

11281



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Instituto de Fisiología Celular**

**Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas**

**“MODULACIÓN POR IONES DE LA APERTURA DEL  
MEGACANAL INESPECÍFICO MITOCONDRIAL DE  
LA LEVADURA”**

**TESIS**

**Para obtener el grado de:  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**Presenta:**

**M. en C. VICTORIANO PÉREZ VÁZQUEZ**

**Asesor:**

**DR. SALVADOR URIBE CARVAJAL**

**México, D. F., Febrero de 2004**



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.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

## DEDICATORIA

A mis hijos Víctor Hugo y Marco Antonio, mi diaria alegría y fuerza para seguir adelante.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Victoriano Pérez  
Vázquez

FECHA: 16 febrero de 2004

FIRMA: 

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Salvador Uribe Carvajal por su asesoría en la realización de este trabajo, por sus consejos, su apoyo y su amistad.

A los miembros de mi comité tutorial: Dr Edmundo Chávez Cossio, Blas Lotina Henssen y Salvador Uribe Carvajal por su asesoría durante todo el tiempo en que se realizó este trabajo.

A la Q.F.B. Norma Silvia Sánchez Sánchez por su amistad y su apoyo técnico durante la realización del presente trabajo.

A los doctores Edmundo Chávez Cossio, José Pedraza Chaverri, Mauricio Díaz Hernández, Antonio Peña Díaz, Alicia Ortega Aguilar y Edgardo Escamilla Marván por la revisión de esta tesis.

A los compañeros de laboratorio: Andrés, José, Ramón, Rodrigo y Vicente por el apoyo brindado durante la realización del presente trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Fisiología Celular por haberme permitido realizar esta tesis.

Esta tesis se realizó gracias a los apoyos parciales de DGAPA-UNAM (IN227202-3), ECOS Nord/ANUIES (MO 1504), CONACyT (27568N) y la beca de CONACyT 153130.

De manera muy especial se agradece a los Doctores Michel Rigoulet del Instituto de Bioquímica y Genética Celular de la Universidad de Bordeaux, Francia y Alfredo Saavedra Molina del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, quienes participaron como co-asesores externos con una constante y atinada asesoría durante los cuatro años de trabajo de la presente tesis.

## INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
LA MITOCONDRIA.....	9
LA CADENA TRANSPORTADORA DE ELECTRONES.....	10
Complejo I.....	10
Complejo II.....	12
Complejo III.....	12
Complejo IV.....	13
Complejo V.....	15
TRANSPORTE DEI CALCIO EN LA MITOCONDRIA.....	16
El uniportador de calcio.....	16
Mecanismos de expulsión de calcio.....	17
EL PORO DE TRANSICIÓN DE LA PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL.....	19
Componentes del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial.....	20
Regulación del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial.....	25
EL MEGACANAL INESPECÍFICO MITOCONDRIAL DE LA LEVADURA.....	30
Permeabilidad inespecifica inducida por la respiración.....	30
Permeabilidad inespecifica inducida por ATP.....	31
Electrofisiología de la membrana interna.....	32
Comparación entre el PTP y el YMUC.....	32

APOPTOSIS EN LA LEVADURA.....	34
Estudios de algunas proteínas de mamífero en levaduras.....	37
EL CANAL DE ANIONES DEPENDIENTE DE VOLTAJE.....	39
LA PROTEÍNA DESACOPLANTE DE LA GRASA CAFÉ.....	42
HIPÓTESIS.....	44
OBJETIVOS.....	44
General.....	44
Específicos.....	44
MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
Materiales y reactivos.....	45
Medios de cultivo.....	45
Aislamiento de mitocondrias de la cepa comercial de <i>S. cerevisiae</i> .....	46
Aislamiento de mitocondrias de las cepas de laboratorio de <i>S. cerevisiae</i> .....	46
Preparación de mitoplastos.....	48
Determinación de proteína.....	48
Consumo de oxígeno.....	48
Potencial transmembranal.....	49
Hinchamiento mitocondrial.....	49
Experimentos de reconstrucción mitocondrial.....	49
RESULTADOS.....	50
LOS CATIONES DIVALENTES Y LAS ALQUILGUANIDINAS CIERRAN EL MEGACANAL INESPECÍFICO MITOCONDRIAL DE LA LEVADURA.....	50
Acoplamiento del consumo de oxígeno por calcio y magnesio .....	50
Estabilización del potencial transmembranal por calcio y magnesio.....	53
Inhibición del hinchamiento mitocondrial por calcio y magnesio.....	55



Acoplamiento del consumo de oxígeno por alquilguanidinas.....	58
Estabilización del potencial transmembranal por alquilguanidinas.....	58
Inhibición del hinchamiento mitocondrial por alquilguanidinas.....	58
La unión de los cationes divalentes al YMUC depende del $\Delta\psi$ .....	62
LOS MITOPLASTOS Y LAS MITOCONDRIAS $\Delta por1$ PIERDEN SU SENSIBILIDAD AL CALCIO.....	64
El calcio no modifica la apertura del megacanal inespecífico en mitoplastos.....	65
El calcio cierra el megacanal inespecífico a través de la porina.....	67
DISCUSIÓN.....	71
CONCLUSIONES.....	77
REFERENCIAS.....	78
ANEXOS.....	99
In <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , cations control the fate of the energy derived from oxidative metabolism through the opening and closing of the yeast mitochondrial unselective channel.....	100

## RESUMEN

La membrana interna mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae* contiene dos canales de alta conductancia que muestran corrientes de 40 y 400 pS. Al menos uno de estos canales aniónicos promueve permeabilidad inespecífica a iones y pequeños solutos, y se ha denominado megacanal inespecífico mitocondrial de la levadura (YMUC). En altas concentraciones de  $K^+$  y en ausencia de  $PO_4^{2-}$ , la adición de ATP, etanol o NADH abate el potencial transmembranal ( $\Delta\Psi$ ) e induce el hinchamiento mitocondrial. En las mitocondrias de mamífero el  $Ca^{2+}$  regula la apertura del PTP mediante su unión a dos sitios diferentes. Para determinar si el YMUC tiene sitios sensibles a cationes, se midieron los efectos de los cationes divalentes  $Ca^{2+}$ , y  $Mg^{2+}$  y de los cationes orgánicos hexilguanidina (HG) y octilguanidina (OG) sobre el consumo de oxígeno, el  $\Delta\Psi$  y el hinchamiento mitocondrial en mitocondrias aisladas de una cepa comercial de *S. cerevisiae*, así como el efecto del  $Ca^{2+}$  en mitocondrias aisladas de la cepa de laboratorio de *S. cerevisiae* B-7553 y B-0610 carente de porina ( $\Delta por1$ ). La presencia de  $PO_4^{2-}$  0.4 mM no cierra el YMUC, aunque sí aumenta la sensibilidad al  $Ca^{2+}$  (la  $I_{50}$  disminuyó de 30 a 0.3 mM) y al  $Mg^{2+}$  (la  $I_{50}$  disminuyó de 3 a 0.83 mM). La  $[Ca^{2+}]$  necesaria para cerrar el YMUC fue mayor que la concentración normalmente observada en la célula. Sin embargo, los efectos del  $Ca^{2+}$ , el  $Mg^{2+}$  y el  $PO_4^{2-}$  fueron aditivos. Ninguno de estos cationes inhibió la re-contracción mitocondrial, lo cual sugiere que su unión es dependiente del  $\Delta\Psi$ . En contraste, la OG ( $I_{50}$  7.5  $\mu M$ ) sí inhibió la re-contracción, probablemente como resultado de la unión de su cola hidrofóbica a la membrana mitocondrial.

En mitoplastos de la cepa industrial de *S. cerevisiae* se perdió la sensibilidad a  $Ca^{2+}$ , indicando que el sitio de unión para este catión se encuentra en la membrana externa, o en el espacio intermembranal. En las mitocondrias aisladas de la cepa  $\Delta por1$  también se perdió la sensibilidad a  $Ca^{2+}$ , mientras que en las mitocondrias de la B-7553 se acopló la mitocondria y se inhibió la caída del  $\Delta\Psi$  con la misma  $[Ca^{2+}]$  que en las mitocondrias aisladas de la cepa industrial. Por ello proponemos que la porina es el sitio de interacción del  $Ca^{2+}$  con el YMUC.

## ABSTRACT

In the internal mitochondrial membrane of *S. cerevisiae*, there are two high conductance channels exhibiting currents of 40 and 400 pS respectively. At least one of these mildly anionic channels constitutes a source of unspecific permeation to ions and small solutes and corresponds to the yeast mitochondrial unspecific channel (YMUC). In the presence of high  $[K^+]$  and in the absence of  $PO_4^{2-}$ , the addition of ATP, ethanol or NADH opens the YMUC leading to mitochondrial swelling and transmembrane potential ( $\Delta\Psi$ ) depletion. In mammalian mitochondria  $Ca^{2+}$  regulates the opening of the permeability transition pore through its binding to two different sites. In order to characterize cation sensitive sites in the YMUC, the effects of the divalent cations  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  and of the organic cations hexylguanidine (HG) and octylguanidine (OG) were measured. The parameters tested were oxygen uptake,  $\Delta\Psi$  and mitochondrial swelling. In addition, the effect of  $Ca^{2+}$  in mitochondria isolated from the laboratory *S. cerevisiae* strains B-7553 (the wild type) and B-10610 (a mutant lacking the *Por1* gene) was tested. Addition of 0.4 mM  $PO_4^{2-}$  does not close the YMUC, although it increases the sensitivity to  $Ca^{2+}$  ( $I_{50}$  decreased from 30 to 0.3 mM) and  $Mg^{2+}$  ( $I_{50}$  decreased from 3 to 0.83 mM). The effects of  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  and  $PO_4^{2-}$  were additive.  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  did not inhibit the contraction of preswollen mitochondria, suggesting that its binding is  $\Delta\Psi$  dependent. In contrast, OG ( $I_{50}$  7.5  $\mu$ M) did inhibit mitochondrial re-contraction, probably as a result of membrane binding through its hydrophobic tail. In mitoplasts  $Ca^{2+}$  sensitivity was lost, indicating that the binding site for this cation is in the external membrane or in the intermembranal space. Mitochondria from the  $\Delta por1$  mutant B-10610 did not respond to  $Ca^{2+}$  suggesting that porin may be the  $Ca^{2+}$  interaction site within the YMUC.

## INTRODUCCION

### LA MITOCONDRIA

La mitocondria es el orgánulo en el que se lleva a cabo una amplia variedad de actividades, incluyendo la producción de ATP, la oxidación de los ácidos grasos, la homeostasis de calcio, el inicio de la apoptosis y la generación de especies reactivas derivadas de oxígeno, entre otras. Se han usado enfoques tanto genómicos como proteómicos para catalogar a los miles de proteínas localizadas dentro de las mitocondrias [Fountoulakis y cols., 2002]. Además, la estructura y dinámica de las mitocondrias se ha evaluado en relación con sus diversas funciones [Collins y cols., 2002]. Estructuralmente, la mitocondria se compone de diferentes compartimentos: La membrana externa envuelve al orgánulo, mientras que la membrana interna separa la matriz (con una concentración proteica extremadamente alta) del espacio intermembranal [Saraste, 1999]. La membrana interna está compuesta de un sistema de dobles membranas llamadas crestas. Estas crestas se pierden durante el desplegamiento de la membrana interna, aunque los estudios de tomografía electrónica de la membrana interna han revelado que las crestas y la membrana interna limitante son distintas estructuralmente [Frey y Mannella, 2002]. Así, el sistema de membrana interna ahora se describe como dos membranas contiguas pero distintas: la membrana interna limitante, la cual se opone a la membrana externa, y las membranas de las crestas, las cuales se extienden hacia el interior mitocondrial como túbulos o lamelas. Las membranas crestales y las membranas limitantes se unen en un número limitado de sitios discretos llamados sitios crestales, que tienen un diámetro de aproximadamente 30 nm pero pueden alterarse al cambiar el volumen de la matriz y la actividad respiratoria [Frey y Mannella, 2002]. Tradicionalmente se usan subfracciones de mitocondrias aisladas para localizar proteínas dentro del organelo, pero estos métodos no han separado claramente la membrana interna limitante de la membrana crestal [Sato y cols., 2003]. Sin embargo, recientemente se demostró que los complejos de la fosforilación

oxidativa III (ubiquinona citocromo c oxido reductasa) y V (ATP sintetasa) están localizados predominantemente en las membranas crestales [Robert y cols., 2003].

En las células animales, la mitocondria es responsable de la mayor parte de las transformaciones de energía a través de la fosforilación oxidativa, que es un proceso en el cual los electrones pasan a través de una serie de moléculas que en conjunto constituyen la cadena transportadoras de electrones. Estos electrones son donados por el NADH o el FADH<sub>2</sub>, que se reducen al oxidar a los sustratos en el ciclo de los ácidos tricarbónicos, a los sustratos de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos y lanzadero de glicerofosfato. Los electrones son finalmente transferidos al oxígeno. La cadena transportadora de electrones consta de 4 complejos de enzimas respiratorias que tienen una orientación específica en la membrana interna mitocondrial, y de dos acarreadores móviles, uno no proteico, la ubiquinona y otro proteico, el citocromo c. El paso de los electrones entre estos complejos implica un cambio de energía almacenada en forma de un gradiente de protones a través de la membrana, y se usa por la ATP sintetasa para fabricar ATP a partir de ADP y fosfato (Fig. 1).

## LA CADENA TRANSPORTADORA DE ELECTRONES

Son tres los complejos intrínsecos de la membrana interna mitocondrial o de las membranas bacterianas que conservan la energía en la cadena respiratoria mediante el transporte activo de protones generando un gradiente electroquímico transmembranal (Fig. 1).

### Complejo I

El Complejo I, o NADH: ubiquinona oxidorreductasa, es el más grande de los complejos. La enzima de mamífero contiene 42 o 43 subunidades diferentes en una estequiometría desconocida, un flavín mononucleótido, 7 u 8 centros hierro-azufre (FeS) unidos covalentemente con lípidos, y al menos 3 moléculas de quinol [Brandt, 1997]. El Complejo I monomérico es de cerca de 900 kilodaltones (kD) y comparable en tamaño a los componentes proteicos del ribosoma. Mediante microscopía electrónica se ha encontrado que el complejo I tiene forma de L con dos dominios

principales unidos por un collar delgado [Guenebaut y cols., 1998]. Se ha intentado hacer un modelo del acoplamiento entre la translocación de protones y la transferencia de electrones en el Complejo I sobre bases cinéticas, espectroscópicas, y datos de inhibidores [Guenebaut y cols., 1998]; sin embargo, se requiere de mayor información estructural para conocer este fenómeno, y la estructura cristalográfica no se ha determinado.

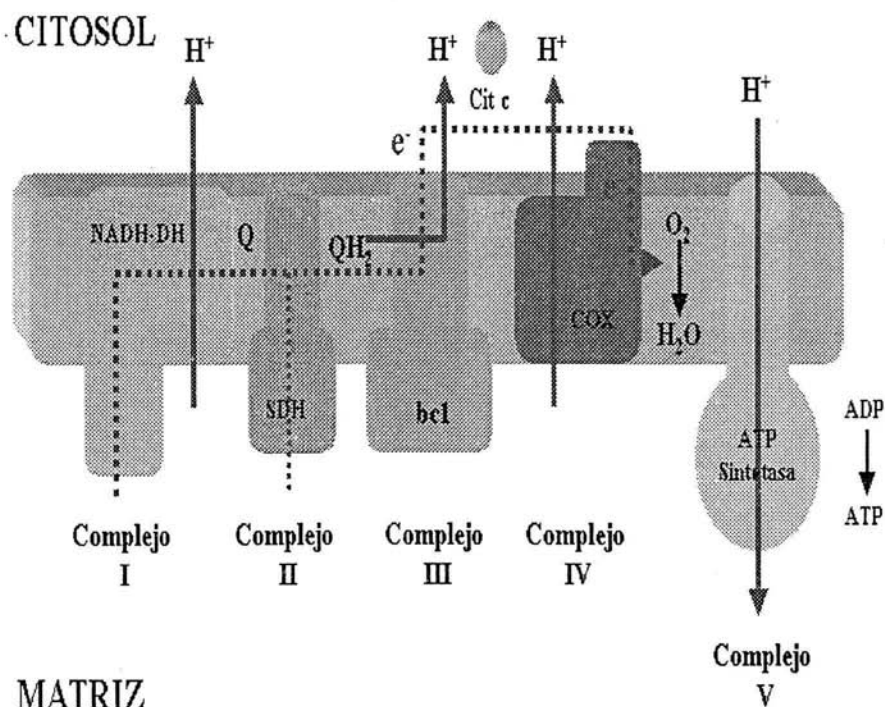


Fig. 1. Enzimas de la membrana interna mitocondrial involucradas en la fosforilación oxidativa. La NADH deshidrogenasa (NADH-DH), la succinato deshidrogenasa (SDH), el citocromo *bc*<sub>1</sub> y la citocromo oxidasa (COX) forman la cadena transportadora de electrones hasta el O<sub>2</sub>. Con excepción de la SDH, estas enzimas translocan protones a través de la membrana. El gradiente de protones es usado por la ATPasa para sintetizar ATP. Línea continua, Bombeo de protones. Línea discontinua, vía de flujo de electrones. Los acarreadores móviles son QH<sub>2</sub> (Ubiquinona) y el citocromo c (cit c).

*S. cerevisiae* no tiene complejo I, las mitocondrias de esta levadura tienen una NADH-ubiquinona óxido-reductasa insensible a rotenona, orientada hacia la matriz mitocondrial. Esta proteína de 57 kDa se ha purificado y es codificada por el gen ND11 (de Vries y Grivell, 1988). Además, tiene la capacidad de oxidar NADH citosólico por medio de dos NADH deshidrogenasas localizadas en el espacio intermembranal y codificadas por los genes NDE1 y NDE2, importantes porque regulan la fosforilación oxidativa a nivel del flujo de electrones, aún cuando no sean bombas de protones. Estas NADH deshidrogenasas están asociadas en un complejo supramolecular junto con la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, dos lactato deshidrogenasas (Dld1p y Cyb2p), dos flavoproteínas, cuatro enzimas del ciclo de Krebs y la acetaldéhidó deshidrogenasa [Grandier-Vazeille y cols., 2001].

### **Complejo II**

El complejo II, o succinato:ubiquinona reductasa, es un componente del ciclo de Krebs, y participa en la cadena, transfiriendo electrones del succinato a la poza de ubiquinonas. Este contiene una flavoproteína de 70 kD, varios centros FeS y el o los citocromos b. El Complejo II no transloca protones, sólo alimenta de electrones a la cadena transportadora de electrones [Hagerhall, 1997].

### **El complejo III**

El complejo III, o citocromo bc<sub>1</sub>, cataliza la transferencia de electrones del ubiquinol al citocromo c al acoplar la reacción redox con la generación de un gradiente de protones a través de la membrana por un mecanismo conocido como ciclo Q. La química redox de un quinol se acopla a la protonación y deprotonación, por lo que estas dos reacciones son organizadas topológicamente de manera que se transportan activamente iones hidrógeno a través de la membrana. Esto requiere dos sitios activos, uno para la oxidación de ubiquinol y la liberación de protones hacia la superficie externa de la membrana (Q<sub>o</sub>), y uno para la reducción de la ubiquinona acoplada a la captación de protones del lado interno de la membrana (Q<sub>i</sub>). Este mecanismo requiere que los electrones sean transferidos del sitio Q<sub>o</sub> al sitio Q<sub>i</sub>. El complejo III de mamífero contiene 11 subunidades, pero sólo tres de ellas

contienen centros redox y sólo estos tres tienen homólogos en toda la escala filogenética. Las subunidades redox son el citocromo *b*, que tiene 8 hélices transmembranales con 2 hemo entre las hélices B y D; una proteína FeS (ISP) anclada a la membrana, que contiene un centro tipo Rieske (2Fe -2S); y un citocromo *c*<sub>1</sub> anclado a la membrana. Las otras 8 subunidades rodean el núcleo metaloproteico [Braun y Schmitz, 1995].

La existencia de dos sitios activos en el complejo III es una característica esencial del mecanismo del ciclo Q, que originalmente se propuso porque diferentes inhibidores se unen a diferentes sitios, e inhiben diferentes pasos del ciclo de reacción. La presencia de los dos sitios activos se confirmó mediante la estructura del cristal. El sitio Q<sub>o</sub> oxida al ubiquinol y se localiza entre ISP y el citocromo *b*, cercano al lado citoplásmico de la membrana interna mitocondrial, y el sitio Q<sub>i</sub> está en el citocromo *b* en el lado de la matriz [Iwata y cols., 1998]. Ambos sitios se comunican con las fases acuosas a través de canales. Los dos hemo del citocromo *b* tienen diferentes potenciales redox. El sitio Q<sub>o</sub> está cerca del hemo *b*<sub>L</sub> (de bajo potencial), y el sitio Q<sub>i</sub> está cercano al hemo *b*<sub>H</sub> (de alto potencial). Un quinol dona 2 electrones que son separados dentro del complejo citocromo bc<sub>1</sub>, de manera que el primer electrón se transfiere al centro Rieske FeS y, de éste al citocromo *c*<sub>1</sub> localizado a 31 Å de distancia [Xia y cols., 1997], y al final al citocromo *c* soluble. El segundo electrón se transfiere al sitio Q<sub>i</sub> vía los hemo *b*<sub>L</sub> y *b*<sub>H</sub> de la subunidad del citocromo *b*. Los hemo *b*<sub>L</sub> y *b*<sub>H</sub> se encuentran localizados a 21 Å de distancia uno del otro y el hemo *b*<sub>H</sub> se encuentra a 27 Å de la FeS proteína [Xia y cols., 1997]. La transferencia de este electrón es un paso electrogénico (crea parte de la fuerza protón-motriz) inducido por la diferencia de potencial redox de los dos hemo. Dos electrones se transfieren al sitio Q<sub>i</sub> después de la oxidación de dos quinoles en el sitio Q<sub>o</sub>, para reducir una quinona. Este mecanismo induce la translocación neta de dos protones por cada electrón transferido al citocromo *c* [Smith, 1998].

#### Complejo IV

La enzima terminal de la cadena respiratoria, el complejo IV o citocromo oxidasa que acopla la oxidación del citocromo *c* a la reducción del oxígeno para



formar agua, genera también un gradiente de protones. Su sustrato es el citocromo c reducido, que es una hemoproteína soluble en agua y dona electrones sobre el lado citoplásmico de la membrana interna mitocondrial. Estos electrones se transfieren al sitio activo, que contiene un hemo Fe-Cu, y los utiliza para reducir al O<sub>2</sub>, formando dos moléculas de agua. Los protones necesarios para esta reacción se toman de la matriz mitocondrial a través de dos canales. Estos mismos canales sirven para bombear un protón (por electrón) a través de la membrana. La estructura cristalográfica de la citocromo oxidasa de bovino reveló que el monómero contiene 13 subunidades [Yoshikawa y cols., 1998]. Las tres subunidades principales son codificadas por el genoma mitocondrial y forman el centro funcional de la enzima; este centro está rodeado por 10 pequeñas subunidades codificadas en el núcleo. La actividad catalítica se encuentra en la subunidad I, pero, aún con la estructura cristalográfica, no se conoce el mecanismo catalítico. La subunidad II tiene un centro dinuclear de Cu (Cu A) [Lappalainen y cols., 1993], que es el primer sitio receptor de electrones provenientes del citocromo c. Estos electrones se transfieren a un hemo (citocromo a) de la subunidad I, y después al sitio activo del citocromo bimetálico a<sub>3</sub>/Cu B [Yoshikawa y cols., 1998]. La citocromo oxidasa tanto en su forma oxidada como reducida o unida al ligando parece ser estática, aunque se puede esperar que la reducción movilice aminoácidos que participan en el bombeo de protones [Yoshikawa y cols., 1998]. Dos canales hidrofóbicos conectan el sitio activo con la fase acuosa de la matriz mitocondrial. Estos canales son llamados K y D por tener conservados una lisina y un aspartato, respectivamente [Wikstrom, 1998]. Durante la reducción del oxígeno, los dos protones consumidos en esta reacción entran a través de los canales D y K. Los protones translocados tienen que pasar a través de una barrera hidrofóbica dentro de la enzima para entrar a la fase acuosa citoplásmica. El oxígeno es reducido en un ciclo que incluye varios intermediarios. El primero y mejor establecido empieza con la enzima oxidada (O) hacia una especie (R) en la cual los dos metales del sitio activo se encuentran reducidos después de aceptar dos electrones. El oxígeno se une a R, lo cual induce la formación de un intermediario peroxidado (P). La aceptación del tercer electrón resulta en la formación de agua y un intermediario ferrilo (F), y finalmente los 4 electrones fuerzan

al sistema a regresar al estado O con la liberación de la molécula de agua [Babcock y Wikstrom, 1992]. La correlación de la ocupación de los últimos dos estados con los potenciales de membrana y de fosforilación llevaron a proponer que sólo los últimos dos pasos del ciclo O -R -P -F -O están involucrados en el bombeo de protones, y que ambos pasos parecen bombear 2 protones para generar una estequiometría de  $4H^+/4e^-$  [Babcock y Wikstrom, 1992].

### Complejo V

La ATP-sintetasa mitocondrial ( $F_1 F_0$  ATPasa) es una enzima funcionalmente reversible (puede sintetizar ATP usando una fuerza protón-motriz a través de la membrana, o puede hidrolizar ATP para bombear protones contra un gradiente electroquímico). La estructura cristalográfica de la enzima de bovino revela que la ATP sintetasa está formada por 16 proteínas diferentes [Lutter y cols., 1993] y es mayor de 500 kD. Un sector membranal ( $F_0$ ) contiene el canal de protones, unido al componente catalítico ( $F_1$ ), localizado en el lado interno de la membrana interna mitocondrial, sostenido por dos estructuras paralelas [Bottcher y cols., 1998] referidas como "rotor" y "estator" [Elston y cols., 1998]. La parte soluble ( $F_1$ ) contiene cinco subunidades diferentes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  en una estequiometría 3:3:1:1:1. Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  son homólogas; ambas unen nucleótidos pero sólo  $\beta$  tiene actividad catalítica. Así, hay tres sitios activos dentro del componente catalítico [Boyer, 1997], cada sitio puede pasar a través de un ciclo de tres diferentes estados (abierto, laxo y tenso), correspondientes a un estado vacío, un estado con ADP y fosfato unidos, y un estado con el ATP fuertemente unido. En cualquier momento, cada uno de los tres sitios está en un estado diferente a los otros dos. La energía se requiere para la unión y liberación del ATP [Boyer, 1997]. Los sitios de contacto entre la subunidad central  $\gamma$  y las subunidades  $\beta$  son factores críticos en el modelo de catálisis rotacional.

## EL TRANSPORTE DEL CALCIO EN LA MITOCONDRIA

El transporte del  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria fue descubierto a principio de los 60s [DeLuca y Engstrom, 1961]. Este se observó como una captación activa seguida de una liberación pasiva [Chance, 1965]. El reconocimiento de la existencia de un potencial de membrana a través de la membrana interna llevó a la interpretación de que la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana interna disminuye la carga energética mientras que su liberación la aumenta [Brand y Murphy, 1987]. Bajo condiciones típicas de la célula, el potencial de membrana ( $\Delta\psi$ ) puede ser de 60 mV, la  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  de 200 nM, la  $[\text{Ca}^{2+}]_e$  de 100 nM y el gradiente de pH ( $\Delta\text{pH}$ ) de 0.5 unidades [Gunter y Pfeiffer, 1990].

Existe evidencia de tres diferentes mecanismos de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  que funcionan en la membrana interna de las mitocondrias de vertebrados. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por un uniportador, y la salida, mediada por un sistema dependiente de  $\text{Na}^+$  y un sistema independiente de  $\text{Na}^+$ . Adicionalmente, la membrana interna mitocondrial contiene un poro de permeabilidad inespecífica activado por el  $\text{Ca}^{2+}$ , que está cerrado en las mitocondrias fuertemente acopladas (Gunter y Gunter, 1994).

### El uniportador de calcio

Un uniportador es una molécula que facilita la difusión transmembranal de un ion, disminuyendo su gradiente electroquímico sin acoplarse directamente al movimiento de otro ion o molécula. El uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial es el responsable de la rápida captación del  $\text{Ca}^{2+}$  externo hacia la matriz mitocondrial y de forma similar capta  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  y lantánidos, en ese orden de selectividad [Akerman, 1977]. La captación de  $\text{Mg}^{2+}$  es mucho menor que la del  $\text{Ca}^{2+}$ , y no parece ser mediada a través del uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$  [Jung y Brierley, 1994].

La demostración de que el mecanismo de captación de  $\text{Ca}^{2+}$  es a través de un uniportador ocurrió por pasos. Primero, se observó que la principal fuente de energía para la captación del  $\text{Ca}^{2+}$  es el potencial de membrana. Segundo, se demostró que

la captación del  $\text{Ca}^{2+}$  no se acopla al transporte de ninguna otra especie. Finalmente, la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  disminuye el gradiente electroquímico de  $\text{Ca}^{2+}$  [Gunter y Gunter, 1994].

Muchos iones inhiben o activan el uniportador. El  $\text{Sr}^{2+}$  [Carafoli, 1987],  $\text{Mn}^{2+}$  [Baker y Schlaepfer, 1978],  $\text{Ba}^{2+}$  [Akerman, 1977],  $\text{Fe}^{2+}$  [Romslo y Flatmark, 1973] y los lantánidos [Reed y Bygrave, 1974] actúan como inhibidores competitivos. El  $\text{Mg}^{2+}$ , el  $\text{H}^+$  y las poliaminas no son transportadas por el uniportador, pero su unión al uniportador o cerca de él activa o inhibe el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  [Gunter y gunter, 1994]. Los policationes como Ru360 [Ying y cols., 1991] o rojo de rutenio [Tashmukhamedov y cols., 1972] se encuentran entre los más fuertes inhibidores del uniportador.

Todos los reportes de la presencia del uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$  se han hecho en mitocondrias de vertebrados, mientras que en la levadura no se ha detectado su existencia [Balcavage y cols., 1973; Uribe y cols., 1992].

### **Mecanismos de expulsión del calcio**

En las mitocondrias de los vertebrados se han identificado dos mecanismos de expulsión del  $\text{Ca}^{2+}$ , el dependiente de  $\text{Na}^+$  [Crompton y cols., 1976] y el independiente de  $\text{Na}^+$  [Puskin y cols., 1976]. El primero, es el mecanismo de expulsión de  $\text{Ca}^{2+}$ , predominante en mitocondrias de corazón, cerebro, músculo esquelético, glándula parótida, corteza adrenal y grasa café [Crompton y cols., 1978], mientras que el mecanismo independiente de  $\text{Na}^+$  es considerado dominante en las mitocondrias de hígado, riñón, pulmón y músculo liso [Crompton y cols., 1978; Puskin y cols., 1976].

El mecanismo de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  independiente de  $\text{Na}^+$  transporta  $\text{Sr}^{2+}$  [Gunter y cols., 1988],  $\text{Ba}^{2+}$  [Lukács y Fonyó, 1985], y  $\text{Mn}^{2+}$  [Gavin y cols., 1990, 1991]. Es inhibido por  $\text{Sr}^{2+}$  [Gunter y cols., 1988],  $\text{Mn}^{2+}$  [Gavin y cols., 1990, 1991], bajas concentraciones de los desacoplantes clásicos como FCCP, CCCP y DNP [Bernardi y Azzone, 1982], por altas concentraciones de cationes lipofílicos como el tetrafenilfosfonio (TPP) [Gunter y cols., 1988] y trifenilmetilfosfonio (TPMP)

[Wingrove y Gunter, 1986b], por el  $\text{CN}^-$  [Gunter y Pfeiffer, 1990] y por altas concentraciones de rojo de rutenio [Wingrove y Gunter, 1986b].

Cinéticamente, el mecanismo de expulsión independiente de  $\text{Na}^+$  es de segundo orden, y no es esencial como transportador [Gavin y cols., 1990], tiene una  $V_{\text{max}} = 1.2 \pm 0.1 \text{ nmol Ca}^{2+}/\text{mg}\cdot\text{min}$  y una  $K_m = 8.4 \pm 0.6 \text{ nmol Ca}^{2+}/\text{mg}$  [Wingrove y Gunter, 1986a]. Finalmente, todos los reportes sugieren que el mecanismo de expulsión del  $\text{Ca}^{2+}$  independiente de  $\text{Na}^+$  es un intercambiador  $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ , impulsado por el gradiente de protones generado por la cadena respiratoria [Gunter y cols., 1991].

En el mecanismo de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de  $\text{Na}^+$ , se transporta  $\text{Sr}^{2+}$  pero no  $\text{Mn}^{2+}$ , como sustituto del  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que el  $\text{Li}^+$  puede sustituir al  $\text{Na}^+$  [Gavin y cols., 1990, 1991]. En el corazón, esta vía de transporte se inhibe por  $\text{Ca}^{2+}$  externo [Hayat y Crompton, 1987] y se activa en presencia de  $\text{Na}^+$  [Crompton y cols., 1980]. El  $\text{Ba}^{2+}$  inhibe esta vía en el lado externo en mitocondrias de corazón [Lukács y Fonyó, 1986], pero en las mitocondrias de hígado esto ocurre en el lado interno [Lukács y Fonyó, 1985]. El mecanismo de expulsión de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de  $\text{Na}^+$  es sensible a una amplia variedad de inhibidores incluyendo el  $\text{Mg}^{2+}$  [Wingrove y Gunter, 1986b],  $\text{Mn}^{2+}$  [Gavin y cols., 1990, 1991],  $\text{Ca}^{2+}$  externo [Hayat y Crompton, 1987], diltiazem [Chiesi y cols., 1987], verapamil [Wolkowicz y cols., 1983], clonazepam [Chiesi y cols., 1987], tetrafenilfosfonio [Wingrove y Gunter, 1986b], trifenilmeltifosfonio [Wingrove y Gunter, 1986b] y altas concentraciones de rojo de rutenio [Wingrove y Gunter, 1986b]. Este mecanismo es estimulado en mitocondrias de cerebro por el etanol [Rottenberg y Marbach, 1991]. Tanto en mitocondrias de corazón [Crompton y cols., 1977] como de hígado [Wingrove y Gunter, 1986b] se ha descrito que el intercambio es de segundo orden para  $\text{Na}^+$  y de primer orden para  $\text{Ca}^{2+}$ . En hígado, este sistema de transporte tiene una  $V_{\text{max}} = 2.6 \pm 0.5 \text{ nmol Ca}^{2+}/(\text{mg}\cdot\text{min})$  [Wingrove y Gunter, 1986b] y es mucho más rápido en mitocondrias de corazón y cerebro, cuyos valores son de  $18 \text{ nmol Ca}^{2+}/(\text{mg}\cdot\text{min})$  para las mitocondrias de corazón, y  $30 \text{ nmol Ca}^{2+}/(\text{mg}\cdot\text{min})$  para las mitocondrias de cerebro [Crompton y cols., 1978].

## EL PORO DE TRANSICIÓN DE LA PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL

Una vez descrita la participación de la transición de la permeabilidad mitocondrial (TPM) en la apoptosis, se demostró que ésta es suficiente para inducir la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN inter-nucleosomal [Kroemer y cols., 1995], y que ambos procesos son inhibidos por ciclosporina A (ScA). Por otro lado, se demostró que el citocromo *c* liberado del espacio intermembranal de la mitocondria, durante la TPM, es un potente inductor de la apoptosis [Liu y cols., 1996]. Sin embargo, posteriormente se concluyó que el citocromo *c* es el inductor del programa de muerte celular por apoptosis, y no necesariamente la transición de la permeabilidad [Yang y cols., 1997]. De cualquier manera, la TPM conduce a un aumento del volumen mitocondrial, la ruptura de la membrana externa y la liberación del citocromo *c* [Priault y cols., 1999].

Una característica importante del poro de transición de la permeabilidad (PTP) es que en condiciones fisiológicas fluctúa entre el estado abierto y el estado cerrado [Al-Nasser y Crompton, 1986a; Al-Nasser y Crompton, 1986b;], esta característica aumentó el interés por conocer la verdadera función del PTP, ya que si participa en la muerte por apoptosis, no tiene sentido que se exprese durante toda la vida de una célula bajo condiciones fisiológicas. Es así que se desconoce la función del PTP, aunque se ha postulado como regulador de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  [LeFurgey, y cols., 1988], como un conducto para importar polipéptidos sintetizados en el citoplasma [Zoratti y Szabo, 1995], como regulador térmico [Lohret y Kinally, 1995] y como inductor de la apoptosis [Zha y cols., 1996]. De estas tres posibles funciones para el PTP, ninguna ha terminado por convencer a los investigadores en esta área.

El primer desencadenante de la TPM es, sin lugar a dudas, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la matriz mitocondrial, pero la concentración requerida depende de las condiciones [Gunter y Pfeiffer, 1990; Bernardi, 1999]. Varios factores aumentan la sensibilidad del PTP al  $\text{Ca}^{2+}$ , de los cuales los más potentes y relevantes son el estrés oxidativo, la depleción de nucleótidos de adenina, el aumento en la concentración de fosfato inorgánico y la despolarización mitocondrial. Bajo condiciones energizadas, también es sensible a los cambios conformacionales del translocador de nucleótidos de adenina inducidos por su ligando y por

carboxiatractilósido (CAT) e inhibido por ácido bongkrékico. La disminución del pH (< 7) inhibe la transición de la permeabilidad probablemente porque los protones compiten con el  $\text{Ca}^{2+}$  por su unión al sitio desencadenante [Haworth y Hunter, 1979; Halestrap, 1991]. La especificidad de este sitio para el  $\text{Ca}^{2+}$  parece ser absoluta, y otros cationes divalentes tales como  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  actúan como inhibidores [Bernardi y cols., 1993]. Adicionalmente a este sitio de unión para  $\text{Ca}^{2+}$  localizado sobre la membrana interna, hay otro sitio de unión inhibitorio localizado sobre la superficie externa de la membrana interna con una constante de inhibición para  $\text{Mg}^{2+}$  de 0.3 mM [Bernardi y cols., 1993]. Más recientemente se demostró que la octilguanidina y la octilamina inhiben la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en mitocondrias previamente cargadas, y que los análogos de las ubiquinonas actúan como activadores o inhibidores de la TPM [Chávez y cols., 2000; Walter y cols., 2000].

Una característica bien documentada de la TPM es que para cualquier mitocondria individual se presenta un fenómeno del todo o nada, es decir, las mitocondrias son normales o hinchadas totalmente, sin estados intermedios [Bernardi, 1999]. Sin embargo, dentro de una población, cada mitocondria posee diferente sensibilidad a los inductores del PTP; así, la magnitud de la dispersión de la luz observada en una suspensión mitocondrial refleja el número de mitocondrias de la población que presenta la transición de la permeabilidad, más que un aumento concertado y uniforme en el volumen de todas la mitocondrias en suspensión [Bernardi, 1999].

### **Componentes del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial**

**A. Translocador de nucleótidos de adenina.** La participación del translocador de nucleótidos de adenina (ANT) en el PTP fue propuesta en 1979 [Hawort y Hunter, 1979] y con evidencia más contundente en 1988 [LeQuoc y LeQuoc, 1988]. El ANT es responsable de la salida de ATP en intercambio por ADP. Este es un acarreador que fluctúa entre dos estados conformacionales en los cuales el sitio de unión al sustrato se transloca del lado citoplásmico de la membrana interna (estado c) al lado de la matriz (estado m). La propuesta de la participación del ANT se originó hace ya más de una década con el hallazgo de que la apertura del PTP es susceptible a los

ligandos del ANT [Hawort y Hunter, 1979]. Los ligandos que se unen en el estado c (atractilósido y fosfato de piridoxal) activan la apertura del PTP, mientras los que se unen en el estado m, la inhiben [Halestrap y cols., 1997].

El ADP de la matriz es un modulador importante de la apertura del PTP que parece estar asociado al ANT. El ADP actúa disminuyendo la sensibilidad del sitio de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  desencadenante de la apertura del PTP [Hawort y Hunter, 2000]. Hay dos sitios de unión al ADP con constantes de inhibición de cerca de 1 y 25  $\mu\text{M}$  respectivamente [Halestrap y cols., 1997]. El sitio de alta afinidad es bloqueado por carboxiatractilósido y parece estar asociado con el ANT [Halestrap y cols., 1997; Hawort y Hunter, 2000]. La identidad del segundo sitio es menos clara pero puede ser un sitio de unión externo para nucleótidos de adenina del ANT. Halestrap y Davidson [1990] han sugerido que el potencial de membrana es percibido por el ANT a través de la unión de nucleótidos de adenina, lo cual es posible porque el ANT cataliza un intercambio electrogénico de  $\text{ATP}^{4-}$  por  $\text{ADP}^{3-}$ , con un mecanismo que puede involucrar un potencial eléctrico que induce un cambio conformacional, alterando la afinidad del ANT por los nucleótidos de adenina sobre cualquier lado de la membrana [Halestrap y Davidson, 1990].

**B. Ciclofilina D.** El descubrimiento de que la apertura del PTP puede inhibirse específicamente por concentraciones nanomolares del endecapéptido inmunosupresor CsA [Crompton y cols., 1988] condujo a estudiar el posible mecanismo, y se ha encontrado que el efecto inmunosupresor involucra su unión a una proteína citosólica llamada ciclofilina A (CyP A) [Galat, 1993]. La CyP A tiene una actividad de peptidil-prolil-cis-trans isomerasa (PPIasa), y cataliza la transformación entre conformaciones de los péptidos adyacentes a los residuos de prolina [Galat, 1993]. Por lo tanto, estas proteínas son adecuadas para generar el cambio conformacional en una proteína de membrana que forma un poro. Halestrap y Davidson [1990] demostraron que la matriz mitocondrial contiene una PPIasa sensible a CsA y que los valores de la constante de inhibición de varios análogos de ella correlacionan con su potencia como inhibidores de la apertura del PTP. Con los hallazgos anteriores se apoyó la propuesta de que el PTP está formado por una interacción del translocador de nucleótidos de adenina con la ciclofilina mitocondrial.



La PPIasa mitocondrial sensible a CsA se purificó, se clonó y se secuenció, y así se confirmó que en mitocondria hay sólo una ciclofilina, la equivalente al producto del gene CyP-3 distinto de la CyP A citosólica [Connern y Halestrap, 1992; Woodfield y cols., 1997]. Ahora conocida como ciclofilina D (CyP-D), esta proteína codificada en el núcleo tiene una presecuencia señal que se hidroliza después de su translocación hacia la matriz [Connern y Halestrap, 1992]. Además, se demostró que la CyP-D está presente en el músculo, corazón, hígado y riñón de rata y tiene el mismo peso molecular en todos estos tejidos [Johnson y cols., 1999].

Para que una proteína soluble tal como la CyP-D pueda ser importante en la apertura del PTP, debe interactuar con otra proteína de membrana e inducir un cambio conformacional desencadenado por  $Ca^{2+}$ . Así, se puede considerar que los factores que facilitan la apertura del PTP, tal como el estrés oxidativo, pueden activar la unión de la CyP-D a su proteína de membrana. Para esto, se demostró que el estrés oxidativo inducido por t-butil hidroperóxido (TBH) o el tratamiento con diamida aumenta la unión de la CyP-D a la membrana interna mitocondrial en paralelo con el aumento de la sensibilidad al  $Ca^{2+}$  del poro [Connern y Halestrap 1994; 1996].

Aunque parece estar bien establecido que la CsA bloquea la apertura del poro mediante su unión a la CyP-D, hay datos que muestran que a muy altas concentraciones de  $Ca^{2+}$  en la matriz, puede no requerirse la unión de la CyP-D para la apertura del PTP. Así, Novgorodov y cols [1992] y Crompton y Andreeva [1994], usando diferentes técnicas, mostraron que a altas concentraciones de  $Ca^{2+}$  en la matriz no se inhibe la apertura del PTP con CsA. Pero, bajo las mismas condiciones, la CsA es capaz de impedir totalmente la unión de la CyP-D a la membrana interna mitocondrial [Connern y Halestrap, 1994; Halestrap y cols., 1997].

**C. Canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC).** La CyP-D es una proteína hidrosoluble. Sin embargo, se pueden recuperar cantidades significativas de CyP-D marcada en la fracción membranal [Andreeva y cols., 1995], sugiriendo que se une fuertemente a un componente intramembranal. Se puede llegar a la misma conclusión partiendo de que la CsA bloquea el PTP en la membrana interna mitocondrial [Szabo y Zoratti, 1991]. El componente de la membrana se identificó

usando una matriz con afinidad por glutatión S-transferasa (GST)  $\pm$  CyP-D. En presencia del detergente CHAPS, los extractos de membranas mitocondriales de corazón unieron tanto al ANT, como al canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC por sus siglas en inglés) en cantidades iguales [Crompton y cols., 1998]. No se detectó ninguna otra proteína de unión a CyP-D, ni en la fracción membranal, ni en la fracción soluble. La cantidad del ANT en las mitocondrias de corazón es cerca de 10 veces el VDAC, por lo que la recuperación 1:1 del complejo VDAC-ANT pudiera indicar que la CyP-D se une selectivamente al complejo más que al ANT libre [Crompton, 1998]. Cuando el complejo VDAC-ANT-CyP-D purificado se incorpora en liposomas, la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  y Pi desencadena la apertura de un poro que es bloqueado por CsA [Crompton y cols., 1998]. Tanto el  $\text{Ca}^{2+}$  como el Pi fueron necesarios en concentraciones parecidas a las que abren el PTP en mitocondrias intactas [Crompton y Costi, 1988; Al-Nasser y Crompton, 1986b]. De todos estos experimentos se ha concluido que el complejo VDAC-ANT-CyP-D puede ser al menos parte del PTP.

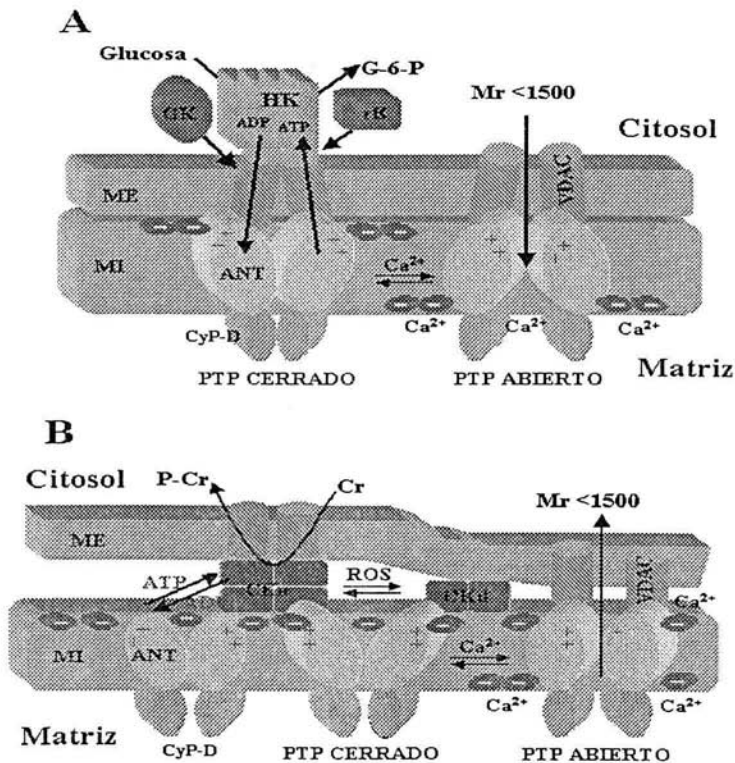
**D. Otros posibles componentes del poro.** Aunque VDAC y ANT parecen ser las proteínas principales que forman el poro, éstas atraen otras proteínas, algunas de las cuales realizan funciones conocidas que se acoplan a la salida de ATP mitocondrial hidrolizándolo y regresando el ADP resultante hacia la matriz mitocondrial (Fig. 2). Algunas de estas proteínas están relacionadas con la eficiencia del metabolismo celular. Las mitocondrias tienen una poza de ATP, mientras que el ADP difunde pobremente en el citosol, ya que se encuentra unido a otras proteínas y la célula necesita trabajar en serie para conseguir una eficiente distribución de energía.

En el espacio intermembranal el complejo VDAC/ANT atrae creatina cinasa creando un microdominio en el cual el ATP translocado por el ANT genera creatina fosfato que se exporta al citosol vía VDAC [O’Gorman y cols., 1997]. En el citosol, la creatina y la creatina fosfato son altamente difusibles.

Otra manera de hacer un sistema eficiente es generando el uso de ATP en el citosol, muy cerca de los sitios de salida del ATP. Así el VDAC atrae hexocinasas y glicerol cinasas del citosol. La hexocinasa se encuentra asociada reversiblemente

con el VDAC, complejoado al ANT. La unión de la hexocinasa a VDAC aumenta en presencia de ATP y glucosa y disminuye en presencia de glucosa-6-fosfato. En sistemas reconstituidos, el ATP y la glucosa inhiben la actividad del poro y la inhibición es revertida por glucosa-6-fosfato [Beutner y cols., 1998].

Se ha implicado también la formación de los complejos VDAC/ANT en el metabolismo de los lípidos. Así, el complejo copurifica con el receptor de benzodazepinas que facilita la transferencia de colesterol a la membrana interna en células esteroideogénicas [McEnery y cols., 1992].



**Fig 2.** El complejo VDAC-ANT del poro de transición de la permeabilidad. A, formación del complejo hexocinasa-porina-ANT-CyP-D. La hexocinasa (HK) se une como tetrámero al complejo VDAC-ANT para mantener cerrado al PTP, la misma función la pueden realizar la glicerol cinasa (GK), o el receptor de las benzodiazepinas (mBr). B, Formación del complejo porina-CK-ANT-CyP-D. La creatina cinasa (CK) se une en forma octamérica para mantener el PTP cerrado. Las especies reactivas de O<sub>2</sub> (ROS) inducen la apertura del PTP desplazando el equilibrio de la creatina cinasa hacia la forma dimérica. En ambos casos, el Ca<sup>2+</sup> induce la apertura del PTP. (Modificada de Vyssokikh y Brdiczka, 2003).

## Regulación del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial

**A. Cationes divalentes.** El  $\text{Ca}^{2+}$  es el factor más importante para la apertura del PTP, y la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  es suficiente para inducir la transición de la permeabilidad mitocondrial [Zoratti y Szabo, 1995], la cual se puede revertir por adición de un exceso de EGTA [Haworth y Hunter, 1980; Crompton y cols., 1987; Petronilli y cols., 1994]. El parámetro relevante es la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la matriz, ya que la inhibición de la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  por rojo de rutenio inhibe la apertura del PTP [Hunter y Haworth, 1979]. La cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  requerida en la matriz para abrir el poro disminuye en presencia de inductores, mientras que aumenta en presencia de inhibidores del PTP [Haworth y Hunter, 1980]. Otros iones  $\text{Me}^{2+}$  generalmente se comportan como inhibidores del PTP, y esto depende de si los cationes son acumulados (como  $\text{Sr}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ ) o no (como  $\text{Mg}^{2+}$ ), por lo que se ha propuesto la existencia de dos sitios de unión a  $\text{Me}^{2+}$  en el PTP: [i] un sitio externo: la ocupación de este sitio por cualquier  $\text{Me}^{2+}$  (incluyendo  $\text{Ca}^{2+}$ ) disminuye la probabilidad de apertura del poro; [ii] un sitio interno: la ocupación de este sitio por  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta la probabilidad de apertura del poro, mientras que todos los otros  $\text{Me}^{2+}$  son inhibidores y aparentemente compiten con el  $\text{Ca}^{2+}$  [Bernardi y cols., 1993].

**B. Potencial de membrana.** El PTP se comporta como un canal dependiente de voltaje, un alto potencial de membrana favorece la conformación cerrada, y la despolarización lleva a la conformación abierta [Bernardi y cols., 1994]. Esto se ha descrito en mitocondrias aisladas, mediante la modulación del potencial de membrana con desacoplantes [Bernardi y cols., 1993] o valinomicina [Scorrano y cols., 1997]. También se ha observado la dependencia de voltaje en experimentos de patch-clamp sobre canales únicos, mediante la modulación del voltaje aplicado [Szabo y cols., 1993; Szabo y Zoratti, 1993]. Estos resultados sugieren la existencia de un sensor del voltaje que cambia la probabilidad de apertura del poro.

Los residuos de arginina altamente conservados son importantes para percibir el voltaje por los canales de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ , y  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática [Catterall, 1988], y resultados recientes con reactivos selectivos para arginina sugieren que estos residuos también pueden ser importantes en la modulación de la apertura del PTP por  $\text{Ca}^{2+}$  y por despolarización [Eriksson y cols., 1998]. La propuesta de que el

poro es sensible a los cambios del potencial de superficie representa un avance importante en el conocimiento del mecanismo de modulación de la la apertura del PTP en respuesta a varios moduladores [Broekemeier y Pfeiffer, 1995]. Los aniones anfipáticos (como los ácidos grasos) se comportan como activadores del poro con un efecto que no se puede explicar por despolarización [Broekemeier y Pfeiffer, 1995]. Por el contrario, los policationes (como la espermina, los péptidos con carga positiva, y los cationes anfipáticos como la esfingosina y la trifluoroperazina) inhiben la apertura del poro [Broekemeier y Pfeiffer, 1995]. Esto sugiere que un potencial de superficie más positivo favorece el cierre del poro, mientras que un potencial de superficie más negativo favorece su apertura [Broekemeier y Pfeiffer, 1995].

**C. pH de la Matriz.** Desde los primeros trabajos, se ha visto que la transición de la permeabilidad se inhibe a bajo pH [Haworth, y Hunter 1979]. En el grupo de Bernardi se reportó que el parámetro relevante es el pH de la matriz [Bernardi y cols., 1992], y la modulación ocurre a través de los residuos de histidina [Nicolli y cols., 1993]. El cierre reversible del PTP ocurre cuando se protonan estos residuos y se puede prevenir mediante el bloqueo de las histidinas con dietilpirocarbonato [Nicolli y cols., 1993].

**D. Estrés oxidativo.** El estrés oxidativo favorece la transición de la permeabilidad [Zoratti y Szabo, 1995]. El PTP posee al menos dos sitios que aumentan la probabilidad de apertura después de su oxidación; [i] el sitio "S," un ditiol en aparente equilibrio redox con el glutatión de la matriz; y [ii] el sitio "P" en aparente equilibrio redox con el pool de nucleótidos de piridina [Chernyak y Bernardi, 1996; Costantini y cols., 1996]. El entrecruzamiento del sitio "S" por arsenito u óxido de fenilarsina, o su oxidación por diamida puede inducir la transición de la permeabilidad bajo condiciones donde el pool de nucleótidos de piridina se encuentra reducido [Costantini y cols., 1996]. El glutatión oxidado recibe electrones del sitio "S" y muchos inductores del poro (como hidroperóxidos orgánicos y peróxido de hidrógeno) parecen afectarlo a través de cambios en los niveles de glutatión reducido más que por oxidación directa del sitio "S" [Chernyak y Bernardi, 1996]. El pre-tratamiento con monobromobimano [Costantini y cols., 1995a], con N-etilmaleimida [Petronilli y cols., 1994], o la reducción con ditioneitol previene

totalmente los efectos de los oxidantes que actúan en el sitio "S" [Petronilli y cols., 1994].

La oxidación del sitio "P" por nucleótidos de piridina oxidados puede inducir la transición de la permeabilidad bajo condiciones en las cuales la poza de glutatión se encuentra en estado reducido, o cuando el sitio "S" ha reaccionado con arsenito [Chernyak y Bernardi, 1996; Costantini y cols., 1996]. A diferencia del sitio "S", el sitio "P" no puede ser bloqueado con monobromobimano o ditioneitol, pero sí es sensible a N-etilmaleimida en el mismo rango de concentración que el sitio "S" [Chernyak y Bernardi, 1996; Costantini y cols., 1996].

Aunque estos experimentos demuestran que en el PTP la transición abierto-cerrado se regula de manera independiente en los sitios "S" y "P", se debe tener en cuenta que su contribución relativa en la apertura del PTP bajo condiciones de estrés oxidativo es extremadamente difícil de diferenciar, ya que los niveles mitocondriales de nucleótidos de piridina reducidos y glutatión se conectan a través de las transhidrogenasas y la glutatión reductasa [Hoek y Rydstrom, 1988]. El papel del NADH como fuente de equivalentes reductores para los sistemas de defensa mitocondriales se evidencia al observar que el paraquat induce la apertura del PTP en presencia de succinato sólo en presencia de rotenona [Costantini y cols., 1995b]. El paraquat ejerce su efecto al oxidar GSH.

**E. Fosfato.** La expulsión de protones por la cadena respiratoria mitocondrial genera un potencial y un gradiente de pH interior negativo y un potencial eléctrico, que puede ser hasta de 100 mV en ausencia de ácidos débiles [Bernardi y Pietrobon, 1982]. En estas condiciones el  $\text{PO}_4^{2-}$  se acumula en la matriz generando una disminución del pH externo y un aumento del potencial de membrana. Estas condiciones favorecen el estado cerrado del PTP y previenen la transición. Aún así, el  $\text{PO}_4^{2-}$  es un potente inductor de la transición de la permeabilidad a través de un mecanismo aún no bien definido. No hay una evidencia clara de que el  $\text{PO}_4^{2-}$  se una directamente al poro y se supone que actúa modulando otros reguladores del PTP [Petronilli y cols., 1993].

**F. Nucleótidos de adenina.** Los nucleótidos de adenina fueron los primeros inhibidores del PTP identificados. El ADP es más efectivo que el ATP, mientras que

el AMP tiene efectos apenas detectables [Zoratti y Szabo 1995]. Los experimentos de patch-clamp confirmaron que el ADP interactúa con el poro en el lado de la matriz mitocondrial [Szabo y Zoratti 1992]. Los agentes que disminuyen la poza de nucleótidos de adenina (PPI o fosfoenolpiruvato) favorecen la transición de la permeabilidad [Hunter y Haworth 1979].

**G. Ciclosporina A.** En presencia de CsA la mitocondria acumula grandes cantidades de  $\text{Ca}^{2+}$  que llegan a colapsar el potencial de membrana y causar la salida del mismo  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana dañada [Fournier y cols., 1987]. Posteriormente se demostró la inhibición de la apertura del PTP por CsA [Crompton y cols., 1988]. Sin embargo, se debe considerar que la CsA no actúa selectivamente sobre la mitocondria, sino que inhibe otras funciones celulares. La mayoría de sus efectos biológicos son mediados por su unión a una familia de receptores intracelulares, las ciclofilinas, que poseen actividad de peptidil-prolil-cis-trans-isomerasa [Galat y Metcalfe, 1995]. La inmunosupresión se debe a la unión dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y calmodulina del complejo CsA-ciclofilina a la calcineurina, una fosfatasa celular que así es inhibida. La inhibición de la calcineurina previene la defosforilación de los activadores transcripcionales. Estos factores no se translocan al núcleo en forma fosforilada, previniendo la transcripción de genes específicos de las células T activadas [Emmel y cols., 1989]. La mitocondria contiene una única ciclofilina en la matriz, la CyP-D [Woodfield y cols., 1997], pero aparentemente ninguna proteína de unión a ciclosporina [Nicolli y cols., 1996]. La hipótesis más aceptada acerca de la regulación de poro por CsA es que la unión de la ciclofilina al PTP por el lado de la matriz favorece su apertura y que la CsA cierra el poro de manera indirecta secuestrando a la CyP-D [Connern y Halestrap, 1996; Nicolli y cols., 1996]. La actividad de peptidil-prolil-cis-trans-isomerasa de la ciclofilina probablemente no es esencial para la modulación del PTP ya que el dietilpírocarbonato promueve la apertura del PTP a concentraciones que inhiben totalmente la actividad de peptidil-prolil-cis-trans-isomerasa de la CyP-D [Nicolli y cols., 1993].

**H. Ubiquinonas y flujo de electrones a través del complejo I.** Se ha descrito un nuevo mecanismo de regulación del PTP relacionado con la actividad de la cadena

respiratoria. En mitocondrias de músculo esquelético, cuando aumenta el flujo de electrones a través del complejo I, aumenta la probabilidad de apertura del poro con un efecto que no se relaciona con la producción de peróxido de hidrógeno [Fontaine y cols., 1998a]. El efecto inductor de la actividad del complejo I se disocia claramente de la oxidación de nucleótidos de purina. Así, en presencia de Pi la apertura del PTP se alcanza con menor acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  cuando las mitocondrias están energizadas con sustratos del complejo I que con sustratos del complejo II [Fontaine y cols., 1998a]. La modulación del PTP por el flujo de electrones a través del complejo I se observa mejor en mitocondrias de músculo esquelético, pero este tipo de regulación también está presente en mitocondrias de hígado [Fontaine y cols., 1998b]. Recientemente se descubrió que algunas quinonas, tales como la ubiquinona 0 y la decilubiquinona, son potentes inhibidoras de PTP [Fontaine y cols., 1998b]. La capacidad de retención de  $\text{Ca}^{2+}$  de la mitocondria de hígado de rata aumenta en presencia de ubiquinona 0 cuando la mitocondria está energizada con succinato. La ubiquinona 0 es más potente que la CsA cuando la mitocondria está energizada con glutamato y malato [Fontaine y cols., 1998b]. La concentración óptima para la inhibición del PTP es cercana a 50 mM para la ubiquinona 0 y 100 mM para la decilubiquinona cuando se agregan directamente al medio de ensayo [Fontaine y cols., 1998b]. La ubiquinona 5 no afecta al PTP pero interfiere con el efecto de la ubiquinona 0 y de la decilubiquinona, pero no de la CsA [Fontaine y cols., 1998b]. Este resultado se explica postulando la existencia de un sitio de unión a quinonas sobre el PTP, que es compartido por las quinonas activas e inactivas. Se considera que el poro existe en un estado ligado con quinonas inactivas o inhibitorias, lo cual confiere diferentes conformaciones al poro ocasionando que el sitio de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  sea menos accesible [Fontaine y cols., 1998b]. Estas conformaciones están en equilibrio con la concentración de quinonas en la membrana. De acuerdo con esto la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  necesaria para abrir al PTP es menor en presencia de quinonas inactivas que en presencia de quinonas inhibitorias.



## EL MEGACANAL INESPECÍFICO MITOCONDRIAL DE LA LEVADURA

Un modelo ideal para estudiar el fenómeno de la transición de la permeabilidad, su composición y su regulación, es *S. cerevisiae*, que tiene la doble ventaja de ser genéticamente manipulable y ser una célula aeróbica facultativa, capaz de crecer aún con mitocondrias defectuosas [Grandier-Vazeille y cols., 2001; Manon y cols., 1998]. Desafortunadamente, todos los intentos por encontrar el PTP clásico en las mitocondrias de levadura han fallado. Sin embargo, los estudios realizados por varios grupos sobre la permeabilidad iónica de la membrana interna mitocondrial de la levadura apoyan la existencia de un canal inespecífico de amplia conductancia, recientemente nombrado "yeast permeability transition pore" (yPTP) [Jung y cols., 1997], o bien "yeast mitochondrial unselective channel" (YMUC) [Manon y cols., 1998].

En su membrana interna, la mitocondria de *S. cerevisiae*, posee dos canales de alta conductancia que exhiben corrientes de 400 y 40 pS respectivamente [Ballarin y Sorgato, 1995]. Al menos uno de estos canales ligeramente aniónicos parece constituir una fuente de permeabilidad inespecífica a iones y solutos pequeños y se ha denominado YMUC [Manon y cols., 1998]. Cuando se abre, el YMUC permite el equilibrio de cargas [Castrejón y cols., 1997] y el paso de solutos hasta de 1.1 kDa a través de la membrana interna [Jung y cols., 1997]. En presencia de altas concentraciones de  $K^+$  y ausencia de  $PO_4^{2-}$ , la adición de ATP, etanol o NADH induce hinchamiento mitocondrial y caída del potencial transmembranal [Prieto y cols., 1992].

### Permeabilidad inespecífica inducida por la respiración

Las primeras evidencias sobre la existencia de un canal inespecífico de alta conductancia para iones en la membrana interna mitocondrial de la levadura se obtuvieron durante los 70s, cuando se estudiaba el transporte de fosfato a través de la membrana interna mitocondrial. Colateralmente al sistema de transporte clásico (cotransporte fosfato/protón sensible a mersalil), se observó que la respiración indujo un gran hinchamiento insensible a mersalil pero sensible a antimicina A [De Chateaubodeau y cols., 1974, 1976]. Por otro lado, se demostró que mitocondrias

aisladas en presencia de KCl 10 mM y en ausencia de fosfato, muestran un aumento irreversible de la velocidad de la respiración y finalmente un daño estructural de ambas membranas mitocondriales [Velours y cols., 1977]. Sin embargo, en esas fechas no se consideró la existencia de un canal inespecífico en la membrana interna mitocondrial [Manon y cols., 1998].

Recientemente se reportó la existencia de un canal inducido por la respiración y que era capaz de transportar manitol a través de la membrana interna de mitocondrias aisladas de cepas de laboratorio [Jung y cols., 1997]. Además, se calculó que el tamaño promedio de las moléculas transportadas es cerca de 1 100 Da; cercano al valor encontrado (1 500 Da) para el PTP en mitocondrias de mamífero.

Con estos experimentos fue posible aceptar la existencia de un canal mitocondrial inespecífico inducido por la respiración, cuyo tamaño es comparable al PTP de las mitocondrias de mamífero. Este sistema es inhibido por fosfato y por otros aniones tales como acetato, arsenato, propionato o vanadato [Velours y cols., 1977; Cortés y cols., 2000].

### **Permeabilidad inespecífica inducida por ATP**

Las mitocondrias suspendidas en una solución isosmótica de sales de  $K^+$  se hinchan en respuesta a valinomicina y ATP [Prieto y cols., 1992; 1995; Guérin y cols., 1994]. Este fenómeno se puede observar en mitocondrias aisladas de la cepa industrial "yeast foam" [Guérin y cols., 1994] o de otras cepas de laboratorio [Prieto y cols., 1992; 1995]. Este hinchamiento fue interpretado como una permeabilidad selectiva a  $H^+$  capaz de neutralizar la entrada del  $K^+$  [Prieto y cols., 1992]. Al observar el mismo fenómeno en mitocondrias suspendidas en gluconato de  $K^+$ , pero en ausencia de valinomicina, se propuso que el hinchamiento se debía a la apertura de un canal inespecífico, capaz de transportar aniones y cationes [Guérin y cols., 1994]. Posteriormente, estas observaciones se confirmaron en mitocondrias aisladas de la cepa de laboratorio W303 [Prieto y cols., 1995], y ahora se acepta que las mitocondrias de levadura tienen un canal inespecífico inducido por ATP, con algunas características que dependen de la cepa utilizada [Roucou y cols., 1997a].

### **Electrofisiología de la membrana interna**

El primer estudio electrofisiológico de la membrana interna mitocondrial de la levadura evidenció un canal de alta conductancia, principalmente catiónico con varios subestados [Szabo y cols., 1994]. Este canal tiene fuerte similitud con el canal sensible a péptidos localizado en la membrana externa mitocondrial, el cual es un posible componente de la maquinaria de importe de proteínas [Juin y cols., 1995].

En otros estudios, el canal de alta conductancia fue considerado como un equivalente del PTP [Lohret y Kinally 1995], aunque no se estudiaron las principales características del PTP, tales como inducción por  $\text{Ca}^{2+}$  y sensibilidad a la CsA. Este canal de alta conductancia es activo aún en mitocondrias aisladas de una mutante que no contiene el ANT [Lohret y cols., 1995], que parece ser un componente esencial del PTP en mitocondrias de mamífero.

El Tim 23, un componente de la maquinaria de importación de proteínas, es requerido para la actividad de este canal, sugiriendo su participación [Lohret y cols., 1996]. Sin embargo, las características de este canal son diferentes a las del canal sensible a péptidos [Juin y cols., 1995].

El canal observado por Ballarin y Sorgato [1995] es más parecido al reportado por el grupo de Guérin y cols., [1994] ya que se encontró un canal aniónico de alta conductancia, cuya probabilidad de apertura aumenta con el ATP. Esta conductancia probablemente equivale al canal inespecífico inducido por ATP observado por Guérin y cols., [1994].

### **Comparación entre el YMUC y el PTP**

Un aspecto sumamente interesante es determinar si el PTP y el YMUC son equivalentes. Se acepta una estructura del PTP, en la cual participan el ANT, el VDAC y la CyP D [Crompton 1999; Beutner y cols., 1998]. Si la mitocondria de levadura tiene una composición equivalente, ésta sería una poderosa herramienta para estudiar la estructura, la función y la regulación del sistema.

La ausencia de selectividad es evidente tanto en el PTP como en el YMUC. Ambos sistemas tienen la capacidad de transportar todo tipo de moléculas y sólo discriminan por el tamaño de los solutos. Otra similitud entre ambos canales es que

cuando se estudian mediante técnicas de electrofisiología, son de naturaleza aniónica [Ballarin y Sorgato 1995]. Adicionalmente, la selectividad bajo diferentes condiciones también cambia tanto en el PTP como en el YMUC, lo cual sugiere la presencia de diferentes subestados en ambos casos.

Por el contrario, la regulación de ambos canales es completamente diferente. El  $\text{Ca}^{2+}$ , a concentraciones fisiológicas, parece no tener efecto sobre el YMUC [Jung y cols., 1997]. La CsA, un inhibidor específico del PTP, no tiene efecto sobre el YMUC [Jung y cols., 1997] aún cuando la mitocondria de levadura contiene una ciclofilina (codificada por el gene CYP3), la cual está involucrada en el plegamiento de las proteínas codificadas en el núcleo [Matoushek y cols., 1995]. El fosfato es un coinductor (con  $\text{Ca}^{2+}$ ) del PTP, mientras que en el YMUC actúa como inhibidor. El YMUC es activo en cepas que no tienen VDAC o el ANT [Roucou y cols., 1997a], los dos principales componentes del PTP; esto es de especial interés ya que ambas mitocondrias muestran sitios contacto que contienen VDAC, ANT y CyP D, y se esperaría que estos sean parte del YMUC [Manon y cols., 1998].

No se conoce el significado fisiológico del YMUC, aunque se han propuesto varias hipótesis. El YMUC no puede estar involucrado en la regulación del  $\text{Ca}^{2+}$ , el cual no tiene un papel evidente en la mitocondria de la levadura [Welihinda y cols., 1993; Nichols y cols., 1994]. Se han propuesto algunas posibles funciones biológicas para el YMUC tales como la regulación del volumen de la matriz mitocondrial, y la regulación de la síntesis de ATP [Guérin y cols., 1994; Prieto y cols., 1995; Roucou y cols., 1997b]. Además, se ha propuesto, que las levaduras se pueden beneficiar de este canal si lo utilizan para la disipación de la energía en forma de calor [Dejean y cols., 2000] y que la masa de la levadura varía ampliamente en una forma dependiente de AMPc, probablemente involucrando a la mitocondria [Dejean y cols., 2002]

El PTP, tiene una posible participación en los primeros pasos de la apoptosis [Crompton 1999]. Aunque la levadura no presenta ningún fenómeno espontáneo de apoptosis clásica y no contiene la familia de genes bcl-2 ni la cascada de caspasas [Aravind y cols., 1999] se puede inducir la muerte celular por expresión de genes pro-apoptóticos tales como bax [Sato y cols., 1994; Zha y cols., 1996].

## LA APOPTOSIS EN LA LEVADURA

La apoptosis o muerte celular programada fue descrita y definida morfológicamente hace más de 30 años [Kerr y cols., 1971]. En las células animales, la apoptosis se refiere a una constelación de eventos morfológicos asociados con un programa de muerte celular. Estos cambios morfológicos y estructurales incluyen condensación citoplásmica, pérdida del potencial transmembranal de la mitocondria, exposición de fosfatidilserina sobre la superficie celular, condensación de la cromatina en la envoltura nuclear, fragmentación del ADN y formación de cuerpos apoptóticos envueltos por la membrana celular [Liu y cols., 1996]. Este fenómeno es crucial para el desarrollo y la homeostasis de los metazoarios ya que permite la eliminación de células indeseables sin afectar a las células sanas. Se ha determinado que quien controla los eventos bioquímicos responsables de la apoptosis es la activación de una familia de proteasas de cisteína llamadas caspasas. Estas proteasas de cisteína hidrolizan sus sustratos en el residuo de aspartato [Salvesen y Dixit 1997]. Las caspasas son controladas por una vasta colección de proteínas que comprenden varias familias como las proteínas inhibitoras de la apoptosis (IAPs), la familia Bcl-2, dominios de reclutamiento de caspasas, dominios de muerte (DD) y dominios efectores de la muerte [Reed 2000]. Todas estas proteínas constituyen la maquinaria central principal de la muerte celular programada.

Aunque muchos estudios han confirmado la importancia de las caspasas en la muerte celular programada [Grutter, 2000], este fenómeno se puede producir por mecanismos alternos, independientes de caspasas. Por ejemplo, se ha reportado que las proteasas activadas por  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina (miembro de la familia de la calpaina) procesan muchos de los sustratos de las caspasas y se han relacionado con la muerte celular patológica en tejidos como corazón y cerebro durante el daño por isquemia reperusión [Wang., 2000]. Además, la endonucleasa G y el factor inductor de la apoptosis (AIF) generan algunos de los cambios nucleares típicamente asociados con la apoptosis dependiente de caspasas [Li y cols., 2001]. Así, la muerte celular programada se puede inducir a través de mecanismos independientes de caspasas, por lo que es difícil describir los mecanismos

bioquímicos únicamente sobre bases morfológicas. Consecuentemente, la morfología de la apoptosis no necesariamente implica la participación de la misma maquinaria bioquímica.

*S. cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* se han utilizado como modelos para el análisis de varias vías y procesos genéticos como la división celular, la secreción, la transcripción y la traducción de señales mediadas por receptores. La levadura no tiene la misma maquinaria apoptótica que las células animales, solamente se han identificado proteínas parecidas a las IAPs que contienen dominios conservados y los dominios BIR (baculoviral inhibitor of apoptosis repeat). En estos organismos, las proteínas que contienen BIR se han relacionado con la regulación de la división celular más que con la muerte programada [Reed y Bischoff, 2000]. En la levadura se ha reportado muerte celular programada en mutantes  $\Delta cdc48$  [Madeo y cols., 1997, 1999]. La proteína Cdc48 de *S. cerevisiae* es una ATPasa, supuestamente involucrada en los eventos de fisión de membranas asociados con la división celular y la secreción. En una mutante  $\Delta cdc48$  sensible a temperatura, se observó fragmentación nuclear y condensación citoplásmica, característicos de la apoptosis observada en las células de mamífero [Madeo y cols., 1997]. Sin embargo no hay evidencia que sugiera que estos cambios no signifiquen más que una coincidencia.

En la levadura la muerte celular programada se ha reportado después del tratamiento con ácido acético, radiación UV, depleción química de glutatión y  $H_2O_2$  [Del Carratore y cols., 2002]. En la mayoría de los casos, la muerte celular se asocia con fragmentación del ADN (medido marcando los extremos dUTP con desoxinucleotidil transferasa terminal; la llamada prueba de TUNEL), condensación de la cromatina en la envoltura nuclear (visualizado por microscopía electrónica de transmisión o con el uso de fluorocromos de unión al DNA) y exposición de fosfatidilserina (mostrada mediante marcaje con anexina-V). La muerte celular de la levadura se previno inhibiendo la síntesis de proteínas con cicloheximida, lo que implica la inducción de un proceso activo [Madeo y cols., 1999]. Por otro lado, el envejecimiento de la levadura en cultivo se ha asociado con la muerte celular programada [Laun y cols., 2001].

En *S. cerevisiae* recientemente se identificó una proteína implicada en la muerte celular inducida por  $H_2O_2$ , ácido acético y envejecimiento [Madeo y cols., 2002]. Esta proteína, preliminarmente llamada caspasa 1 de la levadura (YCA1), es un miembro de la familia de las metacaspasas (supuestas proteasas que tienen un plegamiento parecido al de las caspasas y están presentes en plantas, hongos y protistas, pero no en metazoarios) [Uren y cols., 2000]. La sobreexpresión de YCA1 aumenta la muerte celular por apoptosis inducida por  $H_2O_2$  o por ácido acético en la levadura. La proteína YCA1 también presenta un procesamiento proteolítico dependiente de su sitio activo de cisteína, el cual es similar al de las caspasas de mamífero [Madeo y cols., 2002]. Así, las metacaspasas podrían tener un papel importante en la muerte celular programada en la levadura, lo que indicaría un estricto paralelismo con la apoptosis en los mamíferos. A pesar de esto, muchas características de la metacaspasa YCA1 no se han esclarecido, incluyendo la demostración directa de su actividad de proteasa, el sustrato endógeno, su especificidad y sus inhibidores.

El denominador común en la mayoría de los modelos de muerte celular de la levadura parece ser la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Así, la muerte celular apoptótica inducida por mutaciones en Cdc48 se puede inhibir con sequestradores de radicales libres y con hipoxia [Madeo., 1999]. Por otro lado, la muerte celular asociada con el envejecimiento replicativo de la levadura se acompaña con la producción de ROS localizada en la mitocondria (determinada por tinción con dihidro-rodamina) [Laun y cols., 2001]. La eliminación de genes que codifican para la superóxido dismutasa (SOD) o para la catalasa disminuye el tiempo de vida de la levadura mientras que el glutatión la aumenta [Swiecilo y cols., 2000]. El papel central de ROS en los modelos de muerte celular por apoptosis en la levadura no necesariamente es relevante en el programa de muerte celular orquestado por caspasas en células animales, dado que la apoptosis en mamíferos puede ocurrir en casi completa ausencia de oxígeno [Jacobson y Raff, 1995].

## Estudios de algunas proteínas de mamífero en levaduras

**A. Función de Bcl-2 en levaduras y mamíferos.** Las proteínas Bcl-2 y Bcl-xL son los dos miembros antiapoptóticos más importantes de la familia de proteínas Bcl-2. Bcl-2 fue el primer protoncogene que se descubrió que regula la progresión a través del ciclo celular retardando la entrada a la fase S, su oncogenicidad se debe a su habilidad para prevenir la apoptosis (más que estimular la proliferación) y a que actúa también como antioxidante [Lawen y cols., 1998].

Se ha tratado de entender por qué la levadura, que no contiene homólogos de Bcl-2 muestra fenotipos de apoptosis. Una teoría se basa en el descubrimiento de que varias proteínas de la familia Bcl-2 muestran similitudes estructurales con las moléculas formadoras de poros identificadas en bacterias, tales como las colicinas de *Escherichia coli* y una subunidad del factor letal producida por difteria (Fesik 2000). Además, tanto las proteínas anti-apoptóticas como las proapoptóticas de la familia de Bcl-2 han mostrado tener actividad de canal iónico en membranas sintéticas [Schendel y cols., 1998]. Al respecto, se ha demostrado una importante función para la familia de proteínas Bcl-2 en el control de la permeabilidad de las membranas mitocondriales en células de mamífero [Marzo y cols., 1998]. Así las proteínas pro-apoptóticas tales como Bax y Bak inducen la liberación de citocromo c y otras proteínas apoptogénicas de las mitocondrias, y las proteínas anti-apoptóticas tales como Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub> se oponen a estos efectos. Se han propuesto varias teorías para explicar cómo las proteínas pro-apoptóticas inducen y por otro lado, las proteínas anti-apoptóticas previenen la liberación de proteínas de la mitocondria. Estas teorías incluyen la formación directa de un canal por proteínas tales como Bax. Además, la modulación de la actividad de otras proteínas residentes en las membranas mitocondriales por Bax, Bcl-2 y otras proteínas relacionadas [Green y Reed, 1998; Kroemer y Reed, 2000]. Probablemente la evidencia más directa de la formación del poro en la levadura proviene de los análisis de patch-clamp en membranas externas de mitocondrias de levadura que expresan ectópicamente Bax humano, los cuales mostraron un poro de ~4 nm de diámetro [Pavlov y cols., 2001]. También, de acuerdo con la hipótesis del poro, la depleción de las hélices de Bax (a5 y a6) que forman el poro resulta en una actividad citolítica en la levadura y su



actividad de canal en membranas sintéticas *in vitro* [Matsuyama y cols., 1998]. Estas funciones de Bax observadas en la levadura podrían ser análogas a los mecanismos citotóxicos usados por las colicinas.

**B. Funciones de Bax en mamíferos y levaduras.** Se ha observado un estricto paralelismo en función de Bax en células de levadura y en células de mamífero. Esto sugiere que Bax actúa dentro de una vía endógena en la levadura que es conservada en eucariontes superiores. Por ejemplo, en los dos tipos celulares, Bax se inserta en la membrana mitocondrial, induce hiperpolarización del gradiente de protones a través de la membrana interna, desencadena la liberación de citocromo *c* e induce la producción de ROS [Zha y cols., 1996; Manon y cols., 1997]. Estos eventos son seguidos por la despolarización de la mitocondria. Por otro lado, en células de mamífero, el citocromo *c* liberado se une al factor activador de proteasas (Apaf-1), una proteína que activa a las caspasas desencadenando apoptosis. En las levaduras se ha demostrado que Bax puede matar a las células aún en ausencia de Apaf-1, induciendo un programa de muerte celular no apoptótica que es acompañado por la producción de ROS y daño oxidativo a las membranas y otras moléculas [Haraguchi y cols., 2000; Cheng y cols., 2001]. También hay evidencias genéticas que indican que la liberación del citocromo *c* no es indispensable para que Bax mate a las células, sean de levadura o de mamífero [Roucou y cols., 2000]. Además, tanto los agentes químicos como las proteínas que atenúan a los oxidantes reducen la citotoxicidad de Bax en ambos tipos celulares [Moon y cols., 2002]. De esta manera, aunque las células animales desarrollaron un mecanismo para unir el daño mitocondrial con la apoptosis dependiente de caspasas, la muerte celular es activada por Bax corriente arriba de las caspasas. Este mecanismo puede ser evolutivamente conservado en levaduras y otros organismos que carecen de caspasas [Green y Reed, 1998]. De igual forma, la proteína anti-apoptótica de mamífero Bcl-2, puede interactuar con una vía endógena en la levadura para su citoprotección, como se muestra por su efecto para proteger a las levaduras deficientes de SOD de los efectos letales por exposición a 100% de oxígeno y para prolongar la sobrevivencia de las levaduras silvestres en un medio sin nutrientes [Longo y cols., 1997].

**C. La función de las proteínas mitocondriales.** En virtud de que las proteínas de la familia de Bcl2 que forman los canales parecen interactuar con el aparato endógeno mitocondrial para inducir la muerte celular de la levadura, se han utilizado mutantes para explorar el mecanismo a través del cual las proteínas mitocondriales participan en la muerte inducida por Bax. Desafortunadamente, las variaciones en los resultados obtenidos con levaduras carentes del ANT y el VDAC, proteínas implicadas en el efecto citotóxico de Bax en células de mamífero, no han permitido resolver el mecanismo citotóxico de Bax [Marzo y cols., 1998].

### **CANAL DE ANIONES DEPENDIENTE DE VOLTAJE**

El canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC), también llamado porina mitocondrial se encuentra en alta densidad en la membrana externa mitocondrial y regula la permeabilidad de la membrana a iones y metabolitos [Benz, 1994]. Hay evidencias de que VDAC, al igual que las porinas bacterianas forma poros tipo barril beta. Esto se propuso con base en un modelo de alternancia de los residuos no polares en la estructura primaria de VDAC de *S. cerevisiae* [Forte y cols., 1987]. Adicionalmente, los espectros de dicroísmo circular del VDAC de *Neurospora crassa* han apoyado la estructura de barril beta (Fig. 3) similares a los de las porinas bacterianas [Shao y cols., 1996]. Sin embargo, a pesar de la aparente similitud estructural, VDAC presenta un cierre parcial reversible inducido por bajo voltaje no visto en las otras porinas. El estado cerrado impermeable a ATP es favorecido por ciertos polianiones [Colombini y cols., 1987] y efectores endógenos como el NADH [Zizi y cols., 1994] y por una proteína soluble mitocondrial [Holden y colombini, 1993], sugiriendo que el estado cerrado de VDAC se puede observar *in vivo*.

Las características básicas de los canales formados por la proteína VDAC se han investigado desde hace ya más de 25 años. VDAC fue la primera proteína formadora de poros de las células eucariontes que se purificó e incorporó a bicapas fosfolípídicas [Schein y cols., 1976]. Todas las proteínas VDAC purificadas de cualesquiera de los eucariontes examinados a la fecha conservan una serie de propiedades biofísicas en común. Cuando se reconstituyen en membranas de fosfolípidos, las VDAC se abren, la mayoría de las veces a bajos voltajes de

cualquier signo (10 mV). Así, a bajos potenciales, las corrientes discretas aumentan reflejando la incorporación de una unidad individual. Los canales abiertos tienen una conductancia de 4 nS y una selectividad por aniones sobre cationes. Cuando se aplica cualquier potencial positivo o negativo, típicamente sobre 30 mV las VDACs cambian al estado cerrado. Aunque ambos estados son permeables a sales simples (el estado abierto más permeable que el estado cerrado y el estado cerrado más permeable para cationes que para aniones), su permeabilidad para metabolitos mitocondriales (principalmente para aniones orgánicos) es dramáticamente diferente. Entonces, *in vivo*, el potencial asumido para los estados abierto y cerrado refleja un importante mecanismo de regulación fisiológica por el cual se captan y se liberan los metabolitos. De hecho, todos los paradigmas que involucran a VDAC como un regulador directo de la liberación de moléculas de la mitocondria, tales como el citocromo *c*, durante los procesos apoptóticos están basados en la capacidad de VDAC para adoptar los estados abierto y cerrado en las bicapas.

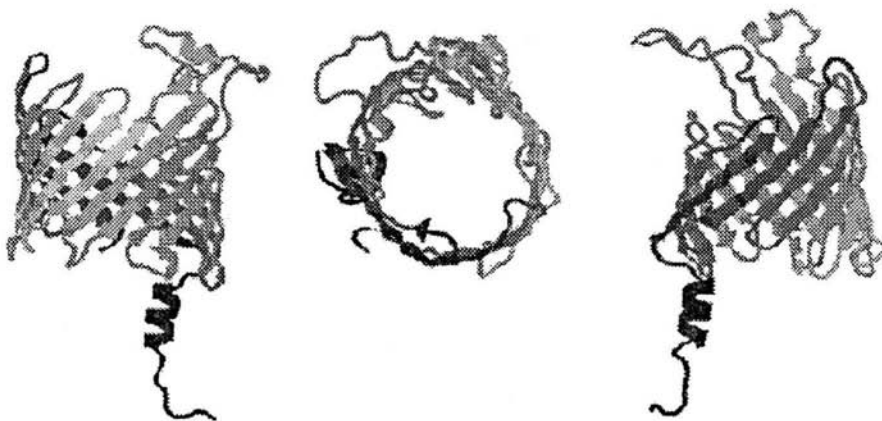


Fig. 3. Diferentes vistas de la estructura tridimensional predicha para el canal de aniones dependiente de voltaje de *N.crassa*. El modelo consiste de un barril beta con 16 láminas beta y una hélice alfa globular. En los extremos se muestran las vistas laterales de la proteína y en el centro se muestra la proteína vista desde arriba. Los modelos de la estructura de VDAC de ratón y levaduras son similares. (Tomada de Casadio y cols., 2002).

Se han usado diferentes enfoques experimentales para demostrar que cada canal está formado por una sola proteína VDAC de 285 aminoácidos (30-32 kD). Este péptido es capaz de formar un poro de gran tamaño (2.5 a 3.0 nm de diámetro cuando está abierto y 1.9 nm en estado cerrado) [Dolder y cols., 1999].

Algunos estudios bioquímicos han demostrado que VDAC es el punto de anclaje para un gran complejo de proteínas entre las que se encuentran varias enzimas que usan ATP, como la hexocinasa, la glucosa cinasa, la glicerol cinasa y la creatina cinasa mitocondrial. Estas enzimas se han encontrado asociadas con la superficie de la membrana externa mitocondrial, unidas a VDAC. Esta localización presumiblemente le da a cada enzima un acceso directo a los sustratos (ATP generado mitocondrialmente o creatina citoplásmica), aunque la creatina cinasa es la única enzima que se ha demostrado que modula la actividad de VDAC en bicapas [Brdiczka y cols., 1994]. La asociación de la hexocinasa con VDAC sobre la superficie externa de la membrana externa parece jugar un papel importante en el acoplamiento entre el metabolismo de la glucosa y la fosforilación oxidativa.

Recientemente se encontró una conexión entre la localización de la hexocinasa mitocondrial y la acción antiapoptótica de la proteína serina/treonina cinasa Akt/PBK [Gottlob y cols., 2001]. Estas observaciones sugirieron que la unión de la hexocinasa a la mitocondria mediada por VDAC juega un papel importante en la regulación de la apoptosis, aunque no se han esclarecido los mecanismos que llevan a tal respuesta. Adicionalmente se supone que VDAC es un componente clave en el complejo de proteínas que forman el poro de transición de la permeabilidad y de los sitios de contacto entre la membrana externa y la membrana interna. De acuerdo con la idea de que VDAC es componente de un gran complejo molecular, se ha demostrado que se encuentra en la mitocondria no como un monómero aislado de 32 kDa, sino como parte de un complejo mucho mayor (estimado de 200 a 440 kDa en la levadura) cuyos componentes aún no se han definido totalmente [Krimmer y cols., 2001]. Considerando estos aspectos se puede suponer que la función de VDAC en el contexto celular difiere dramáticamente de la actividad de canal observada en la proteína reconstituida en bicapas.

## LA PROTEINA DESACOPLANTE DE LA GRASA CAFÉ

La grasa café es un tejido especializado en la producción de calor, donde una proteína desacoplante (UCP1) anclada en la membrana interna mitocondrial cataliza el reingreso de los protones [Fleury y cols., 1997]. Este mecanismo fue considerado como único, hasta el reciente descubrimiento de nuevas UCPs [Boss y cols., 1997], no sólo en otros tejidos de mamíferos, sino también en plantas [Laloi y cols., 1997].

La UCP1 es regulada tanto a nivel mitocondrial como a nivel de expresión. UCP1 se mantiene inhibida mientras el adipocito se encuentra en un estado no termogénico. La inhibición de UCP1 es mediada por la unión de nucleótidos de purinas en el lado citosólico [Nicholls 1976]. Cuando la adrenalina se une a la membrana plasmática del adipocito, aumentan los niveles de AMPc e inician una cascada lipolítica donde los ácidos grasos liberados son quemados por la mitocondria. Durante la última década se ha señalado a los ácidos grasos como activadores fisiológicos de UCP1, actuando como segundos mensajeros citosólicos de la noradrenalina [Locke y cols., 1982]. Este mecanismo de activación por ácidos grasos se ha tratado de explicar de dos maneras. El primer modelo propone que UCP1 cataliza el transporte de ácidos grasos en su forma aniónica. La acción protonoforética del ácido graso se debe completar con el regreso de la forma protonada del ácido graso y la liberación del protón en el lado de la matriz [Garlid y cols., 1996]. El segundo modelo hipotético propone que los ácidos grasos actúan como un grupo prostético en UCP1 que transloca protones [Winkler y Klingenberg 1994]. La mutación de dos residuos de histidina (H145Q y H147N) que bloquean el transporte de protones sin afectar el transporte de aniones parece indicar que las cadenas laterales de UCP1 están involucradas en la translocación de protones y que los grupos carboxilo de los ácidos grasos actúan como parte de la vía de translocación [Bienengraeber y cols., 1998].

Durante los 90s se descubrieron dos nuevas proteínas desacoplaentes. La UCP2 [Fleury y cols., 1997] y la UCP3 [Boss y cols., 1997]. Estas dos nuevas proteínas muestran 59 y 57% de identidad, respectivamente, con la UCP1 humana, mientras que entre ellas existe un 73% de identidad. El gen de UCP2 se expresa en un gran número de órganos, mientras que UCP3 se expresa exclusivamente en

tejido muscular y grasa café. Finalmente, se ha encontrado un nuevo gen homólogo en plantas de papa llamado St UCP [Laloi y cols., 1997]

La función fisiológica de estas proteínas se encuentra bajo investigación. Su función termogénica se evidencia por la expresión de UCP1, UCP2 y UCP3 en tejido adiposo café. Cuando se inactiva el gen de UCP1 por recombinación homóloga se sobrexprea el gene de UCP2 para compensar la pérdida de UCP1 [Enerback y cols., 1997]. Las UCPs pertenecen a una familia de proteínas relacionadas que está constituida por los transportadores de metabolitos de la membrana interna mitocondrial [Kuan y Saier 1993]. Los miembros de esta familia son el translocador de nucleótidos de adenina, el transportador de fosfato, el transportador de oxoglutarato, el transportador de aspartato/glutamato, etc. Estas proteínas tienen características estructurales similares que son caracterizadas por una estructura tripartita que consiste de 3 dominios de cerca de 100 aminoácidos y presentan dos regiones hidrofóbicas en cada dominio que probablemente contiene alfa hélices transmembranales. Los análisis de sus secuencias han revelado dos motivos localizados en los extremos de las asas conectadas por las dos regiones hidrofóbicas [Palmieri, 1994].

Los nucleótidos se unen a UCP1 en el lado citosólico de la membrana interna mitocondrial e inhiben su actividad de transporte [Nicholls, 1976]. Un reporte reciente demostró que la unión del nucleótido a UCP es un proceso bifásico, primero se forma un complejo, el cual adopta una nueva conformación con el nucleótido fuertemente unido a la proteína. Sólo en la conformación en la que la UCP1 se encuentra fuertemente unida al sustrato se inhibe el transporte de protones [Huang y Klingenberg, 1996]. No se ha encontrado el sitio de unión para los ácidos grasos y esto contribuye a la controversia sobre los mecanismos de activación de UCP1. Garlid y cols., [1996] defienden un modelo donde UCP1 es un acarreador de aniones y así los ácidos grasos son sustratos para el acarreador [Garlid y cols., 1996].

## HIPÓTESIS

Si la regulación del megacanal inespecífico mitocondrial de levadura es similar al PTP, los cationes extra e intramitocondriales deben regular su actividad.

## OBJETIVOS

### GENERAL

Caracterizar la regulación del megacanal inespecífico mitocondrial de la levadura ejercida por cationes de importancia fisiológica.

### PARTICULARES

1. Caracterizar el efecto del megacanal inespecífico mitocondrial de la levadura sobre la respiración mitocondrial, el potencial transmembranal y el hinchamiento mitocondrial
2. Evaluar el efecto de cationes de importancia fisiológica sobre la actividad del megacanal inespecífico de la mitocondria de levadura.
3. Identificar el mecanismo de interacción de los cationes con el megacanal inespecífico mitocondrial de la levadura.

## MATERIALES Y METODOS

### Materiales y reactivos

Todos los químicos fueron de grado reactivo. El manitol, el MES, el polietilén-glicol (PEG), el  $\text{CaCl}_2$ , el  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , el naranja de safranina y la albúmina sérica bovina (BSA) fueron de Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO). Las alquilguanidinas fueron sintetizadas por el Dr. Antonio Peña. La cepa industrial de panadería de *Saccharomyces cerevisiae*, fue obtenida de la Azteca, S. A. Las cepas de laboratorio de *S. cerevisiae* B-7553 y la mutante B-10610 (Tabla1) fueron donadas por el Dr. Fred Sherman de la Universidad de Rochester.

Tabla 1

Cepas de laboratorio utilizadas

No. De cepa	Genotipo	Genotipo abreviado
B-7553	<i>MATa CYC1cyc7-738::CYH2 ura3-52 his3-D1 leu2-3,112 trp1-289 cyh2</i>	Cepa normal
B-10610	<i>MATa CYC11 cyc7-738::CYH2 ura3-52 his3-D1 leu2-3,112 trp1-289 cyh2 por1-Δ::TRP1</i>	Δpor 1

### Medios de cultivo.

Las levaduras de la cepa comercial (50 g) se incubaron en medio rico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 %,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.6%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.04%, bactopectona 0.5%, extracto de levadura 0.25%, lactato de sodio al 1.4% y glucosa al 4% [De-Kloet y cols., 1961] bajo aireación (3l/min) durante 8 horas a una temperatura de 30 °C. Posteriormente se cosecharon y lavaron mediante centrifugación; se resuspendieron en agua desionizada y se dejaron en aireación durante 16 horas más.



Las levaduras de la cepa de laboratorio *S. cerevisiae* B-7553 y la mutante B-10610 ( $\Delta por1$ ) se incubaron en medio YLac (Extracto de levadura 1%,  $KH_2PO_4$ , 1%,  $(NH_4)_2SO_4$ , 0.12%, ácido láctico 2% y pH 5 ajustado con NaOH) en agitación continua y a temperatura constante de 30 °C durante 24 horas.

#### **Aislamiento de mitocondrias de la cepa industrial.**

Las células se lavaron tres veces por centrifugación y se resuspendieron en un medio para obtención de mitocondrias (manitol 0.6 M, MES 5 mM, albúmina sérica bovina 0.1% y pH 6.8 ajustado con trietanolamina). Las células se rompieron usando un homogenizador de células Braun y perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro [Uribe y cols., 1985]. A partir del homogenado se aislaron las mitocondrias por centrifugación diferencial en un rotor SS34 (Sorvall) [Peña y cols., 1977].

El homogeneizado se centrifugó en 12 tubos a 3,000 rpm durante 5 min; el sobrenadante se centrifugó a 10 rpm durante 10 min. Se eliminó el medio de los tubos; se eliminó completamente la grasa y se resuspendió suavemente el precipitado con un pincel. Posteriormente se agregó medio de obtención de mitocondrias para llenar 2 tubos hasta las 3/4 partes de su capacidad y se centrifugaron a 5,500 rpm durante 5 min. El sobrenadante se separó y centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min. El precipitado conteniendo las mitocondrias aisladas se resuspendió en 0.5 ml de medio de recuperación (manitol 0.6 M, MES 5 mM, y pH 6.8 ajustado con trietanolamina).

#### **Aislamiento de mitocondrias de las cepas de laboratorio de *S. cerevisiae***

Para la obtención de las mitocondrias de la cepa de laboratorio de *S. cerevisiae* B-7553 y B-10610, las células se cosecharon lavándolas 3 veces por centrifugación en un rotor Sorval GSA a 5,000 rpm durante 5 min y se resuspendieron en agua desionizada.

Después del último lavado, las células se resuspendieron en 20 ml de buffer SH (Tris 0.1 M,  $\beta$ -mercapto-etanol 0.5 M y pH 9.3 con NaOH)/mg de peso seco, y se incubaron de 10 a 15 min a 30 °C bajo agitación moderada. Posteriormente las células se lavaron 4 veces por centrifugación a 5,000 rpm durante 5 min con el buffer

de lavado con KCl (KCl 0.5 M, Tris 10 mM y pH 7 con HCl). A continuación las células se resuspendieron en 10 ml de buffer de digestión (sorbitol 1.35 M, EGTA 1 mM, ácido cítrico 10 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  10 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM, pH 5.8) al que se agregó 10 mg de Zymoliasa/g de peso seco de levadura. En este buffer se incubaron las células a 30 °C hasta alcanzar la formación de esferoplastos. La aparición de los esferoplastos se evaluó determinando la densidad óptica inicial a 600 nm de una suspensión 1:100 y después cada 10 min en una suspensión 1:10, hasta alcanzar la densidad óptica inicial (de la dilución 1:10).

Después de obtener los esferoplastos, la muestra se lavó 3 veces (12,000 rpm durante 5 min en un rotor SS34) con buffer de lavado de esferoplastos (Sorbitol 0.75 M, manitol 0.4 M, Tris 10 mM, BSA 0.1%, pH 6.8), resuspendiendo con un agitador de teflón y homogenizando en un Potter con un vástago delgado para disminuir la presión sobre la suspensión.

Después del último lavado, los esferoplastos se resuspendieron en buffer de homogeneización (manitol 0.6 M, EGTA 2 mM, Tris 10 mM, BSA 0.2%, pH 6.8) y se homogeneizaron en un Potter con vástago de teflón apretado pasando el vástago 25 veces para romper los esferoplastos, y a partir de este homogenado obtener las mitocondrias por centrifugación diferencial.

El homogenado se transfirió a 12 tubos de centrifuga para rotor SS34 que se centrifugaron a 2,500 rpm durante 10 min; el sobrenadante se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min. El precipitado se resuspendió en buffer de recuperación de mitocondrias (manitol 0.6 M, EGTA 2 mM, Tris 10 mM, pH 6.8), se vació en 6 tubos y se centrifugó a 2,500 rpm durante 10 min. Se separó el sobrenadante y se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min.

Las mitocondrias obtenidas en el botón se resuspendieron suavemente con un pincel en el mínimo volumen posible del buffer de recuperación de mitocondrias y se transfirieron a una jeringa de 5 ml con aguja para insulina y se fueron vaciando gota a gota sobre un recipiente con nitrógeno líquido, congelándose de inmediato, sin permitir su aglutinación. Las mitocondrias se transfirieron a Cryo tubos Nunc de 1.8 ml y se guardaron en congelación a -70 °C hasta el momento de ser utilizadas.

Para utilizarlas se descongelaron vaciándolas en un tubo de ensayo, el cual se sumergió en agua hirviendo y se sacó rápidamente para meterlo en hielo después de agitarlo suavemente. Este proceso se repitió una a dos veces más, con cuidado para no dañar las mitocondrias.

### **Preparación de mitoplastos**

Para la obtención de mitoplastos se diluyeron 20 g de proteína mitocondrial en buffer de esferoplastos (sorbitol 0.75 M, manitol 0.4 M, Tris 10 mM, BSA 0.1%, pH 6.8) con BSA (1 mg/ml) en un volumen final de 2 ml. Se agregaron 10 ml de Tris 10 mM (pH 7.4) y se incubaron en hielo durante 20 minutos. Centrifugamos en un rotor SS34 (Sorval) a 1,500 rpm durante 15 minutos. Se resuspendió el sedimento en tris 10 mM y se llevó a un volumen de 10 ml. Se agregaron 5 ml de solución conteniendo sacarosa 1.8 M,  $MgCl_2$  8 mM (en 10 mM Tris), se incubaron en hielo durante 20 minutos y se centrifugaron a 1,500 rpm durante 15 minutos. Los mitoplastos se resuspendieron con buffer de esferoplastos.

### **Determinación de proteína**

La proteína mitocondrial se determinó por triplicado por el método de Biuret, utilizando albúmina sérica bovina como estándar [Gornal y cols., 1949].

### **Consumo de oxígeno**

Las velocidades de consumo de oxígeno se midieron en estado de reposo (estado 4) y fosforilante (estado 3) utilizando un oxímetro YSI modelo 5300 equipado con un electrodo de tipo Clark en una cámara de 3 ml con temperatura controlada a 30°C conteniendo una concentración final de mitocondrias de 0.5 mg prot/ml [Estabrook, 1967]. La mezcla de reacción fue manitol 0.6 M, Mes 5 mM, pH 6.8 (TEA) y 1  $\mu$ l/ml de etanol como sustrato.

Las concentraciones utilizadas de  $PO_4^{2-}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  y  $K^+$  se indican en los pies de figura. Las soluciones madre fueron  $MgCl_2$  1.0 M,  $CaCl_2$  0.2 M, KCl 2.0 M y  $PO_4^{2-}$  1.0 M ó 0.1 M, pH 6.8 (Tris).

### **Potencial transmembranal**

Se evaluó en un espectrofotómetro de doble longitud de onda Aminco DW200, en modo dual a 511-533 nm, siguiendo la incorporación del colorante naranja de safranina en las membranas energizadas. El colapso del  $\Delta\psi$  se logró mediante la adición de FCCP 1 mM [Åkerman y Wikstrom, 1976].

### **Hinchamiento mitocondrial**

Se midió siguiendo el cambio en absorbencia a 540 nm en un espectrofotómetro Aminco DW2000 en modo haz partido. En una celda de cuarzo de 3 ml con un cm de paso de luz se adicionó buffer de manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH 6.8 (TEA). Como sustrato se adicionó etanol (96%) 1 $\mu$ l/ml.

### **Experimentos de reconstrucción**

Para evaluar la reconstrucción, primero agregamos KCl para hinchar las mitocondrias durante aproximadamente 30 segundos. Una vez que las mitocondrias estaban hinchadas, se agregaron los diferentes efectores, y después de la estabilización de la absorbencia se promovió la reconstrucción con PEG de diferentes pesos moleculares, medida espectrofotométricamente [Jung y cols., 1997]. La concentración necesaria para alcanzar 300 mOsM se determinó considerando que el comportamiento osmótico de los PEG no es ideal [Pfeiffer y cols., 1995]. Para las soluciones stock 300 mOsM se prepararon las siguientes concentraciones: 199 mM para el PEG de 0.4 kDa , 172 mM para el PEG de 0.6 kDa, 136 mM para el PEG de 1.0 kDa y 111 mM para el PEG de 1.45 kDa [Pfeiffer y cols., 1995].

## RESULTADOS

### LOS CATIONES DIVALENTES Y LAS ALQUILGUANIDINAS CIERRAN EL MEGACANAL INESPECÍFICO MITOCONDRIAL DE LA LEVADURA COMERCIAL.

#### Acoplamiento del consumo de oxígeno por calcio y magnesio.

Diferentes grupos han reportado que en presencia de 0 a 0.4 ó 0.5 mM  $\text{PO}_4^{2-}$  el YMUC se mantiene abierto [Castrejón y cols., 1997; Velours y cols., 1997]. La impermeabilidad de la membrana interna mitocondrial se puede evaluar midiendo la actividad respiratoria en el estado 4 y en el estado 3 y calculando el control respiratorio estado3/estado4 (CR). En las mitocondrias de levadura, cuando el canal está abierto, el CR se aproxima a 1.0, indicando la pérdida de acoplamiento entre la respiración y la fosforilación, mientras que si la membrana interna es impermeable a iones y protones, el CR llega a valores cercanos o superiores a 2.0.

En las mitocondrias de mamífero, la apertura del PTP está regulada por dos sitios de unión a los cationes divalentes: (i) un sitio interno, donde la unión del  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta la probabilidad de apertura, mientras que la unión de otros cationes divalentes ( $\text{Sr}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ ) tiene el efecto contrario [Bernardi y cols., 1993], y (ii) un sitio externo, donde todos los cationes, incluso el  $\text{Ca}^{2+}$ , aumentan la probabilidad de que el poro se encuentre cerrado [Bernardi y cols., 1993]. Así, el  $\text{Ca}^{2+}$  extramitocondrial puede ser un inhibidor del PTP mientras que el  $\text{Ca}^{2+}$  de la matriz puede desencadenar la apertura del poro.

Exploramos el efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  y del  $\text{Mg}^{2+}$  sobre la apertura del megacanal inespecífico mitocondrial de la levadura. Así, en presencia de  $\text{PO}_4^{2-}$  0.4 mM determinamos el efecto de ambos cationes sobre el consumo de oxígeno en estado 4 y en estado 3 y sobre el control respiratorio. Esta concentración de fosfatos no cierra el YMUC, pero participa en la reacción de fosforilación necesaria para establecer el estado 3. En ausencia de cationes, las velocidades de consumo de oxígeno fueron de: 212  $\text{ngatO}_2$  ( $\text{min.mg prot}^{-1}$ ) en estado 4 y 252  $\text{ngatO}_2$  ( $\text{min.mg prot}^{-1}$ ) en estado 3 (Fig. 4A), dando un control respiratorio de 1.2 (Fig. 4-B) La adición de diferentes  $[\text{Ca}^{2+}]$  o  $[\text{Mg}^{2+}]$  produjo un aumento de la velocidad de consumo

de oxígeno en estado 3 y disminución en el estado 4. La velocidad respiratoria en estado 3 aumentó en proporción ligeramente mayor con la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  que con la adición de  $\text{Mg}^{2+}$  (Fig. 4A). Así, en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  0.5 mM el CR fue de 2.1 mientras con  $\text{Mg}^{2+}$  1 mM el CR fue de 1.8 (Fig. 4-B).

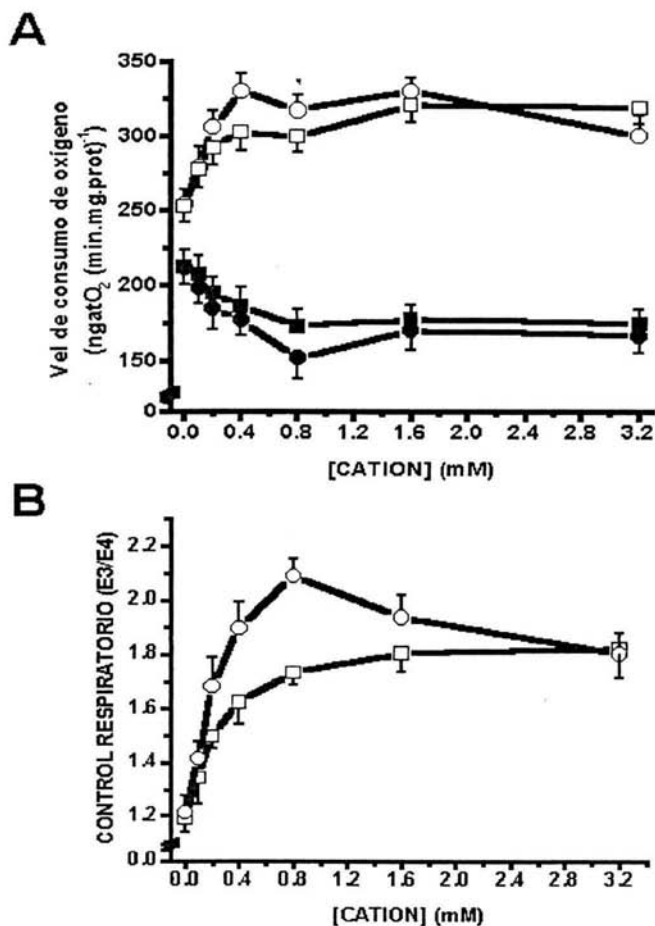


Fig. 4. Efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{Mg}^{2+}$  sobre la velocidad de consumo de  $\text{O}_2$  y control respiratorio en mitocondrias aisladas de levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Mezcla de reacción: manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH 6.8, etanol 1  $\mu\text{l}/\text{ml}$ , KCl 20 mM,  $\text{PO}_4^{2-}$  0.4 mM, pH 6.8 (TEA) y las concentraciones indicadas de  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{MgCl}_2$ . El estado 3 se indujo por adición de ADP 150  $\mu\text{M}$ . (A) Velocidad de consumo de oxígeno en estado 3 (símbolos vacíos) y estado 4 (símbolos llenos). (O y ●)  $\text{Ca}^{2+}$ ; (□ y ■)  $\text{Mg}^{2+}$ . (B) Control respiratorio en presencia de (O)  $\text{Ca}^{2+}$  y (□)  $\text{Mg}^{2+}$ . Cada punto representa la media de 5 experimentos  $\pm$  D. S.

A mayores  $[Ca^{2+}]$  o  $[Mg^{2+}]$  probadas, estas diferencias desaparecieron, de manera que a  $[Ca^{2+}]$  o  $[Mg^{2+}]$  de 3.2 mM la velocidad respiratoria fue de 308  $ngatO_2$  (min.mg prot.)<sup>-1</sup> en estado 3 y 170  $ngatO_2$  (min.mg prot.)<sup>-1</sup> en estado 4 (Fig. 4-A), con un CR de 1.8 en ambos casos (Fig. 4-B).

Para probar si los efectos del  $Ca^{2+}$  y del  $Mg^{2+}$  son aditivos, se realizaron experimentos de consumo de oxígeno en estado 3 y estado 4 en presencia de una concentración fija de  $Mg^{2+}$  (0.5 mM ó 1.0 mM) y diferentes  $[Ca^{2+}]$  y se calcularon los CRs (Tabla 2). Comparando los resultados de la Tabla 2 con los de la Fig. 4-B, se observó que la combinación de  $Mg^{2+}$  0.5 mM o 1 mM con  $Ca^{2+}$  0.3 a 0.6 mM aumentó el CR más que con cualquier catión solo.

**Tabla 2**

Velocidades de consumo de  $O_2$  y control respiratorio de mitocondrias aisladas de *S. cerevisiae* en presencia de dos concentraciones fijas de  $Mg^{2+}$  y diferentes concentraciones de  $Ca^{2+}$ .

$[Ca^{2+}]$ mM	0.5 mM $Mg^{2+}$			1.0 mM $Mg^{2+}$		
	Estado 3 $ngatO_2$ (min.mg prot.) <sup>-1</sup>	Estado 4	CR E3/E4	Estado 3 $ngatO_2$ (min.mg prot.)	Estado 4	CR E3/E4
0	298 ± 10	179 ± 13	1.7 ± 0.1	294 ± 15	167 ± 13	1.8 ± 0.1
0.1	329 ± 12	165 ± 11	1.8 ± 0.1	293 ± 14	161 ± 11	2.0 ± 0.1
0.2	340 ± 13	152 ± 12	1.9 ± 0.2	293 ± 12	152 ± 12	2.2 ± 0.1
0.3	349 ± 14	148 ± 14	2.1 ± 0.1	310 ± 11	146 ± 14	2.4 ± 0.1
0.4	333 ± 14	144 ± 11	2.2 ± 0.1	322 ± 14	136 ± 11	2.4 ± 0.1
0.5	327 ± 17	140 ± 12	2.4 ± 0.1	328 ± 12	133 ± 12	2.5 ± 0.1
0.6	327 ± 11	132 ± 13	2.4 ± 0.2	326 ± 17	134 ± 14	2.4 ± 0.1

La mezcla de reacción fue como en la figura 4. El estado 3 se indujo con la adición de ADP 150  $\mu$ M. Cada valor representa la media de 5 determinaciones ± D. S.

### Estabilización del potencial transmembranal por calcio y magnesio

Los resultados del consumo de  $O_2$  demuestran que tanto el  $Ca^{2+}$  como el  $Mg^{2+}$  acoplan a la mitocondria, probablemente como consecuencia de haber cerrado el YMUC. Estos efectos acoplantes se evaluaron también determinando los efectos del  $Ca^{2+}$  y del  $Mg^{2+}$  sobre el potencial transmembranal ( $\Delta\psi$ ). Inicialmente, durante la determinación del  $\Delta\psi$  omitimos el  $PO_4^{2-}$  y se observó que el YMUC perdió sensibilidad a los cationes ensayados. En ausencia de  $PO_4^{2-}$  las  $[Ca^{2+}]$  y  $[Mg^{2+}]$  necesarias para cerrar el YMUC fueron excesivamente altas: se pudo observar un  $\Delta\psi$  parcialmente estable sólo con  $Ca^{2+}$  50 mM o  $Mg^{2+}$  5 mM (Resultados no mostrados). Estos resultados indicaban que la sensibilidad del YMUC a los cationes es regulada por el fosfato. Para demostrar ésto y simular las condiciones utilizadas en los experimentos de consumo de oxígeno se determinó el  $\Delta\psi$  en presencia de  $PO_4^{2-}$  0.4 mM. En ausencia de cationes se detectó un  $\Delta\psi$  transitorio y las mitocondrias se despolarizaron en menos de 30 segundos. A esta  $[PO_4^{2-}]$  las  $[Ca^{2+}]$  o  $[Mg^{2+}]$  necesarias para generar un  $\Delta\psi$  estable fueron 2 órdenes de magnitud menores que en ausencia de  $PO_4^{2-}$ . Por ejemplo, al agregar diferentes  $[Ca^{2+}]$  (Fig. 5-A) o  $[Mg^{2+}]$  (Fig. 5-B) se generó un  $\Delta\psi$  estable, alcanzando su mayor estabilidad con  $Ca^{2+}$  0.5 mM (Fig. 5-A trazo f) o mayor, y  $Mg^{2+}$  1.0 mM (Fig. 5-B, trazo f) o mayor. Aunque la adición de ambos cationes estabilizó el  $\Delta\psi$ , éste no alcanzó la estabilidad observada en el control en presencia de  $PO_4^{2-}$  4 mM (Fig. 5-A y B, trazo g).

Cuando en los experimentos de oximetría se agregaron juntos el  $Ca^{2+}$  y el  $Mg^{2+}$ , las mitocondrias mostraron un mayor CR que en presencia de cualquier catión solo (Fig. 4 y Tabla 2). Por ello decidimos probar si los efectos del  $Ca^{2+}$  y el  $Mg^{2+}$  sobre el  $\Delta\psi$  son aditivos (Fig. 6).

Los experimentos se realizaron con  $Mg^{2+}$  0.5 mM (Fig. 6-A) ó  $Mg^{2+}$  1.0 mM (Fig. 6-B) y diferentes  $[Ca^{2+}]$ . En las dos  $[Mg^{2+}]$ , la adición de  $Ca^{2+}$  aumentó el  $\Delta\psi$ , de manera que con  $Ca^{2+}$  0.4 mM y 0.3 mM, respectivamente (Fig. 6-A y B, trazos d) el  $\Delta\psi$  fue tan estable como el control realizado en presencia de  $PO_4^{2-}$  4 mM (Fig. 6-A y B, trazos f). Estos resultados demuestran que si se agregan juntos, el  $Ca^{2+}$  y el  $Mg^{2+}$  estabilizan el  $\Delta\psi$  más eficientemente que cada uno de los cationes por separado, apoyando la idea de que ambos cationes actúan aditivamente para cerrar el YMUC.



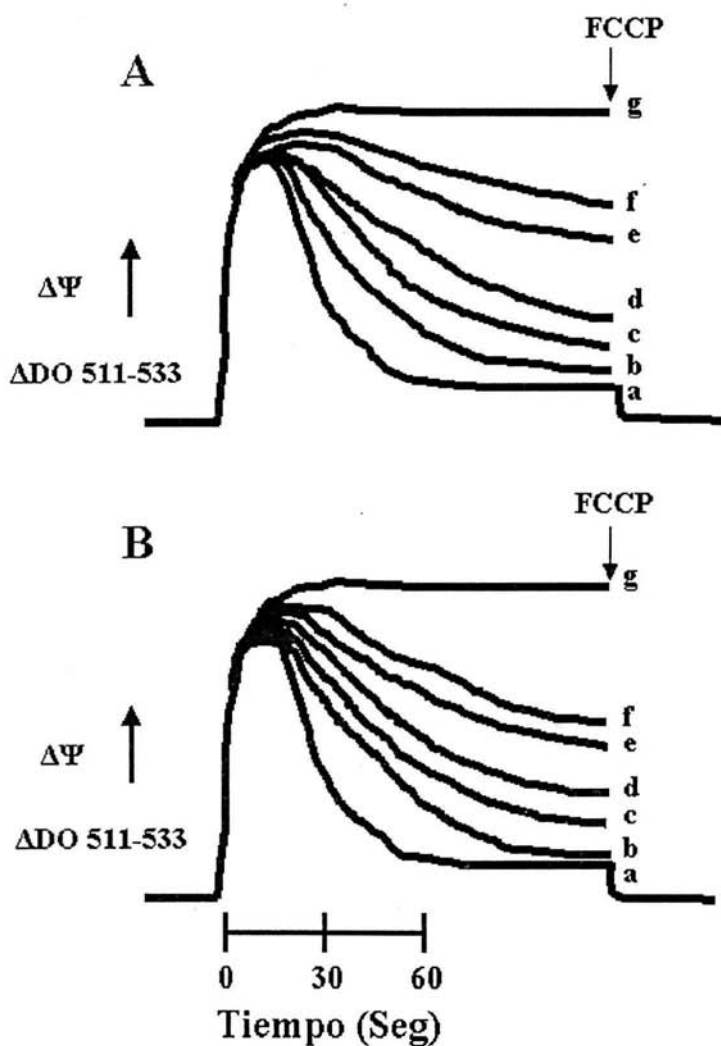


Fig. 5. Efecto de diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$  sobre el potencial transmembranal en mitocondrias aisladas de levadura *S. cerevisiae*. Las condiciones experimentales fueron como en la Fig. 4, excepto que se agregó naranja de safranina 10  $\mu\text{M}$ . (A) Las adiciones de  $\text{Ca}^{2+}$  fueron: a, 0; b, 0.1 mM; c, 0.2 mM; d, 0.3 mM; e, 0.4 mM; f, 0.5 mM y g, control con  $\text{PO}_4^{2-}$  4 mM. (B) Las adiciones de  $\text{Mg}^{2+}$  fueron: a, 0; b, 0.2 mM; c, 0.4 mM; d, 0.6 mM; e, 0.8 mM, f, 1 mM y g, control con  $\text{PO}_4^{2-}$  4 mM.

### Inhibición del hinchamiento mitocondrial por calcio y magnesio

En condiciones de YMUC abierto; la captación de  $K^+$  promueve hinchamiento mitocondrial dependiente de energía [Castrejón y cols., 1997]. Así, para determinar si el  $Ca^{2+}$  y el  $Mg^{2+}$  cierran el YMUC, evaluamos el hinchamiento mitocondrial en presencia de  $PO_4^{2-}$  0.4 mM. Como se esperaba por los experimentos de consumo de  $O_2$  y  $\Delta\psi$ , al aumentar la concentración de cada uno de los cationes probados el hinchamiento mitocondrial se inhibe gradualmente, de manera que con  $Ca^{2+}$  0.5 mM (Fig. 7-A trazo f) y  $Mg^{2+}$  1.0 mM (Fig. 7-B trazo f) el hinchamiento mitocondrial es mínimo, y aún a mayores concentraciones de cada catión no aumenta la inhibición del hinchamiento.

Al omitir el  $PO_4^{2-}$  del medio de reacción, la concentración necesaria de cada uno de los cationes para inhibir el hinchamiento aumentó dos órdenes de magnitud, de la misma forma que en los experimentos de consumo de  $O_2$  y  $\Delta\psi$  (Resultados no mostrados).

Por otro lado, probamos si el  $Ca^{2+}$  y el  $Mg^{2+}$  muestran efectos sinérgicos o aditivos sobre la inhibición del hinchamiento. Los resultados muestran que en presencia de  $Mg^{2+}$  0.5 mM o 1 mM y diferentes  $[Ca^{2+}]$ , el hinchamiento se inhibió a  $Ca^{2+}$  0.3 mM, más que cuando el  $Ca^{2+}$  se agregó sólo, aún a mayor concentración. Los resultados de este experimento son comparables a los obtenidos con el  $\Delta\psi$  (Fig. 6) y sugieren un efecto aditivo de ambos cationes.

Mediante los mismos experimentos de consumo de  $O_2$ ,  $\Delta\psi$  e hinchamiento mitocondrial, encontramos que otros cationes divalentes como el  $Mn^{2+}$  y el  $Zn^{2+}$ , que se agregaron para determinar si el efecto de los cationes divalentes sobre el YMUC podría ser generalizado; también actuaron como bloqueadores del YMUC, aunque sus efectos no son muy claros y la inhibición de la apertura del YMUC en ambos casos es sólo parcial y menor que la observada con  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  (Datos no mostrados).

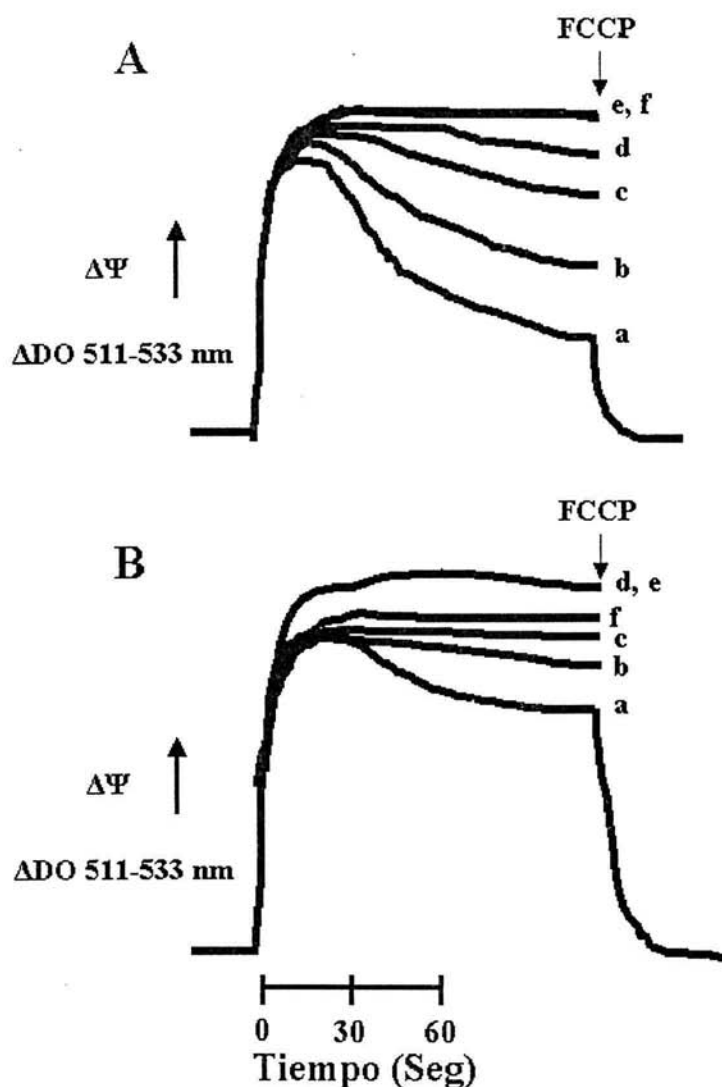


Fig. 6. Efecto de diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre el  $\Delta\Psi$  en mitocondrias aisladas de *S. cerevisiae*, ensayado a dos concentraciones fijas de  $\text{Mg}^{2+}$ . Las condiciones experimentales fueron como en la Fig. 5. (A) 0.5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , (B) 1.0 mM  $\text{Mg}^{2+}$ . Las adiciones de  $\text{Ca}^{2+}$  fueron: a, 0; b, 0.1 mM; c, 0.2 mM; d, 0.3 mM y e, 0.4 mM y f, control con  $\text{PO}_4^{2-}$  4 mM.

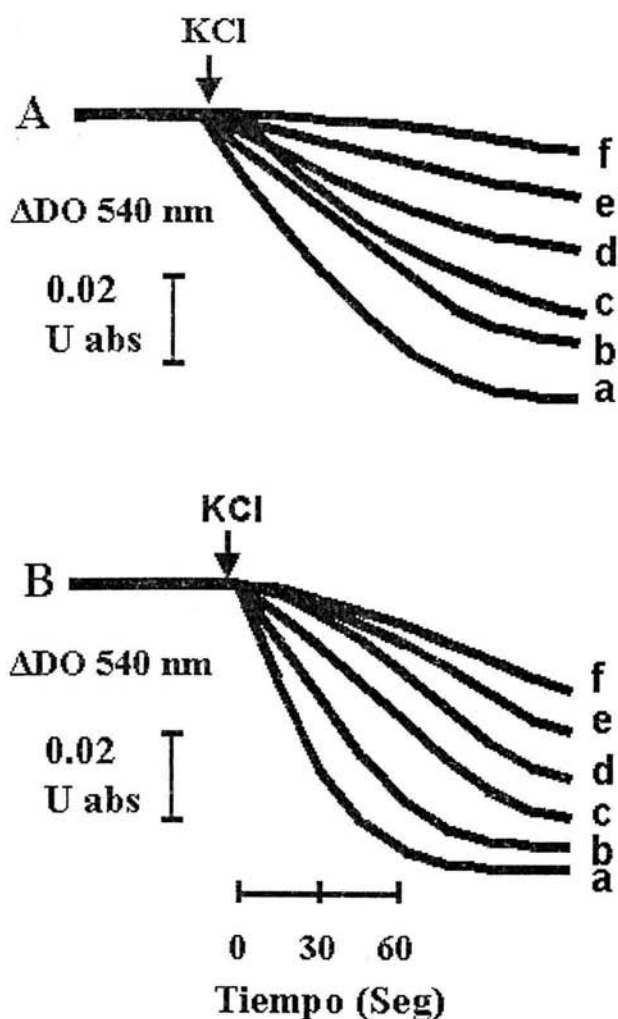


Fig. 7. Efecto de diferentes concentraciones de  $Ca^{2+}$  ó  $Mg^{2+}$  sobre el hinchamiento en mitocondrias aisladas de levadura. Mezcla de reacción como en la Fig. 5, excepto que no se agregó el naranja de safranina. (A) Las concentraciones de  $Ca^{2+}$  fueron: a, 0; b, 0.1 mM; c, 0.2 mM; d, 0.3 mM; e, 0.4 mM y f, 0.5 mM. (B) Las concentraciones de  $Mg^{2+}$  fueron: a, 0; b, 0.2 mM; c, 0.4 mM; d, 0.6 mM; e, 0.8 mM y f, 1 mM.

### **Acoplamiento del consumo de oxígeno por alquilguanidinas.**

Como con los cationes divalentes no se puede descartar que el efecto sobre la mitocondria no se deba a efecto de neutralización de cargas de superficie, para estudiar este fenómeno buscamos un compuesto con carga positiva, que pudiera anclarse a la membrana externa mitocondrial y nos permitiera evaluar sus efectos sobre la permeabilidad mitocondrial. Con este objetivo, se evaluó el efecto de dos alquilguanidinas. La etilguanidina y la butilguanidina no modificaron el acoplamiento mitocondrial. Sin embargo, ambas, HG y OG promovieron un aumento del CR dependiente de la concentración. Sus efectos fueron similares a los observados con  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , excepto que las concentraciones necesarias para acoplar a las mitocondrias son más bajas: la HG 25  $\mu\text{M}$  y OG 12.5  $\mu\text{M}$  promovieron el máximo aumento en el CR (Tabla 3). Como se esperaba por los datos encontrados en la literatura [Pressman, 1963; Papa y cols., 1975], las concentraciones mayores a las empleadas aquí inhiben la respiración mitocondrial y ya no aumentan el CR (Resultados no mostrados). Por ello, las concentraciones usadas para los siguientes experimentos fueron hexilguanidina 25  $\mu\text{M}$  y octilguanidina 12.5  $\mu\text{M}$  o menores.

### **Estabilización del potencial transmembranal por alquilguanidinas**

También se evaluó el efecto acoplante de la HG y de la OG determinando el  $\Delta\psi$ . Con respecto a estos cationes, se observó que al aumentar gradualmente las [HG] (Fig. 8-A) y [OG] (Fig. 8-B) se estabiliza el  $\Delta\psi$  en forma dependiente de la concentración y se logra su completa estabilización a una [HG] 25  $\mu\text{M}$  (Fig. 8-A trazo e) y [OG] 12.5  $\mu\text{M}$  (Fig 8-B trazo e) en presencia de  $\text{P}_0_4$  0.4 mM.

### **Inhibición del hinchamiento mitocondrial por alquilguanidinas.**

De la misma manera que se evaluó el efecto de la HG y de la OG sobre el consumo de oxígeno y sobre el  $\Delta\psi$ , evaluamos el efecto sobre el hinchamiento mitocondrial. Ambos cationes inhibieron el hinchamiento mitocondrial, de manera dependiente de la concentración (Fig. 9), donde la mayor inhibición del hinchamiento se observó en presencia de HG 25  $\mu\text{M}$  (Fig. 9-A trazo f) o de OG 12.5  $\mu\text{M}$  (Fig. 9-B trazo f).

Mayores concentraciones no promueven mayor inhibición del hinchamiento (resultados no mostrados).

**Tabla 3**

Efecto de diferentes concentraciones de hexilguanidina ó de octilguanidina sobre la velocidad de consumo de O<sub>2</sub> y el control respiratorio en mitocondrias aisladas de levadura *S. cerevisiae*.

[HG]	Estado 3	Estado 4	CR	[OG]	Estado 3	Estado 4	CR
μM	ngatO <sub>2</sub> (min.mg prot.) <sup>-1</sup>		E3/E4	μM	ngatO <sub>2</sub> (min.mg prot.) <sup>-1</sup>		E3/E4
0	258 ± 10	213 ± 9	1.2 ± 0.1	0	258 ± 8	213 ± 9	1.2 ± 0.1
5	273 ± 9	195 ± 12	1.4 ± 0.1	2.5	277 ± 10	198 ± 12	1.4 ± 0.1
10	290 ± 12	180 ± 10	1.6 ± 0.1	5	296 ± 11	185 ± 9	1.6 ± 0.1
15	306 ± 10	173 ± 11	1.8 ± 0.1	7.5	313 ± 12	175 ± 13	1.8 ± 0.2
20	317 ± 13	167 ± 10	1.9 ± 0.1	10	322 ± 11	168 ± 10	1.9 ± 0.1
25	321 ± 12	163 ± 13	2.0 ± 0.2	12.5	327 ± 10	165 ± 11	2.0 ± 0.1

La mezcla de reacción fue como en la Fig. 2, excepto por las concentraciones de hexilguanidina y octilguanidina. El estado 3 se indujo mediante la adición de ADP 150 μM. Cada dato es la media de 5 determinaciones ± D. S.

Los resultados obtenidos con las alquilguanidinas sugieren que un compuesto con menor hidrofobicidad es menos eficiente para cerrar al YMUC, probablemente porque su anclaje es más fácilmente desplazado de la membrana mitocondrial cuando se depleta el Δψ; los resultados indican que la octilguanidina cierra el YMUC con la mitad de la concentración requerida de hexilguanidina y que las alquilguanidinas de cadena más corta (con 2 y 4 átomos de carbono) no tienen ningún efecto sobre el YMUC, aún a concentraciones excesivamente altas (resultados no mostrados).

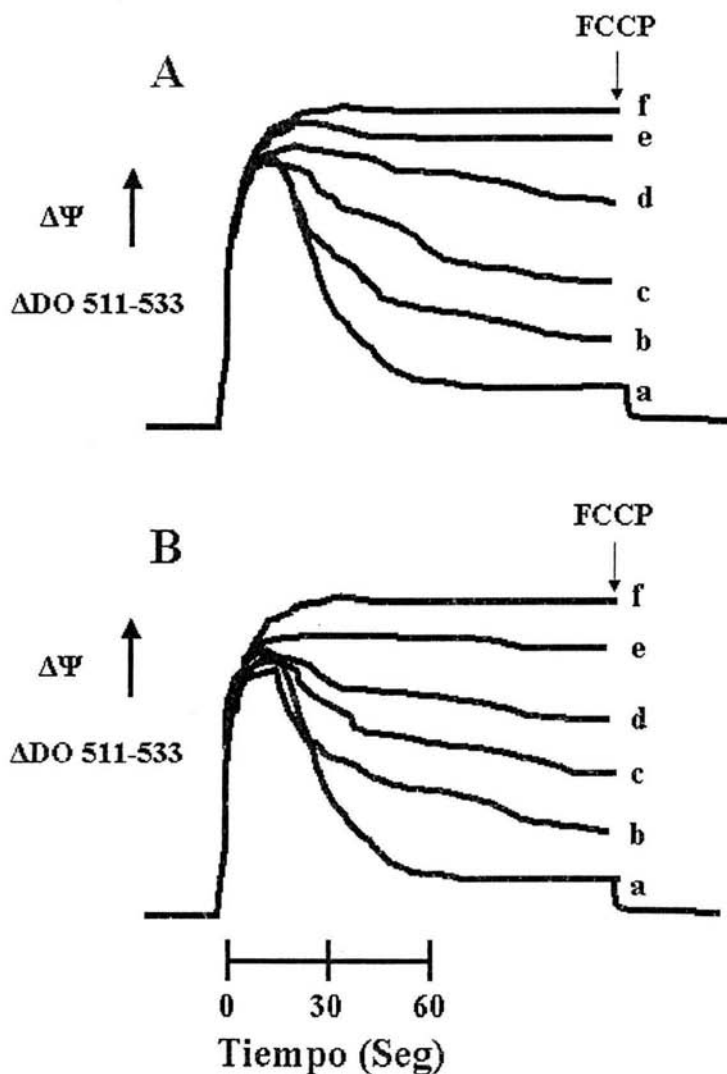


Fig. 8. Efecto de diferentes concentraciones de hexilguanidina u octilguanidina sobre el  $\Delta\Psi$  en mitocondrias aisladas de *S. cerevisiae*. Las condiciones experimentales son como en la Fig. 5. (A) Las adiciones de HG fueron: a, 0; b, 5  $\mu\text{M}$ ; c, 10  $\mu\text{M}$ ; d, 15  $\mu\text{M}$ ; e, 20  $\mu\text{M}$  y f, 25  $\mu\text{M}$ . (B) Las adiciones de OG fueron a, 0; b, 2.5  $\mu\text{M}$ ; c, 5  $\mu\text{M}$ ; d, 7.5  $\mu\text{M}$ ; e, 10  $\mu\text{M}$  y f, 12.5  $\mu\text{M}$ .

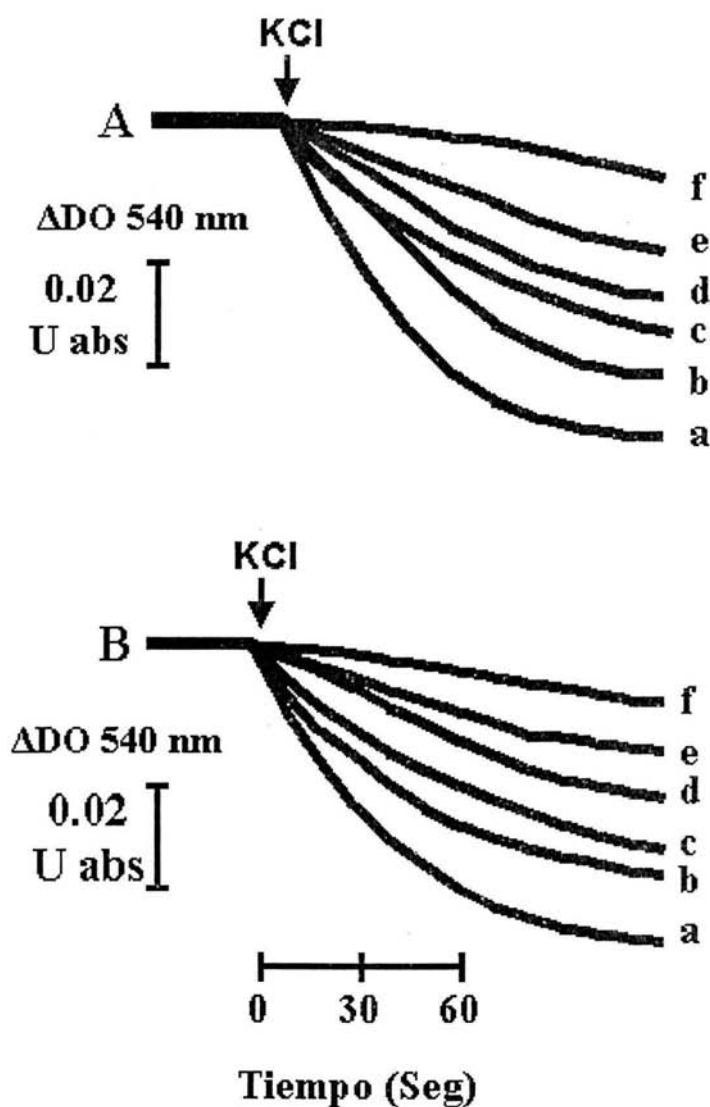


Fig. 9. Efecto de hexilguanidina ó de octilguanidina sobre la velocidad de hinchamiento de mitocondrias aisladas de *S. cerevisiae*. La mezcla de reacción fue como en la Fig. 7. (A) Las adiciones de HG fueron: a, 0; b, 5  $\mu M$ ; c, 10  $\mu M$ ; d, 15  $\mu M$ ; e, 20  $\mu M$  y f, 25  $\mu M$ . (B) Las adiciones de OG fueron: a, 0; b, 2.5  $\mu M$ ; c, 5  $\mu M$ ; d, 7.5  $\mu M$ ; e, 10  $\mu M$  y f, 12.5  $\mu M$ .



### La unión de los cationes divalentes al YMUC depende del $\Delta\Psi$

Para estudiar los mecanismos de la interacción catión/YMUC, se decidió probar si la unión del  $\text{Ca}^{2+}$ , el  $\text{Mg}^{2+}$  o las alquilguanidinas al YMUC es dependiente del  $\Delta\Psi$ . Para ello evaluamos la reconstrucción mitocondrial mediada por polietilén-glicol (PEG) en presencia de cada uno de los efectores. Los PEGs de diferentes pesos moleculares se han usado para estimar el tamaño del PTP [Pfeiffer y cols., 1995] o para inducir reconstrucción de las mitocondrias de mamífero previamente hinchadas [Haworth y Hunter, 1979]. Además, en mitocondrias de levadura, los PEGs se han utilizado para examinar las propiedades de exclusión por tamaño del YMUC [Jung y cols., 1997]. Así, para determinar el estado de apertura del YMUC en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , HG ó OG, examinamos el efecto de 4 diferentes PEGs sobre las mitocondrias hinchadas y abatido el  $\Delta\Psi$ . La lógica era que cuando el YMUC se encuentra cerrado, las mitocondrias hinchadas y cargadas con KCl recuperarían su impermeabilidad y no responderían al aumentar la osmolaridad externa, es decir, se inhibiría la reconstrucción.

Las mitocondrias se incubaron por dos minutos en presencia de  $\text{PO}_4^{2-}$  0.4 mM, KCl 20 mM y etanol 1 $\mu$ l/ml, lo cual generó hinchamiento mitocondrial y abatimiento del  $\Delta\Psi$ . Una vez que la mitocondria alcanzó su hinchamiento máximo, agregamos cada uno de los efectores del YMUC. Después de 30 segundos de incubación se agregó un PEG de diferente peso molecular para inducir la reconstrucción de las mitocondrias (Fig. 10).

En el control se observó que los PEGs de 0.4 kDa (Fig. 10-A, trazo b) o 0.6 kDa (Fig. 10-B, trazo c), que se ha reportado que permean a través del YMUC abierto [Jung y cols., 1997], promovieron sólo una ligera contracción mitocondrial. Por el contrario, la adición de los PEGs de mayor peso molecular, de 1.0 kDa (Fig. 10-A, trazo d) o 1.45 kDa (Fig. 10-A, trazo e), respectivamente, indujeron un alto porcentaje de reconstrucción. Se ha sugerido que la reconstrucción ocurre cuando el PEG que se agrega no puede atravesar la membrana y aumenta la osmolaridad externa, forzando a la mitocondria a liberar KCl y agua de la matriz. Por el contrario, cuando los mismos PEGs se probaron después de la adición de  $\text{PO}_4^{2-}$  4 mM (Fig. 10-B), el cual se cierra el YMUC [Castrejón y cols., 1997], con ninguno de los PEGs

se observó reconstrucción mitocondrial, indicando que el  $\text{PO}_4^{2-}$  cierra al YMUC e inhibe la salida de KCl y agua (Fig. 10-B). Cuando se probó cada catión para determinar su efecto sobre la reconstrucción, se observó que el  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 10-C), el  $\text{Mg}^{2+}$  (resultados no mostrados) y la HG (resultados no mostrados) generaron sólo una ligera inhibición de la reconstrucción mitocondrial mediada por cada uno de los PEGs. Por el contrario, la OG fue tan eficiente como el  $\text{PO}_4^{2-}$  para inhibir la reconstrucción mitocondrial mediada por PEG, sugiriendo que ésta sí es capaz de cerrar el YMUC aún en las mitocondrias desacopladas que no tienen  $\Delta\Psi$  (Fig. 10-D).

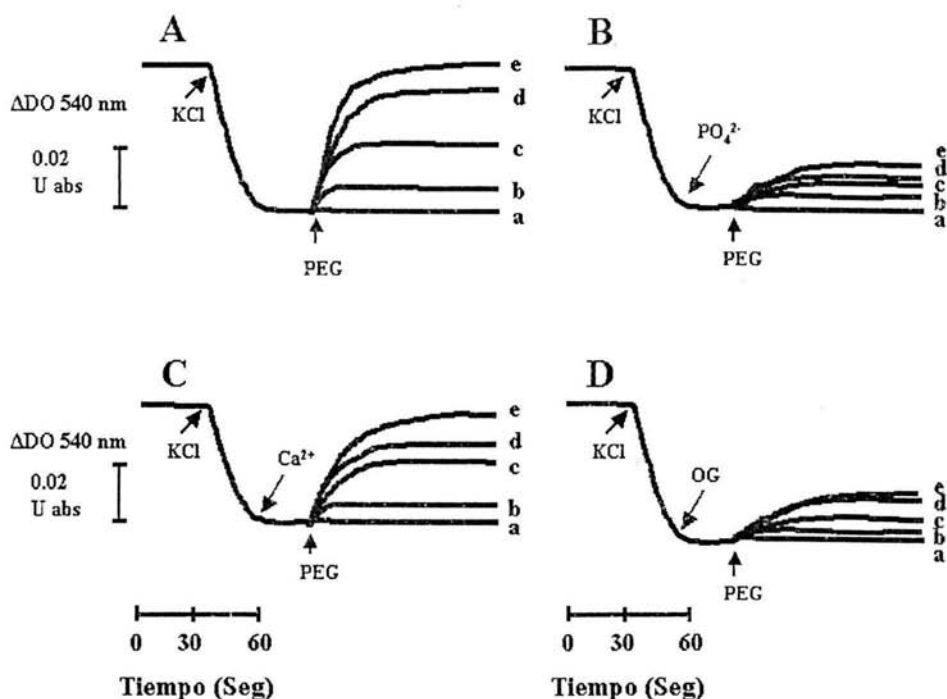


Fig. 10. Reconstrucción mediada por polietilenglicoles de diferentes pesos moleculares en mitocondrias de *S. cerevisiae*. Efecto del  $\text{PO}_4^{2-}$ , el  $\text{Ca}^{2+}$  y la octilguanidina. Mezcla de reacción: manitol 0.3 M, MES 5 mM, pH 6.8, etanol 1  $\mu\text{mL}$ ,  $\text{PO}_4^{2-}$  0.4 mM, pH 6.8. El KCl 20 mM se agregó donde indica la flecha. Después de que ocurrió el hinchamiento, se agregaron los diferentes efectores: (A) Ninguno, (B)  $\text{PO}_4^{2-}$  4 mM, (C)  $\text{Ca}^{2+}$  0.6 mM y (D) OG 15  $\mu\text{M}$ . Después de 30 s de incubación se agregaron los PEGs de diferentes pesos moleculares para aumentar la osmolaridad hasta 0.6 OsM: a, 0; b, 0.4 kDa; c, 0.6 kDa; d, 1 kDa, y e, 1.45 kDa. Las concentraciones de cada uno de los PEGs fueron 199 mM para el PEG de 0.4 kDa, 172 mM para el PEG de 0.6 kDa, 136 mM para el PEG de 1.0 kDa y 111 mM para el PEG de 1.45 kDa [Pfeiffer y cols., 1995].

Esto sugiere que la interacción catión/YMUC está favorecida por el  $\Delta\Psi$  y en reciprocidad, el  $\Delta\Psi$  se mantiene por la interacción catión/YMUC. En el caso de la OG, la interacción entre la membrana y la cola hidrofóbica de carbonos probablemente resulta en el anclaje de la molécula en su sitio de acción, estabilizando la unión aún en ausencia de  $\Delta\Psi$ .

## LOS MITOPLASTOS Y LAS MITOCONDRIAS $\Delta$ por1 PIERDEN LA SENSIBILIDAD AL CALCIO

### El $\text{Ca}^{2+}$ no modifica la apertura del megacanal inespecífico en mitoplastos

Con respecto al sitio de unión de los cationes divalentes, diferentes autores han reportado que la proteína VDAC, localizada en la membrana externa mitocondrial regula la permeabilidad de esta membrana a iones y metabolitos que pasan a través de los barriles beta de la proteína [Colombini., 1979; Vander Heiden., 2001]. Además, se ha sugerido que la porina tiene sitios de unión para  $\text{Ca}^{2+}$  que regulan su apertura [Gincel y cols., 2001]. Para determinar si la porina mitocondrial participa en la regulación del YMUC, decidimos eliminar la membrana externa de las mitocondrias aisladas de levadura *S. cerevisiae* para obtener mitoplastos y en ellos determinar el efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre el consumo de oxígeno, el  $\Delta\Psi$  y el hinchamiento mitocondrial.

Los mitoplastos de *S. cerevisiae* incubados en presencia de  $\text{PO}_4^{2-}$  0.4 mM y en ausencia de cationes consumieron  $248 \pm 12 \text{ ngatO}_2 (\text{min.mg prot})^{-1}$  en estado 4 y  $256 \pm 15 \text{ ngatO}_2 (\text{min.mg prot})^{-1}$  en estado desacoplado, dando un CR de 1.0. La adición de  $\text{Ca}^{2+}$  a las mismas concentraciones que las utilizadas en las mitocondrias, no modificó el consumo de  $\text{O}_2$  en el estado desacoplado ni en el estado 4, manteniéndose en  $248 \pm 12 \text{ ngatO}_2 (\text{min.mg prot})^{-1}$  en estado 4 y  $256 \pm 15 \text{ ngatO}_2 (\text{min.mg prot})^{-1}$  en estado desacoplado, lo que indica que se perdió la sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que se conserva la sensibilidad al  $\text{PO}_4^{2-}$ , ya que los mitoplastos en presencia de  $\text{PO}_4^{2-}$  4 mM disminuyen su consumo de  $\text{O}_2$  hasta  $171 \pm 10 \text{ ngatO}_2 (\text{min.mg prot})^{-1}$  en estado 4 y se mantiene en  $258 \pm 12 \text{ ngatO}_2 (\text{min.mg prot})^{-1}$  en estado desacoplado, aumentando su U/4 hasta 1.5.

Si eliminamos de la mitocondria el sitio de unión para  $\text{Ca}^{2+}$ , esperamos que este catión no pueda restaurar el potencial transmembranal. Los mitoplastos, en presencia de  $\text{KCl}$  20 mM y  $\text{PO}_4^{2-}$  0.4 mM no mantienen el  $\Delta\Psi$  (figura 11, trazo a), pero sí lo mantienen en presencia de  $\text{PO}_4^{2-}$  4 mM (Figura 11, trazo c). La adición de diferentes  $[\text{Ca}^{2+}]$  en presencia de  $\text{PO}_4^{2-}$  0.4 mM, no generó ningún cambio en el potencial transmembranal. En los mitoplastos, la mayor  $[\text{Ca}^{2+}]$  utilizada (0.6 mM), no tuvo ningún efecto (Fig. 11 trazo b), contrario a lo observado en las mitocondrias (Fig. 5). Esto sugiere que al eliminar la membrana externa, y por ende, eliminar las proteínas de esta membrana, el espacio intermembranal y probablemente algunas proteínas del lado externo de la membrana interna de la mitocondria se pierde la sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$ , pero no al  $\text{PO}_4^{2-}$ .

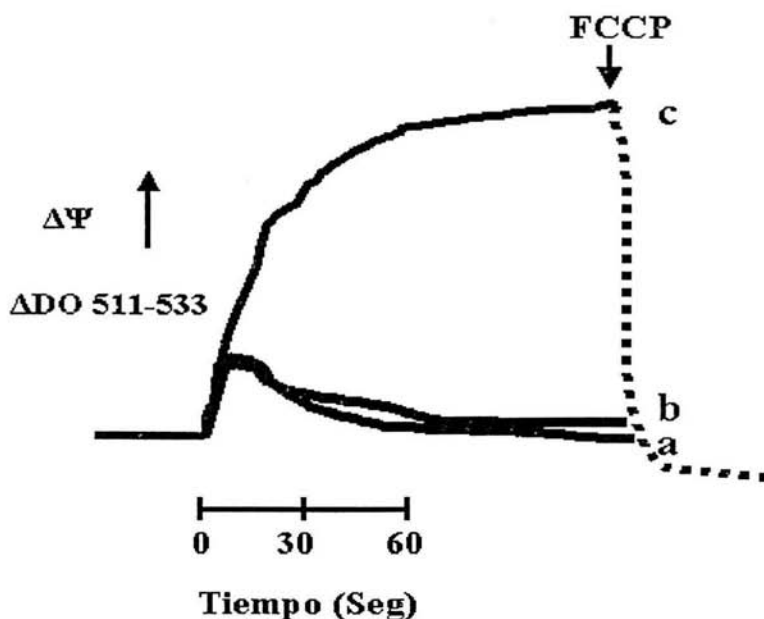


Fig. 11. Efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre el potencial transmembranal en mitoplastos de *S. cerevisiae*. La mezcla de reacción fue como en la Fig. 5. Las adiciones fueron: a,  $\text{PO}_4^{2-}$  0.4 mM; b,  $\text{PO}_4^{2-}$  0.4 mM más  $\text{Ca}^{2+}$  600  $\mu\text{M}$  y c,  $\text{PO}_4^{2-}$  4 mM.

Al medir hinchamiento, los mitoplastos, incubados bajo las mismas condiciones que las mitocondrias, se hinchan al agregar KCl 20 mM (Fig. 12 trazo a) y el  $\text{PO}_4$  4 mM inhibe el hinchamiento de los mitoplastos en presencia de KCl como ocurre en las mitocondrias; sin embargo, en presencia de  $\text{PO}_4$  0.4 mM, diferentes  $[\text{Ca}^{2+}]$  desde 0.2 mM hasta 0.6 mM (Fig. 12 trazos b-g) no inhiben el hinchamiento en los mitoplastos, inhibición que sí se observa en el control en presencia de  $\text{PO}_4^{2-}$  4 mM (Fig. 12 trazo h). Este experimento se realizó también como control en las mitocondrias a partir de las cuales se prepararon los mitoplastos y los resultados fueron como los reportados en la figura 7.

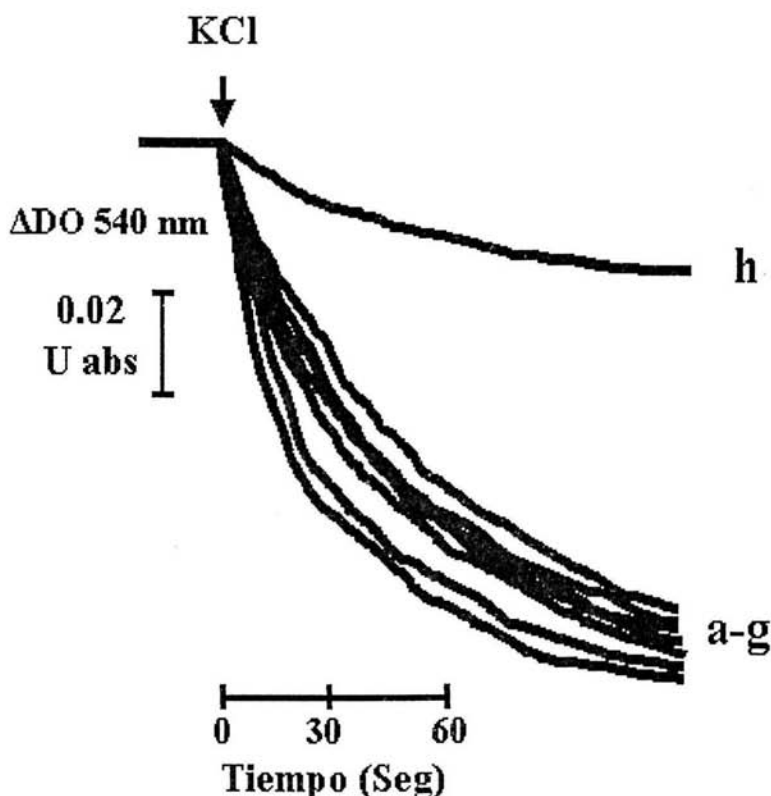


Fig. 12. Efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre el hinchamiento en mitoplastos de *S. cerevisiae*. La mezcla de reacción fue como en la Fig.7. Las adiciones de  $\text{Ca}^{2+}$  fueron: a, 0; b, 0.1 mM; c, 0.2 mM; d, 0.3 mM; e, 0.4 mM; f, 0.5 mM; g, 0.6 mM y h,  $\text{PO}_4^{2-}$  4 mM.

### El $\text{Ca}^{2+}$ cierra el megacanal inespecífico mitocondrial a través de la porina.

Los resultados obtenidos en los mitoplastos sugieren la participación de un componente de la membrana externa mitocondrial, del espacio intermembranal, o bien del lado externo de la membrana interna, en la regulación de la permeabilidad mitocondrial. Un sitio en el cual se ha propuesto que se puede unir el  $\text{Ca}^{2+}$  para cerrar al YMUC en mitocondrias es la porina, localizada en la membrana externa [Gincel y cols., 2001]. Además, está reportado que el  $\text{Ca}^{2+}$  en combinación con el  $\text{Mg}^{2+}$  aumentan la unión de la porina a la creatina cinasa mitocondrial [Schlattner y cols., 2001]. Para analizar la posible participación de la porina como un elemento regulador en la estructura del YMUC, obtuvimos mitocondrias de la cepa B-7553 y de su mutante carente de porina ( $\Delta\text{por1}$ ). La lógica es que si la porina es el sitio a través del cual el  $\text{Ca}^{2+}$  regula la apertura del YMUC, las mitocondrias de la cepa silvestre deben responder al  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de  $\text{PO}_4^{2-}$  0.4 mM manteniendo un cociente respiratorio y un  $\Delta\psi$  elevado mientras que en las mitocondrias de la mutante  $\Delta\text{por1}$  se debe perder la sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  y mantener el YMUC abierto en ausencia y presencia de  $\text{PO}_4^{2-}$  0.4 mM.

El consumo de  $\text{O}_2$  en mitocondrias de la cepa silvestre B-7553 y en mitocondrias de la  $\Delta\text{por1}$  se determinó en presencia de dos diferentes [ $\text{PO}_4^{2-}$ ] (4.0 mM y 0.4 mM) en ausencia de cualquier catión como control y en presencia de  $\text{PO}_4^{2-}$  0.4 mM más diferentes [ $\text{Ca}^{2+}$ ]. En estas cepas se determinó el consumo de  $\text{O}_2$  en estado 4 y en estado desacoplado ya que la  $\Delta\text{por1}$  no capta eficientemente el ADP para establecer el estado 3. Las mitocondrias de la B-7553 en presencia de  $\text{PO}_4^{2-}$  4 mM consumen  $396 \pm 15 \text{ ngatO}_2 (\text{min.mg prot})^{-1}$  en estado desacoplado y  $180 \text{ ngatO}_2 (\text{min.mg prot})^{-1}$  en estado 4, con una relación estado desacoplado/estado 4 (U/4) de 2.2, mientras que en presencia de  $\text{PO}_4^{2-}$  0.4 mM el consumo de  $\text{O}_2$  fue de  $306 \text{ ngatO}_2 (\text{min.mg prot})^{-1}$  en estado desacoplado y  $306 \text{ ngatO}_2 (\text{min.mg prot})^{-1}$  en estado 4, dando un relación U/4 de 1.0 (Tabla 4). Al agregar las diferentes [ $\text{Ca}^{2+}$ ] desde 0.2 hasta 1 mM, en presencia de  $\text{PO}_4^{2-}$  0.4 mM, el U/4 aumentó gradualmente hasta llegar a 1.7. El consumo de  $\text{O}_2$  en estado 4 y estado desacoplado con las diferentes [ $\text{Ca}^{2+}$ ] se muestra en la Tabla 4.

**Tabla 4**

Efecto de diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la velocidad de consumo de  $\text{O}_2$  y control respiratorio en mitocondrias aisladas de la cepa de laboratorio B-7553 y la B-10610 de *S. cerevisiae*.

B-7553				B-10610 ( $\Delta\text{por1}$ )			
$[\text{Ca}^{2+}]$	U	Estado 4	U/4	$[\text{Ca}^{2+}]$	U	Estado 4	U/4
mM	$\text{ngatO}_2 (\text{min.mg prot.})^{-1}$		EU/E4	mM	$\text{ngatO}_2 (\text{min.mg prot.})^{-1}$		EU/E4
0	$306 \pm 12$	$306 \pm 11$	$1.0 \pm 0.1$	0	$365 \pm 8$	$331 \pm 11$	$1.1 \pm 0.1$
0.2	$300 \pm 10$	$218 \pm 10$	$1.4 \pm 0.1$	0.2	$362 \pm 10$	$328 \pm 9$	$1.1 \pm 0.1$
0.4	$309 \pm 9$	$193 \pm 12$	$1.6 \pm 0.1$	0.4	$366 \pm 11$	$322 \pm 13$	$1.1 \pm 0.1$
0.6	$306 \pm 11$	$180 \pm 9$	$1.7 \pm 0.1$	0.6	$353 \pm 12$	$327 \pm 13$	$1.1 \pm 0.1$
0.8	$317 \pm 13$	$186 \pm 9$	$1.7 \pm 0.1$	0.8	$358 \pm 11$	$329 \pm 12$	$1.1 \pm 0.1$
1.0	$313 \pm 11$	$196 \pm 10$	$1.6 \pm 0.1$	1.0	$360 \pm 10$	$321 \pm 10$	$1.1 \pm 0.1$

La mezcla de reacción fue como en la Tabla 2, excepto que ahora la determinación se realizó sólo en presencia de las concentraciones indicadas de  $\text{Ca}^{2+}$ . El estado desacoplado se indujo por la adición de FCCP  $6 \mu\text{M}$ . Cada número representa la media de 4 determinaciones  $\pm$  S. D.

La disminución del consumo de oxígeno en estado 4, como se muestra en esta tabla, sugiere que el  $\text{Ca}^{2+}$  también cierra el YMUC en la cepa de laboratorio B-7553 como ocurrió en las mitocondrias de la cepa comercial.

En las mitocondrias  $\Delta\text{por1}$  se obtuvo un consumo de  $\text{O}_2$  en el estado 4 ligeramente mayor que en las mitocondrias de la B-7553. El consumo de  $\text{O}_2$  de las mitocondrias  $\Delta\text{por1}$  en presencia de  $\text{PO}_4^{2-}$  4 mM fue de  $238 \text{ ngatO}_2 (\text{min.mg prot.})^{-1}$  en estado 4 y  $406 \text{ ngatO}_2 (\text{min.mg prot.})^{-1}$  en estado desacoplado, con un U/4 de 1.7. En presencia de  $\text{PO}_4^{2-}$  0.4 mM el consumo de  $\text{O}_2$  fue  $331 \text{ ngatO}_2 (\text{min.mg prot.})^{-1}$  en estado 4 y  $365 \text{ ngatO}_2 (\text{min.mg prot.})^{-1}$  en estado desacoplado, con un U/4 de 1.1. Al agregar las diferentes  $[\text{Ca}^{2+}]$ , desde 0.2 mM hasta 1 mM, observamos que estas mitocondrias no son sensibles al  $\text{Ca}^{2+}$ , ya que éste no modifica el consumo de  $\text{O}_2$  con respecto al control con  $\text{PO}_4^{2-}$  0.4 mM (Tabla 4).

Estos primeros resultados de consumo de  $O_2$  en mitocondrias aisladas de la cepa  $\Delta por1$  sugieren que el efecto acoplante del  $Ca^{2+}$  se lleva a cabo a través de la porina mitocondrial, ya que su ausencia resultó en la pérdida de la sensibilidad a  $Ca^{2+}$  del consumo de  $O_2$ . Este fenómeno no ocurrió en la cepa B-7553 (Tabla 3).

Para comprobar si las mitocondrias de la cepa  $\Delta por1$  son insensibles al  $Ca^{2+}$  y por ello no se modifica el consumo de oxígeno en su presencia, indicando que éste no cierra el YMUC, decidimos evaluar el  $\Delta\psi$  en las mitocondrias  $\Delta por1$  y B-7553 y comparar los resultados con los obtenidos en la cepa industrial. Las mitocondrias de la cepa B-7553 incubadas en presencia de  $PO_4^{2-}$  0.4 mM y KCl 20 mM pierden el  $\Delta\psi$  en ausencia de  $Ca^{2+}$  (Fig. 13-A trazo a), mientras que la adición de diferentes  $[Ca^{2+}]$  protege el  $\Delta\psi$  (Fig. 13-A trazos b-e), alcanzando un  $\Delta\psi$  comparable al control con  $PO_4^{2-}$  4 mM (Fig. 13-A trazo f) como ocurrió en las mitocondrias de la cepa industrial (Fig. 5).

En las mitocondrias  $\Delta por1$ , donde esperábamos perder la sensibilidad al  $Ca^{2+}$ , los controles con  $PO_4^{2-}$  0.4 mM y  $PO_4^{2-}$  4 mM (Figura 13-B trazos a y g), arrojaron resultados similares a los obtenidos en las mitocondrias de la cepa industrial y de la cepa B-7553. Sin embargo, las adición de  $Ca^{2+}$  a diferentes concentraciones, desde 0.1 mM hasta 0.6 mM no protegió el  $\Delta\psi$  (Fig. 13 trazos b-f).

La pérdida de la sensibilidad al  $Ca^{2+}$  observada en mitocondrias de la cepa  $\Delta por1$  de *S. cerevisiae* como en los mitoplastos de la cepa industrial indican que un fuerte candidato como el sitio de unión para  $Ca^{2+}$  que cierra al YMUC es la porina. Además existe el antecedente de las mitocondrias de mamífero, donde el  $Ca^{2+}$  desencadena la apertura del PTP al unirse a un sitio para cationes divalentes [Gincel y cols., 2001] y donde esta proteína es un componente del PTP [Crompton 1999]. Adicionalmente, si el  $Ca^{2+}$  se une al VDAC, como lo hace en el PTP y de esta manera cierra al YMUC, el VDAC, podría ser un componente del YMUC.



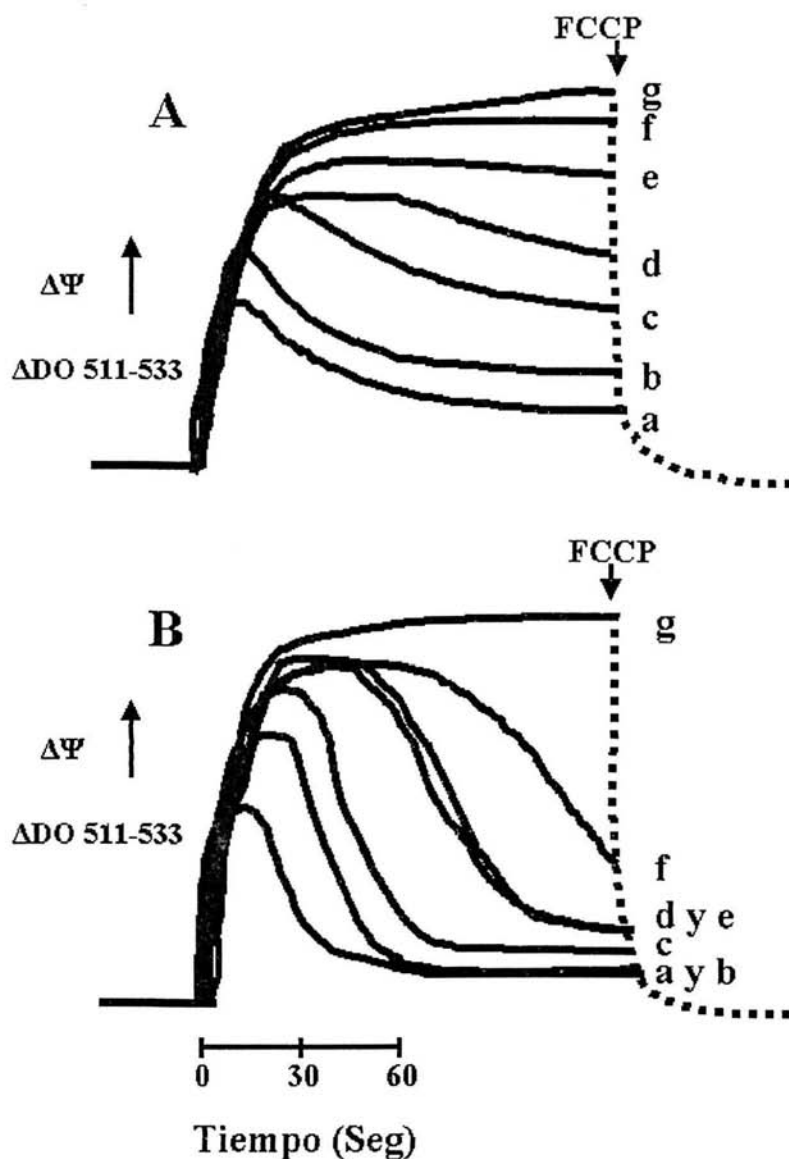


Fig. 13. Efecto de diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre el  $\Delta\Psi$  en mitocondrias aisladas de la cepa B-7553 y la  $\Delta\text{por1}$  de *S. cerevisiae*. Las condiciones experimentales fueron como en la Fig. 5. (A) mitocondrias de la cepa B7553. (B) Mitocondrias de la cepa  $\Delta\text{por1}$ . Las adiciones de  $\text{Ca}^{2+}$  fueron: a, 0; b, 0.2 mM; c, 0.3 mM; d, 0.4 mM; e, 0.5 mM; f, 0.6 mM y g, 4 mM  $\text{PO}_4^{2-}$ .

## DISCUSION

Los resultados presentados en este trabajo describen los efectos inhibitorios del  $\text{Ca}^{2+}$ , del  $\text{Mg}^{2+}$ , de la hexilguanidina y de la octilguanidina sobre la apertura del YMUC y la identificación de la porina como un fuerte candidato para el sitio de unión para  $\text{Ca}^{2+}$ . Los efectos del  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{Mg}^{2+}$  son aditivos, y su interacción con el YMUC depende de la presencia de  $\text{PO}_4^{2-}$  y del  $\Delta\psi$ . Los resultados obtenidos apoyan la idea de que la porina podría ser un componente del YMUC y presenta un sitio de interacción con  $\text{Ca}^{2+}$  y/o  $\text{Mg}^{2+}$  que resulta en el cierre del canal.

Como se mencionó en la introducción, la regulación, la estructura y la función del YMUC aún se encuentran en debate. Si la regulación del YMUC es similar al PTP y éste es regulado por dos sitios de unión a cationes divalentes [Bernardi y cols., 1993], el  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{Mg}^{2+}$  podrían regular al YMUC. Aquí demostramos que el  $\text{Ca}^{2+}$ , el  $\text{Mg}^{2+}$  y el  $\text{PO}_4^{2-}$  cierran al YMUC. Las concentraciones de  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{PO}_4^{2-}$  corresponden con las observadas en la célula, mientras que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  necesaria para cerrar el YMUC fue mayor a la fisiológica [Nakajima-Shimada, 1991].

El sitio de interacción en el YMUC es altamente sensible a la concentración de  $\text{PO}_4^{2-}$ , esto se puede observar por el hecho de que la inhibición de la apertura del YMUC ocurre sólo a muy altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$ , a menos que se agregue  $\text{PO}_4^{2-}$ . La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  necesaria para cerrar el YMUC disminuye al menos dos órdenes de magnitud en presencia de  $\text{PO}_4^{2-}$  0.4 mM. Por otro lado, la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  mostró efectos aditivos. Este efecto aditivo se observó en todos los parámetros probados. Los efectos aditivos de los tres efectores indican que el  $\text{Ca}^{2+}$  puede participar *in vivo* en la regulación del YMUC, ya que el  $\text{PO}_4^{2-}$  y el  $\text{Mg}^{2+}$  potencian el efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  y probablemente exista una concentración crítica de  $\text{PO}_4^{2-}$  en la cual los efectos del  $\text{Ca}^{2+}$  puedan ser observados a las concentraciones fisiológicas.

Si consideramos las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y de  $\text{Mg}^{2+}$  que cierran este canal inespecífico, es posible que tanto el PTP [Bernardi y cols., 1993] como el

YMUC (en este trabajo) puedan ser regulados fisiológicamente por estos cationes. Adicionalmente, se ha calculado que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  necesaria para inhibir la apertura del PTP en un 50% ( $I_{50}$ ) en mitocondrias de mamífero es 0.2 mM [Bernardi y cols., 1993] mientras que para el YMUC es 0.3 mM (Pérez-Vázquez y cols., 2003). Con respecto al  $\text{Mg}^{2+}$ , la  $I_{50}$  es 0.3 mM [Bernardi y cols., 1993], mientras que para el YMUC es 0.8 mM (Pérez-Vázquez y cols., 2003). Así el YMUC parece ser menos sensible a cationes divalentes, en comparación con el PTP.

Hay al menos otro ejemplo en mitocondrias de levadura donde se requiere una mayor  $[\text{Ca}^{2+}]$  que en mitocondrias de mamífero para controlar el mismo fenómeno. El antiportador  $\text{K}^+/\text{H}^+$  de mitocondrias de levadura se inhibe por concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $I_{50}$  0.82 mM) o  $\text{Mg}^{2+}$  ( $I_{50}$  2.08 mM) mayores [Welihinda y cols., 1993] que su contraparte en las mitocondrias de mamífero, que se inhibe por  $\text{Ca}^{2+}$  con una  $I_{50}$  de 12–18  $\mu\text{M}$  o por  $\text{Mg}^{2+}$  con un  $I_{50}$  de 50–65  $\mu\text{M}$ .

En la célula, el aumento en la concentración de  $\text{PO}_4^{2-}$  acompaña a la disminución de la carga energética. Así, el efecto bloqueador de  $\text{PO}_4^{2-}$  sobre el YMUC parece una adaptación lógica para aumentar la síntesis mitocondrial de ATP cuando es necesario. Una vez que se acumula el ATP, se promueve la apertura del YMUC, lo cual constituye un mecanismo típico de regulación negativa, acelerando el consumo de  $\text{O}_2$  como resultado de la disminución del  $\Delta\psi$ .

El efecto inductor del ATP sobre el YMUC ocurre probablemente a través de varios mecanismos: primero, por una interacción directa ATP/YMUC [Prieto y cols., 1992; Roucou y cols., 1997a]; segundo, secuestrando  $\text{Mg}^{2+}$  al formar la sal de ATP; y tercero, captando el  $\text{PO}_4^{2-}$  necesario para fosforilar ADP y formar ATP. Una alta carga energética podría resultar en la apertura del YMUC y la disipación de energía en forma de calor, mientras que una baja carga energética promovería el cierre del YMUC y el aumento de la velocidad de síntesis de ATP.

Es posible que el efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{Mg}^{2+}$  sobre el YMUC ocurra a través de una interacción directa, ya que los experimentos de  $\Delta\psi$ , hinchamiento mitocondrial (Figs. 5 a 9) y contracción de las mitocondrias previamente hinchadas (Fig. 10), realizados en ausencia de nucleótidos, permitieron seguir observando el cierre del YMUC. Si analizamos la propuesta de que existe un sitio de interacción para

cationes en el canal, es importante recordar que la probabilidad de apertura del PTP está regulada por dos sitios de unión a cationes divalentes: (i) un sitio interno, donde la unión del  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta la probabilidad de apertura, mientras que la unión de otros cationes divalentes ( $\text{Sr}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ ) tiene el efecto contrario [Bernardi y cols., 1993]; y (ii) un sitio externo, donde todos los cationes, incluso el  $\text{Ca}^{2+}$ , aumentan la probabilidad de que el poro se encuentre cerrado [Bernardi y cols., 1993]. Así, el  $\text{Ca}^{2+}$  extramitocondrial puede ser un inhibidor del PTP mientras que el  $\text{Ca}^{2+}$  de la matriz puede desencadenar la apertura del poro. De acuerdo a los resultados, en las mitocondrias de levadura podría existir sólo el equivalente al sitio externo para  $\text{Ca}^{2+}$  (y/o  $\text{Mg}^{2+}$ ) y así en la levadura el  $\text{Ca}^{2+}$ , podría cerrar el poro, sin ser capaz de promover la apertura (Fig. 14).

La interacción de los cationes divalentes con el YMUC depende del  $\Delta\Psi$ . Una vez eliminado el  $\Delta\Psi$ , ni el  $\text{Ca}^{2+}$  ni el  $\text{Mg}^{2+}$  fueron capaces de cerrar el YMUC e inhibir la reconstrucción. Por otro lado, se ha reportado que las alquilguanidinas interactúan con las cargas negativas de la membrana de manera estable al aumentar la longitud de la cadena que se hace más hidrofóbica, anclándose en la membrana [Gómez-Puyou y Tuena, 1977]. Además, se ha reportado que la OG inhibe la apertura del PTP en mitocondrias de mamífero, y que bajas concentraciones de HG y OG acoplan a la mitocondria y mantienen el  $\Delta\Psi$  [Chávez y cols., 2000]. En mitocondrias donde el  $\Delta\Psi$  está abatido, la octilguanidina fue la única capaz de inhibir la reconstrucción mitocondrial. La aparente estabilidad de la interacción OG/YMUC se debió tal vez a que la cadena de carbonos de la octilguanidina se ancla en la membrana hidrofóbica [Chávez y cols., 2000; Pressman, 1963]. Este mecanismo se propuso para explicar la inhibición del transporte de electrones a través de la cadena respiratoria a nivel del complejo I [Papa y cols., 1975] así como la inhibición de la captación de  $\text{K}^+$  en mitocondrias de mamífero [Beatty y cols., 1986], y confirma la idea de que los efectos del  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{Mg}^{2+}$  se deben a una interacción directa catión/YMUC dependiente del  $\Delta\Psi$ .

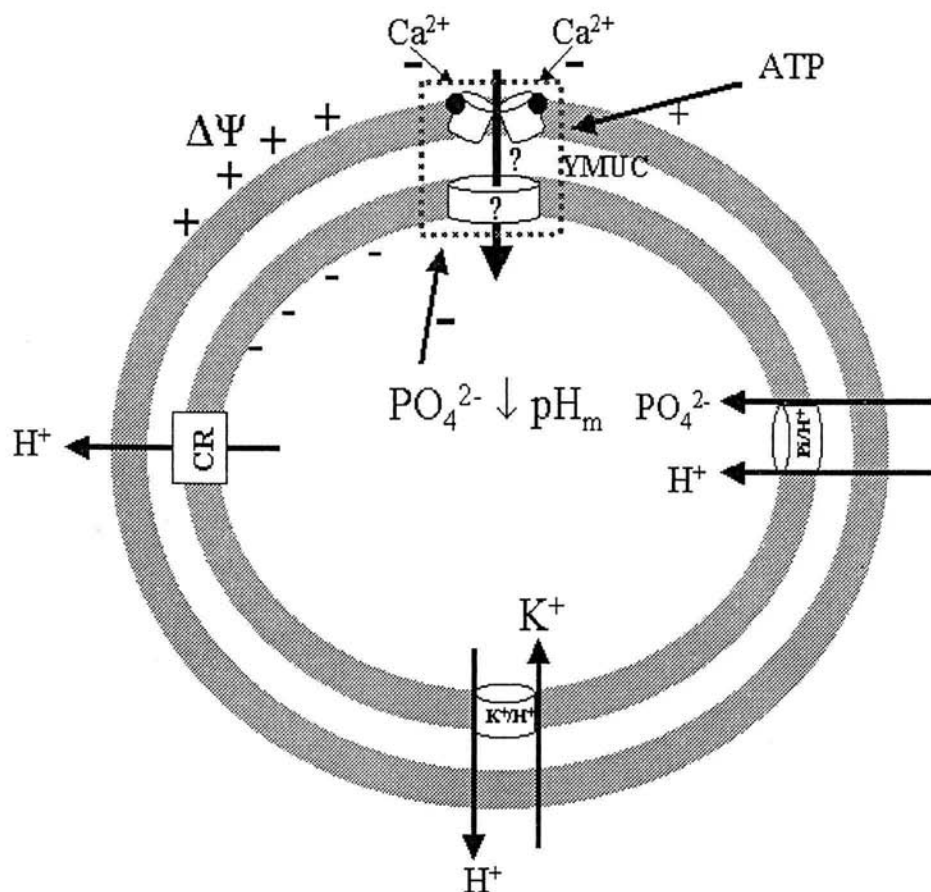


Fig. 14. Modelo de la regulación del YMUC. Se muestra que el  $\text{PO}_4^{2-}$  aumenta el pH de la matriz mitocondrial al ser cotransportado con  $\text{H}^+$ , lo cual probablemente genera una modificación estructural de las proteínas que forman al YMUC. Esta modificación estructural hace más accesibles los sitios de unión para  $\text{Ca}^{2+}$  o para  $\text{Mg}^{2+}$  localizados en la porina, cuya unión depende además del  $\Delta\Psi$  generado por la cadena respiratoria. CR, cadena respiratoria. El signo ? indica que no se conoce la proteína o que no se sabe si participa alguna.

En mitocondrias de mamífero se acepta la participación de diferentes proteínas de la matriz mitocondrial, de la membrana interna, del espacio intermembranal y de la membrana externa [Crompton, 1999], mientras que en mitocondrias de levadura no se ha propuesto un componente de este tipo para el YMUC. En este trabajo sugerimos que la porina es un componente del YMUC, no indispensable probablemente para el estado abierto pero sí para que los cationes divalentes promuevan el estado cerrado (Fig. 14). En nuestros resultados de consumo de  $O_2$ ,  $\Delta\Psi$ , e hinchamiento mitocondrial observamos que los mitoplastos que carecen de membrana externa y las mitocondrias  $\Delta por1$  aún presentan esta permeabilidad mitocondrial. Estos resultados apoyan los reportes en los cuales se observó liberación de citocromo *c* inducida por Bax [Priault y cols., 1999] e hinchamiento mitocondrial y pérdida del  $\Delta\Psi$  inducidos por ATP o etanol [Roucou y cols., 1997a] en mutantes  $\Delta por1$ . Esto demuestra que la porina no es indispensable para que se manifieste el YMUC; sin embargo, hay reportes contradictorios en los que se observó la pérdida del  $\Delta\Psi$ , hinchamiento mitocondrial y liberación de citocromo *c* inducidos por Bax y/o etanol en mitocondrias de levadura silvestre pero no en mutantes  $\Delta por1$  [Shimizu y cols., 2000].

En la mutante carente de porina, en la cepa industrial de *S. cerevisiae* y en la cepa de laboratorio B-7553 observamos permeabilidad mitocondrial al  $K^+$ . En estas cepas se observó una marcada inhibición de la permeabilidad al agregar  $Ca^{2+}$ , sensibilidad que se perdió al eliminar la membrana externa de la mitocondria y en las mitocondrias de la cepa  $\Delta por1$  sugiriendo que la porina es un componente del YMUC, probablemente dispensable para el estado abierto, pero no para el estado cerrado. Esta idea se apoya en los reportes que indican que el  $Ca^{2+}$  (en combinación con el  $Mg^{2+}$ ) favorece la unión de la creatina cinasa a la porina mitocondrial para abrir el PTP en mitocondrias de mamífero [Schlattner y cols., 2001]. Si el  $Ca^{2+}$  no induce la apertura del YMUC, como en el caso del PTP en mitocondrias de mamífero, se debe probablemente a la ausencia del uniportador de  $Ca^{2+}$  en las mitocondrias de la levadura [Balcavage y cols., 1973; Uribe y cols., 1992] y sólo puede unirse a un sitio externo de unión a cationes divalentes, similar al que se ha reportado en el PTP de mitocondrias de mamífero [Bernardi y cols., 1993]. La

propuesta de que la porina forma parte del YMUC se apoya en la pérdida de sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  en mitoplastos y mitocondrias que carecen de la porina, pero también en los reportes que indican que la porina es indispensable para la pérdida del potencial y liberación de citocromo c en mutantes de levadura  $\Delta\text{por1}$  [Shimizu y cols., 2000].

El papel fisiológico de la transición de la permeabilidad no es claro; sin embargo, se han propuesto funciones tales como la muerte celular programada, la destoxificación iónica y la disipación de energía [Gunter y Pfeiffer 1990; Zoratti y Szabo 1995]. Las mitocondrias de levadura contienen un poro inespecífico, y aunque estas células no contienen la cascada típica de proteínas que participan en la apoptosis [Goffeau y cols., 1996], muestran muerte inducida por Bax, y recientemente se ha reportado apoptosis en la levadura, inducida por agentes químicos [Ludovico y cols., 2001]. Con los resultados de este trabajo, en el cual se propone al VDAC como un componente del YMUC, y los reportes de inducción de apoptosis por Bax [Priault y cols., 1999] se podría proponer la participación del YMUC en la muerte celular programada en las levaduras.

El control del YMUC por  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{PO}_4^{2-}$  parece diseñado para aumentar la eficiencia de la fosforilación oxidativa ante una alta demanda de ATP, al abrir una válvula de escape de energía para la célula en reposo. Probablemente la regulación del YMUC por  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{PO}_4^{2-}$  sea importante desde el punto de vista fisiológico, ya que la variación en las concentraciones de los tres efectores ocurre dentro de la célula al cambiar los requerimientos energéticos de la misma. Si esta regulación ocurre *in vivo*, el YMUC podría funcionar como una válvula de disipación de energía, y apoya la hipótesis de que la permeabilidad inespecífica en mitocondrias de mamífero puede tener funciones colaterales a la muerte celular programada o accidental [Szabo y cols., 1992].

En la levadura, el  $\text{Ca}^{2+}$  regula el ciclo celular y se requiere durante la mitosis, un período de alta demanda energética que ocurre en concierto con un aumento en la concentración citoplásmica de  $\text{Ca}^{2+}$  por periodos hasta de 20 min [Iida y cols., 1990]. El aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico estimula la síntesis de ATP aún antes de que éste sea necesario. El mecanismo por el cual aumenta la

conversión de energía en ATP y en biomasa podría involucrar el cierre del YMUC observado en este trabajo. Al respecto, durante otro de los procesos que requieren alta energía, como el apareamiento sexual, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico aumenta tan rápido como la feromona es detectada [Nakajima-Shimada y cols., 1991]. Por esto, es lógico que el  $\text{Ca}^{2+}$  pueda trabajar en combinación con el  $\text{PO}_4^{2-}$  para cerrar el YMUC, controlando la utilización de energía derivada de la fosforilación oxidativa hacia la producción de ATP y otras moléculas.

En la célula en reposo, la acumulación de ATP, la disminución del  $\text{PO}_4^{2-}$  y de la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  induciría la apertura del YMUC y la disipación de energía en forma de calor.

## CONCLUSIONES

1. El  $\text{Ca}^{2+}$ , el  $\text{Mg}^{2+}$  y el  $\text{PO}_4^{2-}$ , cierran el megacanal inespecífico mitocondrial de la levadura (YMUC).
2. Los efectos del  $\text{Ca}^{2+}$ , el  $\text{Mg}^{2+}$  y el  $\text{PO}_4^{2-}$  sobre el YMUC son aditivos.
3. La interacción de los cationes divalentes con el YMUC depende del  $\Delta\Psi$ .
4. La HG y la OG cierran al YMUC gracias a la estabilización de su interacción dada por su cadena hidrofóbica.
5. El sitio de interacción  $\text{Ca}^{2+}$ /YMUC parece ser la porina mitocondrial.
6. La porina mitocondrial podría ser un componente del YMUC que cierra el canal al interactuar con  $\text{Ca}^{2+}$ .



## REFERENCIAS

1. Akerman, K. E. (1977). Effect of  $Mg^{2+}$  and spermine on the kinetics of  $Ca^{2+}$  transport in rat-liver mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **9**: 65-72.
2. Akerman, K. E. y Wikstrom, M. K. (1976). Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett.* **68**:191-197.
3. Al-Nasser, I. y Crompton, M. (1986a). The reversible  $Ca^{2+}$ -induced permeabilization of rat liver mitochondria. *Biochem. J.* **239**: 19-29.
4. Al-Nasser, I. y Crompton, M. (1986b). The entrapment of the  $Ca^{2+}$  indicator arsenazo III in the matrix space of rat liver mitochondria by permeabilization and resealing.  $N^{a+}$ -dependent and -independent effluxes of  $Ca^{2+}$  in arsenazo III-loaded mitochondria. *Biochem. J.* **239**: 31-40.
5. Andreeva, L., Tanveer, A. y Crompton, M. (1995). Evidence for the involvement of a membrane-associated cyclosporin-A-binding protein in the  $Ca^{2+}$ -activated inner membrane pore of heart mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **230**: 1125-1132.
6. Aravind, L., Vishva, M., Dixit y Koomin, E. V. (1999). The domains of death: evolution of the apoptosis machinery. *Trends Biochem. Sci.* 47-53.
7. Asimakis, G. K., y Sordahl, L. A. (1981). Intramitochondrial adenine nucleotides and energy-linked functions of heart mitochondria. *Amer. J. Physiol.* **241**: H672-H678.
8. Babcock, G. T. y Wikstrom, M. (1992). Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature* **356**: 301-309.
9. Baker, P. F. y Schlaepfer, W. W. (1978). Uptake and binding of calcium by axoplasm isolated from giant axons of *Loligo* and *Myxicola*. *J. Physiol.* **276**: 103-125.
10. Balcavage, W. X, Lloyd, J. L., Mattoon, J. R., Ohnishi, T., Scarpa, A. (1973). Cation movements and respiratory response in yeast mitochondria treated with high  $Ca^{2+}$  concentrations. *Biochim Biophys Acta.* **305**: 41-51.

11. Ballarin, C. y Sorgato, M. C. (1995). An electrophysiological study of yeast mitochondria. Evidence for two inner membrane anion channels sensitive to ATP. *J. Biol. Chem.* **270**: 19262-19268.
12. Beaty, G., Gutierrez, C., Lopez-Vancell, R. y Estrada, S. (1986). Magnesium and octylguanidinium inhibition of monovalent cation translocation in mitochondria. *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.* **36**: 217-232.
13. Benz, R. (1994). Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes: review on mitochondrial porins. *Biochim. Biophys. Acta* **1197**: 167-196.
14. Bernardi, P. (1999). Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol. Rev.* **79**: 1127-1155.
15. Bernardi, P. y Azzone, G. F. (1982). A membrane potential-modulated pathway for  $\text{Ca}^{2+}$  efflux in rat liver mitochondria. *FEBS Lett.* **139**: 13-16.
16. Bernardi, P. y Pietrobon, D. (1982). On the nature of  $\text{Pi}$ -induced,  $\text{Mg}^{2+}$ -prevented  $\text{Ca}^{2+}$  release in rat liver mitochondria. *FEBS Lett.* **139**: 9-12.
17. Bernardi, P., Vassanelli, S., Veronese, P., Colonna, R., Szabo, I. y Zoratti, M. (1992). Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations. *J. Biol. Chem.* **267**: 2934-2939.
18. Bernardi, P., Veronese, P. y Petronilli, V. (1993). Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore. I. Evidence for two separate  $\text{Me}^{2+}$  binding sites with opposing effects on the pore open probability. *J. Biol. Chem.* **268**: 1005-1010.
19. Beutner, G., Ruck, A., Riede, B. y Brdiczka, D. (1998). Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. *Biochim. Biophys. Acta* **1368**: 7-18.
20. Bienengraeber, M., Echtay, K. S. y Klingenberg, M. (1998).  $\text{H}^+$  transport by uncoupling protein (UCP-1) is dependent on a histidine pair, absent in UCP-2 and UCP-3. *Biochemistry* **37**: 3-8.
21. Boss, O., Samec, S., Paoloni-Giacobino, A., Rossier, C., Dulloo, A., Seydoux, J., Muzzin, P. y Giacobino, J. P. (1997). Uncoupling protein-3: a new member of the

ESTA TESIS NO PUEDE  
 SER REPRODUCIDA  
 SIN EL CONSENTIMIENTO  
 DE LA BIBLIOTECA

- mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett.* **408**: 39-42.
22. Bottcher, B., Schwarz, L. y Gaber, P. (1998). Direct indication for the existence of a double stalk in  $CF_0F_1$ . *J. Mol. Biol.* **281**: 757-762.
23. Boyer, D. P. (1997). The ATP Synthase. A splendid molecular machine. *Ann. Rev. Biochem.* **66**: 717-749.
24. Brand, M. D. y Murphy, M. P. (1987). Control of electron flux through the respiratory chain in mitochondria and cells. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **62**:141-193.
25. Brandt, U. (1997). Proton translocation by membrane-bound NADH:ubiquinone-oxidoreductase (complex I) through redox-gated ligand conduction. *Biochim. Biophys. Acta* **1318**: 79-91.
26. Braun, H. P. y Schmitz, U. K. (1995). Are the 'core' proteins of the mitochondrial bc1 complex evolutionary relics of a processing protease? *Trends Biochem. Sci.* **20**:171-175.
27. Brdiczka, D., Kaldis, P., y Wallimann, T. (1994). In vitro complex formation between the octamer of mitochondrial creatine kinase and porin. *J. Biol. Chem.* **269**: 27640-27644.
28. Broekemeier, K. M. y Pfeiffer, D. R. (1995). Inhibition of the mitochondrial permeability transition by cyclosporin A during long time frame experiments: relationship between pore opening and the activity of mitochondrial phospholipases. *Biochemistry.* **34**: 16440-16449.
29. Carafoli, E (1987). Intracellular calcium homeostasis. *Ann. Rev. Biochem.* **56**: 395-433.
30. Casadio R., Jacoboni, I., Messina, A y De Pinto, V. (2002). A 3D model of the voltage-dependent anion channel (VDAC). *FEBS Lett.* **520**:1-7.
31. Castrejón, V., Parra, C., Moreno, R., Peña, A. y Uribe, S. (1997). Potassium collapses the  $\Delta\Psi$  in yeast mitochondria while the rate of ATP synthesis is inhibited only partially: modulation by phosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* **346**: 37-44.

32. Catterall, W. A. (1988). Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Science* **242**: 50–61.
33. Chance, B. (1965). The energy-linked reactions of calcium with mitochondria. *J. Biol. Chem.* **240**: 2729-2748.
34. Chateaubodeau, G., Guérin, M. y Guérin, B. (1974). Studies on anionic transport in yeast mitochondria and promitochondria. Swelling in ammonium phosphate, glutamate, succinate and fumarate solutions. *FEBS Lett.* **46**: 184-187.
35. Chateaubodeau, G. A., Guérin, M. y Guérin, B. (1976). Permeability of yeast mitochondrial internal membrane: structure-activity relationship. *Biochimie* **58**: 601-610.
36. Chávez, E., Peña, A., Zazueta, C., Ramírez, J., García, N. y Carrillo, R. (2000). Inactivation of mitochondrial permeability transition pore by octylguanidine and octylamine. *J. Bioenerg. Biomembr.* **32**: 193-198.
37. Cheng, E. H., Wei, M. C., Weiler, S., Flavell, R. A., Mak, T. W., Lindsten, T. y Korsmeyer, S. J. (2001). BCL-2, BCL-X<sub>L</sub> sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol. Cell* **8**: 705-711.
38. Chernyak, B. V. y Bernardi, P. (1996). The mitochondrial permeability transition pore is modulated by oxidative agents through both pyridine nucleotides and glutathione at two separate sites. *Eur. J. Biochem.* **238**: 623–630.
39. Chiesi, M., Rogg, H., Eichenberger, K., Gazzotti, P. y Carafoli E. (1987). Stereospecific action of diltiazem on the mitochondrial Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange system and on sarcolemmal Ca<sup>2+</sup>-channels. *Biochem. Pharmacol.* **36**: 2735-2740.
40. Colombini M. (1979). A candidate for the permeability pathway of the outer mitochondrial membrane. *Nature* **279**: 643-645.
41. Colombini, M., Yeung, C. .L., Tung, J. y Konig, T. (1987). The mitochondrial outer membrane channel, VDAC, is regulated by a synthetic polyanion. *Biochim. Biophys. Acta* **905**: 279-286.
42. Collins, T.J., Berridge, M. J., Lipp, P, Bootman, M. D. (2002). Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *EMBO J.* **21**: 1616-1627.

43. Connern, C. P. y Halestrap, A. P.. (1992). Purification and N-terminal sequencing of peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase from rat liver mitochondrial matrix reveals the existence of a distinct mitochondrial cyclophilin. *Biochem. J.* **284**: 381-385.
44. Connern, C. P. y Halestrap, A. P. (1994). Recruitment of mitochondrial cyclophilin to the mitochondrial inner membrane under conditions of oxidative stress that enhance the opening of a calcium-sensitive non-specific channel, *Biochem. J.* **302**: 321-324.
45. Connern, C. P. y Halestrap, A. P. (1996). Chaotropic agents and increased matrix volume enhance binding of mitochondrial cyclophilin to the inner mitochondrial membrane and sensitize the mitochondrial permeability transition to  $[Ca^{2+}]$ , *Biochemistry.* **35**: 8172-8180.
46. Cortés, P., Castrejón, V, Sampedro, J. G. y Uribe, S. (2000). Interactions of arsenate, sulfate and phosphate with yeast mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* **456**: 67-76.
47. Costantini, P., Chernyak, B. V., Petronilli, V. y Bernardi, P. (1995a). Selective inhibition of the mitochondrial permeability transition pore at the oxidation-reduction sensitive dithiol by monobromobimane. *FEBS Lett.* **362**: 239-242.
48. Costantini, P., Petronilli, V., Colonna, R. y Bernardi, P. (1995b). On the effects of paraquat on isolated mitochondria. Evidence that paraquat causes opening of the cyclosporin A-sensitive permeability transition pore synergistically with nitric oxide. *Toxicol.* **99**: 77-88.
49. Costantini, P., Chernyak, B. V., Petronilli, V. y Bernardi, P. (1996). Modulation of the mitochondrial permeability transition pore by pyridine nucleotides and dithiol oxidation at two separate sites. *J. Biol. Chem.* **271**: 6746-6751.
50. Crompton, M., Kunzi, M. y Carafoli, E. (1977). The calcium-induced and sodium-induced effluxes of calcium from heart mitochondria. Evidence for a sodium-calcium carrier. *Eur. J. Biochem.* **79**: 549-558.
51. Crompton, M., Moser, R., Ludi, H. y Carafoli, E. (1978). The interrelations between the transport of sodium and calcium in mitochondria of various mammalian tissues. *Eur. J. Biochem.* **82**: 25-31.

52. Crompton, M., Heid, I. y Carafoli, E. (1980). The activation by potassium of the sodium-calcium carrier of cardiac mitochondria. *FEBS Lett.* **115**: 257-259.
53. Crompton, M., Costi, A. y Hayat, L. (1987). Evidence for the presence of a reversible  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. *Biochem. J.* **245**: 915-918.
54. Crompton, M. y Costi, A. (1988). Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by  $\text{Ca}^{2+}$ , inorganic phosphate and oxidative stress. A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular  $\text{Ca}^{2+}$  overload. *Eur. J. Biochem.* **178**: 489-501.
55. Crompton, M., Ellinger, H. y Costi, A. (1988). Inhibition by cyclosporin A of a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem. J.* **255**: 357-360.
56. Crompton, M. y Andreeva, L. (1994). On the interactions of  $\text{Ca}^{2+}$  and cyclosporin A with a mitochondrial inner membrane pore: a study using cobaltamine complex inhibitors of the  $\text{Ca}^{2+}$  uniporter. *Biochem. J.* **302**: 181-185.
57. Crompton, M., Virji, S. y Ward, J. M. (1998). Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur. J. Biochem.* **258**: 729-735.
58. Crompton, M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.* **341**: 233-249.
59. DeLuca, H. F. y Engstrom G. W. (1961). Calcium uptake by rat kidney mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**: 1744-1750.
60. de Vries, S y Grivell, L.A. (1988). Purification and characterization of a rotenone-insensitive NADH:Q6 oxidoreductase from mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **176**: 377-84.
61. Del Carratore, R., Della, C. C., Simili, M., Taccini, E., Scavuzzo, M. y Sbrana, S. (2002). Cell cycle and morphological alterations as indicative of apoptosis promoted by UV irradiation in *S. cerevisiae*. *Mutation Res.* **513**: 183-191.

62. Dejean, L., Beauvoit, B., Guérin, B. y Rigoulet, M. (2000). Growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* on a non-fermentable substrate: control of energetic yield by the amount of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* **1457**: 45-56.
63. Dejean, L., Beauvoit, B., Alonso, A. P., Bunoust, O., Guérin, B. y Rigoulet, M. (2002). cAMP-induced modulation of the growth yield of *Saccharomyces cerevisiae* during respiratory and respiro-fermentative metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.* **1554**:159-169.
64. De-kloet, S. R., Van Wermeskerken, R. A. y Koninsberger, V. V. (1961). Studies on protein synthesis by protoplasts of *Saccharomyces carlsbergensis*. I. The effect of ribonuclease on protein synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **47**:138-143.
65. Dolder, M., Zeth, K., Tittmann, P., Gross, H., Welte, W., y Wallimann, T. (1999) Crystallization of the human, mitochondrial voltage-dependent anion-selective channel in the presence of phospholipids. *J. Struct. Biol.* **127**: 64–71.
66. Elston, T., Wang, H. y Oster, G. (1998). Energy transduction in ATP synthase. *Nature* **391**: 510-513.
67. Emmel, E. A., Verweij, C. L., Durand, D. B., Higgins, K. M., Lacy, E. y Crabtree, G. R. (1989). Cyclosporin A specifically inhibits function of nuclear proteins involved in T cell activation. *Science* **246**: 1617–1620.
68. Enerback, S, Jacobsson, A., Simpson, E. M., Guerra, C., Yamashita, H., Harper M. E. y Kozak, L. P. (1997). Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature.* **387**: 90-94.
69. Eriksson, O., Fontaine, E. y Bernardi, P. (1998). Chemical modification of arginines by 2,3-butanedione and phenylglyoxal causes closure of the mitochondrial permeability transition pore. *J. Biol. Chem.* **273**: 12669 –12674.
70. Estabrook, R. W. (1967). Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios. *Methods Enzymol.* **10**: 41-47.
71. Fesik, S. W. (2000). Insights into programmed cell death through structural biology. *Cell* **103**, 273-282.
72. Fleury, C., Neverova, M., Collins, S., Raimbault, S., Champigny, O., Levi-Meyrueis C., Bouillaud, F., Seldin, M. F., Surwit, R. S., Ricquier, D. y Warden, C.

- H. (1997). Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat. Genet.* **15**: 269-272.
73. Fontaine, E., Eriksson, O., Ichas, F. y Bernardi, P. (1998a). Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation By electron flow through the respiratory chain complex I. *J. Biol. Chem.* **273**: 12662–12668.
74. Fontaine, E., Ichas, F. y Bernardi, P. (1998b). A ubiquinone-binding site regulates the mitochondrial permeability transition pore. *J. Biol. Chem.* **273**: 25734–25740.
75. Fountoulakis M, Berndt P, Langen H, Suter L. (2002). The rat liver mitochondrial proteins. *Electrophoresis.* **23**: 311-28.
76. Forte, M., Guy, H. R. y Mannella, C. A. (1987). Molecular genetics of the VDAC ion channel: structural model and sequence analysis. *J. Bioenerg. Biomembr.* **19**: 341-350.
77. Fournier, N., Ducet, G. y Crevat, A. (1987). Action of cyclosporine on mitochondrial calcium fluxes. *J. Bioenerg. Biomembr.* **19**: 297-303.
78. Frey, T. G. y Mannella, C. A. (2002). The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* **25**:319-324.
79. Galat, A. (1993). Peptidylproline cis-trans-isomerases: immunophilins. *Eur. J. Biochem.* **216**: 689-707.
80. Galat, A. y Metcalfe, S. M. (1995). Peptidylproline cis/trans isomerases. *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **63**: 67–118.
81. Gavin, C. E, Gunter, K. K. y Gunter. T. E. (1990). Manganese and calcium efflux kinetics in brain mitochondria. Relevance to manganese toxicity. *Biochem. J.* **266**: 329-334.
82. Gavin, C. E., Gunter, K. K. y Gunter, T. E. (1991). Mn<sup>2+</sup> transport across biological membranes may be monitored spectroscopically using the Ca<sup>2+</sup> indicator dye antipyrylazo III. *Anal. Biochem.* **192**: 44-48.
83. Garlid, K. D, Orosz, D. E., Modriansky, M., Vassanelli, S. y Jezekm, P. (1996). On the mechanism of fatty acid-induced proton transport by mitochondrial uncoupling protein. *J. Biol. Chem.* **271**: 2615-2620.



84. Gincel D, Zaid H, Shoshan-Barmatz V. (2001). Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. *Biochem. J.* **358**: 147-155.
85. Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. y Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science* **546**: 563-567.
86. Gomez-Puyou, A. y Tuena de Gomez-Puyou, M. (1977). Monovalent cations in mitochondrial oxidative phosphorylation. *J. Bioenerg. Biomembr.* **9**: 91-102.
87. Gornal, A. G., Bardavill, C. J., y David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* **177**: 751-760.
88. Green, D. R. y Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**: 1309-1312.
89. Gottlob, K., Majewski, N., Kennedy, S., Kandel, E., Robey, R. B., y Hay, N. (2001). Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the "rst committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. *Genes Dev.* **15**: 1406-1418.
90. Grandier-Vazeille, X., Bathany, K., Chaignepain, S., Camougrand, N., Manon, S, y Schmitter, J. M. (2001). Yeast mitochondrial dehydrogenases are associated in a supramolecular complex. *Biochem.* **40**: 9758-9769.
91. Grutter, M. G. (2000). Caspases: key players in programmed cell death. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**: 649-655.
92. Guenebaut, V., Schlitt, A., Weiss, H., Leonard, K. y Friedrich, T. (1998). Consistent structure between bacterial and mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J. Mol. Biol.* **276**:105-112.
93. Guérin, B., Bunoust, O., Rouqueys, V. y Rigoulet, M. (1994) ATP-induced unspecific channel in yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* **269**: 25406 - 25410.
94. Gunter, T. E., Wingrove, D. E., Banerjee, S. y Gunter, K. K. (1988). Mechanisms of mitochondrial calcium transport. *Adv. Exp. Med. Biol.* **232**: 1-14.
95. Gunter, T. E. y Pfeiffer, D. R. (1990). Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am. J. Physiol.* **258**: C755-C786.

96. Gunter, K. K., Zuscik, M. J. y Gunter, T. E. (1991). The Na<sup>+</sup>-independent Ca<sup>2+</sup> efflux mechanism of liver mitochondria is not a passive Ca<sup>2+</sup>/2H<sup>+</sup> exchanger. *J. Biol. Chem.* **266**: 21640-21648.
97. Gunter, K. K. y Gunter, T. E. (1994). Transport of calcium by mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **26**: 471-485.
98. Hagerhall, C. (1997). Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme. *Biochim. Biophys. Acta.* **1320**:107-141.
99. Halestrap, A. P. y Davidson A. M. (1990). Inhibition of Ca<sup>2+</sup>-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochem. J.* **268**: 153-160.
100. Halestrap, A. P. (1991). Calcium-dependent opening of a non-specific pore in the mitochondrial inner membrane is inhibited at pH values below 7. Implications for the protective effect of low pH against chemical and hypoxic cell damage. *Biochem. J.* **278**: 715-719.
101. Halestrap, A. P., Woodfield, K. y Connern, C. P. (1997). Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. *J. Biol. Chem.* **272**: 3346-3354.
102. Haraguchi, M., Torii, S., Matsuzawa, S., Xie, Z., Kitada, S., Krajewski, S., Yoshida, H., Mak, T. W. y Reed, J. C. (2000). Apoptotic protease activating factor (Apaf-1)-independent cell death suppression by Bcl-2. *J. Exp. Med.* **191**: 1709-1720.
103. Haworth, R. A. y Hunter, D. R. (1979). The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca<sup>2+</sup> trigger site. *Arch. Biochem. Biophys.* **195**: 460-467.
104. Haworth, R. A. y Hunter, D. R. (1980). Allosteric inhibition of the Ca<sup>2+</sup>-activated hydrophilic channel of the mitochondrial inner membrane by nucleotides. *J. Membr. Biol.* **54**: 231-236.

105. Hayat, L. H. y Crompton, M. (1987). The effects of  $Mg^{2+}$  and adenine nucleotides on the sensitivity of the heart mitochondrial  $Na^+$ - $Ca^{2+}$  carrier to extramitochondrial  $Ca^{2+}$ . A study using arsenazo III-loaded mitochondria. *Biochem. J.* **244**: 533-538.
106. Hoek, J. B., y Rydstrom, J. (1988). Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. *Biochem. J.* **254**: 1-10.
107. Holden, M. I. y Colombini, M. (1993). The outer mitochondrial membrane channel, VDAC, is modulated by a protein localized in the intermembrane space. *Biochim. Biophys. Acta* **1144**: 396-402.
108. Huang, S. G. y Klingenberg, M. (1996). Two-stage nucleotide binding mechanism and its implications to  $H^+$  transport inhibition of the uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria. *Biochemistry* **35**: 7846-7854.
109. Hunter, D. R. y Haworth, R. A. (1979). The  $Ca^{2+}$ -induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Arch. Biochem. Biophys.* **195**: 453-459.
110. Iwata, S., Lee, J. W., Okada, K., Lee, J. K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T. A., Ramaswamy, S., y Jap, B. K. (1998). Complete Structure of the 11-Subunit Bovine Mitochondrial Cytochrome  $bc_1$  Complex. *Science* **281**: 64-71.
111. Jacobson, M. D. y Raff, M. C. (1995). Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen. *Nature* **374**: 814-816.
112. Johnson, N., Khan, A., Virji, S., Ward, J. M. y Crompton, M. (1999). Import and processing of heart mitochondrial cyclophilin D. *Eur. J. Biochem.* **263**: 353-359.
113. Juin, P., Pelleschi, M., Sagne, C., Henry, J. P., Thieffry, M. y Vallette, F. M. (1995). Involvement of the peptide sensitive channel in the translocation of basic peptides into mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **211**: 92-99.
114. Jung, D. W. y Brierley, G. P. (1994). Magnesium transport by mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **26**: 527-535.
115. Jung, D. W., Bradshaw, P. C. y Pfeiffer, D. R. Properties of a cyclosporin-insensitive permeability transition pore in yeast mitochondria. (1997). *J. Biol. Chem.* **272**: 21104-21112.

116. Kerr, J. F., Wyllie, A. H. y Curie, A. R. (1971). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**: 239-257.
117. Krimmer, T., Rapaport, D., Ryan, M. T., Meisinger, C., Kassenbrock, C. K., Blachly-Dyson E., Forte, M., Douglas, M. G., Neupert, W., Nargang, F. E., Pfanner, N. (2001) Biogenesis of porin of the outer mitochondrial membrane involves an import pathway via receptors and the general import pore of the TOM complex. *J. Cell. Biol.* **152**: 289–300.
118. Kroemer, G., Petit, P., Zamzami, N., Vayseiere, J. L. y Mignotte, B. (1995). The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J.* **9**: 1277-1287.
119. Kroemer, G. y Reed, J. C. (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nature Med.* **6**: 513-519.
120. Kuan, J. y Saier, M. H. Jr. (1993). The mitochondrial carrier family of transport proteins: structural, functional, and evolutionary relationships. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **28**: 209-233.
121. Kunz, W., Bohnensack, R., Bohme, G., Kuster, U., Letko, G. y Schonfeld, P. (1981). Relations between extramitochondrial and intramitochondrial adenine nucleotide systems. *Arch. Biochem. Biophys.* **209**: 219–229.
122. Laloi, M., Klein, M., Riesmeier, J. W., Muller-Rober, B., Fleury, C., Bouillaud, F. y Ricquier, D. (1997). A plant cold-induced uncoupling protein. *Nature* **389**: 135-136.
123. Lappalainen P, Aasa R, Malmstrom, B. G, y Saraste, M. (1993). Soluble CuA-binding domain from the *Paracoccus* cytochrome c oxidase. *J. Biol. Chem.* **268**: 26416-26421.
124. Laun, P., Pichova, A., Madeo, F., Fuchs, J., Ellinger, A., Kohlwein, S., Dawes, I., Frohlich, K. U. y Breitenbach, M. (2001). Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis. *Mol. Microbiol.* **39**, 1166-1173.
125. Lawen, A., Baker, M. A., y Malik, S. (1998). Apoptosis and redox homeostasis. On a possible mechanism of action of Bcl-2. *Protoplasma* **205**:10–20.

126. Lefurgey A., Ingram, P. y Lieberman, M. (1988) Quantitative microchemical imaging of calcium in Na-K pump inhibited heart cells. *Cell Calcium* **9**: 219-235.
127. LeQuoc, K. y LeQuoc, D. (1988). Involvement of the ADP/ATP carrier in calcium-induced perturbations of the mitochondrial inner membrane permeability: importance of the orientation of the nucleotide binding site. *Arch. Biochem. Biophys.* **265**: 249-257.
128. Li, L. Y., Luo, X. y Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**: 95-99.
129. Iida, H., Sakaguchi, S., Yagawa, Y. y Anraku, Y. (1990). Cell cycle control by  $Ca^{2+}$  in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **265**: 21216-21222.
130. Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R. y Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* **86**: 147-157.
131. Locke, R. M., Rial, E. y Nicholls, D. G. (1982). The acute regulation of mitochondrial proton conductance in cells and mitochondria from the brown fat of cold-adapted and warm-adapted guinea pigs. *Eur. J. Biochem.* **129**: 381-387.
132. Lohret, T. A. y Kinnally, K. W. (1995). Targeting peptides transiently block a mitochondrial channel. *J. Biol. Chem.* **270**:15950-15953.
133. Lohret, T. A., Murphy, R. C., Drgon, T. y Kinnally, K. W. (1996). Activity of the mitochondrial multiple conductance channel is independent of the adenine nucleotide translocator. *J. Biol. Chem.* **271**: 4846-4849.
134. Longo, V. D., Ellerby, L. M., Bredesen, D. E., Valentine, J. S. y Gralla, E. B. (1997). Human Bcl-2 reverses survival defects in yeast lacking superoxide dismutase and delays death of wild-type yeast. *J. Cell. Biol.* **137**, 1581-1588
135. Ludovico, P., Sousa, M. J., Silva, M. T., Leao, C. y Corte-Real, M. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. *Microbiology* **147**: 2409-2415.
136. Lukács, G. L. y Fonyó, A. (1985).  $Ba^{2+}$  ions inhibit the release of  $Ca^{2+}$  ions from rat liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **809**: 160-166.

137. Lukács, G. L. y Fonyó, A. (1986). The Ba<sup>2+</sup> sensitivity of the Na<sup>+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> efflux in heart mitochondria: the site of inhibitory action. *Biochim. Biophys. Acta.* **858**: 125-134.
138. Lutter, R., Saraste, M., van Walraven, H. S., Runswick, M. J., Finel, M., Deatherage, J. F. y Walker, J. E. (1993). F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase from bovine heart mitochondria: development of the purification of a monodisperse oligomycin-sensitive ATPase. *Biochem. J.* **295**: 799-806.
139. Madeo, F., Frohlich, E. y Frohlich, K. U. (1997). A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *J. Cell. Biol.* **139**: 729-734.
140. Madeo, F., Frohlich, E., Ligr, M., Grey, M., Sigrist, S. J., Wolf, D. H. y Frohlich, K. U. (1999). Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J. Cell. Biol.* **145**, 757-767.
141. Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lachelt, S., Herlan, M., Fehr, M., Lauber, K., Sigrist, S. J., Wesselborg, S. y Frohlich, K.U. (2002). A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol. Cell.* **9**: 911-917.
142. Manon, S., Chaudhuri, B. y Guérin, M. (1997). Release of cytochrome c and decrease of cytochrome c oxidase in Bax-expressing yeast cells, and prevention of these effects by coexpression of Bcl-xL. *FEBS Lett.* **415**: 29-32.
143. Manon, S., Roucou, X., Guérin, M., Rigoulet, M. y Guérin, B. (1998). Characterization of the yeast mitochondria unselective channel: a counterpart to the mammalian permeability transition pore?. *J. Bioenerg. Biomembr.* **30**: 419-429.
144. Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jurgensmeier, J. M., Susin, S. A., Vieira, H. L., Prevost, M. C., Xie, Z., Matsuyama, S., Reed, J. C y Kroemer, G. (1998). Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* **281**: 2027-2031.
145. Matsuyama, S., Schendel, S. L., Xie, Z. H. y Reed, J. C. (1998). Cytoprotection by Bcl-2 requires the pore-forming  $\alpha 5$  and  $\alpha 6$  helices. *J. Biol. Chem.* **273**: 30995-31001.
146. McEnery, M. W., Snowman, A. M., Trifiletti, R. R. y Snyder, S. H. (1992). Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage

- dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **89**: 3170–3174.
147. Moon H, Baek, D., Lee, B., Prasad, D. T., Lee, S. Y., Cho, M. J., Lim, C. O., Choi, M. S., Bahk, J., Kim, M. O., Hong, J. C. y Yun, D. J. (2002) Soybean ascorbate peroxidase suppresses Bax-induced apoptosis in yeast by inhibiting oxygen radical generation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **290**, 457–462.
148. Nakajima-Shimada, J., Iida, H., Tsuji, F. I. y Anraku, Y. (1991). Monitoring of intracellular calcium in *Saccharomyces cerevisiae* with an apoaequorin cDNA expression system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 6878–6882.
149. Nichols, B. J., Rigoulet, M., y Denton, R. M. (1994). Comparison of the effects of  $Ca^{2+}$ , adenine nucleotides and pH on the kinetic properties of mitochondrial NAD(+)-isocitrate dehydrogenase and oxoglutarate dehydrogenase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and rat heart. *Biochem. J.* **303**, 461–465.
150. Nicholls, D. G. (1976). Hamster brown-adipose-tissue mitochondria. Purine nucleotide control of the ion conductance of the inner membrane, the nature of the nucleotide binding site. *Eur. J. Biochem.* **62**: 223–228.
151. Nicolli, A., Petronilli, V. y Bernardi, P. (1993). Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by matrix pH. Evidence that the pore open-closed probability is regulated by reversible histidine protonation. *Biochemistry.* **32**: 4461–4465.
152. Nicolli, A., Basso, E., Petronilli, V., Wengers, R. M. y Bernardi, P. (1996). Interactions of cyclophilin with the mitochondrial inner membrane and regulation of the permeability transition pore, and cyclosporin A-sensitive channel. *J. Biol. Chem.* **271**: 2185–2192.
153. Novgorodov, S. A., Guduz, T. I., Milgrom, Y. M. y Brierley, G. P. (1992). The permeability transition in heart mitochondria is regulated synergistically by ADP and cyclosporin A. *J. Biol. Chem.* **267**: 16274–16282.
154. O’Gorman, E., Beutner, G., Dolder, M., Koretsky, A. P., Brdiczka, D. y Wallimann, T. (1997). Role of creatine kinase in inhibition of permeability transition, *FEBS Lett.* **414**: 253–257.
155. Palmieri, F. (1994). Mitochondrial carrier proteins. *FEBS Lett.* **346**: 48–54.

156. Papa, S., Tuena de Gomez-Puyou, M. y Gomez-Puyou, A. (1975). On the mechanism of action of alkylguanidines on oxidative phosphorylation in mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **55**: 1-8.
157. Pavlov, E. V., Priault, M., Pietkiewicz, D., Cheng, E. H., Antonsson, B., Manon, S., Korsmeyer, S. J., Mannella, C. A. y Kinnally, K. W. (2001). A novel, high conductance channel of mitochondria linked to apoptosis in mammalian cells and Bax expression in yeast. *J. Cell. Biol.* **155**: 725-731.
158. Peña, A., Piña, M. Z., Escamilla, E. y Piña, E. (1977). A novel method for the rapid preparation of coupled yeast mitochondria. *FEBS Lett.* **80**: 209-213.
159. Pérez-Vázquez, V., Saavedra-Molina, A. y Uribe, S. (2003). In *Saccharomyces cerevisiae*, cations control the fate of the energy derived from oxidative metabolism through the opening and closing of the yeast mitochondrial unselective channel. *J. Bioenerg. Biomembr.* **353**: 231-241.
160. Petronilli, V., Cola, C. y Bernardi, P. (1993). Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore. II. The minimal requirements for pore induction underscore a key role for transmembrane electrical potential, matrix pH, and matrix  $Ca^{2+}$ . *J. Biol. Chem.* **268**: 1011-1016.
161. Petronilli, V., Costantini, P., Scorrano, L., Colonna, R., Passamonti, S. y Bernardi, P. (1994). The voltage sensor of the mitochondrial permeability transition pore is tuned by the oxidation-reduction state of vicinal thiols. Increase of the gating potential by oxidants and its reversal by reducing agents. *J. Biol. Chem.* **269**: 16638-16642.
162. Pfeiffer, D. R., Gudiz, T. I., Novgorodov, S. A. y Erdahl, W. L. (1995). The peptide mastoparan is a potent facilitator of the mitochondrial permeability transition. *J. Biol. Chem.* **270**: 4923-4932.
163. Pressman, B. C. (1963). The Effects of Guanidine and Alkylguanidines on the Energy Transfer Reactions of Mitochondria. *J. Biol. Chem.* **238**: 401-409.
164. Priault, M., Chaudhuri, B., Clow, A., Camougrand, N. y Manon, S. (1999). Investigation of bax-induced release of cytochrome c from yeast mitochondria permeability of mitochondrial membranes, Role of VDAC and ATP requirement. *Eur. J. Biochem.* **260**: 684-691.



165. Prieto, S., Bouillaud, F., Ricquier, D. y Rial, E. (1992). Activation by ATP of a proton-conducting pathway in yeast mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **208**: 487-491.
166. Prieto, S., Bouillaud, F. y Rial, E. (1995) The mechanism for the ATP-induced uncoupling of respiration in mitochondria of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **307**: 657-661.
167. Puskin, J. S., Gunter, T. E., Gunter, K. K. y Russell, P. R. (1976). Evidence for more than one  $\text{Ca}^{2+}$  transport mechanism in mitochondria. *Biochemistry.* **15**: 3834-3842.
168. Reed, K. C. y Bygrave, F. L. (1974). Accumulation of lanthanum by rat liver mitochondria. *Biochem. J.* **138**: 239-252.
169. Reed, J. C. (2000). Mechanisms of apoptosis (Warner-Lambert Award). *Am. J. Pathol.* **157**: 1415-1430.
170. Reed, J. C. y Bischoff, J. R. (2000). BIRinging chromosomes through cell division --and survivin´ the experience. *Cell* **102**: 545-548.
171. Robert, W., Gilkerson, J., Selker, R. M. L. y Capaldi, A. (2003). The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. *FEBS Letters* **546**:355- 358
172. Romslo, I. y Flatmark, T. (1973). Energy-dependent accumulation of iron by isolated rat liver mitochondria. II. Relationship to the active transport of  $\text{Ca}^{2+}$ . *Biochim. Biophys. Acta* **325**: 38-46.
173. Rostovtseva, T. y Colombini, M. (1996). ATP flux is controlled by a voltage-gated channel from the mitochondrial outer membrane. *J. Biol. Chem.* **271**:28006-28008.
174. Rottenberg, H. y Marbach, M. (1991). Alcohol stimulates  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange in brain mitochondria. *Life Sci.* **48**: 987-994.
175. Roucou, X., Manon, S. y Guérin, M. (1997a). Conditions allowing different states of ATP- and GDP-induced permeability in mitochondria from different strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys Acta* **1324**:120-32.
176. Roucou, X., Manon, S. y Guérin, M. (1997b). Modulation of the electrophoretic ATP-induced  $\text{K}^+$ -transport in yeast mitochondria by delta pH. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **43**: 53-61.

177. Roucou, X., Prescott, M., Devenish, R. J. y Nagley, P. (2000). A cytochrome c-GFP fusion is not released from mitochondria into the cytoplasm upon expression of Bax in yeast cells. *FEBS Lett.* **471**: 235-239.
178. Salvesen, G. S. y Dixit, V. M. (1997). Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* **91**: 443-446.
179. Saraste M. (1999). Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science* **283**: 1488-1493.
180. Satoh, M., Hamamoto, T., Seo, N., Kagawa, Y. y Endo, H. (2003). Differential sublocalization of the dynamin-related protein OPA1 isoforms in mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**: 482-93.
181. Shao, L., Kinnally, K. W. y Mannella, C. A. (1996). Circular dichroism studies of the mitochondrial channel, VDAC, from *Neurospora crassa*. *Biophys. J.* **71**:778-786.
182. Schein, S. J., Colombini, M., y Finkelstein, A. (1976). Reconstitution in planar lipid bilayers of a voltage-dependent anion-selective channel obtained from paramecium mitochondria. *J. Membr. Biol.* **30**: 99-120.
183. Schendel, S., Montal, M. y Reed, J. C. (1998). Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell. Death Differ.* **5**: 372-380
184. Shikama, K. (1971). Standard free energy maps for the hydrolysis of ATP as a function of pH, pMg and pCa. *Arch. Biochem. Biophys.* **147**: 311-317.
185. Shimizu, S., Shinohara, Y. y Tsujimoto, Y. (2000). Bax and Bcl-xL independently regulate apoptotic changes of yeast mitochondria that require VDAC but not adenine nucleotide translocator. *Oncogene.* **19**: 4309-4318.
186. Schultheiss, H. P y Klingenberg, M. (1984). Immunochemical characterization of the adenine nucleotide translocator. Organ specificity and conformation specificity. *Eur. J. Biochem.* **143**: 599-605.
187. Schlattner, U., Dolder, M., Wallimann, T. y Tokarska-Schlattner, M. (2001). Mitochondrial creatine kinase and mitochondrial outer membrane porin show a direct interaction that is modulated by calcium. *J. Biol. Chem.* **276**:48027-48030.

188. Scorrano, L., Petronilli, V. y Bernardi, P. (1997). On the voltage dependence of the mitochondrial permeability transition pore. A critical appraisal. *J. Biol. Chem.* **272**: 12295–12299.
189. Smith, J. L. (1998). Secret Life of Cytochrome bc<sub>1</sub>. *Science* **281**: 58-59.
190. Swiecilo, A., Krawiec, Z., Wawryn, J., Bartosz, G. y Bilinski, T. (2000). Effect of stress on the life span of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Biochim. Pol.* **47**: 355-364.
191. Szabo, I. y Zoratti, M. (1991). The giant channel of the inner mitochondrial membrane is inhibited by cyclosporin A. *J. Biol. Chem.* **266**: 3376-3379.
192. Szabo, I. y Zoratti, M. (1992). The mitochondrial megachannel is the permeability transition pore. *J. Bioenerg. Biomembr.* **24**: 111–117.
193. Szabo, I., De Pinto, V. y Zoratti, M. (1993). The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. II. The electrophysiological properties of VDAC are compatible with those of the mitochondrial megachannel. *FEBS Lett.* **330**: 206–210.
194. Szabo, I. y Zoratti, M. (1993). The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. I. Binary structure and voltage dependence of the pore. *FEBS Lett.* **330**: 201–205.
195. Tashmukhamedov, B. A., Gagelgans, A. I., Mamatkulov, K. y Makhmudova, E. M. (1972). Inhibition of Ca<sup>2+</sup> transport in mitochondria by selective blockade of membrane mucopolysaccharides by hexamine cobaltichloride. *FEBS Lett.* **28**: 239-242.
196. Uren, A. G., O'Rourke, K., Aravind, L. A., Pisabarro, M. T., Seshagiri, S., Koonin, E. V. y Dixit, V. M. (2000). Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol. Cell.* **6**: 961-967.
197. Uribe, S., Ramírez, J. y Peña, A. (1985). Effects of beta-pinene on yeast membrane functions. *J. Bacteriol.* **161**: 1195-1200.
198. Uribe, S., Rangel, P. y Pardo, J. P. (1992). Interactions of calcium with yeast mitochondria. *Cell Calcium* **13**: 211-217.

199. Vander Heiden, M. G., Li, X. X., Gottlieb, E., Hill, R. B., Thompson, C.B. y Colombini, M. (2002). Bcl-xL promotes the open configuration of the voltage-dependent anion channel and metabolite passage through the outer mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* **276**: 19414-19419.
200. Velours, J., Rigoulet, M. y Guérin, B. (1977). Protection of yeast mitochondrial structure by phosphate and other H<sup>+</sup>-donating anions. *FEBS Lett.* **81**: 18-22.
201. Vyssokikh, M. Y. y Brdiczka, D. 2003. The function of complexes between the outer mitochondrial membrane pore (VDAC) and the adenine nucleotide translocase in regulation of energy metabolism and apoptosis. *Acta Biochim Pol.* **50**: 389-404.
202. Walter, L., Nogueira, V., Lerverve, X., Heitz, M. P., Bernardi, P. y Fontaine, E. (2000). Three classes of ubiquinone analogs regulate the mitochondrial permeability transition pore through a common site. *J. Biol. Chem.* **275**: 29521-29527.
203. Wang, K. K. (2000). Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci.* **23**: 20-26.
204. Welihinda, A. A., Trumbly, R. J., Garlid, K. D. y Beavis, A. D. (1993). On the regulation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in yeast mitochondria: evidence for the absence of an Na<sup>+</sup>-selective Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Biochim. Biophys. Acta* **1144**: 367-373.
205. Wikstrom, M. (1998). Proton translocation by bacteriorhodopsin and heme-copper oxidases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**: 480-488.
206. Wingrove, D. E. y Gunter, T. E. (1986a). Kinetics of mitochondrial calcium transport. II. A kinetic description of the sodium-dependent calcium efflux mechanism of liver mitochondria and inhibition by ruthenium red and by tetraphenylphosphonium. *J. Biol. Chem.* **261**: 15166-15171.
207. Wingrove, D. E. y Gunter, T. E. (1986b). Kinetics of mitochondrial calcium transport. I. Characteristics of the sodium-independent calcium efflux mechanism of liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **261**: 15159-15165.
208. Winkler, E. y Klingenberg, M. (1994). Effect of fatty acids on H<sup>+</sup> transport activity of the reconstituted uncoupling protein. *J. Biol. Chem.* **269**: 2508-2515.

209. Wolkowicz, P. E., Michael, L. H., Lewis, R. M. y McMillin-Wood, J. (1983). Sodium-calcium exchange in dog heart mitochondria: effects of ischemia and verapamil. *Am. J. Physiol.* **244**: H644-H651.
210. Woodfield, K. Y., Price, N. T. y Halestrap, A. P. (1997). cDNA cloning of rat mitochondrial cyclophilin. *Biochim. Biophys. Acta* **1351**: 27-30.
211. Xia, D., Yu, C., Kim, H., Xia, J., Kachurin, M. A., Zhang, L., Yu, L. y Deisenhofer, J. (1997). Crystal Structure of the Cytochrome bc<sub>1</sub> Complex from Bovine Heart Mitochondria. *Science* **277**: 60-66.
212. Yang, J., Lui, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., Peng, T. I., Jones, D. P. y Wang, X. (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* **275**: 1129-1132.
213. Ying, W. L., Emerson, J., Clarke, M. J. y Sanadi, D.R. (1991). Inhibition of mitochondrial calcium ion transport by an oxo-bridged dinuclear ruthenium ammine complex. *Biochemistry* **30**: 4949-452.
214. Yoshikawa, S., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yamashita, E., Inoue, N., Yao, M., Fei, M. J., Peters, C. L., Mizushima, T., Yamaguchi, H., Tomizaki, T. y Tsukihara, T. (1998). Redox-Coupled Crystal Structural Changes in Bovine Heart Cytochrome c Oxidase. *Science* **280**: 1723-1729.
215. Zha, H., Fisk, H. A., Yaffe, M. P., Majan, N., Herman, B. y Reed, J. C. (1996) Structure-function comparisons of the proapoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 6494-6508.
216. Zizi, M., Forte, M., Blachly-Dyson, E. y Colombini, M. (1994). NADH regulates the gating of VDAC, the mitochondrial outer membrane channel. *J. Biol. Chem.* **269**: 1614-1616.
217. Zoratti, M. y Szabo, I. (1994). Electrophysiology of the inner mitochondrial membrane. *J. Bioenerg. Biomembr.* **26**: 543-553.
218. Zoratti, M. y Szabo, I. (1995). The mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta* **1241**: 139-176.

**ANEXO**

## In *Saccharomyces cerevisiae*, Cations Control the Fate of the Energy Derived From Oxidative Metabolism Through the Opening and Closing of the Yeast Mitochondrial Unselective Channel

Victoriano Pérez-Vázquez,<sup>1</sup> Alfredo Saavedra-Molina,<sup>2</sup> and Salvador Uribe<sup>1,3</sup>

Received December 6, 2002; accepted March 11, 2003

The yeast mitochondrial unselective channel (YMUC) sensitivity to inorganic ( $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Mg}^{2+}$ ) or organic (hexyl or octyl-guanidine) cations was measured. The rate of oxygen consumption in State 3 and State 4, the transmembrane potential ( $\Delta\psi$ ), mitochondrial swelling, and the polyethylene-glycol mediated recontraction were used to follow opening of the YMUC. Addition of 0.4 mM  $\text{PO}_4$  did not close the YMUC, although it did enhance the sensitivity to  $\text{Ca}^{2+}$  ( $I_{50}$  decreased from 50 to 0.3 mM) and  $\text{Mg}^{2+}$  ( $I_{50}$  decreased from 5 to 0.83 mM  $\text{Mg}^{2+}$ ). The  $\text{Ca}^{2+}$  concentration needed to close the YMUC was higher than the concentrations usually observed in the cell. Nonetheless,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , and  $\text{PO}_4$  exhibited additive effects. These cations did not inhibit contraction of preswollen mitochondria, suggesting that the YMUC/cation interaction was labile. Octyl-guanidine (OG- $I_{50}$  7.5  $\mu\text{M}$ ) was the only cation which inhibited mitochondrial recontraction, probably as a result of membrane binding stabilization through its hydrophobic tail. The  $\text{PO}_4$ -dependent,  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -mediated closure of the YMUC may be a means to control the proportion of oxidative energy producing ATP or being lost as heat.

**KEY WORDS:**  $\text{Ca}^{2+}$ ;  $\text{Mg}^{2+}$ ; octyl-guanidine; permeability transition; phosphate; energetic charge; yeast mitochondria; YMUC.

### INTRODUCTION

The physiological significance of mitochondrial unselective conductance is not clear. A large number of publications link unselective pore opening to cell death in mammalian systems (Crompton, 1999; Lemasters *et al.*, 1998). However, other authors have proposed that unselective channels may participate in activities such as

Key to abbreviations:  $\Delta\psi$ , transmembrane potential; HG, hexyl-guanidine; OG, octyl-guanidine; PEG, polyethylene glycol; PTP, permeability transition pore; RC, respiratory control; YMUC, yeast mitochondrial unselective channel.

<sup>1</sup>Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México, DF, México.

<sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas UMSNH, México, DF, México.

<sup>3</sup>To whom correspondence should be addressed at Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo Postal 70-242, Cd. Universitaria, 04510 México, DF, México; e-mail: suribe@ifc.unam.mx.

ion detoxification or energy dissipation (Bernardi and Petronilli, 1996; Lohret and Kinnally, 1995; Zoratti and Szabo, 1995). In mammalian cells,  $\text{Ca}^{2+}$  is the candidate to be expelled from mitochondria upon opening of the permeability transition pore (PTP) and depolarization. It has been proposed that yeast would profit from this channel if it could switch mitochondrial metabolism from ATP to heat production and back (Beauvoit *et al.*, 1993; Dejean *et al.*, 2000). Yeast mass yield varies widely in a cAMP controlled fashion, probably involving mitochondria (Dejean *et al.*, 2002). The yeast mitochondrial unselective channel (YMUC) is alternatively termed the yeast permeability transition pore (yPTP) (Jung *et al.*, 1997).

The YMUC and the PTP exhibit similar conductivity properties, but different or even opposite effector sensitivity (For reviews see, Jung *et al.*, 1997; Manon *et al.*, 1998; Zoratti and Szabo, 1995). Whether these channels are equivalent structures or serve the same functions is still

undefined, however, the use of yeast as a model to study cell death is growing (Matsuyama *et al.*, 1999). Furthermore, the existence of a death program in yeast has been recently reported (Madeo *et al.*, 1999), opening the need to study the mechanism(s) controlling this program.

In its inner mitochondrial membrane, *S. cerevisiae*, possesses two high conductance channels exhibiting currents of 400 and 40 pS, respectively (Ballarin and Sorgato, 1995). At least one of these mildly anionic channels seems to constitute a source of unspecific permeation to ions and small solutes and it has been identified as the YMUC (Manon *et al.*, 1998). When open, the YMUC allows charge equilibration (Castrejón *et al.*, 1997) and the passage of solutes as large as 1.1 kDa across the inner membrane (Jung *et al.*, 1997). In the presence of high  $[K^+]$  and in the absence of  $PO_4$ , addition of ATP, ethanol or NADH leads to mitochondrial swelling and transmembrane potential ( $\Delta\psi$ ) depletion (Prieto *et al.*, 1992).

Different molecules control the opening of unspecific channels from different sources: the YMUC is open by ATP and respiratory substrates, while it is closed by  $PO_4$  (Roucou *et al.*, 1997; Velours *et al.*, 1977),  $SO_4$ ,  $AsO_4$  (Cortés *et al.*, 2000), and  $decaVdO_4$  (Manon *et al.*, 1998). In addition, it has been reported that neither  $Ca^{2+}$  nor cyclosporin-A have effects on the YMUC (Manon and Guérin, 1992; Szabo *et al.*, 1995). In contrast, the PTP is closed by ATP and cyclosporin-A, while  $Ca^{2+}$  plus  $PO_4$  induce its opening (Halestrap and Davidson, 1990). Recently octyl-guanidine, an amphiphilic cation, has been reported to inhibit PTP opening with high affinity (Chávez *et al.*, 2000). The authors have proposed that the association between the PTP and octyl-guanidine is stabilized by insertion of the hydrophobic alkyl chain in the membrane core (Chávez *et al.*, 2000).

In regard to  $Ca^{2+}$  and yeast mitochondria, this cation does seem to regulate the activity of some enzymes such as the mitochondrial pyrophosphatase (Uribe *et al.*, 1993), while in contrast pyruvate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase, and oxoglutarate dehydrogenase, which are regulated by  $Ca^{2+}$  in mammalian mitochondria (Denton and McCormack, 1980), do not seem to be affected by  $Ca^{2+}$  in yeast (Nichols *et al.*, 1994). Recently, a fatty acid-activated  $Ca^{2+}/H^+$  antiporter catalyzing the active efflux of  $Ca^{2+}$  was detected in mitochondria from *S. cerevisiae* (Bradshaw *et al.*, 2001). This efflux activity is higher than the uptake rates reported before (Uribe *et al.*, 1992). Thus, the role of  $Ca^{2+}$  in yeast mitochondria is still open to exploration. Furthermore, it has been reported that  $Ca^{2+}$  does not open the YMUC, although no efforts were made to determine whether closure was promoted (Jung *et al.*, 1997).

Another physiologically important divalent cation,  $Mg^{2+}$  reaches millimolar concentrations in both the cy-

toplasm and the mitochondrial matrix (Jung and Brierley, 1986; Masiacos *et al.*, 1991). In diverse biological systems, both  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  have been reported to have additive, synergistic or antagonistic effects (Pérez-Vázquez *et al.*, 2002; Uribe *et al.*, 1993; Zhu *et al.*, 2002). For a long time the concentration of  $Mg^{2+}$  was assumed to remain constant in the cell (Corkey *et al.*, 1986). However, recently it was demonstrated that mammalian cells expel  $Mg^{2+}$  in response to hormonal stimuli and thus, at least in some instances  $Mg^{2+}$  may regulate metabolism acting instead or in concert with  $Ca^{2+}$  (Romani *et al.*, 1993; Romani and Scarpa, 1992).

To determine whether the YMUC has a cation-sensitive site, the divalent cations  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  and the organic cations hexyl (HG) and octyl-guanidine (OG) were tested in isolated mitochondria. Oxygen consumption,  $\Delta\psi$ , and swelling were measured to determine the degree of membrane permeation. It was observed that depending on whether  $PO_4$  was present in the medium, all four cations tested promoted coupling. In contrast, recontraction of swollen mitochondria was not inhibited by  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , or HG, although it was sensitive to OG. It is suggested that, cation/membrane dissociation occurred after depletion of the  $\Delta\psi$ , unless there was an additional strong hydrophobic cation/membrane interaction, as seems to be the case for OG (Pressman, 1963). The possible physiological significance of the cation-mediated,  $PO_4$ -dependent regulation of the YMUC is discussed.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

All chemicals were reagent grade. Mannitol, MES, polyethylene glycol (PEG), succinate, safranin-O,  $CaCl_2$ ,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  and bovine serum albumin type V were from Sigma Chem Co. (St. Louis, MO). All other reagents were of the highest purity commercially available. A commercial strain of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* (La Azteca, S.A.) was purchased from a local bakery and grown overnight in sterile rich medium.

### Isolation of Yeast Mitochondria

Yeast (50 g) were suspended and incubated in a rich liquid medium (De-Kloet *et al.*, 1961) under aeration (3 L/min) for 8 h, washed, suspended in distilled water and starved overnight under aeration. The cells were washed by centrifugation three times and suspended in 0.6 M mannitol, 5 mM MES, 0.1% bovine serum albumin, pH 6.8 (triethanolamine). Cells were disrupted using



a Braun cell homogenizer and 0.45 mm diameter glass beads (Uribe *et al.*, 1985). From the homogenate, mitochondria were isolated by differential centrifugation in a SS34 rotor (Sorvall) (Peña *et al.*, 1977). Protein concentration was determined by the Biuret method (Gornal *et al.*, 1949).

### Oxygen Consumption

The rate of oxygen consumption was measured in the resting state (State 4) and in the phosphorylating state (State 3) using an YSI model 5300 Oxygraph equipped with a Clark-Type electrode at room temperature in a 3-mL chamber containing mitochondria at a final concentration of 0.5 mg prot/mL (Estabrook, 1967). The reaction mixture was 0.6 M mannitol, 5 mM Mes pH 6.8 (TEA) plus 1  $\mu$ L/mL ethanol as a substrate. The concentrations of  $\text{PO}_4$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , and  $\text{K}^+$  used are indicated under each figure. Stock solutions were 1.0 M  $\text{MgCl}_2$ , 2.0 M KCl, and either 1.0 or 0.1 M  $\text{PO}_4$  buffer, pH 6.8 (Tris) as needed.

### Transmembrane Potential ( $\Delta\Psi$ )

The  $\Delta\Psi$  was determined using safranin-O, following the absorbance changes at 511–533 nm (Åkerman and Wikstrom, 1976) in a DW2000 Aminco spectrophotometer in dual mode.

### Mitochondrial Swelling

The  $\text{K}^+$  mediated mitochondrial swelling was determined at room temperature, following the change in absorbance at 540 nm in a DW 2000 Aminco spectrophotometer in split mode. The spectrophotometer was equipped with a magnetic stirrer (Halestrap and Davidson, 1990).

### PEG-Induced Contraction of Swollen Mitochondria

To evaluate recontraction, mitochondria were subjected to  $\text{K}^+$  mediated swelling for approximately 4 min. Once swelling stopped, as determined by stabilization of absorbance, recontraction was promoted by the addition of polyethylene glycols (PEG) of different molecular weights and followed spectrophotometrically (Jung *et al.*, 1997). The PEG concentration needed to reach 300 mOsm was determined considering their nonideal osmotic behavior (Pfeiffer *et al.*, 1995). For the 300 mOsm stock solutions,

the following concentrations were used: for the 0.4 kDa PEG, 199 mM; for the 0.6 kDa PEG, 172 mM; for the 1.0 kDa PEG, 136 mM; and for the 1.45 kDa PEG, 111 mM (Pfeiffer *et al.*, 1995).

## RESULTS

Opening of the YMUC results in uncoupling of mitochondria (Castrejón *et al.*, 1997; Manon *et al.*, 1998). Thus, the effects of increasing concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , HG, or OG on the rate of  $\text{O}_2$  consumption in State 4 and in State 3, and on the respiratory control (RC) were tested (Fig. 1) in the presence of 0.4 mM  $\text{PO}_4$ . This  $\text{PO}_4$  concentration does not close the YMUC, but does

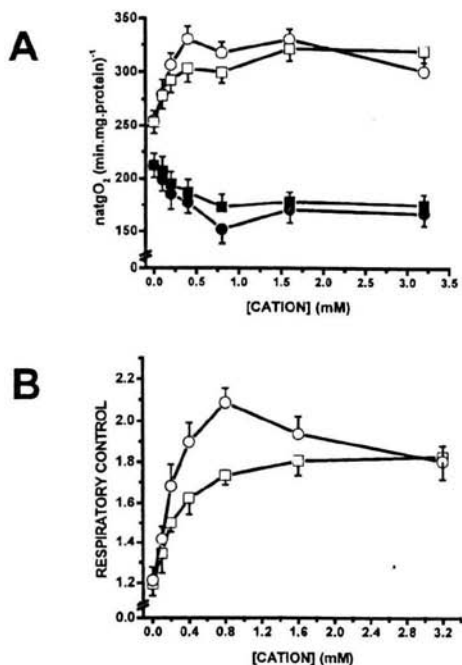


Fig. 1. Effect of  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Mg}^{2+}$  on the rate of  $\text{O}_2$  consumption and on the respiratory control in isolated yeast mitochondria. Reaction mixture: 0.6 M mannitol, 5 mM MES, pH 6.8, 1  $\mu$ L/mL ethanol, 20 mM KCl, 0.4 mM  $\text{PO}_4$ , pH 6.8 (Tris) and the indicated  $\text{CaCl}_2$  and  $\text{MgCl}_2$  concentrations. State 3 was induced adding 150  $\mu$ M ADP. (A) Rates of oxygen consumption in State 3 (Open symbols) and State 4 (Closed symbols).  $\circ$  and  $\bullet$   $\text{Ca}^{2+}$ ;  $\square$  and  $\blacksquare$   $\text{Mg}^{2+}$ . (B) Respiratory control in the presence of  $\circ$   $\text{Ca}^{2+}$  or  $\square$   $\text{Mg}^{2+}$ . Each point represents the mean of five experiments  $\pm$  SD.

participate in the phosphorylation reaction needed to establish State 3. In the absence of cations, the rates of O<sub>2</sub> consumption were as follows (Fig. 1(A)): in State 4 the rate was 212 natgO<sub>2</sub> (min·mg prot)<sup>-1</sup> and in State 3 it was 252 natgO<sub>2</sub> (min·mg prot)<sup>-1</sup> (Fig. 1(A)) yielding a RC of 1.2 (Fig. 1(B)), indicative of almost complete uncoupling. Addition of increasing Ca<sup>2+</sup> or Mg<sup>2+</sup> resulted in an increase in RC, which resulted from both an increase in the rate of O<sub>2</sub> consumption in State 3 and a decrease in State 4. For Ca<sup>2+</sup>, the increase in State 3 was higher and occurred at slightly lower Ca<sup>2+</sup> than Mg<sup>2+</sup> (Fig. 1(A)): in the presence of 0.6 mM Ca<sup>2+</sup>, the RC was 2.1 while at 1.6 mM Mg<sup>2+</sup>, RC = 1.8 (Fig. 1(B)). At the highest [Ca<sup>2+</sup>] or [Mg<sup>2+</sup>] tested (3.2 mM), State 3 rate was 308 natgO<sub>2</sub> (min·mg prot)<sup>-1</sup> and State 4 was 170 natgO<sub>2</sub> (min·mg prot)<sup>-1</sup> (Fig. 1(A)) with an RC = 1.8 (Fig. 1(B)) for either cation.

Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> coexist in the cell modulating the effects of each other. In our system, both Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> increased RC, so it was decided to test whether these cations acted synergistically. To do so, the effect of increasing Ca<sup>2+</sup> (0–0.6 mM) on the rates of O<sub>2</sub> consumption in State 3 and State 4 was measured in the presence of two fixed concentrations of Mg<sup>2+</sup> (0.5 or 1 mM) (Table I). In the absence of Ca<sup>2+</sup>, at 0.5 mM Mg<sup>2+</sup>, RC = 1.65 and at 1 mM Mg<sup>2+</sup>, RC = 1.78. Then, in the presence of increasing Ca<sup>2+</sup> (0.1–0.6 mM), the rate of O<sub>2</sub> consumption in State 3 increased and State 4 decreased, with the consequent increase in RC: at 0.5 mM Mg<sup>2+</sup> plus 0.5 μM Ca<sup>2+</sup> or at 1 mM Mg<sup>2+</sup> plus 0.3 μM Ca<sup>2+</sup> the RC was 2.4. At higher Ca<sup>2+</sup> the RC did not increase further (Table I). Thus, the effects of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> were additive, resulting in higher RC than either cation when added alone (Fig. 1 and Table I).

In addition to Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>, the effects of alkyl-guanidines were analyzed (Table II). Ethyl- and butyl-

guanidine did not affect mitochondrial coupling (results not shown). In contrast, hexyl-guanidine and octyl-guanidine promoted a concentration dependent increase in the RC. Their effects were similar to those of Ca<sup>2+</sup> or Mg<sup>2+</sup>, except the concentrations needed to couple mitochondria were lower: 25 μM hexyl-guanidine or 12.5 μM octyl-guanidine promoted the maximal increase in RC (Table II). As expected from the literature (Papa *et al.*, 1975; Pressman, 1963), at higher alkyl-guanidine concentrations inhibition of respiration was observed while no further increase in RC was observed (results not shown). Therefore, the highest alkyl-guanidine concentrations tested in all the following experiments were 25 μM hexyl-guanidine or 12.5 μM octyl-guanidine.

The coupling effects of Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, and alkyl-guanidines were also evaluated by determining whether the transmembrane potential ( $\Delta\psi$ ) was stabilized by each of these cations. In the absence of cations, only a transient  $\Delta\psi$  was detected and mitochondria were depolarized within 1 min. When increasing Ca<sup>2+</sup> (Fig. 2(A)) or Mg<sup>2+</sup> (Fig. 2(B)) were added, a stable  $\Delta\psi$  was generated, reaching the highest stability at 0.5 mM Ca<sup>2+</sup> (Fig. 2(A), trace f) or higher (results not shown) and at 1.0 mM Mg<sup>2+</sup> (Fig. 2(B), trace f) or higher (results not shown). Although the  $\Delta\psi$  was stabilized by either cation, it did not reach the stability observed in the presence of 4 mM PO<sub>4</sub> (Fig. 2(A) or (B), trace g).

It was decided to test whether Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> exhibited additive effects on the  $\Delta\psi$  (Fig. 3). Experiments were performed at 0.5 (Fig. 3(A)) or 1.0 mM Mg<sup>2+</sup> (Fig. 3(B)) and increasing concentrations of Ca<sup>2+</sup>. At both Mg<sup>2+</sup> concentrations, Ca<sup>2+</sup> addition increased the  $\Delta\psi$ , such that at 0.4 mM Ca<sup>2+</sup> (Fig. 3(A) and (B), traces d) the  $\Delta\psi$  was as stable as the control performed in the presence of 4 mM PO<sub>4</sub> (Fig. 3(A) and (B), traces f). These results indicated that when added together, Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> stabilized the

**Table I.** Rates of O<sub>2</sub> Consumption and Respiratory Control of Isolated Yeast Mitochondria in the Presence of Two Fixed Concentrations of Mg<sup>2+</sup> and Increasing Concentrations of Ca<sup>2+</sup>

Ca <sup>2+</sup> (mM)	0.5 mM Mg <sup>2+</sup>			1.0 mM Mg <sup>2+</sup>		
	State 3 (natgO <sub>2</sub> )	State 4 (min·mg protein) <sup>-1</sup>	RC (E3/E4)	State 3 (natgO <sub>2</sub> )	State 4 (min·mg protein) <sup>-1</sup>	RC (E3/E4)
0	298 ± 10	179 ± 13	1.7 ± 0.1	294 ± 15	167 ± 13	1.8 ± 0.1
0.1	329 ± 12	165 ± 11	1.8 ± 0.1	293 ± 14	161 ± 11	2.0 ± 0
0.2	340 ± 13	152 ± 12	1.9 ± 0.2	293 ± 12	152 ± 12	2.2 ± 0.1
0.3	349 ± 14	148 ± 14	2.1 ± 0.1	310 ± 11	146 ± 14	2.4 ± 0.1
0.4	333 ± 14	144 ± 11	2.2 ± 0.1	322 ± 14	136 ± 11	2.4 ± 0.1
0.5	327 ± 17	140 ± 12	2.4 ± 0.1	328 ± 12	133 ± 12	2.5 ± 0.1
0.6	327 ± 11	132 ± 13	2.4 ± 0.2	326 ± 17	134 ± 14	2.4 ± 0.1

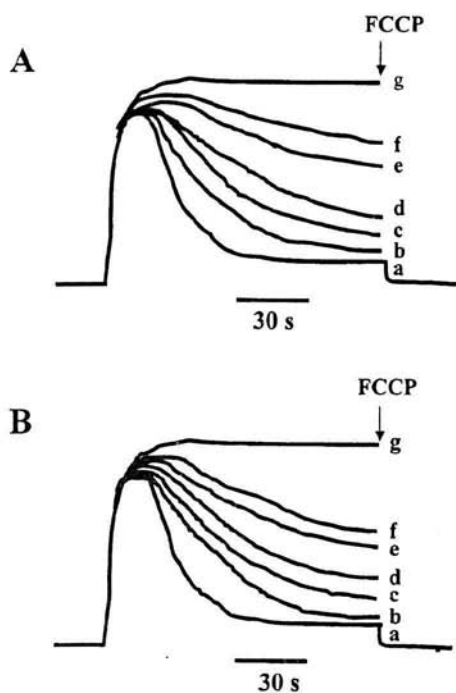
*Note.* Reaction mixture as in Fig. 1, except Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> concentrations, which are indicated. State 3 was induced by adding 150 μM ADP. Each number is the mean of five determinations ± SD.

**Table II.** Effect of Increasing Hexyl-guanidine or Octyl-Guanidine Concentrations on the Rate of O<sub>2</sub> Consumption and on the Respiratory Control of Isolated Yeast Mitochondria

HG ( $\mu\text{M}$ )	State 3 (natgO <sub>2</sub> )	State 4 (min-mg protein) <sup>-1</sup>	RC (E3/E4)	OG ( $\mu\text{M}$ )	State 3 (natgO <sub>2</sub> )	State 4 (min-mg protein) <sup>-1</sup>	RC (E3/E4)
0	258 $\pm$ 10	213 $\pm$ 9	1.2 $\pm$ 0.1	0	258 $\pm$ 8	213 $\pm$ 9	1.2 $\pm$ 0.1
5	273 $\pm$ 9	195 $\pm$ 12	1.4 $\pm$ 0.1	2.5	277 $\pm$ 10	198 $\pm$ 12	1.4 $\pm$ 0.1
10	290 $\pm$ 12	180 $\pm$ 10	1.6 $\pm$ 0.1	5	296 $\pm$ 11	185 $\pm$ 9	1.6 $\pm$ 0.1
15	306 $\pm$ 10	173 $\pm$ 11	1.8 $\pm$ 0.1	7.5	313 $\pm$ 12	175 $\pm$ 13	1.8 $\pm$ 0.2
20	317 $\pm$ 13	167 $\pm$ 10	1.9 $\pm$ 0.1	10	322 $\pm$ 11	168 $\pm$ 10	1.9 $\pm$ 0.1
25	321 $\pm$ 12	163 $\pm$ 13	2.0 $\pm$ 0.2	12.5	327 $\pm$ 10	165 $\pm$ 11	2.0 $\pm$ 0.1

Note. Reaction mixture as in Fig. 1, except for the indicated hexyl-guanidine and octyl-guanidine concentrations. State 3 was induced by adding 150  $\mu\text{M}$  ADP. Each number is the mean of five determinations  $\pm$  SD.

$\Delta\psi$  more efficiently than each cation by itself, supporting the idea that these two cations act synergistically to close the YMUC.



**Fig. 2.** Effect of Ca<sup>2+</sup> or Mg<sup>2+</sup> on the transmembrane potential ( $\Delta\psi$ ) of isolated yeast mitochondria. Experimental conditions as in Fig. 1, except 10  $\mu\text{M}$  safranin was added. (A) Ca<sup>2+</sup> additions were a, control; b, 0.1 mM; c, 0.2 mM; d, 0.3 mM; e, 0.4 mM; f, 0.5 mM, and g, none, plus 4 mM PO<sub>4</sub>. (B) Mg<sup>2+</sup> additions were a, control; b, 0.2 mM; c, 0.4 mM; d, 0.6 mM; e, 0.8 mM, f, 1 mM, and g, none, plus 4 mM PO<sub>4</sub>.

In regard to the alkyl-guanidines, it was observed that increasing concentrations of either HG (Fig. 4(A)) or OG (Fig. 4(B)) stabilized the  $\Delta\psi$  and complete stabilization was observed at 25  $\mu\text{M}$  HG (Fig. 4(A), trace e) or 12.5  $\mu\text{M}$  OG (Fig. 4(B), trace e).

Initially, during the  $\Delta\psi$  measurements, PO<sub>4</sub> was omitted. However, it was observed that the YMUC lost most of its sensitivity to each of the cations tested here, i.e., when PO<sub>4</sub> was absent from the reaction mixture, the concentrations of Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, HG, or OG needed to observe closure of the YMUC were exceedingly high: a partially stable  $\Delta\psi$  could be observed only at 50 mM Ca<sup>2+</sup> or 5 mM Mg<sup>2+</sup> (results not shown) and it was not possible to determine the concentration at which HG or OG closed the YMUC because the respiratory chain was inhibited at high alkyl-guanidine concentrations (results not shown) (Papa *et al.*, 1975; Pressman, 1963). Further experiments measuring O<sub>2</sub> consumption in State 4 and the uncoupled state confirmed that there is a large decrease in sensitivity of the YMUC to Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, HG, or OG when in the absence of PO<sub>4</sub> (results not shown). These results indicated that the cation sensitivity of the YMUC is regulated by PO<sub>4</sub>.

Under open YMUC conditions, the uptake of K<sup>+</sup> promotes energy-dependent mitochondrial swelling (Castrejón *et al.*, 1997). Thus, to test whether Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, HG, or OG close the YMUC, it was decided to evaluate mitochondrial swelling in the presence of 0.4 mM PO<sub>4</sub>. As expected from the O<sub>2</sub> consumption and  $\Delta\psi$  experiments, increasing concentrations of each cation tested resulted in gradual inhibition of mitochondrial swelling, such that swelling was negligible at 0.5 mM Ca<sup>2+</sup> (Fig. 5(A), trace f), 1.0 mM Mg<sup>2+</sup> (Fig. 5(B), trace f), 25  $\mu\text{M}$  hexyl-guanidine (Fig. 5(C), trace f) or 12.5  $\mu\text{M}$  octyl-guanidine (Fig. 5(D), trace f). Higher concentrations of each cation did not promote higher inhibition of swelling (results not shown). When PO<sub>4</sub> was omitted from the reaction mixture the concentrations of each of these cations needed to inhibit swelling increased manifold, to the same extent as

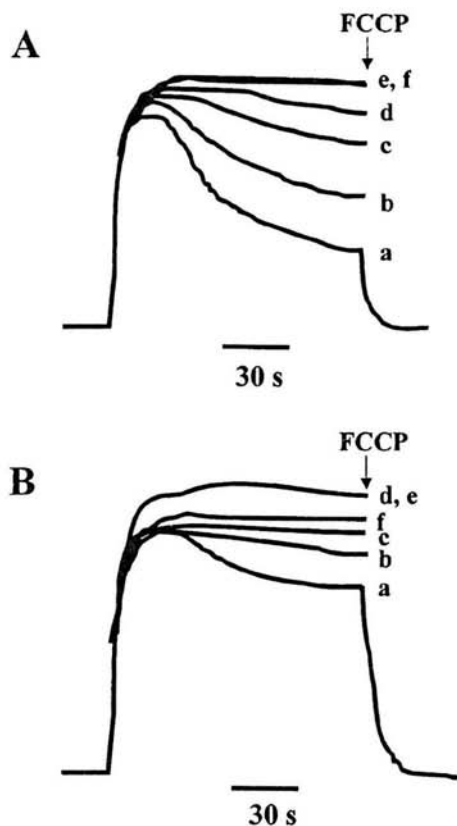


Fig. 3. Effect of increasing  $\text{Ca}^{2+}$  on the  $\Delta\psi$  of isolated yeast mitochondria assayed in the presence of two fixed  $[\text{Mg}^{2+}]$ . Experimental conditions as in Fig. 2. (A) 0.5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , (B) 1.0 mM  $\text{Mg}^{2+}$ .  $\text{Ca}^{2+}$  additions were a, none; b, 0.1 mM; c, 0.2 mM; d, 0.3 mM; e, 0.4 mM, and f, none, plus 4 mM  $\text{PO}_4$ .

in the  $\text{O}_2$  consumption or in the  $\Delta\psi$  experiments (results not shown).

It was decided to test whether  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  exhibited synergistic inhibitory effects on swelling. It was observed that in the presence of 0.5 or 1 mM  $\text{Mg}^{2+}$  and increasing concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$ , swelling was inhibited, and that at 0.3 mM  $\text{Ca}^{2+}$  swelling was inhibited to a higher degree than when each cation was added alone, even at higher concentrations (results not shown).

To explore the mechanism of the cation/YMUC interaction, it was decided to test whether the binding of the positively charged  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , or alkyl-guanidines to the YMUC was dependent on the  $\Delta\psi$ , which is neg-

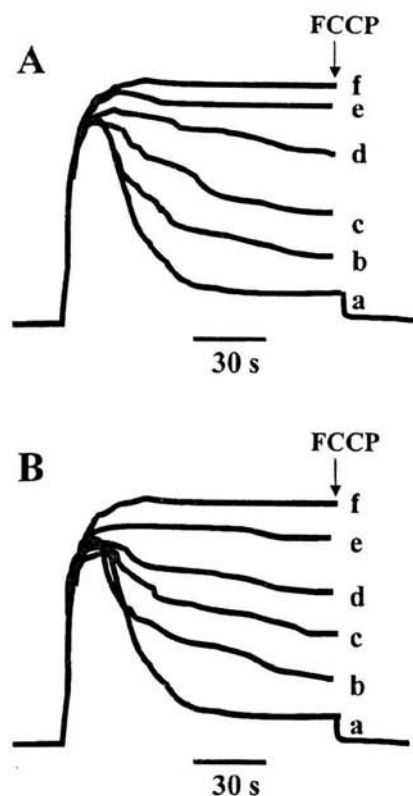


Fig. 4. Effect of hexyl-guanidine or octyl-guanidine on the  $\Delta\psi$  of isolated yeast mitochondria. Experimental conditions as in Fig. 2. (A) Hexyl-guanidine concentrations were a, 0; b, 5  $\mu\text{M}$ ; c, 10  $\mu\text{M}$ ; d, 15  $\mu\text{M}$ ; e, 20  $\mu\text{M}$ ; f, 25  $\mu\text{M}$ . (B) Octyl-guanidine additions were a, 0; b, 2.5  $\mu\text{M}$ ; c, 5  $\mu\text{M}$ ; d, 7.5  $\mu\text{M}$ ; e, 10  $\mu\text{M}$ , and f, 12.5  $\mu\text{M}$ .

ative inside and thus should attract cations. To do this, polyethylene-glycol (PEG)-mediated mitochondrial recontraction was evaluated in the presence of each effector. PEGs of different molecular weights have been used to estimate the size of the PTP (Pfeiffer *et al.*, 1995) or to induce recontraction of previously swollen mammalian mitochondria (Haworth and Hunter, 1979). Furthermore, in yeast mitochondria PEGs have been used to examine the size-exclusion properties of the YMUC (Jung *et al.*, 1997). Thus, to determine whether the YMUC was closed or not by  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , HG, or OG, it was decided to examine the effects of four different PEGs on swollen,  $\Delta\psi$ -depleted mitochondria. The logic was that once the YMUC was closed, swollen,  $\text{K}^+$  loaded mitochondria would recover

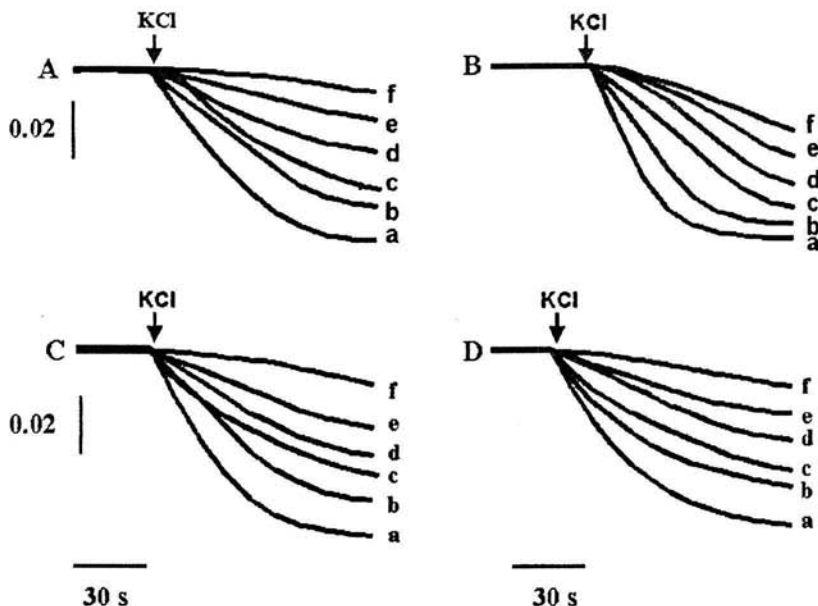


Fig. 5. Effect of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , hexyl-guanidine or octyl-guanidine on the swelling rate of isolated yeast mitochondria. Reaction mixture as in Fig. 1, except KCl (20 mM) was added at the arrow. (A)  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations were a, 0; b, 0.1 mM; c, 0.2 mM; d, 0.3 mM; e, 0.4 mM; f, 0.5 mM. (B)  $\text{Mg}^{2+}$  concentrations were a, 0; b, 0.2 mM; c, 0.4 mM; d, 0.6 mM; e, 0.8 mM, and f, 1 mM. (C) Hexyl-guanidine concentrations were a, 0; b, 5  $\mu\text{M}$ ; c, 10  $\mu\text{M}$ ; d, 15  $\mu\text{M}$ ; e, 20  $\mu\text{M}$ , and f, 25  $\mu\text{M}$ . (D) Octyl-guanidine concentrations were a, 0; b, 2.5  $\mu\text{M}$ ; c, 5  $\mu\text{M}$ ; d, 7.5  $\mu\text{M}$ ; e, 10  $\mu\text{M}$ , and f, 12.5  $\mu\text{M}$ .

their impermeability and thus, even in the presence of a PEG-mediated increase in external osmolarity mitochondria would be unable to neither expel the  $\text{K}^+$  from the matrix nor recontract.

Mitochondria were incubated for 2 or 3 min in the presence of 0.4 mM  $\text{PO}_4$ , 20 mM KCl and 1  $\mu\text{L}$  ethanol/mL which resulted in  $\Delta\psi$  depletion and swelling. Once mitochondria were swollen, each putative YMUC effector was added at the following concentrations: Control without additions (Fig. 6(A)), 4 mM  $\text{PO}_4$  (Fig. 6(B)), 0.6 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 6(C)), 2 mM  $\text{Mg}^{2+}$  (results not shown), 25  $\mu\text{M}$  HG (results not shown) or 15  $\mu\text{M}$  OG (Fig. 6(D)). After further incubation (30 sec) recontraction of mitochondria was induced by adding PEGs of different molecular weights (Fig. 6). In the control traces it was observed that the smaller PEGs, of 0.4 (Fig. 6(A), trace b) or 0.6 kDa (Fig. 6(A), trace c), which have been reported to permeate through the open YMUC (Jung *et al.*, 1997), promoted only a mild recontraction of mitochondria. In contrast, addition of the larger PEGs, weighing 1.0 kDa (Fig. 6(A), trace d) or 1.45 kDa (Fig. 6(A), trace e) respectively, did

promote recontraction. It has been suggested that recontraction occurs when addition of large PEGs which cannot cross the membrane, results in an increase in external osmolarity, forcing mitochondria to expel  $\text{K}^+$ . In contrast, when these same PEGs were tested after the addition of 4 mM  $\text{PO}_4$  (Fig. 6(B)), which is known to close the YMUC, none of the PEGs were able to promote recontraction, indicating that the  $\text{PO}_4$  promoted closure of the YMUC was tight enough to inhibit  $\text{K}^+$  efflux (Fig. 6(B)). When each cation was tested to determine whether it inhibited recontraction, it was observed that  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 6(C)),  $\text{Mg}^{2+}$  (results not shown) or HG (results not shown) exhibited only a mild inhibition of the mitochondrial recontraction mediated by each PEG. In contrast, OG was as efficient as  $\text{PO}_4$  to inhibit PEG mediated recontraction, regardless of the MW of the PEG, suggesting that this cation was able to close the YMUC in uncoupled mitochondria (Fig. 6(D)). Thus, it is suggested that the cation/YMUC interaction was favored by the  $\Delta\psi$  and in reciprocity, the  $\Delta\psi$  was maintained by the same cation/YMUC interaction. In the case of OG, the hydrophobic interaction

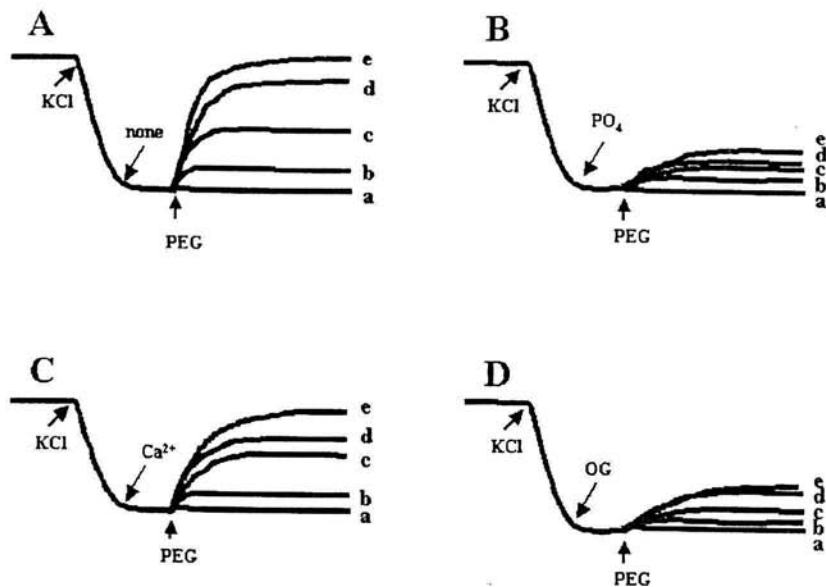


Fig. 6. Polyethylen-glycol-mediated recontraction of swollen yeast mitochondria. Effect of  $\text{PO}_4$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  or octyl-guanidine. Reaction mixture: 0.3 M mannitol, 5 mM MES, pH 6.8,  $1 \mu\text{L}/\text{mL}$  ethanol, 0.4 mM  $\text{PO}_4$ , pH 6.8. KCl (20 mM) was added at the arrow. After allowing for swelling to occur, an effector was added as follows (A) None, (B) 4 mM  $\text{PO}_4$ , (C) 0.6 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , (D) 15  $\mu\text{M}$  OG. After 30 s of further incubation, PEGs of different molecular weights were added to increase osmolarity by 0.3 Osm as follows: a, 0; b, 0.4 kDa and b, 0.6 kDa; c, 1 kDa, and d, 1.45 kDa. Specific PEG concentrations are listed in methods.

between the core of the membrane and the hydrophobic eight carbon tail in OG probably resulted in insertion of the molecule at its action site, even in the absence of a  $\Delta\psi$ .

## DISCUSSION

From a physiological point of view, the regulation of the YMUC by  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , and  $\text{PO}_4$  is probably important, as wide concentration variations in all three effectors occur in concert with the energetic requirements of the cell. If this regulation occurs in vivo, the YMUC would then function as an energy dissipating valve, supporting the idea that unspecific mitochondrial permeability should serve other functions besides programmed, or accidental, cell death [Ichaz, 1997; Szabó *et al.*, 1992]. The  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{PO}_4$  concentrations used were in the range observed in the cell, while the  $\text{Ca}^{2+}$  concentration needed to close the YMUC was higher [Anraku *et al.*, 1991]. Nonetheless, the additive effects of all three effectors may indicate that

even  $\text{Ca}^{2+}$  may be participating in vivo in the regulation of the YMUC.

In the cell, the increase in  $\text{PO}_4$  concentration indicates a decrease in energy charge. Thus, the  $\text{PO}_4$  mediated closure of the YMUC seems a logical adaptation as it results in an increase in the rate of ATP synthesis by mitochondria when it is needed. Once, ATP is accumulated, opening of the YMUC is promoted constituting a typical negative feed-back mechanism. In this regard, ATP would open the YMUC perpetuating the acceleration in oxygen consumption as a result of the decrease in the transmembrane potential. The opening effects of ATP on the YMUC probably occur through various mechanisms: first, through direct ATP/YMUC interaction [Prieto *et al.*, 1992; Roucou *et al.*, 1997]; second, sequestering  $\text{Mg}^{2+}$  to become the ATP salt; and third, depleting the  $\text{PO}_4$  which is used for ATP synthesis. In short, a high energy charge would result in opening of the YMUC and dissipation of energy as heat, while a low energy charge would promote YMUC closure and increased rate of ATP synthesis.

In yeast,  $\text{Ca}^{2+}$  regulates the cell cycle.  $\text{Ca}^{2+}$  is required during mitosis, a period of high energetic demand that occurs together with a rise in cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ) for periods lasting up to 20 min (Anraku *et al.*, 1991). Besides activating a large number of calmodulin dependent and independent pathways, the increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  probably stimulates the synthesis of ATP, even before it is needed. The mechanism for increased energy conversion into ATP and then bio-mass would possibly include the closure of the YMUC observed here (Figs. 2–5). In this regard, during another high energy requiring process, namely sexual interaction,  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  rises as soon as a pheromone is detected and the cell prepares to merge into a diploid (Nakajima-Shimada *et al.*, 1991). Thus, it is logical that  $\text{Ca}^{2+}$  should work in combination with  $\text{PO}_4$  to close the YMUC, shifting the utilization of the energy derived from oxidative metabolism toward production of ATP and other molecules. In contrast, the depletion of  $\text{PO}_4$ , the accumulation of unused ATP and the decrease in  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  observed when the cell enters a period of rest, leads to opening of the YMUC which in turn results in dissipation of energy as heat.

In most cells,  $[\text{Mg}^{2+}]$  fluctuates between 0.5 and 1.0 mM and the variation within these limits seems to regulate the activity of more than 350 enzymes (Romani and Scarpa, 2000). Considering the concentrations of  $\text{Mg}^{2+}$  which close unspecific channels, it is likely that both, the PTP (Bernardi *et al.*, 1993) and the YMUC (this paper) could be physiologically regulated by  $[\text{Mg}^{2+}]$ . In addition, the  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  required to inhibit the opening of the mammalian PTP by 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) has been calculated at 0.2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (Bernardi *et al.*, 1993) while in the YMUC the  $\text{IC}_{50}$  was estimated at 0.3 mM (this work). For  $\text{Mg}^{2+}$ , the PTP  $\text{IC}_{50}$  was 0.3 mM  $\text{Mg}^{2+}$  (Bernardi *et al.*, 1993), while for the YMUC the  $\text{IC}_{50}$  was 0.8 mM  $\text{Mg}^{2+}$  (this work). Thus, in comparison with the PTP, the YMUC seems to be less sensitive to divalent cations. There is at least another example where higher cation concentrations are needed in yeast mitochondria than in mammalian cells: the  $\text{K}^+/\text{H}^+$  antiporter from yeast is inhibited by higher  $[\text{Ca}^{2+}]$  ( $\text{IC}_{50}$  0.82 mM) or  $[\text{Mg}^{2+}]$  ( $\text{IC}_{50}$  = 2.08 mM) (Welihinda *et al.*, 1993) than its mammalian counterpart, which is inhibited by  $\text{Ca}^{2+}$  at  $\text{IC}_{50}$  = 12–18  $\mu\text{M}$  or by  $\text{Mg}^{2+}$  at  $\text{IC}_{50}$  = 50–65  $\mu\text{M}$  (Garlid, 1988).

The  $\text{Ca}^{2+}$  and/or  $\text{Mg}^{2+}$  mediated closing of the YMUC could be due to the generation of ADP and/or ATP salts as these nucleotides associated to the added divalent cation. This possibility was suggested during the oxygen consumption experiments, specially considering that cation concentrations were above the reported  $\text{Kd}$  for the  $\text{Ca-ATP}^{2-}$ ,  $\text{Mg-ATP}^{2-}$ , and  $\text{Mg-ADP}^-$  salts which are  $2.5 \times 10^{-4}$  M,  $1 \times 10^{-4}$  M, and  $1 \times 10^{-3}$  M, respectively

(Shikama, 1971). However, we believe that the cation mediated closing effects on the YMUC were due to a direct interaction with this channel because the experiments measuring  $\Delta\psi$  (Figs. 2 and 3) and swelling (Fig. 5) were performed in the absence of nucleotides and closure of the YMUC was still observed.

In regard to putative cation interaction site(s) in mitochondrial unspecific channels, the PTP open/closed probability is modulated by two divalent cation sites: (i) an internal site, where  $\text{Ca}^{2+}$  binding increases open pore probability, while the binding of other divalent cations ( $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ) has the opposite effect (Bernardi *et al.*, 1993); and (ii) an external site where all divalent cations including  $\text{Ca}^{2+}$ , increase the closed probability (Bernardi *et al.*, 1993). So extramitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  would be an inhibitor of the PTP while  $\text{Ca}^{2+}$  in the matrix would trigger the opening of the pore. In the light of our results, in yeast mitochondria only the equivalent of the external site for  $\text{Ca}^{2+}$  would exist and thus in yeast,  $\text{Ca}^{2+}$  (or  $\text{Mg}^{2+}$ ) would be capable of closing the pore but would be unable to promote opening.

The cation interaction site in the YMUC would be highly sensitive to  $\text{PO}_4$  concentrations as evidenced by the fact that closure of the YMUC occurred only at exceedingly high  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Mg}^{2+}$  concentrations, unless  $\text{PO}_4$  was added. The  $\text{Ca}^{2+}$  needed to close the YMUC decreased by at least two orders of magnitude when in the presence of a submillimolar concentration of  $\text{PO}_4$ . In addition,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  exhibited synergistic effects, exhibiting a stronger coupling effect than when each cation was added alone. This additive effect was observed in all parameters tested, i.e., oxygen consumption (Table I),  $\Delta\psi$  (Fig. 3), and mitochondrial swelling (results not shown).

Among the factors involved in the regulation of the cation/YMUC interactions, the  $\Delta\psi$  was observed to play an important regulatory role. Once the  $\Delta\psi$  was depleted and mitochondria were swollen, neither  $\text{Ca}^{2+}$  nor  $\text{Mg}^{2+}$  were able to close the YMUC and inhibit recontraction. Thus, to explore cation/YMUC interactions, we decided to test the alkyl-guanidines, which have been reported to interact with negative charges in the membrane (Gómez-Puyou and Tuena, 1977) and among which OG has recently been reported to inhibit the mammalian PTP (Chávez *et al.*, 2000). Neither ethyl- nor butyl-guanidine had any effects on the YMUC (results not shown) and thus, they were not further studied. In contrast, low concentrations of HG and OG did mimic the  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  effects, coupling mitochondria and maintaining a high  $\Delta\psi$ . Furthermore, in  $\Delta\psi$  depleted, swollen mitochondria, OG was the only cation tested which was capable of inhibiting mitochondrial recontraction. The apparent stability of the OG/YMUC interaction was probably due to the anchoring

of the octyl chain in OG with the hydrophobic core of the membrane (Chávez *et al.*, 2000; Pressman, 1963). This mechanism has been previously proposed to explain the OG mediated inhibition of electron transport through the respiratory chain at the level of complex I (Papa *et al.*, 1975) and the OG mediated inhibition of mitochondrial  $K^+$  influx in mammals (Beatty *et al.*, 1986). Probably the interaction of the membrane with the hexyl group in HG was not sufficiently strong to anchor the molecule in the absence of a  $\Delta\psi$  and this is why HG did not affect recontraction and a higher HG concentration was needed to couple mitochondria. In this regard, PTP inhibition by octyl-amine, but not by hexyl-butyl or ethyl-amine has been reported (Chávez *et al.*, 2000)

The physiological role of mitochondrial permeability transitions is not clear. Besides programmed cell death, other functions such as ion detoxification or energy dissipation have been proposed as alternatives (Bernardi, 1996; Gunter and Pfeiffer, 1990; Zoratti and Szabo, 1995). Yeast contain a mitochondrial nonspecific pore, although these cells do not contain the typical caspase cascade proteins that participate in apoptosis (Goffeau *et al.*, 1996). In addition, the control of the YMUC by  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , and  $PO_4$  seems ideally engineered to increase the efficiency of oxidative phosphorylation at times when ATP is in high demand, and switch into an energy-scape valve during the resting state.

## ACKNOWLEDGMENTS

Partially funded by grants DGAPA-UNAM IN227202-3 and ECOS Nord/ANUIES MO1504. VPV is a CONACYT fellow. The alkyl-guanidines were a kind gift from Dr Antonio Peña. Dr Edmundo Chávez, from the Inst Nal de Cardiología, critically read the manuscript. The technical assistance of Ramón Méndez and Norma Silvia Sánchez is acknowledged.

## REFERENCES

- Åkerman, K. E. O., and Wikstrom, M. K. F. (1976). *FEBS Lett.* **68**, 191-197.
- Anraku, Y., Ohya, Y., and Iida, H. (1991). *Biochim. Biophys. Acta* **1903**, 169-177.
- Ballarin, C., and Sorgato, M. C. (1995). *J. Biol. Chem.* **270**, 19262-19268.
- Beatty, G., Gutiérrez, C., López-Vancell, R., and Estrada, S. (1986). *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.* **36**, 217-232.
- Beauvoit, B., Rigoulet, M., Bunoust, O., Raffard, G., Canioni, P., and Guérin, B. (1993). *Eur. J. Biochem.* **214**, 163-172.
- Bernardi, P. (1996). *Biochim. Biophys. Acta* **1275**, 5-9.
- Bernardi, P., and Petronilli, B. (1996). *J. Bioenerg. Biomembr.* **28**, 131-138.
- Bernardi, P., Veronese, P., and Petronilli, B. (1993). *J. Biol. Chem.* **268**, 1005-1010.
- Bradshaw, P. C., Jung, D., and Pfeiffer, D. R. (2001). *J. Biol. Chem.* **276**, 40502-40609.
- Castrejón, V., Parra, C., Moreno, R., Peña, A., and Uribe, S. (1997). *Arch. Biochem. Biophys.* **346**, 37-44.
- Chávez, E., Peña A., Zazueta, C., Ramírez, J., García, N., and Carrillo, R. (2000). *J. Bioenerg. Biomembr.* **32**, 193-198.
- Corkey, B. E., Duszynsky, J., Rich, T. L., Mat-Schinsky, B., and Williamson, J. R. (1986). *J. Biol. Chem.* **261**, 2567-2574.
- Cortés, P., Castrejón, V., Sampedro, J. G., and Uribe, S. (2000). *Biochim. Biophys. Acta* **1456**, 67-76.
- Crompton, M. (1999). *Biochem. J.* **341**, 233-249.
- Dejean, L., Beauvoit, B., Alonso, A., Bunoust, O., Guérin, B., and Rigoulet, M. (2002). *Biochim. Biophys. Acta* **1554**, 159-169.
- Dejean, L., Beauvoit, B., Guérin, B., and Rigoulet, M. (2000). *Biochim. Biophys. Acta* **1457**, 45-56.
- De-kloet, S. R., Van Wermskerken, R. K. A., and Konigsberger, V. V. (1961). *Biochim. Biophys. Acta* **47**, 138-143.
- Denton, R. M., and McCormack, J. G. (1980). *FEBS Lett.* **119**, 1-8.
- Estabrook, R. W. (1967). *Methods Enzymol.* **10**, 41-47.
- Garliid, K. D. (1988). In *Integration of Mitochondria Function* (Lemasters, J. J., Hackenbrock, C. R., Thurman, R. G., and Westerhoff, H. V., eds.), Plenum, New York, pp. 259-278.
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., and Oliver S. G. (1996). *Science* **274**, 546-567.
- Gómez-Puyou, A., and Tuena, M. (1977). *J. Bioenerg. Biomembr.* **9**, 91-102.
- Gornal, A. G., Bardavill, C. J., and David, M. M. (1949). *J. Biol. Chem.* **177**, 751-760.
- Gunter, T. E., and Pfeiffer, D. R. (1990). *Am. J. Physiol.* **258**, C755-C786.
- Halestrap, A. P., and Davidson A. M. (1990). *Biochem. J.* **268**, 153-160.
- Haworth, R. A., and Hunter, D. R. (1979). *Arch. Biochem. Biophys.* **195**, 460-467.
- Ichaz, F., Jouaville, L. S., and Mazat, J. P. (1997). *Cell* **89**, 1145-1153.
- Jung, D. W., Bradshaw, P. C., and Pfeiffer, D. R. (1997). *J. Biol. Chem.* **272**, 21104-21112.
- Jung, D. W., and Brierley, G. P. (1986). *J. Biol. Chem.* **261**, 6408-6415.
- Lemasters, J. J., Nieminen, A. L., Quian, T., Trost, L. C., Elmore, S. P., Nishimura, Y., Crowe, R. A., Cascio, W. E., Bradham, C. A., Brenner, D. A., and Herman, B. (1998). *Biochim. Biophys. Acta* **1366**, 177-196.
- Lohret, T. A., and Kinnally, K. W. (1995). *J. Biol. Chem.* **270**, 15950-15953.
- Madeo, F., Fröhlich, E., Ligr, M., Grey, M., Sigrist, S. J., Wolf, D. H., and Fröhlich, K. U. (1999). *J. Cell. Biol.* **145**, 757-767.
- Manon, S., and Guérin, M. (1992). *Biochim. Biophys. Acta* **1108**, 169-176.
- Manon, S., Roucou, X., Guerin, M., Rigoulet, M., and Guerin, B. (1998). *J. Bioenerg. Biomembr.* **30**, 419-429.
- Masiacos, P. T., Williams, D. G., Berkich, D. A., Smith, M. B., and LaNoue, K. F. (1991). *Biochemistry* **30**, 8351-8357.
- Matsuyama, S., Nouraini, S., and Reed, J. C. (1999). *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 618-623.
- Nakajima-Shimada, J., Iida, H., Tsuji, F. L., and Anraku, Y. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 6878-6882.
- Nichols, B. J., Rigoulet, M., and Denton, R. M. (1994). *Biochem. J.* **303**, 461-465.
- Papa, S., Tuena de Gómez-Puyou, M., and Gómez-Puyou, A. (1975). *Eur. J. Biochem.* **55**, 1-8.
- Peña, A., Piña, M. Z., Escamilla, E., and Piña, E. (1977). *FEBS Lett.* **80**, 209-213.
- Pérez-Vázquez, V., Ramírez, J., Aguilera-Aguirre, L., González-Hernández, J. C., Clemente-Guerrero, M., Manzo-Avalos, S., Uribe S., and Saavedra-Molina, A. (2002). *Amino Acids* **22**, 405-416.
- Pfeiffer, D. R., Gudiz, T. I., Novgorodov, S. A., and Erdahl, W. L. (1995). *J. Biol. Chem.* **270**, 4923-4932.



- Pressman (1963). *J. Biol. Chem.* **238**, 401–409.
- Prieto, S., Bouillaud, F., Ricquier, D., and Rial, E. (1992). *Eur. J. Biochem.* **208**, 487–491.
- Romani, A., Marfella, C., and Scarpa, A. (1993). *J. Biol. Chem.* **268**, 15489–15495.
- Romani, A., and Scarpa, A. (1992). *Arch. Biochem. Biophys.* **298**, 1–12.
- Romani, A., and Scarpa, A. (2000). *Front. Biosci.* **5**, D720–D734.
- Roucou, X., Manon, S., and Guérin, M. (1997). *Biochem. Mol. Biol. Int.* **43**, 53–61.
- Shikama, K. (1971). *Arch. Biochem. Biophys.* **147**, 311–317.
- Szabo, I., Bathori, G., Wolf, D., Stare, T., Cola, C., and Zoratti, M. (1995). *Biochim. Biophys. Acta* **1235**, 115–125.
- Szabo, I., Bernardi, P., and Zoratti, M. (1992). *J. Biol. Chem.* **267**, 2940–2946.
- Uribe, S., Ramirez, J., and Peña, A. (1985). *J. Bacteriol.* **161**, 1195–2000.
- Uribe, S., Rangel, P., and Pardo, J. P. (1992). *Cell Calcium* **13**, 211–217.
- Uribe, S., Rangel, P., Pardo, J. P., and Pereira-da-Silva L. (1993). *Eur. J. Biochem.* **258**, 817–821.
- Velours, J., Rigoulet, M., and Guéran, B. (1977). *FEBS Lett.* **81**, 18–22.
- Welihinda, A. A., Trumbly, R. J., Garlid, K. D., and Beavis, A. D. (1993). *Biochim. Biophys. Acta* **1144**, 367–373.
- Zhu, B., Wan, C. M., Liu, R. T., Sun, A. M., Huang, S., and Wang, Z. R. (2002). *Space Med. Eng.* **15**, 355–358.
- Zoratti, M., and Szabo, I. (1995). *Biochim. Biophys. Acta* **1241**, 139–176.