacto entre la cadena de citocromos y las distintas flavoproteínas, los mecanismos de transferencia de energía en los que está implicado, son complejos y no han sido todavía completamente revelados (11).

#### 2.4.3. Citocromo c:

El citocromo c se ha distinguido desde el principio, debido a que es fácilmente extraído por ácido c sal y por resistir la desnaturalización; por lo tanto muy pronto, hacia 1930, pudo ser purificado por Keilin; se cristalizó en 1955, y fue examinado en la forma monomolecular por microscopía electrónica por Levin en 1962 (20). Este citocromo es una proteína muy básica, de peso molecular relativamente bajo (aprox. 13 000 d.) que contiene un grupo hemo; probándose que la oxidación o reducción del citocromo c da lugar a cambios en la configuración tridimensional de la molécula (11).

En 1940, Yakushiji y Okunuki encontraron que el punto máximo de absorción del citocromo c a 550 nm. podía separarse en dos componentes, uno de los cuales tenía su auténtico punto máximo a 553 nm. Esta observación condujo al reconocimiento de un nuevo citocromo, normalmente llamado c<sub>1</sub>. Ambos tipos de absorción se encuentran muy próximos entre sí, sugiriendo que los dos tienen semejanzas estructurales (11).

Hoy en día, la estructura del citocromo c de eucariontes y de algunos otros organismos, es una de las estructuras proteicas mejor conocidas, rivalizando con la hemoglobina en este aspecto, pero extendida a un campo biológico mucho más extenso, pues se ha empleado para estudiar la divergencia evolutiva de diferentes especies. El establecimiento de la secuencia aminoácida, la estructura primaria, ha llegado a ser un procedimiento de rutina en diversos laboratorios. Por otro lado, el conocimiento de la estructura terciaria de algunos citocromos, puede ser rápidamente establecida como es el caso de la mioglobina.

#### 2.5. EL CIANURO COMO INHIBIDOR RESPIRATORIO:

No obstante de que se han realizado muchos trabajos sobre la inhibición con cianuro, nuestro conocimiento de estas reacciones, es más bien insatisfactorio. El cianuro no parece combinarse con  $a^{2+}$  o  $a^{3+}$ , pero se combina con ambos  $a_3^{2+}$  y  $a_3^{3+}$ . De este modo, el cianuro disminuye considerablemente la reducción de  $a_3^{3+}$  pero no de  $a^{3+}$ . El efecto inicial del cianuro en el espectro férrico de  $aa_3$  es pequeño, lo cual fue confirmado por Camerino y King (1966), quienes descubrieron un cambio lento de la banda de Soret en incubación con cianuro, siendo confirmado por Geyer y Lemberg, y consiste en un corrimiento a una longitud de onda distinta, dando un máximo de absorción a 427 nm. Se ha sugerido que el cianuro combinado solo con el hemo a, es disociable por medios físicos tales como diálisis, y que el corrimiento irreversible del máximo de absorción en la banda de Soret es debido a un componente no disociable del cianuro con algún otro sitio, probablemente el cobre (20). Evidencias recientes afirman que el cobre es un sitio de unión alternativo; sin embargo esto aún no ha sido confirmado y existen numerosas controversias al respecto. Por otra parte, se cree que los dos átomos de cobre de la citocromo oxidasa, que dan señales

de resonancia de espín electrónico (7), catalizan la transferencia de electrones desde el hemo  $a_3$  al oxígeno. Así pues, el cianuro inhibe la reoxidación del citocromo  $a_3$  reducido por el oxígeno.

## 2.6. LA ANTIMICINA A, Y SU UNIÓN AL CITOCROMO b:

La antimicina A, fue primero identificada por Leben y Keitt como un fungicida producido por una especie de Streptomyces (4). Fue aislada en forma cristalina por Strong y colaboradores y por Nakayama (27).

El poder inhibitorio de la antimicina en la cadena respiratoria fue primero observado por Ahmad, et al. Posteriormente Potter y Reif mostraron su efecto, concluyendo que la antimicina A bloquea el paso de electrones. Esto fue confirmado por Chance, quien encontró que en presencia de sustrato, aire y antimicina A, el citocromo b queda reducido, mientras que los citocromos c y  $a_3$  permanecen oxidados. Más tarde, cuando fue establecida la función del citocromo  $c_1$  en la cadena respiratoria, Keilin y Hartree (1955) localizaron el sitio de acción de la antimicina A más precisamente entre los citocromos b y  $c_1$  (27). La localización de la acción de la antimicina A, fue confirmada por estudios con la  $QH_2$ -citocromo c óxido-reductasa aislada (Complejo III)(22). Rieske mostró que la inhibición total de la actividad enzimática del complejo b- $c_1$  se logra con una molécula de antimicina A por una de citocromo  $c_1$  y dos moléculas de citocromo b (2).

La antimicina A es una mezcla de por lo menos cuatro componentes de estructura estrechamente relacionada. Es poco soluble en agua y usualmente se añade a las mitocondrias o preparaciones mitocondriales en solución alcohólica, en la cual muestra una banda máxima de absorción a 320 m $\mu$ . de  $4.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , siendo usado este coeficiente de extinción para determinar la concentración de

las soluciones "stock" de antimicina (27).

La solución alcohólica de antimicina A, fluoresce con un máximo aparente de excitación en el espectro a 350 nm. La fluorescencia se incrementa cuando la antimicina se une a la sero-albúmina, la cual tiene un sitio de unión para la antimicina A, con una constante de disociación de 0.12  $\mu$ M (27).

La inhibición con antimicina A se revierte por adición de sero-albúmina, o por extracción con éter, con este último se produce la restauración casi completa de la actividad enzimática, liberándose aproximadamente la mitad de la antimicina de las partículas submitocondriales, independientemente del grado de inhibición. Por otra parte, la antimicina A se une mucho más firmemente a las partículas respiratorias que a la sero-albúmina (27).

Estas observaciones sugieren que hay dos tipos de sitios de unión de la antimicina A, a las partículas submitocondriales, diferenciando en accesibilidad al éter. Ambos sitios son simultáneamente saturados con la misma cantidad de antimicina A y con constantes de unión iguales. Esto podría estar relacionado a lo encontrado con el ATP y la antimicina A (Ver 2.4.2.)(12), que afecta a aproximadamente la mitad del total de citocromo b ( $b_T$ ). Slater ha sugerido una doble localización del citocromo b en la membrana mitocondrial interna (27).

### 3. METODOLOGIA:

#### 3.1. DELINEAMIENTO DE LA ESTRATEGIA METODOLOGICA:

A partir de la cepa KT13 de Kluyveromyces lactis, procedente del cepario existente en el laboratorio, con un requerimiento de arginina como marcador de auxotrofia, se lograron las dos mutantes respiratorio-deficientes empleadas en esta tesis. Las mutantes fueron obtenidas por el M.C. Valentín Mendoza R. por mutagénesis con N-metil-N'-nitro-N-nitroso guanidina (MNNG).

De este modo, la selección de las mutantes "petite", está dada por su incompetencia respiratoria; es decir, por su incapacidad de generar energía a partir de sustratos no fermentables como única fuente de carbono, en virtud de poseer una mitocondria funcionalmente deficiente. Así pues, con el fin de estimar la alteración producida en la función de dicho organelo, se investigaron tanto en las mutantes como en la progenitora, características como velocidad de crecimiento, capacidad respiratoria, estudio espectral de citocromos y comportamiento ante inhibidores específicos de la cadena respiratoria (cianuro y antimicina A).

#### 3.2. REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO:

##### 3.2.1. Soluciones Amortiguadoras:

a) Amortiguador de fosfatos, 50 mM, pH 7.0

$\text{KH}_2\text{PO}_4$                     2.62 g.

$\text{K}_2\text{HPO}_4$                     7.00 g.

$\text{H}_2\text{O}$                         1000 ml.

b) Amortiguador de fosfatos 0.2 M, pH 4.5

$\text{KH}_2\text{PO}_4$                     2.72 g.

Agua bidestilada        100 ml.

## c) Amortiguador de resuspensión de mitocondrias, pH 7.4

Tris	13.0 mM
Manitol	0.33 M
Sorbitol	0.27 M
EDTA	0.7 mM

\* Albúmina bovina 6 mg./ml.

Aforar después de añadir la albúmina tratada con carbón activado.

## d) Medio para molido de mitocondrias, pH 6.8

Manitol	0.6 M
Hepes	0.5 g./l.

\* Albúmina bovina 6 mg./ml.

EDTA 36.6 mg./ml.

Agitar para disolver y ajustar el pH con Tris.

## e) Medio de preparación o lavado para mitocondrias

Medio de molido sin EDTA.

## f) Medio para respiración de Mitocondrias (Mezcla suficiente para 10 pruebas)

Manitol 0.8 M	19.5 ml.
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> -Tris 0.1 M, pH 6.5	3.0 ml.
KCl 1M	1.2 ml.
* Albúmina al 5 % (sin ácidos grasos)	1.2 ml.
Etanol de 96 % o Succinato 1 M	0.45 ml.
Agua bidestilada	4.65 ml.

---

30.00 ml.

Generalmente se omite el sustrato (etanol o succinato) y se agrega durante la medición

\* Albúmina bovina 5 mg./ml. libre de ácidos grasos.-  
 Para preparar esta albúmina usamos: Albumin, "bovine fraction V Powder", de Sigma Chemical Co. Se pesan 10 g. de albúmina y se disuelven en 100 ml. de agua destilada con 5 g. de carbón activado. Se baja el pH a 3.0 con HCl 0.2 N. Se agita durante una hora en frío. Se centrifuga 30 minutos a 36 000 x G y se extrae cuidadosamente con pipeta Paesteur el sobrenadante. Se ajusta el pH del sobrenadante a 7.0 con NaOH 0,2 N. Se afora para lograr una concentración de 5 % (p/v).

g) Medio de molido para partículas submitocondriales pH 7.5

Sacarosa	0.25 M
Tris - HCl	50 mM

### 3.2.2. Medios de Cultivo:

a) Mezcla sin fuente de carbono para medios completos -  
 (YPA):

Extracto de levadura	1 % (p/v)
Peptona de gelatina	1 % (p/v)
Sulfato de adenina	80 µg./ml.
Agua destilada	

b) Medio completo con glucosa (YPAD):

Dextrosa	2 % (p/v)
Mezcla YPA	

c) Medio completo con glicerol (YPAG):

Glicerol	3 % (v/v)
Mezcla YPA	

- d) Medio completo con etanol (YPAE):
- |                 |           |
|-----------------|-----------|
| Etanol absoluto | 3 % (v/v) |
| Mezcla YPA      |           |
- e) Medio completo con lactato (YPAL):
- |                                      |           |
|--------------------------------------|-----------|
| Solución al 50 % de lactato de sodio | 2 % (v/v) |
| Mezcla YPA                           |           |
- f) Medio sintético con glucosa y aminoácidos (SD + aa)
- |   |              |
|---|--------------|
| Base nitrogenada de levadura libre de aminoácidos (Difco) | 0.67 % (p/v) |
| Dextrosa  | 2.0 % (p/v)  |
| Bacto-agar  | 2.0 % (p/v)  |
- \*\* Soluciones de aminoácidos:
- Sulfato de adenina 20 mg./l.
  - L-uracilo 20 mg./l.
  - L-triptofano 20 mg./l.
  - L-histidina 20 mg./l.
  - L-arginina 20 mg./l.
  - L-metionina 20 mg./l.
  - L-tirosina 30 mg./l.
  - L-leucina 30 mg./l.
  - Isoleucina 30 mg./l.
  - Clorhidrato de lisina 40 mg./l.
  - Fenil-alanina 50 mg./l.
  - L-valina 150 mg./l.
- \*\*\* L-treonina 200 mg./l.
- L-serina 375 mg./l.
  - Acido glutámico 100 mg./l.
- \*\*\* Acido aspártico 100 mg./l.

\*\*\* Agregarlo después de la esterilización.

\*\* Las soluciones de aminoácidos pueden o no adicionarse al medio según se requiera, de este modo se preparan medios con uno o varios aminoácidos; o bien, medios completos con carencia de un aminoácido determinado.

g) Medio mínimo con glucosa (MD):

Base nitrogenada de levadura libre de aminoácidos (Difco)	0.67 % (p/v)
Dextrosa	2.0 % (p/v)
Agua destilada	

h) Medio mínimo con glucosa, ácidos grasos y esteroides

(MD - TE):

Tween 80	1.0 % (v/v)
Ergosterol	10 $\mu$ g./ml.
Medio de cultivo MD	

### 3.3. PRUEBA DE CRECIMIENTO EN SUSTRATOS NO FERMENTABLES:

Se inició la caracterización de las mutantes, observando su crecimiento en medios de cultivo conteniendo sustratos no fermentables como única fuente de carbono, de tal modo que cualquier alteración o modificación en el funcionamiento adecuado de sus mitocondrias, traerá como consecuencia una falta de crecimiento en dichos medios.

Cada mutante, previamente purificada, se suspendió en agua - destilada estéril, y una gota de esta se colocó en placas con medio completo (YPA) adicionado con distintos sustratos como única fuente de carbono. YPAD: medio completo + glucosa, YPAG: medio - completo + glicerol, YPAE: medio comp. + etanol, e YPAL: medio - comp. + lactato.

Se observaron los cultivos después de 48 y 72 horas de incubación a 30 °C, reconociendo las cepas con incompetencia respiratoria por su desarrollo lento en YPAD y por su incapacidad de crecer en el resto de los medios probados.

### 3.4. DETERMINACION DE MARCADORES DE AUXOTROFIA:

El avance fundamental en el empleo de levaduras como material genético, se logra mediante mutaciones que alteran la capacidad - de aquellas para sintetizar metabolitos esenciales. Por ejemplo, K. lactis generalmente se desarrolla bien con glucosa como única fuente de carbono, y una mezcla de sales minerales y vitaminas; - pero, como resultado de mutaciones específicas, existen cepas que solo crecen, cuando el medio se suplementa con un metabolito específico. Resulta fácil trabajar con este tipo de mutaciones (que sirven para "marcar" a una cepa dada), para comprobar su presencia tan solo se necesita hacer crecer el posible mutante tanto en ausencia como en presencia de un metabolito, como por ejemplo histi

dina. Si hubo una mutación que inhibe la biosíntesis de este aminoácido, la cepa solo se desarrollará en presencia de histidina.

Los marcadores de auxotrofia son importantes, no solo por su ayuda en los estudios de cruza y segregación, sino que además, - contribuyen a eliminar la posibilidad de estar trabajando con una cepa diferente a la esperada.

La cepa KT13, progenitora de las mutantes bajo estudio (VTN8 1D y VTN14-1E), tiene como marcador de auxotrofia a la arginina, por lo que resultó necesario determinar si las mutantes respiratorio-deficientes obtenidas, conservaban aún el mismo marcador. Para realizar esta prueba, se suspendieron las cepas en concentración aproximada de  $10^8$  células/ml. en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0. Una gota de la suspensión se colocó sobre placas de YPAD, MD (medio mínimo + glucosa) y de los diferentes medios sintéticos preparados por adición de todos los aminoácidos menos uno a medio mínimo (SD + aa)(Ver 3.2.2.f.). Los cultivos se incuban a 30 °C durante 48 horas para poder observar el carácter de auxotrofia en los medios SD + aa.

### 3.5. CRUZAS Y SEGREGACION:

Se seleccionó para cruzar las cepas respiratorio-deficientes, cepas respiratorio-competentes de factor de compatibilidad y marcadores de auxotrofia complementarios. En vista de que las mutantes respiratorio-deficientes de K. lactis tienen alterada su capacidad para cruzarse, se suplementó el medio de cruce con esteroides y ácidos grasos no saturados (tween 80), ya que estos no se sintetizan en ausencia de oxígeno. A partir de estos cultivos - frescos, se sembraron las cepas a cruzar, sobre placas de YPAD, de aquí se tomaron las células para mezclarse en placas con medio MD

TE, a razón de 2 partes de células respiratorio-deficientes por una parte de células respiratorio-competentes. Las placas se incubaron a 30 °C, haciendo observaciones al microscópio a las 24, 48, 72 y 96 horas, en busca de células cigóticas que por complementación den lugar a diploides prototróficos, a partir de los cuales se induce la esporulación, y de este modo observar las características transmitidas a las ascosporas para poder determinar el carácter de la mutación en base a su segregación (Ver 2.2.1.).

### 3.6. CURVAS DE CRECIMIENTO:

Resulta posible seguir el crecimiento de K. lactis, en base a la densidad óptica observada en soluciones nutritivas líquidas. Si se inocula un medio nutriente con un número pequeño de células en división, provenientes de un medio análogo, continuarán dividiéndose a intervalos de tiempo constante, doblando su número en cada lapso, por lo que el número de células aumenta exponencialmente. El crecimiento exponencial continua hasta que dejan de existir las condiciones nutritivas óptimas originales, pasando por tanto a una etapa estacionaria en la que el número de células deja de aumentar. Se emplea frecuentemente la expresión "curva de crecimiento", para describir el aumento del número de células en función del tiempo, la cual nos permite el cálculo del tiempo medio de generación de una cepa dada.

Así pues, con el fin de determinar de que manera altera la mutación a la velocidad media de crecimiento, y permitir el cálculo del tiempo medio de generación, se realizará una curva de crecimiento de cada una de las cepas, en base al incremento en la densidad óptica observada en medio líquido completo, graficándose unidades Klett (640 - 700 nm.) contra tiempo.

Para esta determinación se colocaron 50 ml. de medio líquido

completo (YPAD) en matraces nefelométricos con capacidad para 250 ml. Los matraces se inocularon con volúmenes adecuados de una sus pensión de células frescas, para lograr una concentración final de  $10^6$  células/ml., incubando con agitación a 30 °C, y registrando la turbidez en un fotocolorímetro Klett-Summerson, provisto de un filtro rojo (640 - 700 nm.). Las lecturas se efectuaron cada 60 minutos desde el tiempo cero hasta el inicio de la fase logarítmica, después de la cual se hicieron lecturas cada 30 minutos hasta alcanzar la etapa estacionaria del cultivo.

### 3.7. MEDICION DE LA RESPIRACION:

El oxígeno molecular está directamente involucrado en las re acciones de óxido-reducción de la cadena respiratoria, debido a - que funciona como el aceptor final de electrones en esta serie de reacciones; así pues, resulta evidente, que en condiciones normales el consumo de oxígeno de una célula, estará dado por la efica cia de sus mitocondrias, es por ello que se pensó cuantificar el consumo de oxígeno en cada una de las cepas tanto mutantes (VTN8-1D y VTN14-1E) como progenitora (KT13).

Para realizar este estudio, se inocularon 25 ml. de medio YPAD con la cepa en cuestión, a una concentración de  $10^6$  células/ml, incubando con agitación a 30 °C hasta alcanzar la fase estacionaria. Las células se recogieron por centrifugación a 2 500 rpm. du rante 10 minutos a una temperatura de 5 a 10 °C, lavandose tres veces con agua estéril bajo las mismas condiciones.

La actividad respiratoria fue medida a 30 °C, usando un elec trodo de Clark, en un oxímetro provisto de un graficador; la de terminación se llevó a cabo colocando de 20 a 40 microlitros; se gún la cepa, de una suspensión de células al 50 % en 3 ml. de a mortiguador de fosfato-glucosa, pH 4.5, preparado con 8.74 partes

de amortiguador 0.2 M y 100 partes de solución de glucosa 117 mM.

Se midió también el consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas de cada una de las cepas, las cuales fueron obtenidas como se describirá más adelante (Ver 3.8.2.). Se realizó la medición, diluyendo de 20 a 40 microlitros de la suspensión de mitocondrias en 3 ml. de medio para respiración de mitocondrias (Ver 3.2.1.) a 30 °C, utilizando como sustrato 0.45 ml. de succinato 1 M y para el control respiratorio, 5 microlitros de ADP 50 mM.

Para poder correlacionar el consumo de oxígeno de las cepas estudiadas, se determinó la cantidad de proteína, por el método de Lowry, de las suspensiones mitocondriales, y para el estudio con células completas se obtuvo el peso seco de la suspensión celular.

### 3.8. ESTUDIO ESPECTRAL DE CITOCROMOS:

Debido a que la deficiencia respiratoria va generalmente acompañada de alteraciones en uno o varios de los citocromos mitocondriales, un estudio espectral de los mismos resulta de gran utilidad, aprovechando la propiedad de cada uno de los citocromos de exhibir bandas de absorción características en su estado reducido. Para ello se utilizará un espectrofotómetro Aminco DW-2A™.

#### 3.8.1. Espectro Absoluto:

Para lograr este tipo de espectros, las mediciones de absorbancia son hechas con un solo monocromador en un rango de longitud de onda previamente establecido. El rayo de este monocromador pasa de manera alterna a través de la muestra y la referencia, la cual es para este caso, un "blanco" que elimina la turbidez de la muestra. La diferencia en absorbancia entre la muestra

y la referencia, es lo que registra el aparato.

Para la preparación de las muestras, primeramente se hace un cultivo de 24 horas en placas de YPAD incubando a 30 °C. Con esta semilla se inoculan matraces nefelométricos de 250 ml. de capacidad con 50 ml. de medio líquido YPAD a una concentración de  $10^6$  células/ml., incubando con agitación a 30 °C hasta alcanzar la etapa estacionaria de acuerdo a la densidad óptica observada en cada una de las cepas. Las células se colectan por centrifugación de los cultivos a 2 500 rpm. durante 10 minutos a una temperatura de 5 a 10 °C. Las células se lavan 3 veces, suspendiéndolas en agua destilada estéril y centrifugando nuevamente bajo las mismas condiciones. Se cuentan las células lavadas, y se realiza la dilución adecuada para obtener una concentración de  $10^{10}$  células/ml. Esta dilución se coloca en una cubeta de 3 ml. de capacidad y se añade una pequeña cantidad (loque se toma con la punta de una espátula) de bisulfito de sodio como agente reductor.

Se emplea como "blanco" una solución de leche, preparada con 575 mg. de leche descremada Difco en 4.7 ml. de agua destilada, a partir de la cual se prepara la dilución de leche más apropiada (generalmente 1:5) de acuerdo con la turbidez observada en la muestra.

Se corre el espectro de absorción de citocromos en la modalidad rayo dividido (Split beam mode) a un rango de longitud de onda de 480 a 615 nm.

### 3.8.2. Espectro Diferencial:

En el espectro diferencial, al igual que en el absoluto, las mediciones de absorbancia son hechas con un solo rayo que pasa de manera alterna a través de la muestra y la referencia. Sin embargo, en el espectro diferencial, se obtiene un registro en base a

la diferencia de absorbancia de la muestra reducida contra la misma en estado oxidado (referencia).

Con el fin de obtener una mayor resolución en el espectro diferencial, se obtuvo el registro a partir de muestras de mitocondrias a baja temperatura de cada una de las cepas bajo estudio, para lo cual primeramente se hace un cultivo de 24 horas en placas de YPAD incubando a 30 °C. Con esta semilla se inoculan matraces nefelométricos de 250 ml. de capacidad con 50 ml. de medio líquido YPAD y matraces Erlenmeyer de 2 litros de capacidad con 500 ml. de medio líquido YPAD, a una concentración de  $10^6$  células/ml., incubando en agitación a 30 °C hasta alcanzar la etapa estacionaria en base a la densidad óptica observada en los matraces nefelométricos de cada una de las cepas.

Para cosechar las células se centrifuga en frascos de 250 ml de capacidad o mayores. Se elimina el medio de cultivo y se lavan las células dos veces con agua estéril, y se elimina en lo posible el agua.

Condiciones de centrifugación.- Se centrifuga a 3 000 rpm. durante 10 minutos a una temperatura de 5 a 10 °C en una centrifuga refrigerada Sorvall RC-5B con un rotor GSA con capacidad para 6 botellas de Nalgene de 250 ml.

Procedimiento para el molido de las células y posterior obtención de mitocondrias.- Las células usadas deben ser frescas, esto es de no más de un día de obtenidas, pues de lo contrario puede ocurrir que se contaminen con bacterias. Por cada 20 gramos de células se añaden 25 ml. de medio de molido, resuspendiéndolas en frío con un agitador de vidrio. Se mide el volumen obtenido y se transfieren las células a dos frascos de vidrio de boca ancha y tapón esmerilado de un litro de capacidad, previamente mantenidos en frío. Se agrega también un volumen igual de perlas de vi

drio de 0.45 - 0.52 mm. de diametro, recomendadas para levadura.

Se procede ahora al molido de las células, para ello se puede utilizar un agitador mecánico que garantice un molido adecuado en nuestro caso hemos utilizado un agitador marca Precision Scientific Co. que opera a 115 volts.

Se constata el grado de ruptura de las células, por observaciones en un microscopio de contraste de fases, para ello, a una asada del molido se le adiciona una gota de agua destilada, observándose las células rotas, oscuras y las no rotas, claras. Si distinguimos aproximadamente el 50 % de las células rotas, podemos entonces continuar el procedimiento.

El molido lo pasamos a un filtro Büchner con fibra de vidrio adaptado a un matraz Kitasato, al cual se le hace vacío para retener las perlas y recuperar el molido. Se lavan tanto los frascos como las perlas con medio de preparación o de lavado varias veces hasta completar un volumen de 320 ml., suficiente para garantizar que todo está recuperado. Se inician entonces las centrifugaciones.

Primera centrifugación.- Todo el molido a 2 700 rpm. durante 15 minutos, se desecha el precipitado. Al decantar los tubos hay que evitar en lo posible que pase a nuestro líquido sobrenadante una capa blanca que normalmente está separada del paquete de células y que está constituida por lípidos.

Segunda centrifugación.- El sobrenadante a alta velocidad, 8 500 rpm. durante 15 minutos, se desecha el sobrenadante.

Tercera centrifugación.- Todos los tubos son limpiados cuidadosamente por dentro con ayuda de papel absorbente, tratando de eliminar en lo posible la capa de lípidos que visiblemente se encuentra en las paredes de los tubos, cuidando de no absorber el "pelet". Se le agrega entonces más o menos 2 ml. de medio de pre

paración a cada tubo, se resuspenden y se les agrega suficiente medio hasta llenar la capacidad de los tubos. Se centrifuga a 2 700 rpm. durante 15 minutos y se desecha el precipitado.

Cuarta centrifugación.- Todo el sobrenadante a 9 500 rpm. durante 15 minutos, se elimina el sobrenadante.

Para garantizar que a nuestras mitocondrias no les queden lípidos, por medio de una pipeta Pateur adaptada a una trompa de vacío, extraemos toda la capa lipídica que rodea el "pelet", auxiliandonos de papel absorbente si es necesario.

Manteniendo todos los tubos en hielo, tomamos ahora 0.2 ml. de medio de preparación y lo ponemos en el primer tubo, lo sesuspendemos y lo pasamos a otro tubo hasta acabar con todos. Medimos el volumen de nuestras mitocondrias y las guardamos en congelación.

Posteriormente se lleva a cabo la determinación de proteína de cada una de las muestras; por el método de Lowry, y se diluye hasta alcanzar una concentración aproximada de 20 mg./ml., sin embargo esta concentración es variable de acuerdo con la cepa.

Se congela la muestra a la concentración adecuada en amortiguador de fosfatos, pH 7.0, en una cubeta adaptada al espectrofotómetro, conteniendo nitrógeno líquido. Se corre entonces el espectro, con la muestra previamente reducida con bisulfito de sodio.

Se corre el espectro dentro de un intervalo de longitud de onda de 480 a 615 nm. y un desfaseamiento del otro monocromador de 2 nm., es decir, 478 - 613 nm.

### 3.9. INHIBICION DEL CONSUMO DE OXIGENO POR KCN:

La posible presencia de alguna cotocromo oxidasa terminal al

terna en Kluyveromyces lactis (no reportada), podría enmascarar una alteración en la cadena respiratoria de las mutantes en cuestión. Para descartar esta posibilidad, es necesario realizar una curva de inhibición del consumo de oxígeno por KCN, pues el cianuro bloquea el paso de electrones, específicamente a nivel del citocromo aa<sub>3</sub>. Por otra parte, el obtener una curva de inhibición por cianuro, nos permite determinar si la alteración producida en las mutantes, afecta también la concentración media inhibitoria en relación con la progenitora.

Para este estudio, se crece la cepa en 25 ml. de medio YPAD a 30 °C, a partir de un inóculo de 10<sup>6</sup> células/ml., se recogen las células, tanto en fase logarítmica como estacionaria, por centrifugación a 25 000 rpm. durante 10 minutos y se lavan tres veces con agua estéril.

Las distintas mediciones se realizan midiendo el consumo de oxígeno, mediante un electrodo de Clark, colocando de 20 a 40 microlitros de una suspensión de células al 50 % en 3 ml. de amortiguador de fosfato-glucosa pH 4.5. El cianuro se agrega en cantidades crecientes durante el registro.

### 3.10. COMPORTAMIENTO FRENTE AL INHIBIDOR RESPIRATORIO, ANTIMICINA A:

La antimicina A, es un inhibidor específico altamente potente, de la transferencia de electrones en el segmento b-c<sub>1</sub> de la cadena respiratoria mitocondrial (4), demostrándose recientemente que el citocromo b es el componente de unión específico a la antimicina A (23). Basándonos en este hecho, resulta interesante observar el comportamiento de las mutantes respiratorio-deficientes, ante el inhibidor específico antimicina A, para lo cual el estudio se dividió en las dos etapas siguientes:

### 3.10.1. Inibición del Consumo de Oxígeno por Antimicina A:

La obtención de una curva de inhibición, nos permite observar si las mutantes (VTN8-1D y VTN14-1E), presentan alguna alteración en la concentración media inhibitoria con respecto a la progenitora (KT13), puesto que se ha demostrado que en la inhibición de la actividad enzimática del segmento b-c<sub>1</sub>, existe una relación estequiométrica con la cantidad de antimicina requerida (2).

Para realizar este estudio, se hace un cultivo de 24 horas en placas de YPAD incubando a 30 °C. Con esta siembra se inoculan matraces nefelométricos con 50 ml. de medio líquido YPAD y matraces con 500 ml., a una concentración de 10<sup>6</sup> células/ml., incubando con agitación a 30 °C hasta alcanzar la etapa estacionaria. Las células se colectan centrifugando en frascos de 250 ml. de capacidad o mayores. Se elimina el medio de cultivo y se lavan las células dos veces con agua estéril, eliminandose en lo posible el agua. A partir de este paquete de células, se extraen mitocondrias de cada una de las cepas como se describió anteriormente - (Ver 3.8.2.).

Con las suspensiones de mitocondrias obtenidas, se llevaron a cabo las mediciones del consumo de oxígeno, colocando 20 - 40 microlitros en 3 ml. de medio de respiración de mitocondrias, usando un electrodo de Clark con un oxímetro provisto de un graficador, donde se registró primeramente, el consumo de oxígeno de mitocondrias intactas, con succinato como sustrato. Posteriormente se le adicionó concentraciones crecientes, a partir de una solución metanólica de antimicina A, la cual fue preparada tomando en cuenta el coeficiente de extinción molar a 226 y 320 nm. (log 4.54, 3.68 a 226 y 320 nm. respectivamente).

Para poder relacionar la inhibición, con la cantidad de muestra empleada, se determinó proteína por el método de Lowry, a ca-

da una de las suspensiones mitocondriales.

### 3.10.2. Captación de Antimicina A, por el Citocromo b:

Basandonos en el hecho, de la intensa fluorescencia que emite la antimicina A, y en su capacidad de unión alostérica con el citocromo b, es posible utilizar dichas propiedades como herramienta en la demostración de la deficiencia en citocromo b en una cepa mutante.

Si agregamos concentraciones crecientes de antimicina, a una suspensión mitocondrial, el citocromo b presente, captará gradualmente al inhibidor. Una vez formado el complejo antimicina-citocromo b, se centrifuga a alta velocidad, de modo que el complejo sedimentará, dejando en el sobrenadante una cantidad de antimicina inversamente proporcional a la cantidad de citocromo b presente en la muestra.

Para este estudio, se obtuvieron inicialmente suspensiones de mitocondrias aisladas de cada una de las cepas en cuestión, bajo las condiciones ya descritas con anterioridad (Ver 3.8.2.). Las mitocondrias así obtenidas, se suspendieron en medio de molido para partículas submitocondriales, pH 7.5, posteriormente se sonicaron durante dos intervalos de 30 segundos al máximo de intensidad. El sonicado homogéneo fue centrifugado a 10 000 x G durante 10 minutos y el sobrenadante obtenido fue nuevamente centrifugado a 100 000 x G durante 60 minutos. Todas las operaciones fueron realizadas a 2 °C. Al final, las partículas submitocondriales fueron resuspendidas en unas gotas de medio de molido y congeladas en nitrógeno líquido.

En una serie de tubos de ultracentrífuga (rotor 50 ti) con capacidad para 5 ml., previamente enjuagados con agua bidestilada

o desionizada, poner 3 ml. de amortiguador de resuspensión conteniendo 6 mg./ml. de albúmina sérica bovina. Agregar las partículas submitocondriales en volúmenes suficientes para tener un milligramo de proteína en cada tubo (determinado por el método de Lowry). Añadir la antimicina A, a las distintas concentraciones. Todo esto en frío.

Incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos, centrifugar a 35 000 rpm. 30 minutos, recuperar el sobrenadante y medir fluorescencia a 410 nm. (SLM-Fluorescence Instrumentation).

La curva patrón se prepara de igual manera que la problema, salvo que las distintas concentraciones de antimicina A, se agregan después de la centrifugación, directamente al sobrenadante; esto se hace con el fin de eliminar la posible fluorescencia inespecífica liberada al medio, por las partículas submitocondriales y que podrían alterar la medición.

La antimicina se adicionó en concentraciones micromolares, a partir de una solución metanólica preparada en base al coeficiente de extinción molar, como ya se ha indicado.

#### 4. PRESENTACION Y ANALISIS DE RESULTADOS:

##### 4.1. PRUEBA DE CRECIMIENTO EN SUSTRATOS NO FERMENTABLES:

La incompetencia respiratoria, se puso de manifiesto en las mutantes VTN8-1D y VTN14-1E, al ser incapaces de crecer en medios completos con sustratos no fermentables como única fuente de carbono, debido a que estas cepas poseen una mitocondria con alguna alteración funcional, que le impide generar suficiente energía mediante respiración aeróbica (Tabla 4.1.).

Por otra parte, a diferencia de la cepa progenitora KT13, se observó en las mutantes, un desarrollo lento en medio completo + glucosa (YPAD), característico de las cepas respiratorio-deficientes.

##### 4.2. DETERMINACION DE MARCADORES DE AUXOTROFIA:

Al igual que la cepa progenitora KT13, las mutantes respiratorio-deficientes, presentaron al aminoácido arginina como marcador de auxotrofia; puesto que fueron incapaces de crecer en medio SD + todos los aminoácidos menos arginina, y observaron colonias en medio mínimo + glucosa + arginina (SD + arginina).

##### 4.3. CRUZAS Y SEGREGACION:

Con el fin de determinar el origen de la mutación mediante el estudio de la segregación meiótica del caracter respiratorio-deficiente inducido, se intentó la formación de diploides a partir de cruzas entre mutantes y células respiratorio-competentes, de factor de compatibilidad (sexo) y requerimiento auxotrófico complementarios.

Desafortunadamente no se logró la obtención de diploides; debido tal vez, a que el crecimiento anaeróbico de estas cepas en

glucosa, no es suficiente para sintetizar algún componente requerido en la conjugación. Por otra parte se había observado que ácidos grasos no saturados y ergosterol favorecen la cruce en esta levadura (16), por lo que se emplearon medios conteniendo estas sustancias, sin haberse tenido éxito alguno.

Por lo tanto, se llevó a cabo una técnica distinta para determinar la naturaleza de la mutación, conocida como fusión de protoplastos, mediante la cual en el laboratorio, se logró establecer que se trataba de una mutación de carácter nuclear en las dos mutantes estudiadas (VTN8-1D y VTN14-1E); es decir que las mutantes eran "petite segregacionales" (Ver 2.2.).

A continuación se presenta una tabla en la que se resumen los resultados obtenidos hasta el momento:

TABLA 4.1. CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS CEPAS:

	CEPAS:		
	KT13 (Progenitora)	VTN8-1D (Mutante)	VTN14-1E (Mutante)
CRECIMIENTO EN:			
GLUCOSA	+	+	+
GLICEROL	+	-	-
ETANOL	+	-	-
LACTATO	+	-	-
MARCADOR DE AUXOTROFIA	Arginina	Arginina	Arginina
NATURALEZA DE LA MUTACION DE INCOMPETENCIA RESPIRATORIA	- -	Nuclear	Nuclear

#### 4.4. CURVAS DE CRECIMIENTO:

Con el propósito de conocer, de que manera es alterado el cre cimiento en las mutantes respiratorio-deficientes, considerando que su desarrollo está basado en una sola ruta energética, se rea lizó una curva de crecimiento para cada una de las cepas, de acuer do a la densidad óptica observada en función del tiempo, graficán dose unidades Klett (640 - 700 nm.) contra el tiempo en horas (Fi gura 4.1.).

Este estudio nos permitió cuantificar el desarrollo lento ya observado, en las cepas mutantes en relación con su progenitora. De este modo, podemos puntualizar dichas diferencias como sigue:

- a) Hay una marcada prolongación del periodo de latencia en ambas mutantes respiratorio-deficientes, VTN8-1D y VTN14-1E (Figura 4.1.).
- b) Una notoria diferencia en los valores máximos de absor-bancia alcanzados en la etapa estacionaria, debido probablemente a que en Kluyveromyces lactis no existe repre sión catabólica, y por tanto las dos rutas metabólicas, fermentación y oxidación, se encuentran activas simultáneamente.
- c) Por último se observa una disminución en la velocidad me dia de crecimiento, principalmente en la mutante VTN14-1E dada por la pendiente de la etapa exponencial, y vista más claramente en la figura 4.2., en donde se grafica el logaritmo de las unidades Klett contra el tiempo.

El cálculo del tiempo medio de generación, resultó ser, para la cepa KT13 (progenitora) de 110 minutos, para la mutante - VTN8-1D; 120 minutos, y para la mutante VTN14-1E; 210 minutos.

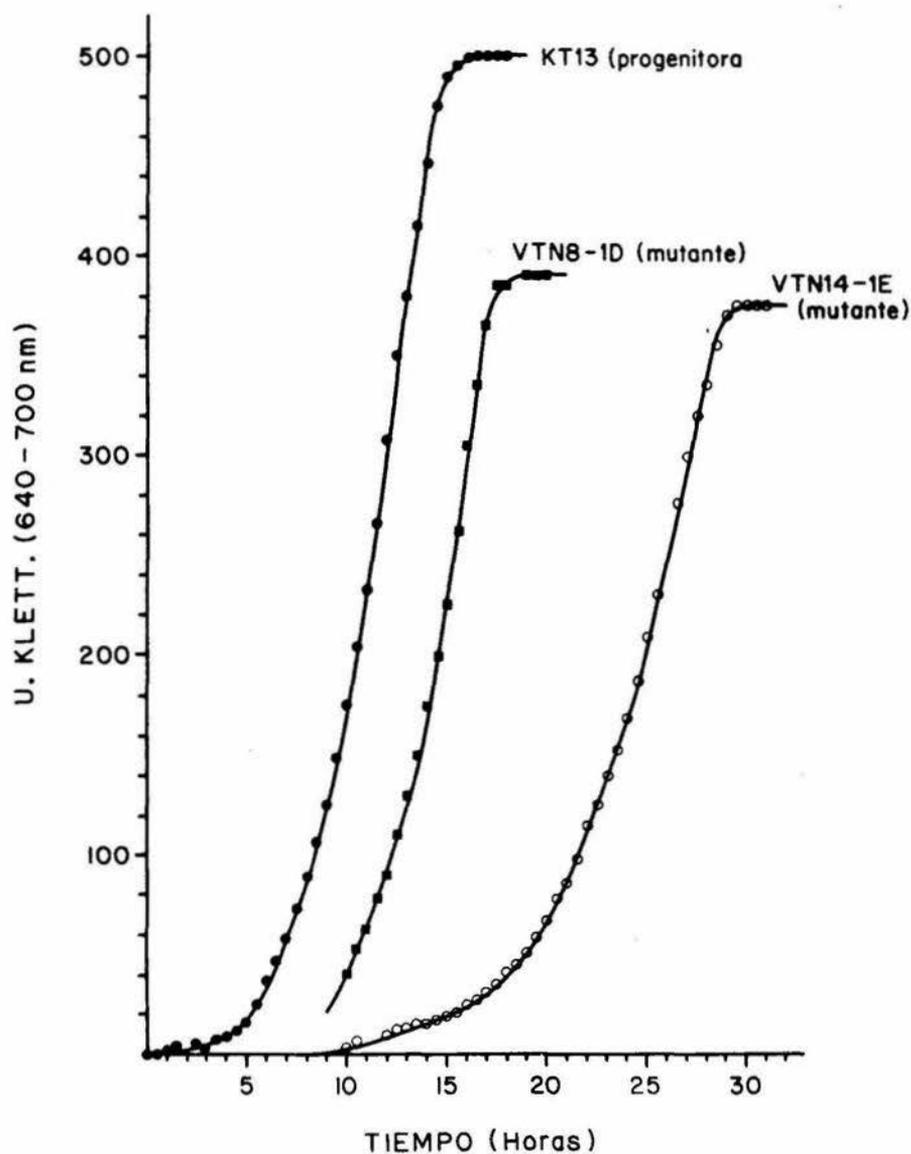


FIGURA 4.1. Curvas de crecimiento, en base al incremento en la densidad óptica observada en medio líquido completo (YPAD) incubando con agitación a 30 °C.

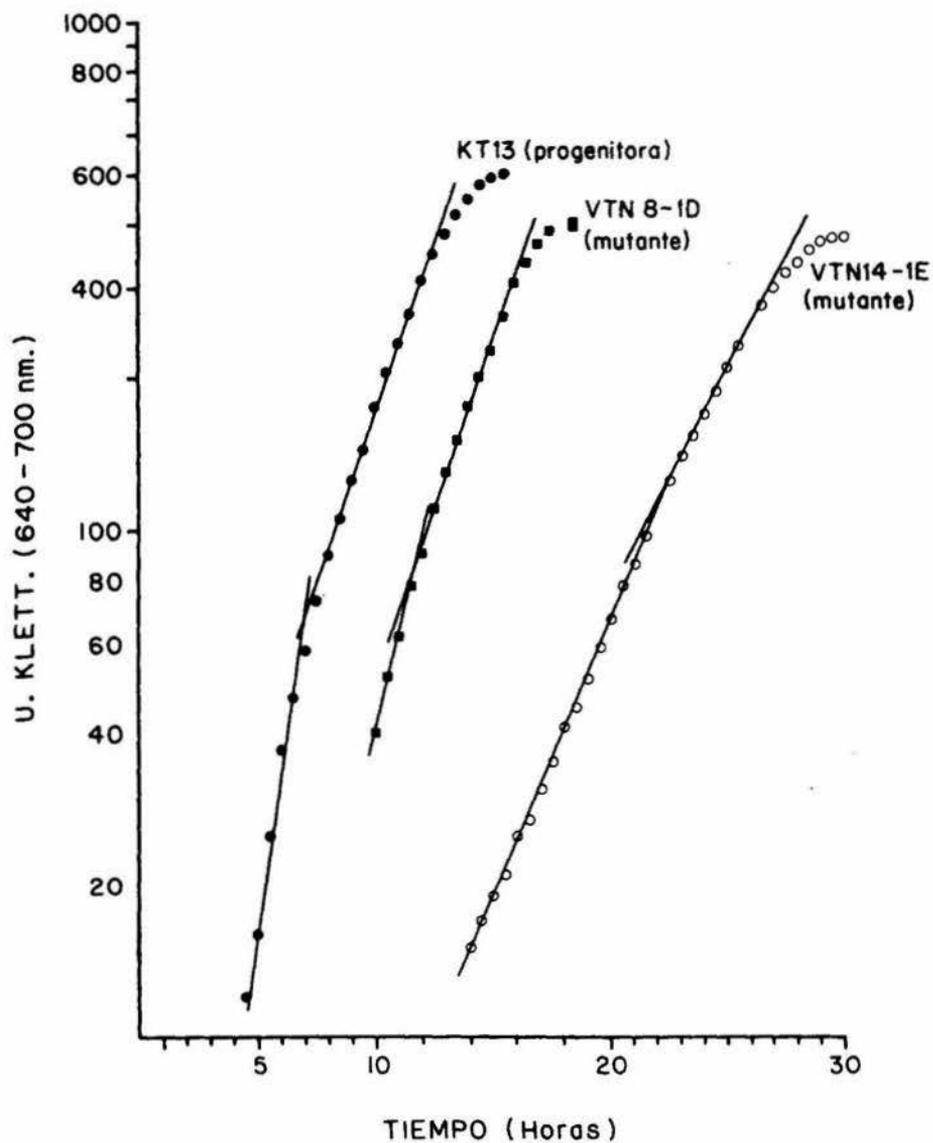


FIGURA 4.2. Gráfica de las curvas de crecimiento como función de tipo exponencial, para la obtención de los tiempos medios de generación en base a sus pendientes.

## 4.5. MEDICION DE LA RESPIRACION:

En la oxidación de los combustibles orgánicos, el oxígeno actúa como el aceptor electrónico final en la respiración, es por esto que se pensó cuantificar el consumo de oxígeno en cada una de las cepas, dándonos de este modo, una idea más precisa del daño ocasionado en la respiración de las cepas mutantes.

Los resultados fueron obtenidos en nanoátomos de oxígeno por miligramo de peso seco por minuto, y por miligramo de proteína para las mediciones hechas con mitocondrias. Dichos valores pueden ser estimados en términos porcentuales, con el fin de considerarlos comparativamente. Esto se calcula, tomando el valor obtenido para la progenitora como el 100 % de la respiración.

Como puede observarse en la tabla 4.2., el consumo de oxígeno en las cepas respiratorio-deficientes (VTN8-1D y VTN14-1E) es significativamente alto, considerando su incapacidad total de crecer en presencia de sustratos no fermentables como única fuente de carbono.

Por otra parte, no se observaron variaciones considerables en los valores obtenidos en células completas con respecto a los obtenidos con mitocondrias aisladas.

TABLA 4.2. MEDICION DE LA RESPIRACION:

CEPAS:	KT13	VTN8-1D	VTN14-1E
CONSUMO DE OXIGENO EN CELULAS COMPLETAS (nátomos O <sub>2</sub> /mg. peso seco/min.)	152.3 (100 %)	80.8 (53.1 %)	99.5 (65.3 %)
CONSUMO DE O <sub>2</sub> EN MITOCONDRIAS AISLADAS (nátomos O <sub>2</sub> /mg. proteína/min.)	151.5 (100 %)	83.4 (55.0 %)	91.3 (60.3 %)
CONTROL RESPIRATORIO	1.125	1.062	1.081

En la fase respiratoria conocida como "estado 4", la mayor parte del ADP disponible se ha fosforilado para dar ATP, y el sistema se halla en reposo. Al añadir ADP, la velocidad de consumo de oxígeno experimenta un brusco incremento a una fase respiratoria más activa ("estado 3"), durante la cual, el ADP adicionado se fosforila a ATP. Cuando se ha fosforilado casi todo el ADP, las mitocondrias retornan a la velocidad del estado 4. La relación de la velocidad del estado 3 de la respiración, entre la del estado 4, es la relación del control respiratorio (Tabla 4.2.).

El control respiratorio constituye una medida útil, de la integridad de las mitocondrias aisladas; cuanto más elevada es la relación, menos desacopladas se hallan las mitocondrias.

Los valores del control respiratorio obtenidos, aunque bajos resultan satisfactorios para los fines comparativos de este estudio.

#### 4.6. ESTUDIO ESPECTRAL DE CITOCROMOS:

Puesto que la incompetencia respiratoria, es ocasionada generalmente por alteraciones en algunos componentes de la cadena respiratoria, como lo son los citocromos, se estudió el estado de estos en la progenitora y las 2 mutantes. Este estudio reveló una deficiencia notoria en dos de ellos (citocromo b y  $aa_3$ ), lo cual fue corroborado con la obtención de 3 tipos de espectros de absorción.

##### 4.6.1. Espectro Absoluto:

En el espectro obtenido (Figura 4.3.), se observan los tres trazos de cada una de las cepas. La KT13 (progenitora de las mutantes) exhibe tres bandas de absorción  $\alpha$ , características de los citocromos en estado reducido; el pico a 550 nm. del citocromo c,

ESPECTRO DE ABSORCION DE CITOCROMOS  
MODO: RAYO DIVIDIDO (Reducido Vs. Patrón)

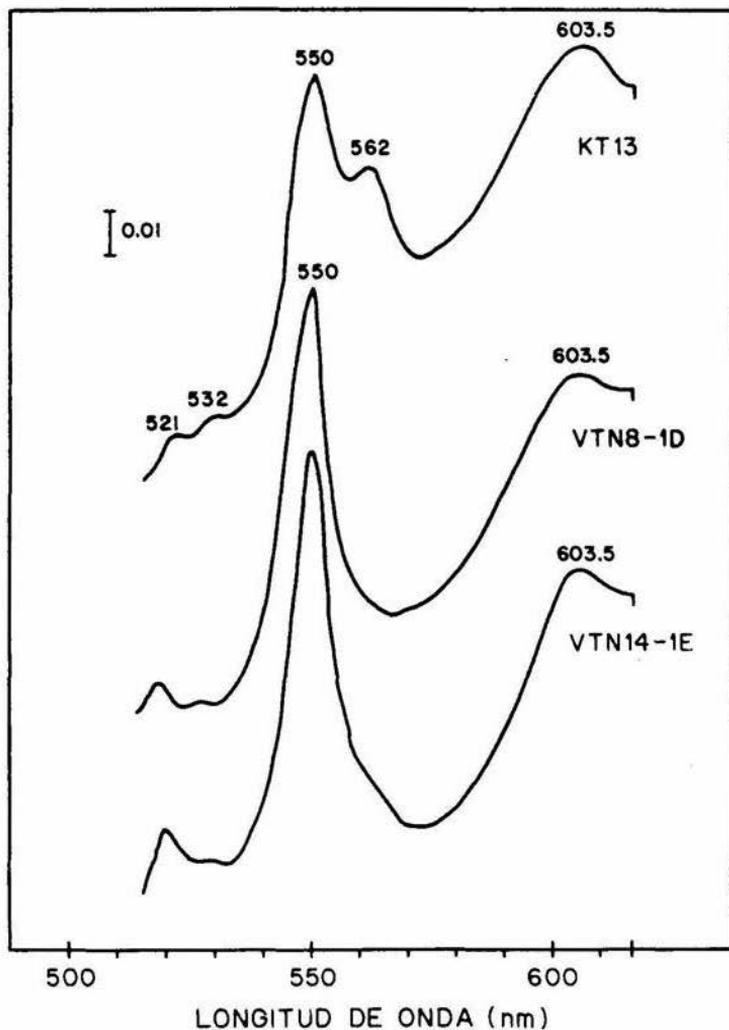


FIGURA 4.3. Espectro absoluto con células completas reducidas con bisulfito de sodio contra solución de leche como referencia.

a 562 nm. del citocromo b y a 603.5 nm. el  $a_3$ . También se observan los máximos de absorción de las bandas  $\beta$  del citocromo c; a 521 nm., y del citocromo b a 532 nm.

En las mutantes VTN8-1D y VTN14-1E, se puede notar la desaparición del pico de absorción del citocromo b a 562 nm. y una marcada disminución del citocromo  $aa_3$  a 603.5 nm.. Las bandas  $\beta$  se encuentran también alteradas.

Cabe hacer notar, que típicamente las mutantes respiratorio-deficientes de S. cerevisiae, tienen disminuido el contenido de los citocromos  $aa_3$  y b, acompañadas de un aumento aparente del pico de absorción del citocromo c, como lo demuestran diversos trabajos (Sherman y Slonimski, 1964; Reilly y Sherman, 1965; Mackler et al., 1965)(20).

#### 4.6.2. Espectro Diferencial:

En los espectros diferenciales, basados en la diferencia de la muestra en estado reducido menos la misma en estado oxidado (referencia), se obtuvieron a baja temperatura con mitocondrias congeladas, factor que produce un corrimiento hacia el azul de los máximos de absorción de los citocromos.

Como puede notarse en la figura 4.4., las mutantes VTN8-1D y VTN14-1E presentan disminuidos los citocromos  $aa_3$  y b, confirmando las observaciones hechas en el espectro absoluto.

#### 4.6.3. Espectro Derivativo:

La derivada de un espectro de absorción, es la medida del cambio de absorbancia con respecto a la longitud de onda. De modo que, al obtener esta derivada, el máximo de absorción está dado por la intersección con la línea basal; es decir, el punto ce

ESPECTRO DE ABSORCION DE CITOCROMOS  
 MODO: RAYO DIVIDIDO (Oxidado Vs. Reducido)

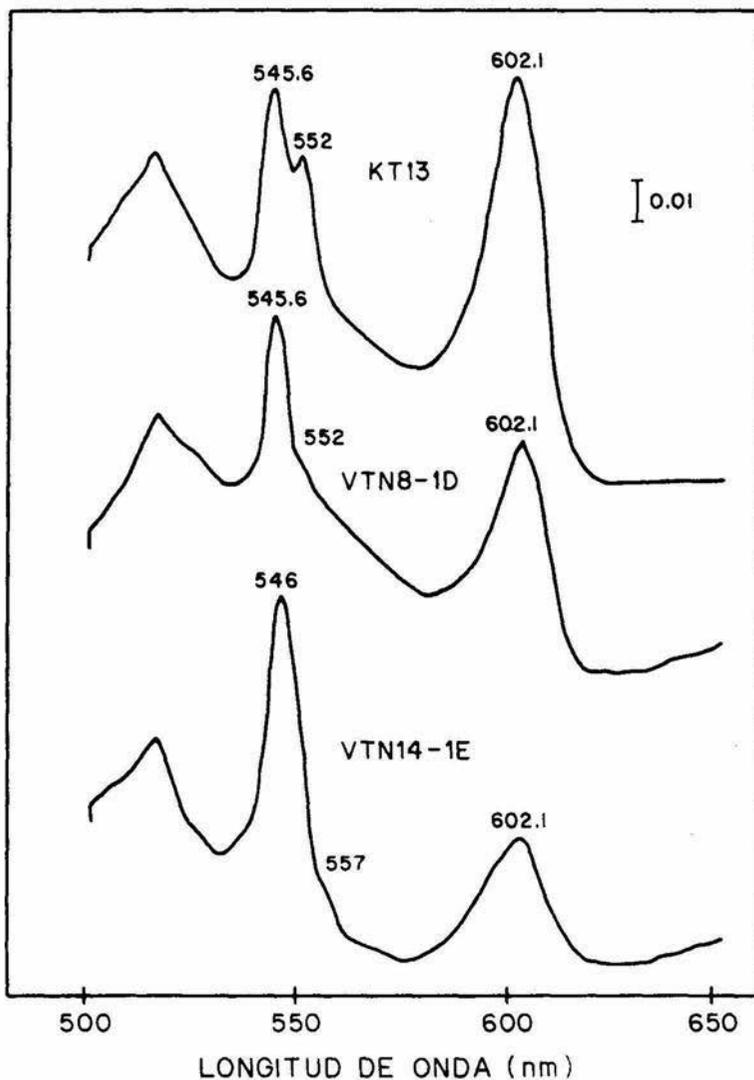


FIGURA 4.4.- Espectro diferencial a baja temperatura. Mitocondrias aisladas, en amortiguador de fosfatos pH 7.0, reducidas con 2 mg./ml. de bisulfito de sodio, contra mitocondrias oxidadas con persulfato de amonio.

ESPECTRO DE ABSORCION DE CITOCROMOS  
MODO: DERIVATIVO (Reducido)

48

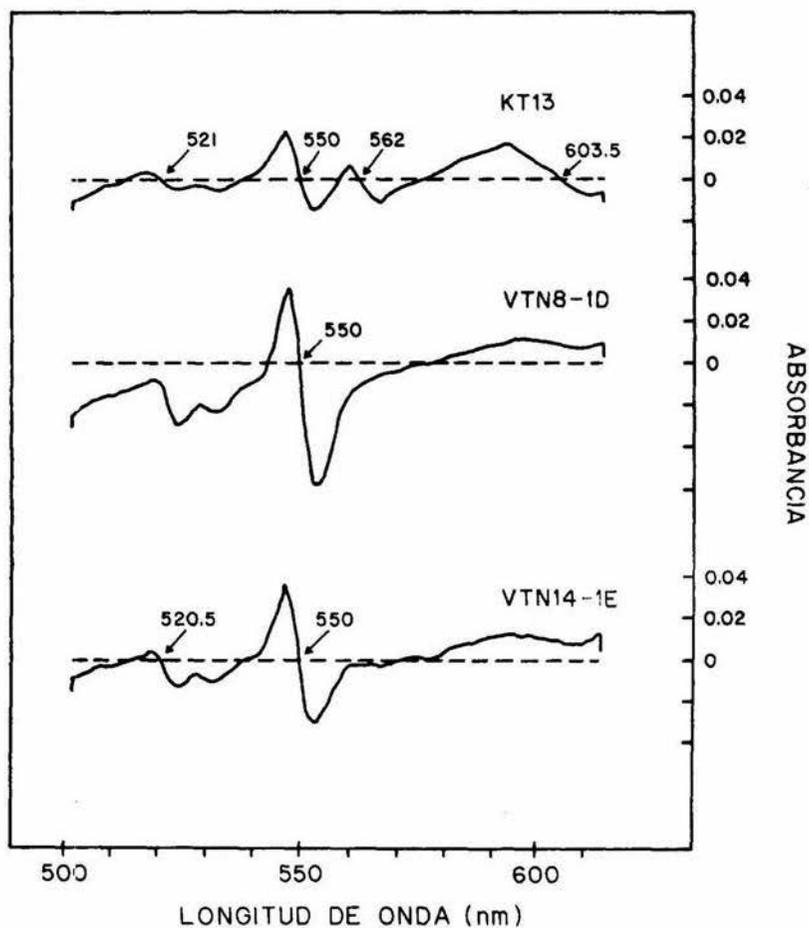


FIGURA 4.5. Espectro derivativo.  $\Delta\lambda = 2 \text{ nm}$ . Células completas reducidas con bisulfito de sodio.

ro de absorbancia.

Este tipo de espectro es también considerado como absoluto, ya que el registro es en base a una sola muestra en estado reducido, sin embargo en este caso, proporciona un incremento en la resolución, confirmando la deficiencia en los citocromos aa<sub>3</sub> y b en ambas cepas mutantes (Figura 4.5.).

#### 4.7. INHIBICION DEL CONSUMO DE OXIGENO POR KCN:

Las curvas de inhibición del consumo de oxígeno por cianuro (Figuras 4.6., 4.7., y 4.8.), nos muestran una inhibición del 95 % del consumo de oxígeno tanto en la progenitora como en las mutantes, lo cual, aunque no radicalmente, descarta la posibilidad de que existiese alguna citocromo oxidasa terminal alterna. Por otra parte, con el fin de corroborar los resultados obtenidos, se crecieron las cepas en presencia de cianuro para inducir una probable oxidasa terminal, y se observó nuevamente el grado de inhibición producido, obteniéndose resultados similares.

Cabe hacer notar, que tampoco se observó variación alguna en lo referente a la etapa de crecimiento en que fueron colectadas, ya fuera en la fase logarítmica o en la fase estacionaria del cultivo, los resultados fueron los mismos.

Sin embargo, la única diferencia observada, fue en el cálculo de la concentración media inhibitoria (inserto en las gráficas) la cual fue de 0.125  $\mu\text{mol. KCN/mg. de peso seco}$  en la cepa KT13, de 0.5  $\mu\text{mol. KCN/mg. de peso seco}$  para la mutante VTN8-1D, y de 0.1  $\mu\text{mol. KCN/mg. de peso seco}$  para VTN14-1E.

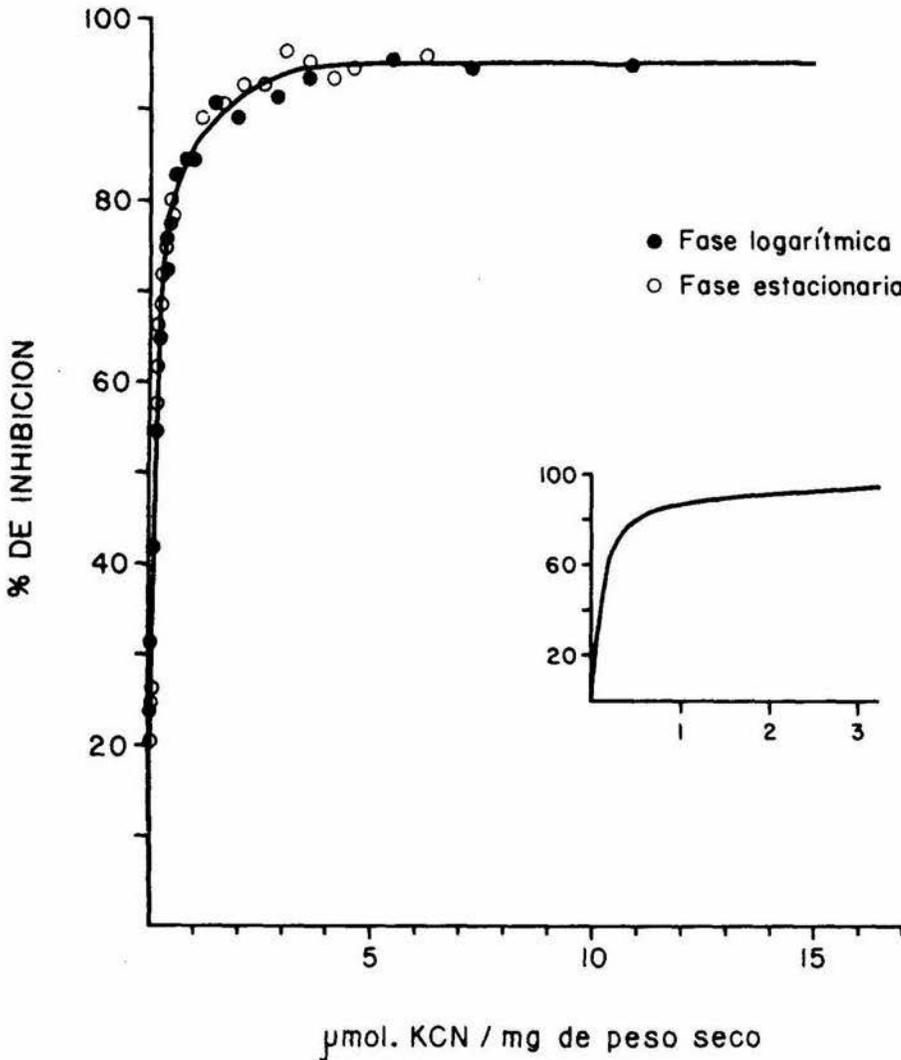


FIGURA 4.6. Inhibición del consumo de oxígeno por KCN. Células completas en amortiguador de fosfato-glucosa, pH 4.5. Cepa KT13 (progenitora).

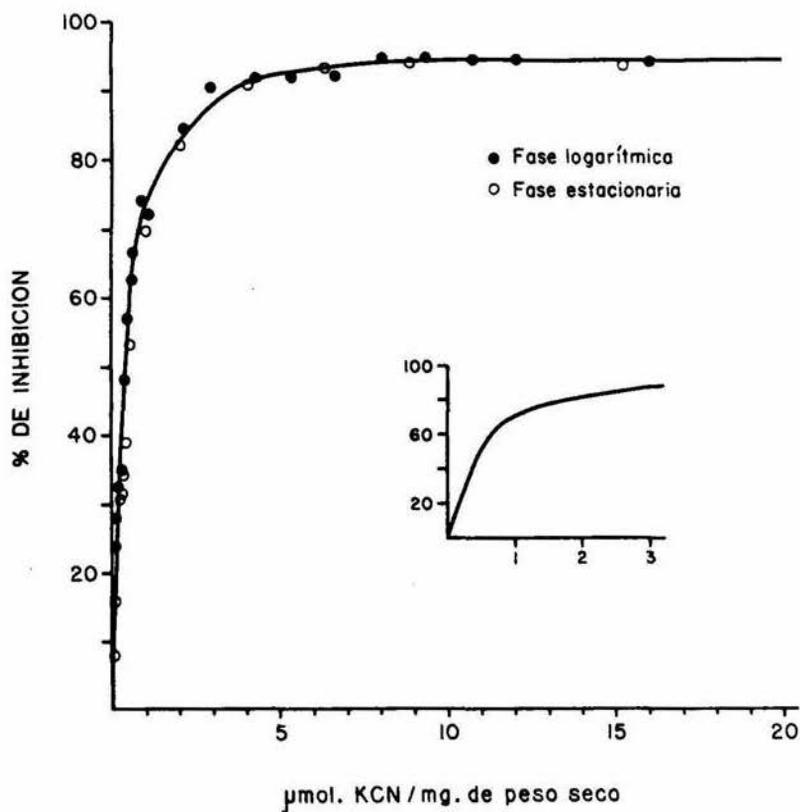


FIGURA 4.7. Inhibición del consumo de oxígeno por KCN. Células completas en amortiguador de fosfato-glucosa, pH 4.5. Cepa VTN8-1D (mutante).

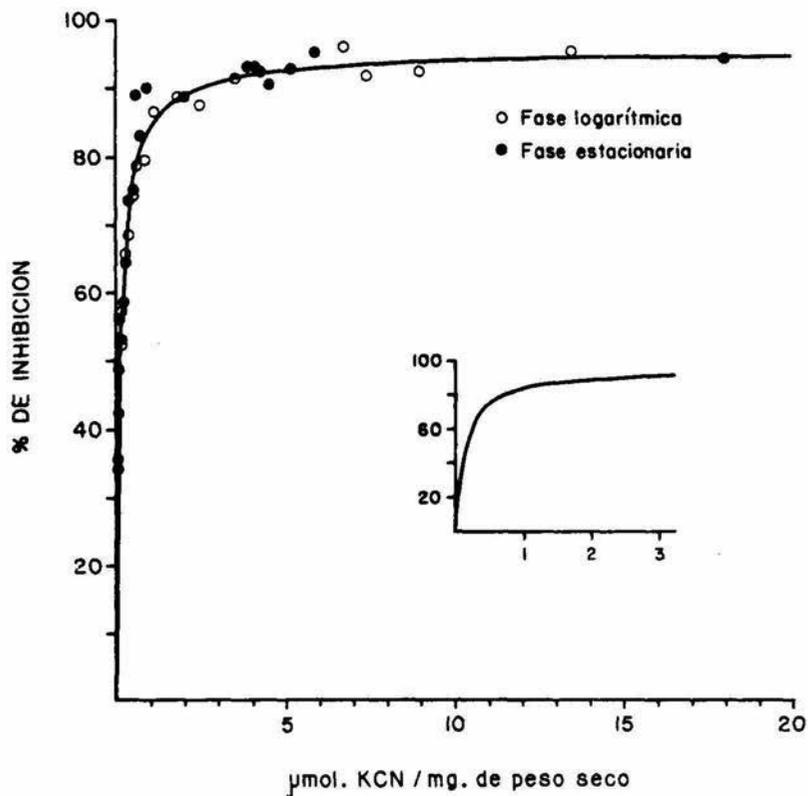


FIGURA 4.8. Inhibición del consumo de oxígeno por KCN. Células completas en amortiguador de fosfato-glucosa pH 4.5. Cepa VTN14-1E (mutante).

#### 4.8. COMPORTAMIENTO FRENTE AL INHIBIDOR RESPIRATORIO, ANTIMICINA A:

La antimicina fue usada como inhibidor específico de la transferencia de electrones en el segmento b-c<sub>1</sub>, uniéndose específicamente al citocromo b, en base a lo cual, los resultados obtenidos en el tratamiento de las mutantes con antimicina A, fueron correlativos con la deficiencia en citocromo b, anteriormente observada.

##### 4.8.1. Inhibición del Consumo de Oxígeno por Antimicina:

En la figura 4.9., se muestran las curvas de inhibición por antimicina A de cada una de las cepas, encontrándose una marcada diferencia en la concentración media inhibitoria, siendo de 80 nM para la progenitora (KT13), de 21.5 nM para la mutante VTN8-1D, y de 27 nM. para la VTN14-1E, cantidades que pueden ser correlativas con la cantidad de citocromo b nativo, presente en cada cepa.

Rieske y colaboradores, mostraron en 1967, que la completa inhibición de la actividad enzimática del complejo b-c<sub>1</sub>, es obtenida con una molécula de antimicina A por dos moléculas de citocromo b, encontrándose la misma relación en estudios de unión directa (2,3).

Esta misma relación estequiométrica, puede ser utilizada para evaluar de un modo indirecto, la concentración aproximada de citocromo b existente en las cepas estudiadas.

De este modo, consideramos que para inhibir el 50 % de la actividad enzimática del complejo b-c<sub>1</sub>, se requiere de 0.5 moléculas de citocromo b. Bajo este criterio se calcula la concentración de citocromo b como sigue:

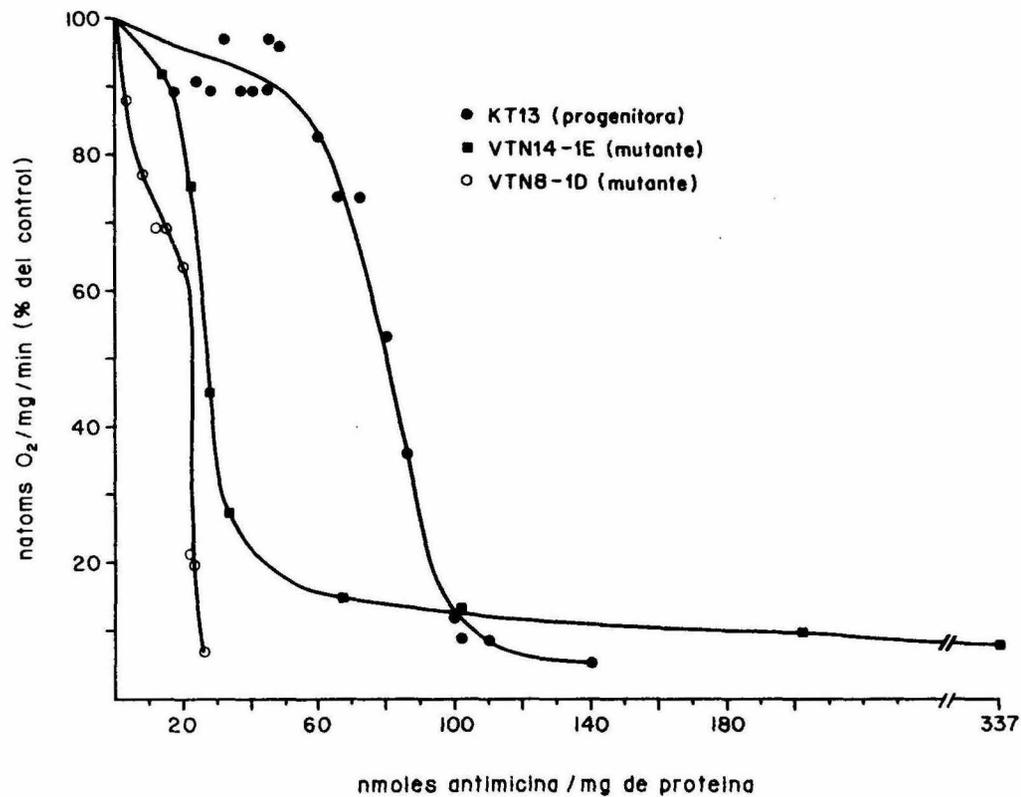


FIGURA 4.9. Inhibición del consumo de oxígeno por antimicina A. Se colocaron de 20 a 40 microlitros en 3 mililitros de medio de respiración de mitocondrias, de una suspensión mitocondrial.

Si en una solución de antimicina A 1 M., hay  $6.023 \times 10^{23}$  moléculas (número de Avogadro) de antimicina A, entonces:

KT13:	80 nM _____	$4.81840 \times 10^6$	moléculas de antimicina
VTN8-1D:	21.5 nM _____	$1.29494 \times 10^6$	"
VTN14-1E:	27 nM _____	$1.62621 \times 10^6$	"

Si 0.5 moléculas de antimicina A, es a 2 moléculas de citocromo b, la cantidad de citocromo está dada por la siguiente expresión:

$$C = \frac{2(N)}{0.5} = 4(N)$$

En donde:

N = es el número de moléculas de antimicina de la concentración media inhibitoria.

C = es el número de moléculas de citocromo b.

De este modo, obtenemos las siguientes aproximaciones:

CEPA:	Moléculas de citocromo b/mg proteína	Porcentaje:
KT13	$19.2736 \times 10^{16}$	100 %
VTN8-1D	$5.17978 \times 10^{16}$	26.88 %
VTN14-1E	$6.50484 \times 10^{16}$	33.75 %

#### 4.8.2. Captación de Antimicina A, por el Citocromo b:

La unión de la antimicina al citocromo b, fue ensayada por el método de Berden y Slater (3). Las partículas submitocondriales aisladas, fueron tratadas con bajas concentraciones de antimicina A en presencia de sero-albúmina bovina, la cual libera la

antimicina A unida a las partículas de los sitios de baja afinidad, incrementando así, la sensibilidad del método. La captación del inhibidor por el citocromo b, es además observada, como un decremento en la fluorescencia, dado por la posición de la recta al graficar fluorescencia contra adición de antimicina A (Figura 4. 10.).

Los resultados de tales experimentos, son mostrados en la figura 4.10., en donde la cantidad de antimicina A unida, está dada por la diferencia entre las rectas de cada una de las cepas con la del control (patrón), la cual representa la fluorescencia total de la antimicina añadida, medida en el sobrenadante libre de partículas submitocondriales con adición directa de las distintas concentraciones de antimicina A.

La disminución de la fluorescencia en la cepa KT13, ocurre de modo casi paralelo con la recta del control, variando solo ligeramente en su pendiente. En contraste con la progenitora, las cepas VTN8-1D y VTN14-1E presentan una menor captación de antimicina A, observable por la mayor fluorescencia registrada en cada punto.

Por otra parte, la notable diferencia en las pendientes de las mutantes, en relación a la progenitora y al control, sugiere un incremento en las constantes de disociación de la antimicina A a las partículas de las cepas mutantes, disminuyendo por alguna causa aún no aclarada, la afinidad del sitio de unión a la antimicina A.

Una posible explicación de este efecto, resulta de la integración de las características observadas previamente, en cada una de las cepas. Así pues, si consideramos el consumo de oxígeno comparativamente alto, medido en las mutantes, y el bajo contenido de citocromo b, podemos pensar que posiblemente existe un au-

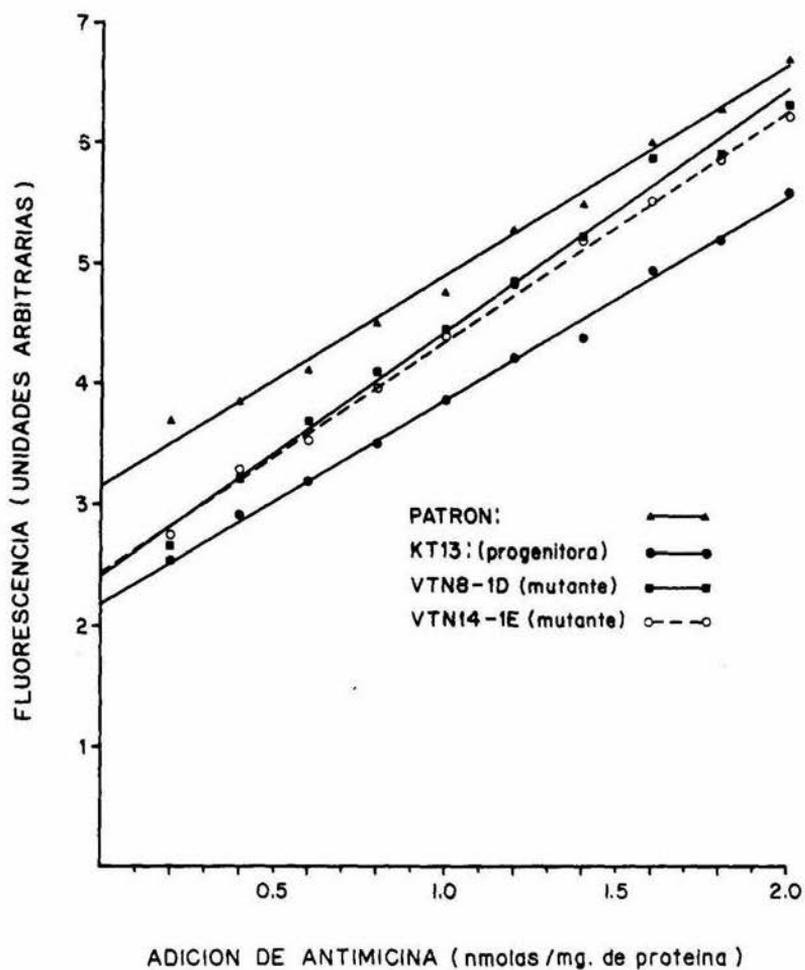


FIGURA 4.10. Captación de antimicina A por partículas sub-mitocondriales en 3 ml. de amortiguador de resuspensión pH 7.4 + 6 mg/ml de albúmina sérica bovina.

mento en el flujo de electrones, lo cual podría ser corroborado mi diéndose el potencial óxido-reducción "standard". Este aumento ocasionaría una mayor facilidad de reducción del citocromo b, pa-compensar así su disminución; justificando de esta manera, el in-cremento en su constante de disociación con la antimicina A, ya que este inhibidor se une más firmemente a las partículas oxida-das que a las reducidas (23,27).

Una segunda explicación podría ser sencillamente, que las partículas submitocondriales de las mutantes respiratorio-defi-cientes, resultan más fácilmente reducibles, debido precisamen-te a la baja cantidad de citocromo b presente.

#### 5. CONCLUSIONES:

Se caracterizaron dos mutantes respiratorio-deficientes de K. lactis, las cuales se asemejan a las mutantes "petite" de S. cerevisiae, en su incapacidad de crecer en sustratos no fermentables como única fuente de carbono, y por formar pequeñas colo-nias típicas de las mutantes "petite", en medio completo con -glucosa. Estas mutantes tienen aparentemente, un DNA mitocon-drial normal con una pérdida de algunos componentes del aparato respiratorio. Se observó una herencia típicamente Mendeliana, segregando el carácter de la mutación en una proporción 2:2, - por lo que se determinaron como mutaciones nucleares ("petites segregacionales").

A continuación se presenta una tabla en la que se resumen los resultados obtenidos en la caracterización de las 2 mutantes:

TABLA 5.1. CARACTERISTICAS DETECTADAS EN LAS CEPAS BAJO ESTUDIO.

CEPAS:	KT13 (progenitora)	VTN8-1D (mutante)	VTN14-1E (mutante)
CRECIMIENTO EN:			
GLUCOSA	+	+	+
GLICEROL	+	-	-
ETANOL	+	-	-
LACTATO	+	-	-
MARCADOR DE AUXOTROFIA	Arginina	Arginina	Arginina
NATURALEZA DE LA MUTACION DE INCOMPETENCIA RESPIRATORIA	- -	Nuclear	Nuclear
TIEMPO MEDIO DE GENERACION EN MEDIO COMPLETO + GLUCOSA	110 min.	120 min.	210 min.
CONSUMO DE O <sub>2</sub> . CELULAS COMPLETAS (nátomos O <sub>2</sub> /mg peso seco/min)	152.3 (100 %)	80.8 (53.1 %)	99.5 (65.3 %)
CONSUMO DE O <sub>2</sub> . MITOCONDRIAS AIS- LADAS (nátomos O <sub>2</sub> /mg prot./min.)	151.5 (100 %)	83.4 (55.0 %)	91.3 (60.3 %)
CITOCROMO b (No. de moléculas/mg proteína)	19.3 x 10 <sup>16</sup>	5.2 x 10 <sup>16</sup>	6.5 x 10 <sup>16</sup>
CITOCROMO aa <sub>3</sub>	++	+-	+-
CONCENTRACION MEDIA INHIBITORIA (umol. KCN/mg. peso seco)	0.125	0.50	0.10

Las curvas de crecimiento y la medición de la respiración, muestran una marcada deficiencia en relación a su progenitora, - siendo su consumo de oxígeno de 55 y 60 % para cada mutante, valores que resultan ser muy elevados considerando la disminución que presentan en el máximo de absorción de los citocromos aa<sub>3</sub> y b.

Al inhibir el consumo de oxígeno con cianuro, mostraron algu

nas diferencias en la concentración requerida para inhibir el 50 % de la respiración, pero en todas ellas se logra alcanzar el 95 % de inhibición considerándose como completa, ya que no todo el oxigeno consumido es utilizado en la respiración.

Se observaron así mismo, marcadas variaciones en la concentración media inhibitoria, al tratarlas con antimicina A, lo cual sirvió para aproximar la concentración de citocromo b presente en cada cepa mutante, siendo de 26.88 % y 33.75 % en relación con la progenitora.

La determinación de la captación de antimicina A por partículas submitocondriales, se corroboró con la deficiencia en citocromo b, presentando un aparente incremento en sus constantes de disociación con la antimicina A, disminuyendo de este modo, la afinidad de su sitio de unión.

## 6. A B R E V I A T U R A S :

ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
ATPasa	Adenosín trifosfatasa
DNA	Acido desoxirribonucleico
mtDNA	Acido desoxirribonucleico mitocondrial
EDTA	Acido etilendiamino tetracético
MD	Medio mínimo con glucosa
MD-TE	Medio mínimo con glucosa, ácidos grasos y esteroides
MNNG	N-metil-N'-nitro-N-nitroso guanidina
NAD <sup>+</sup> , NADH	Nicotinamida-adenín-dinucleótido y su forma reducida
RNA	Acido ribonucleico
tRNA	Acido ribonucleico de transferencia
SD	Medio sintético con glucosa
TRIS	Tris hidroximetil aminometano
YPAD	Medio completo con glucosa
YPAE	Medio completo con etanol
YPAG	Medio completo con glicerol
YPAL	Medio completo con lactato

## VI. BIBLIOGRAFIA

1. ALLMARK, B.M.; DANKS, S.M.; and WHITTAKER, P., (1977), "Isolation and Characterization of Respiratory-Deficient Mutants of Kluyveroyces lactis, a 'Petite'-Negative Yeast", BIOCHEM. SOC. TRANS.
2. BERDEN, J.A.; and OPPERDOES, F.R., (1972), "An Antimycin-Sensitive Cytochrome b Component in Beef-Heart Mitochondria", BIOCHEM. BIOPHYS. ACTA. 267 : 7 - 14.
3. BERDEN, J.A. and SLATER, E.C. (1972), "The Allosteric Binding of Antimycin to Cytochrome b in the mitochondrial Membrane:", BIOCHIM BIOPHYS. ACTA. 256: 199 - 215.
4. BOWYER, J.R. ; and TRUMPOWER, B.L.; (1981), Rapid Reduction of Cytochrome  $c_1$  in the Presence of Antimycin and Its Implication for the Mechanism of Electron Transfer in the Cytochrome b- $c_1$  Segment of the Mitochondrial Respiratory Chain, BIOL. CHEM.
5. BRIQUET M.; PURNELLE B.; FABER A.M.; and GOFFEAU, (1981), "Identification of Three Distinct Spectral Species of Yeast Mitochondrial C Cytochrome b Using a Combination of Respiratory Inhibition, BIOCHIM, BIOPHYS ACTA.
6. BRUNNER, A., (1974) "Obtención y caracterización de Mutantes Mitocibdriales en una Levadura "Petite-Negativa", LOS PERFILES DE LA BIOQUIMICA EN MEXICO, Ed. Mora, U.N.A.M. México, p.p. 91 - 99
7. BRUNORI, M. and WILSON, M.T. (1982), "Cytochrome Oxidase", 7 (8) 295 - 298.

8. CLARK WALKER, G.D.; and LINNANE, A.W., (1967), "The Biogenesis of Mitochondria in Saccharomyces cerevisias", J. CELL. BIOL.
9. CONVENT, B.; and BRIQUET, N., (1978), "Properties of 3-(3,4-Dichlorophenyl)-1, 1-Dimethylurea and Other Inhibitors of the Cytochrome b-c<sub>1</sub> Segment of the Mitochondrial Respiratory Chain in Sacchromyces cerevisias", EUR. J. BIOCHEM. 82: 473- 481.
10. DAWES, IAN W.; and CARTER, BRUCE L.A. (1974), "Nitrosoguanidine Mutagenesis During Nuclear and Mitochondrial Gene Replication", NATURE 250 : 709 - 712.
11. DUPRAW, ERNEST J., (1971) "CELL AN MOLECULAR BIOLOGY", Academic Press Inc., New York, p.p. 53 - 57.
12. DUTTON, P.; ERECINSKA, M.; SATO, N.; MUKAI, Y.; PRING, M.; and WILSON, D.F., (1972), "Reactions of b-Cytochromes with ATP Antimycin A in Pigeon Heart - Mitochondria", BIOCHIM BIOHYS ACTA.
13. EDWARDS, C.A.; BOWYER, J.R.; and TRUMPOWER, B.L., (1982), "Function of the Iron-Sulfur Protein of the Cytochrome b-c<sub>1</sub> Segment in Electron Transfer Reactions of the Mitochondrial Respiratory Chain", J. BIOL. CHEM. 257 : 3705 - 3713.
14. FERRERO, I.; VIOLA, A.M.; and GOFFEAU, A., (1981), "Induction by Glucose of an Antimycin-insesitive, Azide-sensitive Respiration in the Yeast Kluyveromyces lactis", ANTONIE VAN LEEUWENHOEK 47 : 11 - 24.
15. FINCHAM, J.R.S.; DAY, P.R. and RADFORD, A., (1979), "FUNGAL GENETICS", Fourth Edition, Botancial Monographs, Vol. 4, Blackwell Scientific Publications, Oxford London.

16. GILLHAM, NICHOLAS W., (1978), "ORGANELLE HEREDITY", Raven Press, New York.
17. GRIVELL, LESLIE A., (1983), "Mitochondrial DNA", SCIENTIFIC AMERICAN 248 (3) : 60 - 74.
18. HOLLENBERG, C.P.; et al., (1969), "MITOCHONDRIAL DNA, A 25  $\mu$  Closed Circular Duplex DNA Molecule in Wild-Type Yeast Mitochondrial. Structure and Genetic Complexity", BIOCHIM BIOPHYS. ACTA.
19. LEHNINGER, ALBERT L., (1979), "BIOQUIMICA", Segunda edición, Ediciones Omega S.A., Barcelona España, p.p. 487 - 516, 1040 1041.
20. LEMBERG, R.; and BARRETT, J., (1973), "CITOCROMES", Academic Press Inc., New York U.S.A.
21. PACKER, LESTER., (1974), "BIOMEMBRANES. Architecture, Biogenesis, Bioenergetics, and Differentiation", Academic Press, Inc., New York U.S.A. p.p. 1 - 128 -
22. RIESKE, J.S., (1976), "Composition, Structure, and Function of Complex III of the Respiratory Chain", BIOCHIM, BIOPHYS ACTA.
23. ROBERTS, H.; SMITH, S.C.; MARZUKI, S.; and LINNANE, A.W., (1980), "Evidence that Cytochrome b is the Antimycin Binding Component of the Yeast Mitochondrial Cytochrome b-c<sub>1</sub> Complex", ARCH. BIOCHEM, BIOPHYS 200 (2): 387 - 395
24. ROSE, ANTHONY H.; and HARRISON, J.S., (1971), "THE YEASTS", Physiology and Biochemistry of Yeasts, Vol. 2, Academic Press Inc. London.

25. ROTHFIELD, LAWRENCE I., (1971), "STRUCTURE AND FUNCTION OF BIOLOGICAL MEMBRANES, Academic Press Inc., New York U.S.A., p.p. 420 - 425.
26. SAGER, RUTH., (1972), "CYTOPLASMIC GENES AND ORGANELLES", Academic Press Inc., New York U.S.A. p.p. 115 - 116.
27. SLATER, E.C., (1973), "The Mechanism of Action of the Respiratory Inhibitor, Antimycin", BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA.
28. SMITH, JOHN E., (1977), "GENETICS AND PHYSIOLOGY OF Aspergillus", Academic Press Inc., London., p.p. 326 - 329.
29. TEINTZE M.; SLAUGHTER, M.; WEISS, H.; and NEUPERT, W., (1982), "Biogenesis of Mitochondrial Ubiquinol: Cytochrome Reductase (Cytochrome b-c<sub>1</sub>- Complex)", J. BIOL. CHEM.
30. WATSON, JAMES D., (1978), "BIOLOGIA MOLECULAR DEL GEN", Tercera edición, Fondo Educativo Interamericano S.A., Madrid España., p.p. 42, 157, 488- 489, 506 - 507.
31. WEISS, HANNS., (1976), "Subunit Composition and Biogenesis of Mitochondrial Cytochrome b", BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA.

ESTE TRABAJO DE TESIS FUE REALIZADO EN EL DEPARTAMENTO DE  
MICROBIOLOGIA DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES EN FISIOLOGIA  
CELULAR U.N.A.M. , BAJO LA ASESORIA DE LA DRA. AURORA  
BRUNNER L.