



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

POSGRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

“CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA H⁺-ATPasa
DE LA LEVADURA DE *U. MAYDIS* CULTIVADA EN
MEDIO MÍNIMO Y DE YPD”

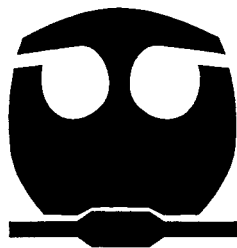
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A:
BIOL. MACARIO GENARO MATUS ORTEGA

ASESOR: DR. JUAN PABLO PARDO VÁZQUEZ

2007





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a los miembros del Comité Tutorial Rafael Moreno Sánchez, Roberto Coria Ortega y Juan Pablo Pardo Vázquez por asesorarme de manera atinada durante el desarrollo de este trabajo de maestría.

Mil gracias por sus críticas, por su paciencia, por sus aportaciones e ideas, por sus consejos atinados y por sus constantes palabras de aliento durante el desarrollo de esta tesis de maestría.

Gracias a los Sinodales Roberto Coria Ortega, Salvador Uribe Carvajal, Marina Gavilanes Ruiz, Alicia González Manjarrez y Héctor Riveros Rosas por las correcciones que realizaron de manera objetiva y sustancial a este trabajo.

En particular Gracias al Dr. Héctor Riveros Rosas y al Dr. Salvador Uribe Carvajal por sus comentarios y aportaciones tan oportunas en las secciones de microbiología, cinética enzimática y biología evolutiva.

Gracias al CONACyT y a la DGEP por el apoyo económico que permitieron el desarrollo de esta maestría en Ciencias Bioquímicas.

Gracias a los doctores Rafael Moreno Sánchez, Rosario Muñoz Clares, Luis Mario Calcagno y Juan Pablo Pardo Vázquez por instruirme y marcar mi inicio en el campo de la cinética enzimática.

Gracias a Leticia García (Lety) por apoyarnos a todos los estudiantes del posgrado con la realización tan eficiente de su trabajo como secretaria y coordinadora de la Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas.

Gracias infinitas al Dr. Juan Pablo Pardo y al Departamento de Bioquímica de la U. N. A. M. por permitirme crecer y desarrollarme en el campo profesional y personal a lo largo de estos 5 años de trabajo en la Facultad de Medicina.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por permitirme seguir creciendo en áreas tan distintas como la Ciencia, la Docencia, la Religión y el entendimiento de las relaciones humanas.

Gracias Dios por la oportunidad de vida, de amor, de alegría y de madurez que representó este tiempo de preparación llamado maestría.

Gracias a mi madre, a mi padre y a mi hermana por apoyarme, cada uno a su estilo, en este camino que decidí emprender solo.

Gracias a María del Rocío Fernández Suárez por haber sido uno de los pilares y apoyos más fuertes que he tenido en esta vida. Sin ti Rocío este trabajo, que bien sabes que también es tuyo, no hubiera sido posible. Gracias por tu tiempo, por tu paciencia, por tu amor, por tus palabras, por tu compañía, y sobre todo por recordarme que otro camino de justicia, de equidad y lucha también es posible.

Gracias al Dr. Juan Pablo Pardo por haberme permitido desarrollar en su laboratorio. Gracias Dr. Pardo por sus palabras tan acertadas, gracias por los buenos tiempos, por las buenas bromas, por los buenos y por los malos chistes. Gracias sobre todo por los momentos tan plenos que ocurrieron en estos años.

Gracias a Natalia Osorio Sagrero por haberme mostrado un camino de Dios distinto, vivo, nuevo y fresco. Gracias Natalia por tu amistad, por tus palabras de ánimo, de razón, de sabiduría y aliento que llegaron justo en el tiempo necesario para dejar una semilla de esperanza y fuerza en mi mente, corazón y alma.

Gracias a mis amigos Omar Díaz, Javier Palencia y Héctor Cuevas por permitirme caminar junto a ustedes y aprender de su forma de ser, de andar, de vivir y de entender la vida.

Gracias a Omar Díaz, Javier Palencia, Itzel Gutierrez y Susana Lucio por sus palabras, por su alegría, por sus consejos de madurez, entereza, experiencia y firmeza en esta aventura llamada Grupo Universitario de Trabajo Educativo.

Gracias a Dios. Gracias a la vida. Gracias al amor. Gracias a la suerte. Gracias a la infortuna. Gracias al destino. Gracias al mundo. Por permitirme seguir aquí, tan distinto pero con el mismo ánimo, coraje, razón y fuerza que siempre.

Hoy puedo decir queridos camaradas y amigos de la vida que soy ustedes. Soy sus palabras, soy sus amores, soy sus sentires, soy sus sentimientos, soy sus pesares..., Soy ustedes, pues son ustedes quienes me han ayudado a dar forma, razón, origen y trayectoria a este camino.

DEDICATORIA

A mi madre Maura Ortega Gómez, a mi padre Macario Matus Gutierrez y a mi hermana Maura Matus Ortega.

A todos mis amigos y compañeros de la vida. En particular a las hermanas Teresita y María de Guadalupe González Molina, a Omar Díaz, a Javier Palencia y a Héctor Cuevas.

A todos mis amores y amistades de la vida. En particular este trabajo es dedicado con todo mi cariño y amor a María del Rocío Fernández Suárez.

A todos los integrantes del Colectivo Ricardo Flores Magón de la Facultad de Ciencias (CRFM-FC) y del Grupo Universitario de Trabajo Educativo del Centro Universitario Cultural (GUTE-CUC). En particular a Maura Matus, Ámbar López, Erika Sánchez, Erick Pedro Blas, Pablo Jaques, Víctor García, Rafael Amaya, Itzel Gutiérrez, Fernando Barrera, Susana Lucio y Andrea López.

A todos los alumnos y alumnas que he tenido la fortuna de conocer a lo largo de estos años. Gracias a ustedes compañeros y camaradas de aula. Gracias por sus críticas, por sus comentarios y por sus aportaciones constantes que me han animado a continuar en este camino tan cansado y tan reconfortante llamado Docencia.

RETROSPECTIVA

Primera parte: El tiempo ha dejado huella.

“...la experiencia acumulada de poco sirve si no es sopesada, entendida, razonada y valorada a través de la perspectiva del tiempo y de la vida...”.

Cuanta razón tiene esa frase en este momento de decisión en mi vida. Cuan cierto es aquella oración que llegó a mis oídos en la primera juventud y que tanto he tardado en asimilar y comprender. Más aún, que atinado es afirmar que “...sólo cuando los problemas son redimensionados y mirados con frialdad a la luz de la razón son superados de manera efectiva...”

Han pasado tres años desde el último recuento serio que hice de mi vida y aún cuando parece que todo ha cambiado, lo esencial permanece.

Siguen los mismos sueños, continúan las mismas ilusiones y las mismas utopías como coordenadas celestes que dictan los senderos de la vida. La diferencia es que ahora hay un camino recorrido y cada vez se ven más reales las oportunidades de cristalización y concretización de lo abstracto. Ahora hay trabajo realizado y también hay semillas en el campo que están a la espera de una oportunidad para germinar, iluminar y llenar de vida y fulgor su entorno. Lo que antes era una sensación de algo potencial ahora se convierte cada vez más en un hecho real, tangible y palpable.

Segunda parte: Madurar implica un proceso de enseñanza-aprendizaje.

En la Biblia Pablo menciona que "...hasta de los sufrimientos debemos gloriarnos, pues el sufrimiento engendra la paciencia, la paciencia engendra la virtud sólida, la virtud engendra la esperanza y la esperanza no defrauda..." (Pablo; 5-15).

En la misma forma, hoy bendigo y bendeciré siempre los días malditos que lleguen a mi vida, pues han sido esos días y esas noches de soledad, derrota y tristeza, los que me han conducido a mirarme tal cual soy y me han permitido conocer mis fortalezas, mis virtudes, mis vicios y también reconocer mis muy frecuentes errores.

Cierto que en estos años conocí mis límites y mis capacidades y que he vislumbrado varias fronteras de cerca. Algunas las he tocado, otras las he roto y otras simplemente aguardan allí para una mejor ocasión.

Solo el tiempo dirá si realmente aprendimos de las experiencias y los errores. Ahora el camino vuelve a ensancharse y las vías se multiplican. Venga lo que venga estoy listo. Estoy preparado para seguir creciendo, para seguir enseñando, para seguir aprendiendo y aprehendiendo la vida, la ciencia y el amor.

Tercera parte: El presente y el futuro se entrelazan y confunden continuamente.

Ya no es tiempo de espera ni de confianza. Es tiempo de trabajo, de lucha, de esfuerzo, de conquista, de triunfo, de ánimo y voluntad para levantarse de la derrota, para reconocer y asumir el costo de los errores. También es tiempo de enfrentar y desenmascarar el triunfo fácil.

Es tiempo de ser ejemplo de vida, de obra, de camino y de muerte. A falta de maestro y sendero es necesario continuar buscando dentro de uno y en el entorno los motivos, las razones y los fundamentos del verdadero crecimiento a través del aprendizaje.

Todas las sendas parecen accesibles y adecuadas para llegar a buen puerto. Pero todas las decisiones deben ser enfrentadas con entereza y madurez. Es tiempo de cristalizar y abandonar de una vez por todas la sensación de potencialidad y demostrar ya capacidad como una realidad tangible.

Parafraseando a José Ingenieros me permito recordarme que "...el éxito es apenas el comienzo de una senda verdaderamente grande y sólida muchas veces insospechada..."

En el triunfo y en la derrota, en la salud y en la enfermedad, en la grandeza y en la pequeñez Dios es el principal actor y ejecutor de mi vida.

Pedí un Don y se me concedieron varios.

Ahora pido algunos pretendiendo conseguir algo en esta vida.

ÍNDICE

INDICE	1
ABREVIATURAS	6
ABSTRACT	7
RESUMEN	9
I INTRODUCCION	11
1. Los Hongos Ustilaginales.....	11
2 La biología de <i>Ustilago maydis</i>	14
3 El ciclo de vida de <i>Ustilago maydis</i>	14
3.1 Teliosporas.....	15
3.2 Basidiosporas.....	16
3.3 Células filamentosas dicariontes.....	17
3.4 Células filamentosas diploides.....	17
3.5 Formación de Teliosporas.....	18
4 Las relaciones ecológicas planta-hongo.....	20
4a Los hongos Necrotróficos.....	22
4b Los hongos Biotróficos.....	22
4c Los mecanismos de defensa vegetal.....	23
5 Las ATPasas tipo P.....	24
6 La H ⁺ -ATPasa de la membrana plasmática de los hongos.....	25
7 La estructura primaria de las H ⁺ -ATPasas.....	27
8 La topología de las H ⁺ -ATPasas.....	29
9 Los dominios funcionales de las H ⁺ -ATPasas.....	31
10 El mecanismo enzimático de la H ⁺ -ATPasa.....	34

11 La Regulación de la H ⁺ -ATPasa.....	37
II OBJETIVOS.....	38
III JUSTIFICACIÓN.....	39
IV HIPÓTESIS.....	40
V MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
1. Estrategia metodológica.....	41
2. Reactivación de las cepas de <i>U. maydis</i>	41
2.1 Preparación de los medios líquidos de inoculación y cultivo.....	41
2.1a Composición del medio rico de YPD.....	41
2.1b Composición del medio mínimo.....	42
2.1c La composición del medio mineral.....	42
2.2 Reactivación de la cepa e inoculación del medio YPD.....	43
2.3 Cultivo de las células.....	43
2.4 Cosecha de las levaduras.....	43
3 Cinéticas de crecimiento de las levaduras de <i>U. maydis</i>	44
3.1 Determinación de la concentración de glucosa en los medios de cultivo durante la curva de crecimiento.....	44
3.2 Lectura del pH de los medios de cultivo durante la curva de crecimiento...	45
4. Obtención de la membrana plasmática a través de ruptura mecánica con perlas de vidrio.....	45
4.1 Obtención de la membrana plasmática a partir de esferoplastos.....	46
5 Purificación de la ATPasa con un gradiente zonal de sacarosa.....	47
6 Determinación de proteína.....	48
7 Determinación de la actividad de la H ⁺ -ATPasa.....	49
8 Ensayo de actividad de la H ⁺ -ATPasa.....	49
8.1 Determinación de los parámetros cinéticos de la H ⁺ -ATPasa.....	51
8.2 Método colorimétrico para la determinación de Pi.....	52

9 Estabilidad de la enzima a diferentes valores de pH.....	52
9.1 Efecto del pH sobre la actividad de la enzima.....	52
10 Efecto de cationes mono y divalentes sobre la actividad de la ATPasa ...	53
11 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes.....	53
V RESULTADOS.....	55
1 Cinética de crecimiento de <i>Ustilago maydis</i>	55
1.1 Consumo de glucosa y variación del pH del medio de cultivo.....	56
1.2 Cambio del pH del medio en diferentes medios mínimos no amortiguados.	59
2 Obtención de la membrana plasmática de levaduras de <i>U.maydis</i> cultivadas en medio mínimo a pH 5.5.....	61
2.1 Rompimiento de las levaduras y obtención de fracciones membranales sin contaminación mitocondrial.....	61
2.2 Obtención de la H ⁺ -ATPasa de la membrana plasmática de <i>U. maydis</i>	63
3. Parámetros cinéticos de la H ⁺ -ATPasa de membrana plasmática de levaduras cultivadas en medios mínimos y de YPD.....	63
4 Efecto del pH sobre la actividad de la H ⁺ - ATPasa de membrana plasmática proveniente de levaduras de <i>U. maydis</i> cultivadas en medio mínimo.....	66
4.1 Efecto del pH sobre la estabilidad de la enzima.....	71
5 El efecto del Na ⁺ sobre la actividad de la H ⁺ -ATPasa.....	72
6 El efecto del K ⁺ sobre la actividad de la H ⁺ -ATPasa.....	73
7 Efecto del Mg-ADP sobre la actividad de la H ⁺ -ATPasa.....	75
8 Efecto del vanadato (VO ₄) sobre la actividad de la H ⁺ -ATPasa.....	76
9. La Genómica comparativa de las H ⁺ -ATPasas de <i>U. maydis</i>	78
9.1 Resultados de los Alineamientos Básicos Locales Múltiples (BLAST).....	78
9.2 Análisis filogenético de las tres primeras secuencias del genoma de <i>U. maydis</i> que se obtuvieron con BLASTP y TBLASTN.	80
10. Análisis de las dos secuencias de H ⁺ -ATPasas presentes en el genoma de <i>U. maydis</i>	83

VI. DISCUSION.....	87
1. Caracterización de las curvas de crecimiento de las levaduras de <i>U. maydis</i> en diferentes medios de cultivo cerrado (cultivo en Batch)	87
1.1 Las levaduras de <i>U. maydis</i> alcalinizan el medio de YPD.....	89
2. La obtención de la membrana plasmática de las levaduras de <i>U. maydis</i> ...	91
3. Los parámetros cinéticos de la H ⁺ -ATPasa de la membrana plasmática de las levaduras de <i>U. maydis</i>	94
4. El efecto del pH sobre la actividad y la estabilidad de la H ⁺ -ATPasa de levaduras de <i>U. maydis</i> cultivadas en medio mínimo.....	97
5. Efecto de los cationes monovalentes Na ⁺ y K ⁺ sobre la actividad de la H ⁺ -ATPasa.....	98
6. Efecto del Mg-ADP sobre la actividad de la H ⁺ -ATPasa.....	99
7. Efecto del vanadato (VO ₄) sobre la actividad de la H ⁺ -ATPasa.....	99
8 La genómica comparativa de las H ⁺ -ATPasas de <i>U. maydis</i>	100
8.1 Evolución molecular por duplicación génica.....	100
8.2 Alineamientos Básicos Locales Múltiples (BLAST) de las H ⁺ -ATPasas de <i>U. maydis</i>	102
9. Grados de similitud y divergencia entre las dos secuencias de H ⁺ -ATPasas presentes en el genoma de <i>U. maydis</i>	102
9.1 Las dos H ⁺ -ATPasas localizadas en el genoma de <i>U. maydis</i> son homólogas.....	102
9.2 Existen zonas de alta conservación entre las dos H ⁺ -ATPasas de <i>U. maydis</i>	103
10. Implicaciones evolutivas de la divergencia de las dos secuencias de de H ⁺ -ATPasas presentes en el genoma de <i>U. maydis</i>	103
10.1 La Evolución como un proceso biológico reconocible en los distintos niveles de organización biológica.....	103
10.2 Algunas aclaraciones sobre la sistemática filogenético o cladística.....	105
10.3 Información derivada de los árboles filogenéticos realizados con las H ⁺ -ATPasas.....	106

10.4 Escenarios evolutivos para explicar la alta diversidad en las H ⁺ -ATPasas de <i>U. maydis</i>	107
VI. CONCLUSIONES	115
VII. BIBLIOGRAFÍA	117
VIII. APENDICE	123

ABSTRACT

The primary active transport systems in the plasma membrane of plants and fungi cells are dependent on the activity of H⁺-ATPase (EC 3.6.1.35). This polytopic integral membrane protein belongs to the P-type ATPases, and generates an electrochemical proton gradient across the membrane which drives the uptake of nutrients and ions by secondary transport systems. The enzyme is part of the regulatory systems controlling the intracellular pH and the cytosolic ion composition. The importance of the H⁺-ATPase to cellular homeostasis is evident by examination of the relationship between its activity and the rate of cell growth. Given the central role of this enzyme in the bioenergetics of the cell, it highly regulates both, at the protein level, by phosphorylation at the carboxy terminus of the enzyme, and at the expression level, where the amount of active enzyme is modulated by transcriptional and post-translational mechanisms.

In the scientific literature exists an extensive work on the H⁺-ATPases of several saprophytic fungi, such as yeast, but there is little knowledge about the function and regulation of H⁺-ATPases from plant pathogenic fungi. Such is the case with the pathosystem fungi *Ustilago maydis*, in which the kinetics, expression and function of the H⁺-ATPases are practically unknown. *U. maydis* is a heterobasidiomycetous fungi that causes corn smut, a common disease that produces an important economic problem in many countries. It is known that the activity of H⁺-ATPase plays an important role in nutrient uptake by rust haustoria and germ tubes in the biotrophic plant-microbe interactions between the rust fungus *Uromyces viciae-fabae*. However, there is limited information about the role and the kinetic mechanism of H⁺-ATPase from other basidiomycota, including *U. maydis*. With the goal of gaining more information about the role of the H⁺-ATPase in *U. maydis*, we obtained the kinetics parameters of this enzyme in yeast cells cultured under different conditions and the effect of diverse ligands on the enzyme was analyzed. The result indicates that in yeast cells growing on minimum media

occurs an increase in both the catalytic efficiency (V_{max}/Km) and the V_{max} , and decrease Km . This changes in the kinetic parameters respond with the acidification of the minimum culture medium, meanwhile the YPD medium is alkalized. This results make us recompile the role that H^+ -ATPase like a factor in the generation of an electrochemical gradient of protons used in the secondary transport of yeast.

It was found that pH optimum of 6.5 for enzyme activity, which corresponds with the intracellular pH in the mycelia form. Was found that Mg-ADP and vanadate are competitive inhibitors against Mg-ATP, K_i are 1.25 mM and 0.94 mM for Mg-ADP and vanadate, respectively. The effect that vanadate, an analogue with inorganic phosphate (Pi)-one of the products of hydrolysis of ATP, behaves like a competitive inhibitor in respect to enzyme substrate leads us to formulate a model BiBiUniUni Iso ping-pong mixes in a stationary state and rapid equilibrium.

Using bioinformatic tools we found that two potential genetic sequences that codify H^+ -ATPase in *U. maydis* genome. From *in silico* analysis about these sequences we found a higher divergence level between them. UMO258,1 sequence has a bigger similarity and identity with H^+ -ATPases fungi meanwhile the second sequence targeted with UMO1205,1 key possesses more resemblance with H^+ -ATPases plants. Inferences were realized regarding evolution and divergence of such and fifteen more proteins, that allowed the supposing of genetic duplication events before diversification of Ascomycotas and Basydiomycotas.

RESUMEN

Los sistemas de transporte activo primarios de la membrana plasmática de células de plantas y hongos dependen de la actividad de la H⁺-ATPasa (EC 3.6.1.35). Esta proteína integral de membrana, politópica, que se agrupa dentro de las ATPasas tipo P, genera un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana que permite el transporte secundario de iones y nutrientes forma parte del sistema de regulación del pH intracelular y de la composición citosólica. La importancia del mantenimiento de la homeostasis es clara cuando se analiza la relación existente entre la actividad de la enzima y la tasa de crecimiento celular. Dado el papel central de esta enzima en la bioenergética celular su funcionamiento se regula a diferentes niveles, por ejemplo, a través de mecanismos de fosforilación del extremo carboxilo terminal y por medio del control de la expresión génica, de tal suerte que la actividad de la enzima se modula a nivel transcripcional y postranscripcional.

En la literatura científica existe un extenso trabajo donde se describe el funcionamiento de las H⁺-ATPasas de diversos hongos saprófitos, como las levaduras de *S. cerevisiae* y *K. lactis*. En contraste, poco se sabe sobre la función y los mecanismos de regulación de las H⁺-ATPasas de hongos patógenos de plantas. Se desconoce la cinética, expresión y funcionamiento de las H⁺-ATPasas durante el establecimiento de la interacción biológica planta-hongo del parásito obligado *Ustilago maydis*. *U. maydis* es un heterobasidiomycota que causa los tizones o tiznes del maíz, una enfermedad que ocurre en la mayor parte del mundo y que produce un importante problema económico. Se sabe que la actividad de la H⁺-ATPasa desempeña un papel importante en la toma de nutrientes a través de los haustorios y tubos germinales en las interacciones biotróficas planta-hongo en *Uromyces viciae-fabae*. Sin embargo se desconoce el mecanismo cinético de las H⁺-ATPasas de *U. maydis*. Con el objetivo de tener mayor información acerca del papel de la H⁺-ATPasa de levaduras de *U. maydis*,

en este trabajo se obtuvieron los parámetros cinéticos de la enzima proveniente de cultivos en diferentes medios y se analizó el efecto que efectúan diversos ligandos. Los resultados indican que durante el crecimiento celular de las levaduras en medio mínimo incrementa 16.8 veces la eficiencia catalítica de la enzima (cociente V_{max}/Km) y 2,8 veces la V_{max} , mientras la afinidad de la enzima por el sustrato incrementa (disminuye 3,91 veces la Km), respecto a la enzima proveniente de cultivos en medios de YPD. Estos cambios en los parámetros cinéticos de la enzima corresponden con la acidificación de los medios mínimos, mientras los medios de YPD, donde la H^+ -ATPasa es poco eficiente, se alcalinizan. Esto conduce a replantear el papel que pueda desempeñar la H^+ -ATPasa como un factor importante en la generación del gradiente electroquímico de protones utilizado en el transporte secundario de las levaduras. Se encontró que la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática de *U. maydis* tiene un pH óptimo de 6.5, que corresponde con el pH intracelular de la forma miceliar del hongo. Se encontró que el Mg-ADP y el vanadato se comportan como inhibidores competitivos contra el sustrato Mg-ATP, las K_i para ambos compuestos son 125 mM y 0.94 mM, respectivamente. Que el vanadato, un análogo del fosfato inorgánico (Pi), se comporte como un inhibidor competitivo con respecto al sustrato de la enzima condujo a proponer un modelo BiBiUniUni Iso ping-pong mixto en estado estacionario y en equilibrio rápido.

A través del uso de herramientas bioinformáticas se encontraron dos secuencias génicas potencialmente codificantes para la H^+ -ATPasa en el genoma de *U. maydis*. A partir del análisis *in silico* de estas secuencias se encontró un alto grado de divergencia entre ellas, la secuencia génica UMO258,1 tiene mayor grado de similitud e identidad con las H^+ -ATPasas fúngicas, mientras la segunda, señalada con la clave UMO1205,1 tiene mayor parecido con las H^+ -ATPasas de las plantas. Se realizaron inferencias sobre la evolución y divergencia de esta proteína, y otras 15 secuencia más, que permiten dilucidar eventos de duplicación génica previos a la diversificación de los ascomycotas y basidiomycotas.

I. INTRODUCCIÓN

1 Los Hongos Ustilaginales

La familia de los hongos Ustilaginales comprende a los fitopatógenos popularmente conocidos como “carbones”, “tiznes”, “tizones” y “caries” de las plantas. Este grupo de hongos pertenece a la subdivisión de los Basidiomycetes (ver figura 1), en particular a la clase Heterobasidiomycete (de la clasificación morfológica de Herrera; Herrera y Ulloa, 1986) con más de 1,200 organismos que son patógenos importantes de más de 4 000 especies de angiospermas (Martínez-Espinoza, et al., 2002). Entre las plantas afectadas por los Ustilaginales se encuentran varios cultivos de gran importancia para la economía mundial, como el maíz, el trigo, la cebada, la papa, el sorgo y la caña de azúcar, entre otros. Por lo cual, las especies de hongos de esta familia se han considerado tradicionalmente como agentes indeseados en los campos de cultivo (ver tabla 1).

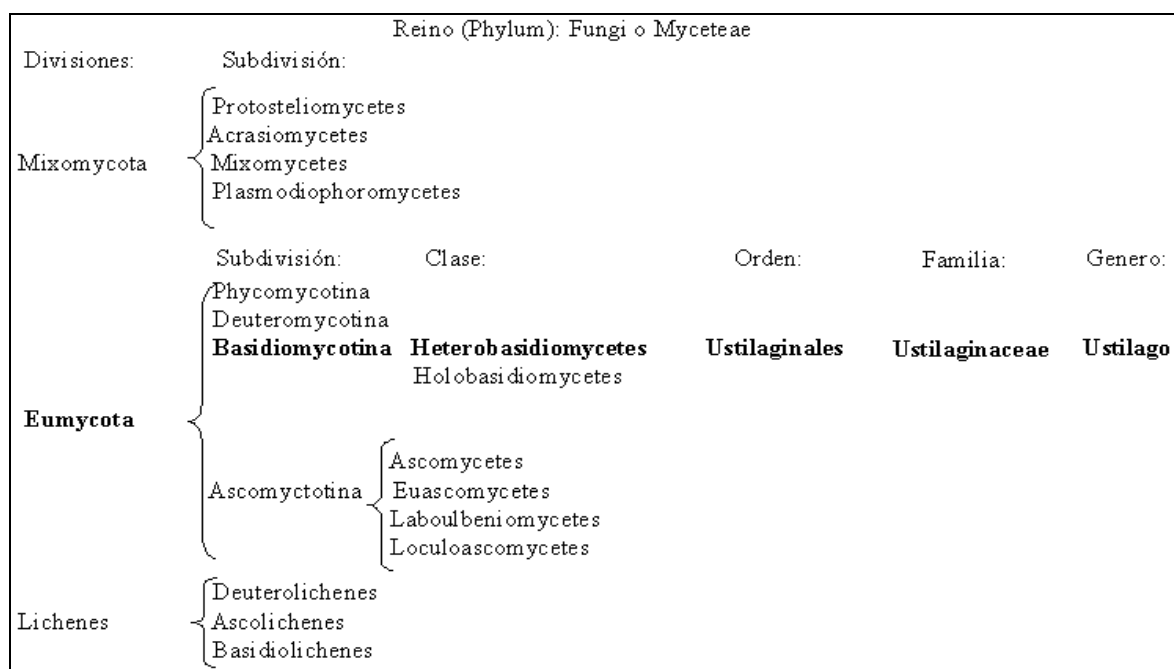


Figura 1. Clasificación para el reino fungi propuesta por Teófilo Herrera y Miguel Ulloa en 1990. La clasificación general para el reino Myceteae, comprende las cuatro divisiones generales que se marcan en la figura, además de once subdivisiones. Para mayor claridad en la ilustración, sólo se ha resaltado la localización del género de los Ustilaginales y no se ha señalado la ubicación taxonómica de otros hongos de interés bioquímico como *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces lactis*.

En la figura dos se muestra la clasificación taxonómica de los hongos construida con base en secuencias de RNAr que se encuentra en la base de datos del Centro Nacional de Biotecnología de los Estados Unidos de Norteamérica (NCBI, por sus siglas en inglés). A partir de esta clasificación queremos resaltar la equivalencia jerárquica entre las subdivisiones de Basidiomycota con los Ascomycota, Zigomycota y Microsporidios con la clasificación morfológica de Herrera y Ulloa de la figura 1. Sin embargo, varios clados fúngicos de las clasificaciones anatómicas y celulares (incluidos en la división mixomycota y lichen) quedan fuera de los hongos y son contenidos dentro de otros reinos.

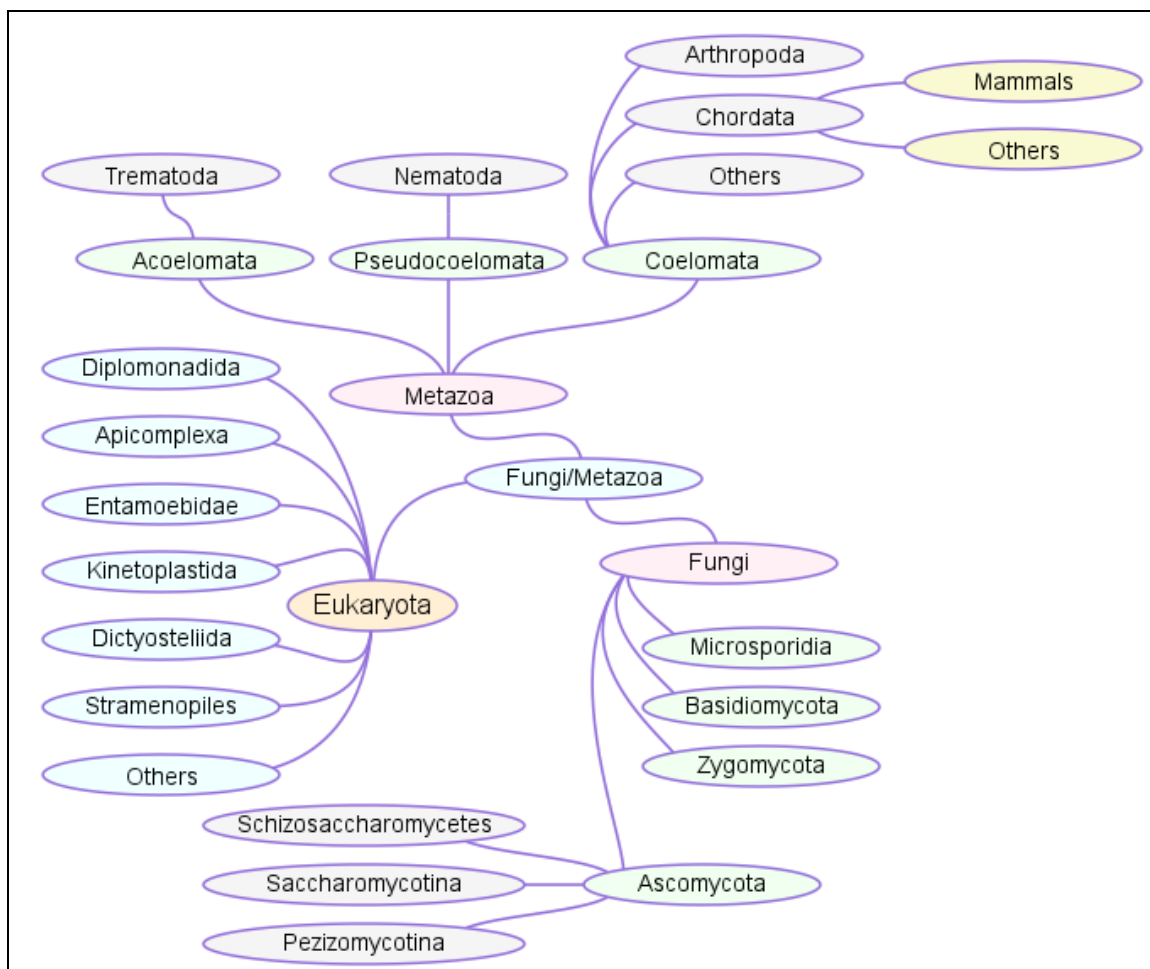


Figura 2. Clasificación para el phylum o reino fungi aceptada por el Centro Nacional de Investigación Biotecnológica de los E. U. Este árbol filogenético fue tomado de la dirección: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_tree.cgi

Consideramos conveniente colocar esta clasificación en este momento, pues nos referiremos frecuentemente a este árbol cladista en el desarrollo de este trabajo.

Tabla 1. Ejemplos de Ustilaginales fitopatógenos comunes en los campos de cultivo. Fuentes: Agrios, G. N. Fitopatología. Tercera edición. Limusa. México. Cfr. 493-515. Alexopoulos, C.J., Mims, C. W. (1985) Introducción a la Micología. Primera edición. Ediciones Omega. España. Cfr 301, y Herrera, T. y Ulloa, M.(1998) El reino de los hongos. Micología básica y aplicada. Fondo de cultura económica. UNAM. México. Capítulos 1, 2, 4, 8, 9 y 12. cfr 301.

Organismo fitopatógeno: Cultivar afectado:	
<i>Ustilago avenae</i>	Avena
<i>Ustilago esculenta</i>	Arroz
<i>Ustilago kolleri</i>	Avena
<i>Ustilago hordei</i>	Cebada y avena
<i>Ustilago maydis</i>	Maíz y teozintle
<i>Ustilago nuda</i>	Cebada
<i>Ustilago nigra</i>	Cebada
<i>Ustilago scitaminae</i>	Caña de azúcar
<i>Ustilago sorghi</i>	Sorgo
<i>Ustilago striiformis</i>	Gramíneas, céspedes y pastos
<i>Ustilago reiliana</i>	Sorgo y maíz
<i>Ustilago tritici</i>	Trigo

El hongo hemisaprobio *Ustilago maydis* (también conocido como *Ustilago zaeae*) es un patógeno frecuente en los cultivos de maíz (*Zea mays*) y de teozintle (*Zea mays sp parviglumis* y *sp. mexicana*). La intrusión de *Ustilago maydis* en la industria agrícola provoca pérdidas que se calculan en más de 200 millones de dólares cada año (White, 1999).

Sin embargo, los Ustilaginales empiezan a ser apreciados como modelos de estudio para dilucidar los mecanismos que gobiernan la patogenicidad y los cambios dimórficos de los hongos, así como para estudiar ciertos aspectos de su metabolismo intermedio y su bioenergética, que todavía son desconocidos (Bölker, 2001; Voegelé and Mendgen, 2003). En el campo de la ciencia básica, *Ustilago maydis* se ha utilizado como un modelo biológico en la genética clásica, así como para determinar las bases moleculares y bioquímicas del apareamiento celular, la recombinación de los cromosomas homólogos y la transducción de las señales celulares (Banuett, 1992; Holliday, 1974; Christensen, 1963).

2 La biología de *Ustilago maydis*

Ustilago maydis es un hongo eurícora (cosmopolita) que se desarrolla típicamente como un parásito facultativo y hemisaprobio, que es altamente selectivo en su relación hospedero-parásito con las plantas de maíz y teozintle, por lo que se le cataloga dentro de los hongos estenoxenos, que es el término que se utiliza en el campo de la micología ecológica para referirse a las especies “más o menos estrictas” respecto a los hospederos que atacan (Herrera y Ulloa, 1990). *Ustilago maydis* también se describe como un organismo eucárpico y macrocárpico semigloboso, pues sólo desarrolla una forma de esporas, masculinas o femeninas, en basidiocarpos macroscópicos globiformes que se forman en micelios separados. Al mismo tiempo, *Ustilago maydis* se clasifica como un hongo hemicárpico, pues el himenio, que es la capa fértil localizada en el centro de la “fructificación” o “carpo” donde se forman las esporas sexuales, sólo se expone durante la madurez sexual del hongo. Al igual que los demás Ustilaginales, *Ustilago maydis* es un hongo heterotálico y autoestéril (unisexual y dióico), que tiene un ciclo de vida haplo-diplobionte bien caracterizado (Alexopoulos, 1985).

3 El ciclo de vida de *Ustilago maydis*

El ciclo de vida de *Ustilago maydis* implica numerosos pasos y estadios que están íntimamente ligados a su interacción con la planta de maíz (Figura 3).

Típicamente, *U. maydis* presenta al menos las siguientes cuatro formas celulares durante su ciclo de vida:

- a) Una forma unicelular, haploide, uninucleada (llamada esporidio o basidiospora), que desarrolla un estilo de vida saprobio,
- b) Una forma filamentosa, dicarionte, parasítica y patogénica,
- c) Una forma diploide altamente infecciosa,
- d) Una forma diploide uninuclear llamada teliospora que corresponde a una estructura homocarionte capaz de germinar y experimentar meiosis para generar las basidiosporas haploides uninucleadas, cerrando el ciclo haplo diplo bionte de *Ustilago maydis* descrito en la figura 3..

3.1 Teliosporas

Varios autores (Alexopoulos y Mims, 1985 y Bölker, 1992) refieren a la teliospora o teleutospora como “la basidiospora de resistencia” que se forma en los tumores o “agallas” inducidos por los micelios diploides en la parte aérea de las plantas de maíz y de teozintle. Christensen (1963) reportó que el número de teliosporas que existe por centímetro cúbico de tejido vegetal es de 2.5-6 billones de esporas, y la viabilidad de las esporas es variable y puede ir de semanas a meses o incluso años.

Durante el proceso de germinación de las teliosporas, éstas muestran una división polar, en la cual, una vez fragmentada la pared celular de la espóra, un segmento de la membrana plasmática empieza a invaginarse. Enseguida, el núcleo de la célula madre, que normalmente se localiza en el centro de la célula, se dirige hacia esta invaginación, se divide por mitosis y uno de los dos núcleos resultantes regresa al centro de la célula primaria (Snetselaar, 1993; Jacobs, *et al*, 1994). Es importante hacer notar que la migración de los núcleos durante la división mitótica es diferente en otras levaduras. Por ejemplo, en *Saccharomyces cerevisiae* los núcleos migran de manera conjunta hacia el cuello o región estrecha que se origina durante la gemación, y una vez ubicados los núcleos en este punto, sobreviene la división celular (Martínez-Espinoza, *et al*, 2002).

3.2 Basidiosporas (esporididos)

Como resultado de la división celular, las esporas de *U. maydis* germinan y, mediante la repetición secuencial de estas divisiones mitóticas, se forman los cuerpos promiceliales a partir de los cuales las células haploides generan las basidiosporas haploides por medio de divisiones mitóticas que ocurren en las células apicales. Las basidiosporas haploides pueden desarrollar filamentos saprobios o generar directamente las hifas de apareamiento o “tubos de conjugación”. La fusión de las hifas ocurre sólo entre células que tienen diferentes locus *a*.

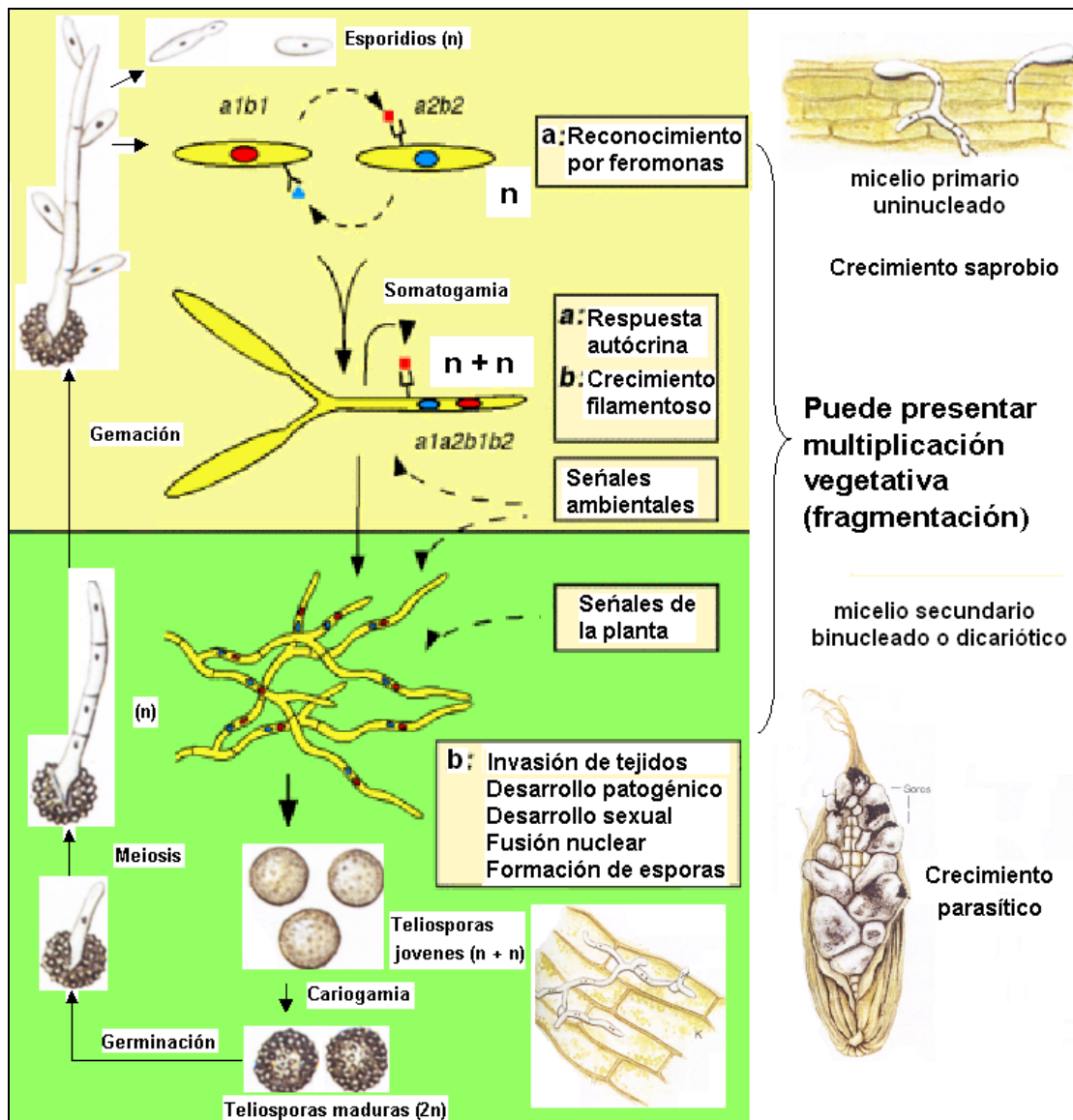


Figura 3. Esquema del ciclo de vida de *Ustilago maydis*. Modificado a partir de Herrera y Ulloa, 1990 y de Banuett F. 1992.

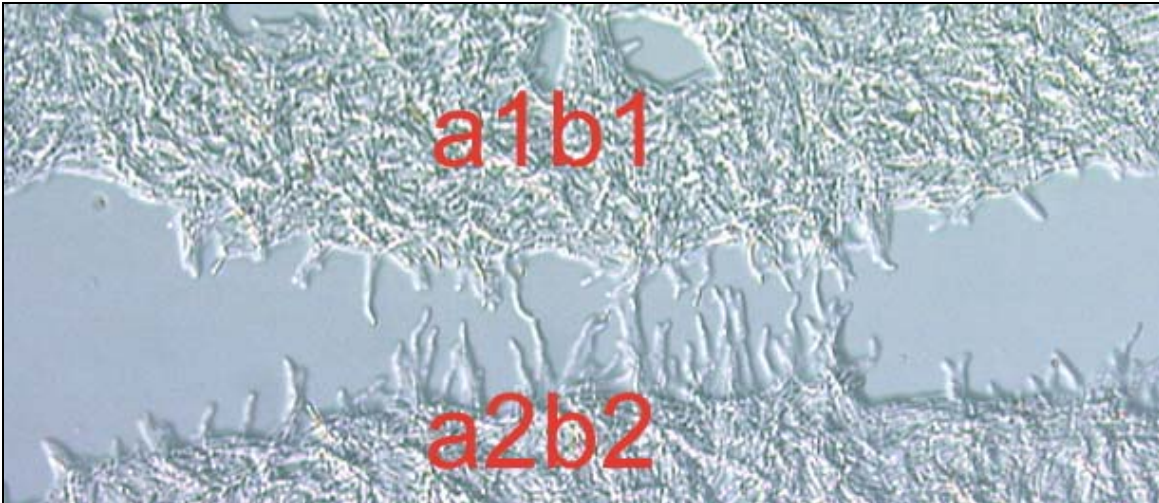


Figura 4. Fotografía de campo claro del apareamiento entre cepas complementarias de *Ustilago maydis*. Cuando cepas de *U. maydis* complementarias se colocan juntas en un medio de cultivo, las células tienden a formar puentes filamentosos que siguen la ruta del gradiente de feromonas secretado por uno y otro lado. La imagen fue tomada a partir de la página web de la Dra. Karen Snetselaars Ph. D. de la Universidad "Saint Joseph's" de Georgia U. S. A. (www.sju.edu/biology/Faculty_and_Staff/Karen_Snetselaar)

3.3 Células filamentosas dicariontes

Durante el apareamiento, las células secretan feromonas lipopeptídicas y responden a la presencia de las células que exhiben el locus opuesto (Bölker, et al, 1992). Las células haploides complementarias se estrechan originando los tubos de conjugación, los cuales presentan un crecimiento direccional hacia las hifas complementarias (ver figura 4). Las hifas de apareamiento se unen por sus extremos y en seguida ocurre la fusión total de los filamentos (somatogamia). Como resultado de este proceso se forma un micelio dicarionte (Spellig, 1994), y si las hifas fusionadas poseen alelos diferentes en el locus *b* multialélico de sus genomas, el organismo dicarionte será estable. En caso de no existir compatibilidad entre las células fusionadas, el micelio dicarionte comenzará su transformación en células haploides que nuevamente desarrollarán micelios y tubos de conjugación durante su fase de vida saprobia. (Banuett, F., 1991).

3.4 Células filamentosas diploides

Los micelios secundarios dicariontes compatibles crecen mitóticamente, generando filamentos capaces de infectar a las plantas de maíz y de teozintle,

principalmente a través de las estructuras abiertas como los órganos florales y los estomas de las espigas de las plantas (Snetselaar and Mims, 1992, White, 1999).



Figura 5. Fotografías del proceso infeccioso de *Ustilago maydis* sobre las mazorcas de maíz. En el panel a se muestra una fotografía de una planta con signos de clorosis claras (ausencia de pigmento) producto de la infección temprana de su órgano floral. En el panel b se muestra una fotografía de los soros producidos por *U. maydis* durante una fase previa a la liberación de las teliosporas. En el panel c se muestra una fotografía de una mazorca de maíz que experimentó la infección de *U. maydis*. Imágenes tomadas de las páginas web www.broad.mit.edu/media, www.gmcaesaraugusta.com y www.javiergimenez.com/setas.php, respectivamente.

3.5 Formación de teliosporas

Una vez dentro de la planta, *U. maydis* crece de forma irregular, tanto intra como intercelularmente, causando pocos daños a las células hospederas. De manera interesante, se ha visto que las hifas de *U. maydis* penetran la pared celular de las células de maíz, pero la membrana plasmática permanece intacta (Bannuet and Hekowitz, 1996). El crecimiento de las hifas infectivas de *U. maydis* ocurre preferencialmente en los tejidos meristemáticos, donde inducen cambios morfológicos como la aparición de las agallas o “tumores carnosos” en la superficie de la planta.

El síntoma infeccioso más evidente de la patogénesis inducida por *U. maydis* es la formación de tumores fructificantes o agallas en la parte aérea de la planta, donde se producen las teliosporas (ver figuras 4 y 5). Otros síntomas son la disminución de la clorofila en las espigas y en los tallos (clorosis) y una reducción en las tasas de crecimiento. Asimismo, se puede producir infertilidad en las flores del maíz y la acumulación de pigmentos de antocianina en círculos o manchas irregulares que muestran tonos rojizos a púrpura (Banuett, 1995).

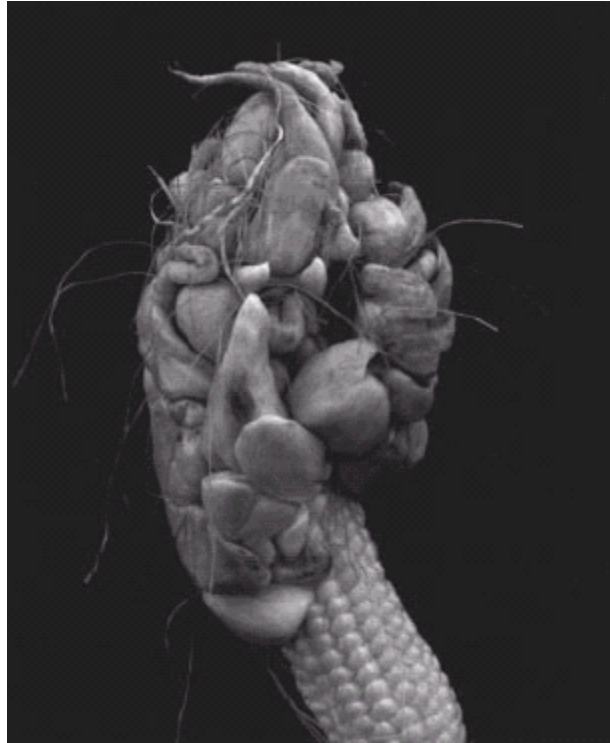


Figura 6. Fotografía de los soros de *Ustilago maydis* formados sobre la mazorca de maíz. El crecimiento tan prolífico de las agallas o cuerpos de fructificación tumorales, son resultado de la infección avanzada de la planta. Dentro de los tumores, ocurre la proliferación del tejido fúngico en forma miceliar, y la formación de las teliosporas. Imagen tomada de la página web www.micologia.net.

En las fructificaciones aéreas (llamadas carpos o soros) de *U. maydis* ocurre la formación de las esporas de dispersión y resistencia llamadas teliosporas. Las teliosporas dicariontes, inicialmente amorfas, van adquiriendo formas ovoides y esféricas, al mismo tiempo que se incrementa el grosor de su pared celular y adquieren los pigmentos oscuros característicos de las teliosporas maduras. Estas teliosporas maduras se agregan en los soros, originando masas negras que semejan al carbón o al tizne. Finalmente, las teliosporas maduras se liberan al medio circundante después de que ocurre la cariogamia (fusión de los núcleos) y la subsecuente división meiótica de las esporas, con lo que se completa el ciclo de vida de *U. maydis*. Es bien conocido que *U. maydis* atraviesa el invierno en forma de teleutosporas, las cuales se conservan viables durante años en el suelo o sobre restos del maíz.

Aunque generalmente se acepta que *U. maydis* requiere de las plantas de maíz o teozintle para completar su ciclo sexual, Ruiz-Herrera y colaboradores, en

1999 describieron el desarrollo de células pigmentadas semejantes a las teliosporas, en callos crecidos *in vitro* (Ruiz-Herrera, et al, 1999).

4 Las relaciones ecológicas planta-hongo

La complejidad estructural y funcional de las interacciones biotróficas entre las plantas y los hongos, así como las interacciones ecológicas de parasitismo y simbiosis que sucede en los campos de cultivo, ha fascinado a los biólogos desde finales del siglo XIX. En 1886, el botánico alemán Anton deBary observó que los hongos parásitos de las plantas alteran la morfología de sus hifas en respuesta a las características estructurales y fisiológicas de la superficie del hospedero. Justo después de la invasión del tejido vegetal, los hongos forman estructuras infectivas que desempeñan papeles cruciales durante los estadios de la patogénesis, que incluyen la unión, el reconocimiento del hospedero, la penetración, la proliferación y la nutrición del parásito (Medgen and Hahn, 2003).

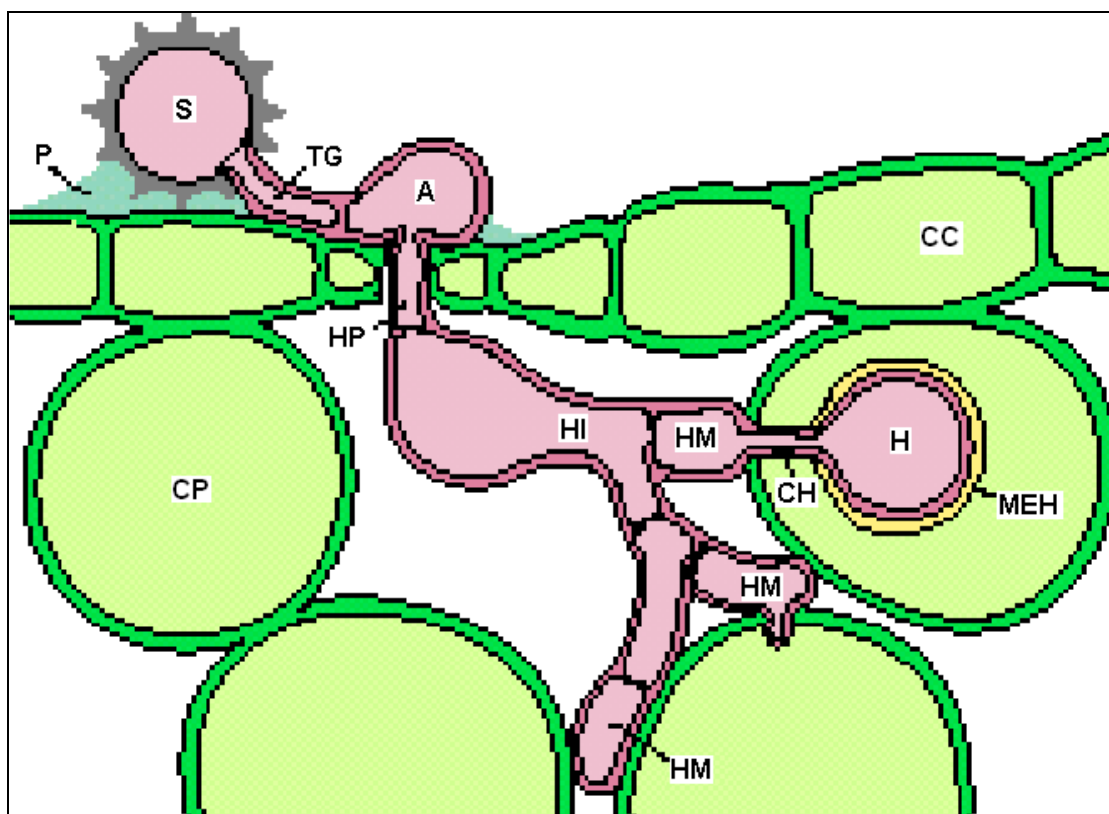


Figura 7. El proceso de infección biotrófica por *Uromyces fabae*. Las letras mayúsculas señalan las estructuras: S: espora; P: pie de adhesión; TG: tubo de germinación; A: apresorio; HP: hifa de penetración; HI: Hifa de infección; HM: células haustorias proliferativas; H: haustorio; MEH: membrana extra haustorial; CH: cuello del haustorio; CC células cuticulares; CP: células parenquimatosas. (Mendgen and Hahn, 2003).

La invasión del tejido de la planta por el micelio y el establecimiento de relaciones estables entre ambos organismos resulta de un desarrollo coordinado de los programas celulares tanto en el huésped como en el hospedero. Se propone, por ejemplo, que la simbiosis micorrízica proporciona a la mayoría de las plantas una gran cantidad de nutrientes minerales que de otra forma no le serían asequibles. En contraparte, los hongos obtienen grandes cantidades de nutrientes a partir del tejido vegetal que infectan. Un caso muy distinto son las relaciones ecológicas que se forman entre los mohos y las plantas, que causan enfermedades devastadoras en la mayor parte de las plantas de cultivo (ver figura 8).

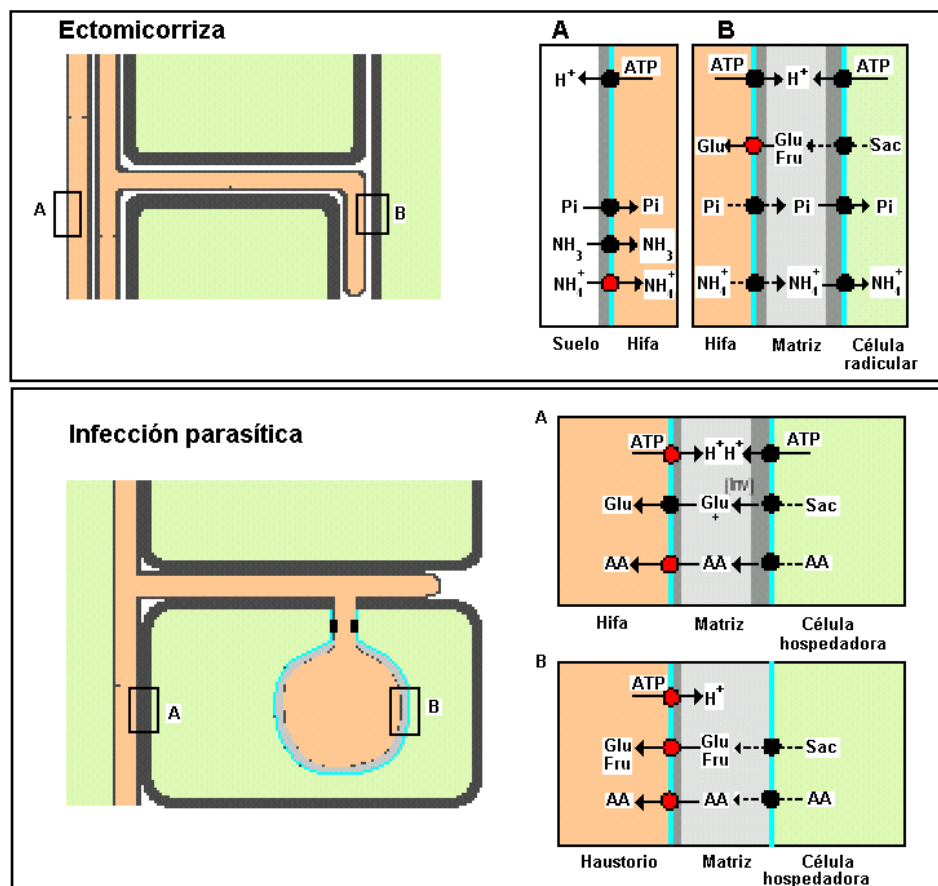


Figura 8. Comparación entre una relación simbiótica (ectomicorriza) y una relación de parasitismo entre un hongo y una planta. En el panel superior existe un flujo bidireccional de metabolitos entre la planta y el hongo, el hongo aporta principalmente fosfato inorgánico y amoníaco, mientras la planta aporta nutrientes como azúcares, aminoácidos y otros metabolitos, que favorecen la relación simbiótica. En el panel inferior se muestra una relación parasítica clásica en la cual el parásito, una vez dentro del hospedero degrada la pared celular de la planta pero dejan intacta su membrana plasmática. Entonces comienza el flujo unidireccional de nutrientes, como aminoácidos y azúcares sencillos, hacia el hongo sin que la planta reciba algún beneficio. Esquema modificado de Vogele and Mendgen, 2003.

Algo que resulta sorprendente en las relaciones entre los hongos y las plantas es que a pesar de los efectos contrastantes que se observan entre las micorrizas y las relaciones necrotróficas mediadas por los haustorios, ambos fenómenos comparten estructuras de infección similares.

4a Los hongos Necrotróficos

Los hongos tienen diferentes estrategias para acceder a los nutrientes que necesitan. Algunos son necrotróficos y rápidamente matan a las pequeñas plantas del suelo para alimentarse después de sus restos como organismos saprobios. En este tipo de relación ecológica las hifas del parásito secretan enzimas y otras sustancias que, al difundirse en los tejidos circundantes, afectan la integridad fisiológica y física de las células constituyentes. Primero se afecta la permeabilidad de las células del hospedero, por lo que éstas pierden agua y azúcares, se pierde el control de las funciones metabólicas normales que se asocia con un aumento en la respiración y, posteriormente, comienzan a actuar las enzimas extracelulares del hongo, que degradan los componentes de la pared celular. Las celulasas desintegran los materiales celulósicos, mientras que las enzimas pectinolíticas (pectinesterasas y polialacturonasas) destruyen la lámina media que se encuentra en la pared celular ocasionando la maceración de los tejidos. Para este momento, las células del hospedero han muerto, resultando las lesiones típicas de las pudriciones “suaves”.

4b Los hongos Biotróficos

Otros hongos mantienen relaciones biotróficas con sus huéspedes en diferentes vías: por ejemplo, a través de contactos intracelulares, subcuticulares, intra e intercelulares, extracelulares con haustorios dentro de células epidérmicas, intracelulares con haustorios dentro de las células parenquimatosas.

En la mayoría de las enfermedades causadas por los hongos biotróficos existe cierto grado de equilibrio entre el hospedante y el parásito que les permite a las células del primero permanecer vivas durante periodos de tiempo relativamente largos. A diferencia de los hongos necrotróficos, los biotróficos

entran en sus hospedantes a través de superficies intactas o por medio de aperturas naturales, como los estomas de las hojas o las lentécelas de los tallos. Estos hongos desarrollan apresorios e hifas infectivas para penetrar en el hospedante, utilizando una combinación de enzimas y fuerzas mecánicas, y se diseminan de una célula a otra por medio de hifas colonizadoras, de las que se originan los haustorios que atraviesan la pared celular e invaginan la membrana plasmática para absorber los alimentos. Las micorrizas son una relación biotrófica de mutualismo.

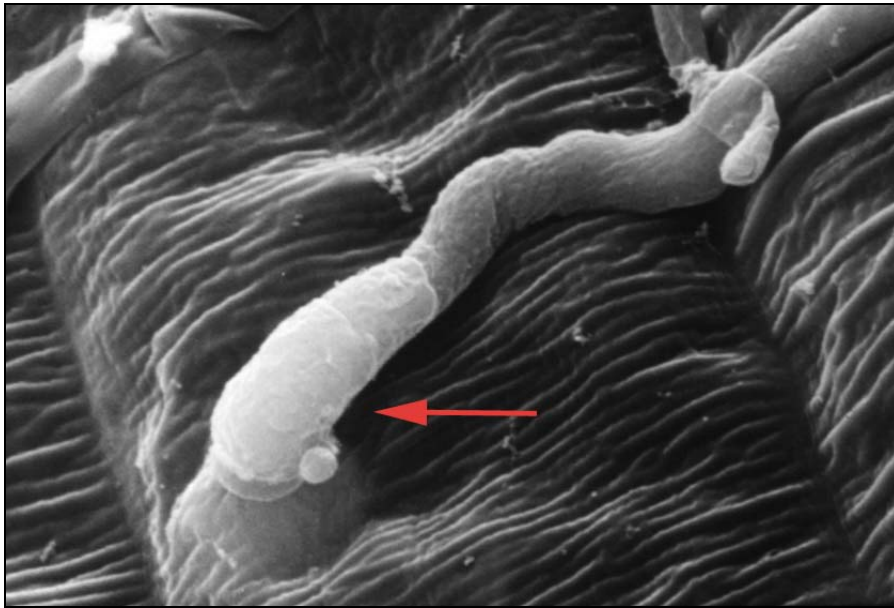


Figura 9. Micrografía electrónica que muestra un filamento de *Ustilago maydis* que comienza a penetrar la epidermis de una hoja de maíz. La flecha señala el punto donde se localiza el apresorio (el órgano o estructura especializada para la infección vegetal). La imagen fue tomada a partir de la página web de la Dra. Karen Snetselaars Ph. D. de la Universidad "Saint Joseph's" de Georgia U. S. A. (www.sju.edu/biology/Faculty_and_Staff/Karen_Snetselaar)

4c Los mecanismos de defensa vegetal

Las plantas son capaces de responder a la infección de los patógenos a través de la inducción de varios sistemas de defensa que incluyen, entre otras cosas, a la muerte celular programada. En contraste, ofrecen poca resistencia cuando se infectan por hongos simbióticos y lejos de impedir la invasión del tejido favorecen la colonización del tejido vegetal por las hifas.

Por lo menos se han propuesto tres mecanismos para explicar la respuesta de las plantas durante la infección.

- 1) El encubrimiento o degradación de los órganos elicitores que son importantes para la degradación de la pared celular de las células vegetales y que se localizan predominantemente en los tubos de germinación y los apresorios, pero no en las hifas que invaden al tejido del hospedero durante la simbiosis.
- 2) Una deficiencia en los nutrientes de las células infectadas. En ausencia de fuentes de carbono suficientes para la asimilación, falla la expresión de genes propiciando la infección fúngica.
- 3) La supresión de sistemas de defensa. Aunque todavía no se conocen supresores fisiológicos de las interacciones biotróficas, oligómeros de oligogalacturonamida, así como algunos glucopéptidos y β -glucanos se han relacionados con la disminución de los sistemas de defensa.

El flujo de los nutrientes en las interfaces hongo-planta de las relaciones biotróficas son bidireccionales, pero en los hongos parásitos el flujo de los nutrientes es más bien unidireccional. En el esquema general para el transporte de nutrientes en la interfase hongo-planta se propone que:

- a) Hay una relación entre la actividad de la H^+ -ATPasa y la capacidad para la toma de metabolitos para los hongos y
- b) Los transportadores de iones y metabolitos se encuentran en la interfase hongo-planta.

Es decir, se propone que el funcionamiento de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática de los hongos puede ser fundamental para el establecimiento de la relación ecológica bio o necrotrófica.

5 Las ATPasas tipo P

Las ATPasas pertenecen al grupo de los transportadores primarios, los cuales tienen la capacidad de transducir en una diferencia de potencial electroquímico la energía proveniente de distintas fuentes, como la lumínica, la oxidación de nutrientes, la hidrólisis de ATP o de alguna otra molécula orgánica de

alta energía. Las ATPasas se distinguen por su composición de subunidades, la presencia o ausencia de un intermediario fosforilado, por la sensibilidad a inhibidores específicos, por la estequiometría ión/ATP y por la función fisiológica de sintetizar o hidrolizar ATP. Este tipo de transportadores se pueden clasificar en tres categorías principales: P, V y F, dependiendo de su estructura, función y mecanismo de reacción (Pedersen y Carafoli, 1987). En particular, las ATPasas tipo P pueden transportar iones como H^+ , Na^+ , K^+ y Ca^{2+} y se caracterizan porque durante su ciclo catalítico forman un intermediario covalente fosforilado, un aspartil-fosfato altamente inestable.

Las ATPasas Tipo P conforman una familia importante de proteínas membranales, presentes en los tres dominios de la vida, Eucariontes, Eubacterias y Archeobacterias (Koonin, 1997), y suele subdividirse este tipo de ATPasas en dos grupos principales, dependiendo de la especificidad a los cationes y el perfil de hidropatía (Lutsenko, 1995). El grupo P_1 transporta metales pesados, como el Cu, el Cd y el Hg. El grupo P_2 acarrea una amplia gama de cationes mono y divalentes, como el H^+ , el Na^+ , el K^+ , el Mg^{2+} y el Ca^{2+} . Y en un tercer grupo P_3 se agrupan a los transportadores que comparten regiones homólogas con los otros dos grupos, pero que no funcionan como entidades individuales, sino que son parte de complejos multiproteicos, como las bombas de potasio de las bacterias (Altendorf, 1992).

6 La H^+ -ATPasa de la membrana plasmática de los hongos

Las ATPasas de protones que se encuentran en la membrana plasmática de los protistas, las algas, los hongos y las plantas vasculares, son proteínas politópicas que pertenecen a las ATPasas tipo P. Su actividad se ha correlacionado con las tasas de crecimiento celular y desempeñan un papel central en la fisiología de estos organismos (Mason, 1998; Portillo, 1989 y 2000).

Este translocador de protones altamente electrogénico es el principal componente de la membrana plasmática de las células con tasas altas de transporte activo, como las levaduras y las de los tejidos radiculares de las plantas vasculares. En *S. cerevisiae* la H^+ -ATPasa es una de las proteínas celulares más

abundantes, ya que representa cerca del 15% de las proteínas presentes en la membrana plasmática y el 0.3% del total de las proteínas de la levadura. Se encuentran alrededor de 10^6 enzimas por cada célula (cerca de 10^4 ATPasas por micrómetro cuadrado de membrana plasmática), con un número de recambio entre 20 y 100 protones por segundo, por lo que el flujo que genera oscila entre 10^5 a 10^6 protones por segundo en cada micrómetro cuadrado de membrana plasmática. Este flujo de H^+ es comparable al proceso análogo que ocurre en los cloroplastos y las mitocondrias de eucariontes o en las membranas de bacterias fotosintéticas (Serrano, 1988). El funcionamiento normal de la enzima consume cerca del 20% o más del total del ATP celular. El gradiente electroquímico que genera la H^+ -ATPasa es utilizado por acarreadores secundarios para transportar nutrientes como los aminoácidos y azúcares, por mecanismos de cotransporte con el protón, y para mover cationes como el sodio y el calcio por antitransporte con el protón (Goffeau, 1981). Asimismo, este gradiente de potencial electroquímico se utiliza en la regulación del pH citosólico, el balance osmótico, la tolerancia a los metales pesados como el cobre (Weissman, 1999) y la respuesta al estrés térmico y salino. El mecanismo de acción y el papel fisiológico de la H^+ -ATPasa se ha estudiado por medio de dos enfoques experimentales: 1) la modificación química específica de los aminoácidos, con el cual se ha sugerido la participación de algunos residuos en el ciclo catalítico y 2) el análisis por mutaciones dirigidas del gen, con el que se ha propuesto el papel de algunos aminoácidos en el bombeo de protones y en la hidrólisis del ATP (Portillo, *et al* 1989).

Ambas técnicas tienen sus limitaciones. En el caso de la modificación química, no existen agentes químicos específicos para un sólo aminoácido, y los grupos funcionales que reaccionan con el inhibidor pueden estar enmascarados por el entorno, por lo que es arriesgado realizar aseveraciones precisas, y además, en ocasiones resulta imposible determinar el número de grupos funcionales modificados que participan en la pérdida de la actividad enzimática (William and Koshland Jr., 1961).

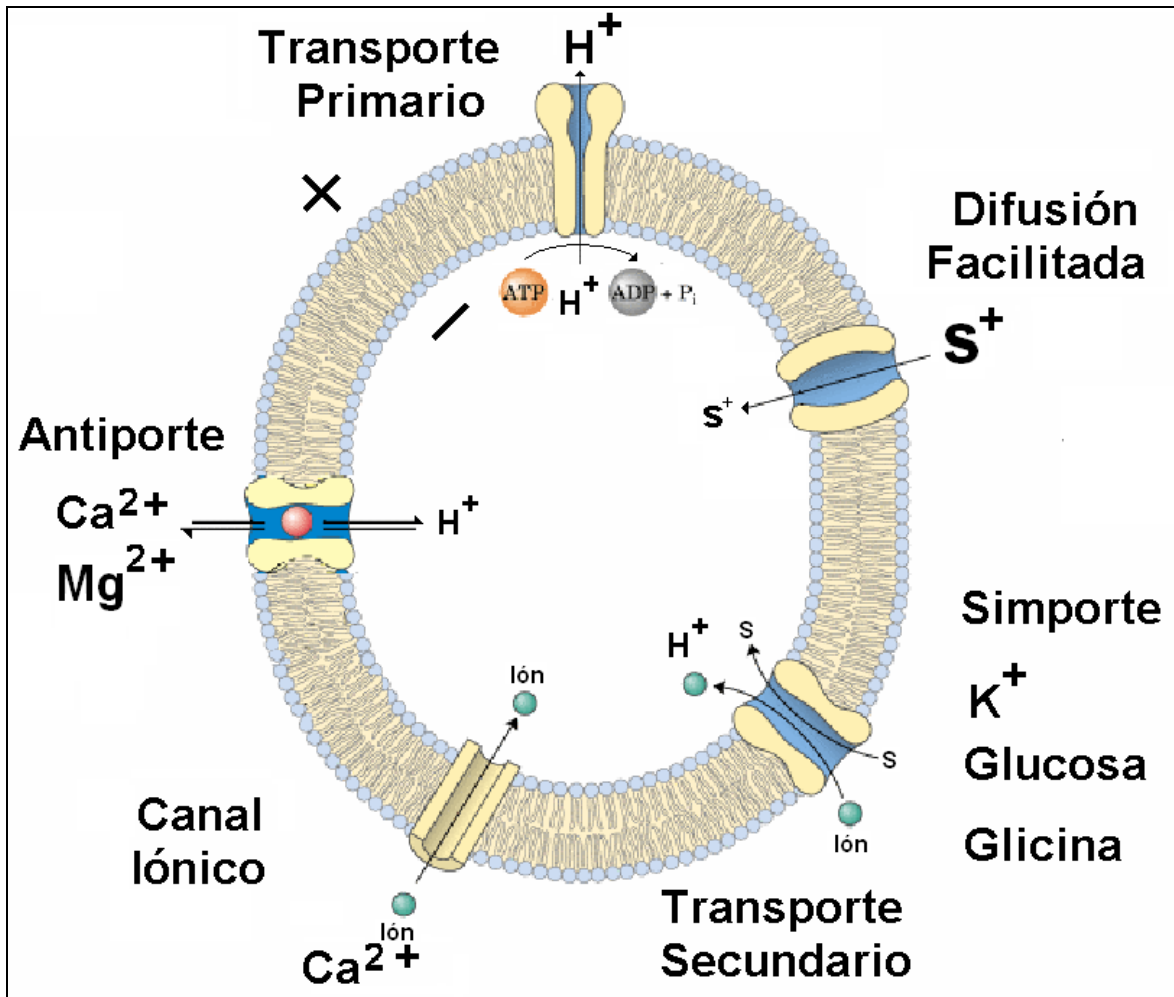


Figura 10. Los sistemas de transporte en la membrana de *K. lactis*. La actividad de cada transportador depende en gran medida del potencial electroquímico de protones generado por la ATPasa de protones, que es un transportador primario. Modificado de Nelson y Cox (2000).

En la misma forma, los análisis por mutagénesis dirigida arrojan resultados un tanto paradójicos con respecto al alto número de mutaciones artificiales que pueden ser toleradas con pocos o ningún efecto aparente en las propiedades funcionales de la enzima, lo cual contrasta con las altas tasas de conservación de varias secuencias de aminoácidos de este grupo de proteínas (Møller, 1996).

7 La estructura primaria de las H^+ -ATPasas

Las H^+ -ATPasas que hidrolizan ATP fisiológicamente más estudiadas son las de *S. cerevisiae* y *N. crassa*. Ambas enzimas pertenecen a la clase de las P-ATPasas de metales ligeros (P_2), están incorporadas a la bicapa lipídica a través de 10 segmentos transmembranales, presentan una sola unidad proteica de ~100

kDa y carecen de proteolípidos de bajo peso molecular (Hager,1986; Serrano, 1988; Nakamoto, 1989).

```

1 madhsasgap alstniesgk fdekaaeaaa yqpkpkvedd ededidalie dleshdghda
61 eeeeeeatpg ggrvvpedml qtdtrvglts eevvqrrrky glngmkeeke nhflkflgff
121 vgpigqvmeg aavlaagled wvdfgvicgl lllnavvgfv qefqagsivd elkktlalka
181 vvlrdgtlke ieapevvpqd ilqveegtii padgrivtdd aflqvdsal tgeslavdkh
241 kgdqvfassa vkrgeafvvi tatgdntfvg raaalvnaas gsgghftevl ngigtillil
301 viftllivwv ssfyrsnpiv qileftlait figvpvglpa vvtttmavga aylakkaiv
361 qklsaiesla gveilcskt gtltknklsl hdpvtvagvd pedlmltacl aasrkkkgid
421 aidkaflksl kyypraksvl skykvlqfhp fdpvskkvva vvespqqeri tcvkgaplfv
481 lktveedhpi peevdqaykn kvaefatrgf rslgvarkrg egswelgim pcmdpprhd
541 yktvceaktl glsikmltgd avgiaretsr qlglgtniyn aerlglgggg dmpgsevydf
601 veaadgfaev fpqhkynvve ilqrgylva mtgggvndap slkkadtgia vegssdaars
661 aadvflapg lgaiidakt srqifhrmya yvvrialsi hleiflglwi ailnrslnie
721 lvvfiaifag vatlaiaydn apysqtpvkw nlpklwgmsv llgvvlavgt witvttmyaq
781 genggivqmf gnmdevflq isltenwlif itrangpfs sipswqlsga iflvdilatc
841 ftiwgwfehs dtsivavvri wifsfgifci mggvvyilq dsvgfdnlmhg kspkgnqkqr
901 sledfvvslq rvstqheksq

```

Figura 11. La secuencia de los aminoácidos de la ATPasas de la membrana plasmática de *N. crassa*, codificada por el gen PMA1. En rojo se muestra el aspártico (d) 378 correspondiente al sitio de fosforilación. En amarillo la lisina (k) 615 y los residuos de aspártico (d) 534, 560, 634 y 638 involucrados con el mecanismo de hidrólisis del ATP. En verde el sitio de unión del protón, aspártico 730. En Violeta se colorean los aminoácidos isoleucina (i) 331 y 332, valina (v) 334, tirosina (y) 694 y serina (s) 699, implicados en la translocación del protón. En azul se denota la serina (s) 913 y la treonina (t) 914 correspondientes a los sitios de inhibición de la enzima por mecanismos de fosforilación. Secuencia reportada por Hager en 1986. La clave de acceso a la secuencia de la proteína en la base de datos SWISS PROT es P07038.

En la figura 11 se muestra la secuencia de aminoácidos de la H^+ -ATPasa de *N. crassa*. La estructura primaria se dedujo a partir de la secuencia de nucleótidos del gen *PMA 1*, presente en los genomas de *S. cerevisiae*, *Candida albicans*, *Zygosaccharomyces rouxii* y *N. crassa*. Las enzimas de *S. cerevisiae* y de *N. crassa* tienen 918 y 920 aminoácidos, respectivamente, con masas moleculares de 99.7 y 99.9 kDa. Estos valores corresponden con el peso molecular estimado mediante la electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (Serrano, 1988; Hager, 1986).

Esta proteína también se encuentra en *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans*, *Kluyveromyces marxianus* y otros hongos. Al alinear las secuencias de aminoácidos de las ATPasas de H^+ de los hongos se observa que están muy conservadas. Entre las secuencias de *S. cerevisiae* y *N. crassa* el porcentaje de identidad es de 74%, con solo 238 residuos diferentes, de los cuales 105 son cambios conservativos.

La porción central de la proteína tiene una identidad de 83%, mientras que la mayor parte de las diferencias se localiza en los extremos amino y carboxilo, con 74 y 42 divergencias respectivamente (Serrano, 1988). Pese a ello, cabe mencionar que ambas regiones están involucradas en la regulación de la enzima. Los primeros 50 aminoácidos de las ATPasas fúngicas, que contienen la secuencia ampliamente conservada DEDEIDALIE (residuos 40 a 50), son indispensables para la actividad de la enzima y su inserción dentro de la membrana plasmática. Paralelamente, los últimos 11 ó 18 aminoácidos regulan la actividad de la enzima por mecanismos de fosforilación mediados por proteínas cinasas (Portillo, 1989 y 1991).

8 La topología de las H⁺-ATPasas

La figura 12 muestra el modelo topológico de la ATPasa de protones con 10 segmentos transmembranales. Este modelo se basa en el análisis de hidropatía y en la predicción de la estructura secundaria del polipéptido de 100 kDa de *N. crassa*. Se puede ver que la mayor parte de la enzima se localiza en la cara citoplásmica de la membrana, y sólo una pequeña porción de la enzima (más o menos 50 aminoácidos) está expuesta al medio externo. La localización citoplásmica de los extremos amino y carboxilo, así como la de las dos primeras asas hidrofílicas mayores, se comprobó mediante técnicas de unión de anticuerpos y experimentos de tripsinólisis (Nakamoto, 1989; Mandala, 1989; Hennessey, 1990; Scarborough, 1990). La descripción detallada de la estructura y el funcionamiento de la bomba de protones se basa en los datos experimentales de modificación química y mutagénesis dirigida (Rao, et al, 1992).

La región amino terminal es la que menos conserva la estructura primaria y también la que más varía en el número de residuos de aminoácidos que la integran, con 34 en los transportadores de potasio de las bacterias y hasta 115 en las ATPasas de protones de los hongos (Serrano, 1988).

Los segmentos transmembranales M1 y M2 que siguen al extremo amino varían en longitud, de 20 a 27 y 20 a 21 residuos de aminoácidos

respectivamente, y están separados entre sí por 5 o 13 aminoácidos. Las siguientes dos secciones que cruzan la membrana (M3 y M4) están separadas por 7 a 12 aminoácidos y conforman la región más conservada de los elementos transmembranales. El segmento M3, que varía de 25 a 28 aminoácidos, contiene la secuencia TILLI que se conserva en las ATPasas fúngicas y de bacterias como *E. coli* (ver en la figura 10 los residuos 295 a 299 de la H⁺-ATPasa de *N. crassa*). El segmento M4, que es la hélice transmembranal más conservada, está formado de 26 a 30 aminoácidos y contiene dos prolinas altamente conservadas en la escala biológica. En particular para los hongos, ambas prolinas se incluyen en la secuencia PVGLP (residuos 335 a 339 de la figura 10) (Kühlbrandt, *et al*, 2002).

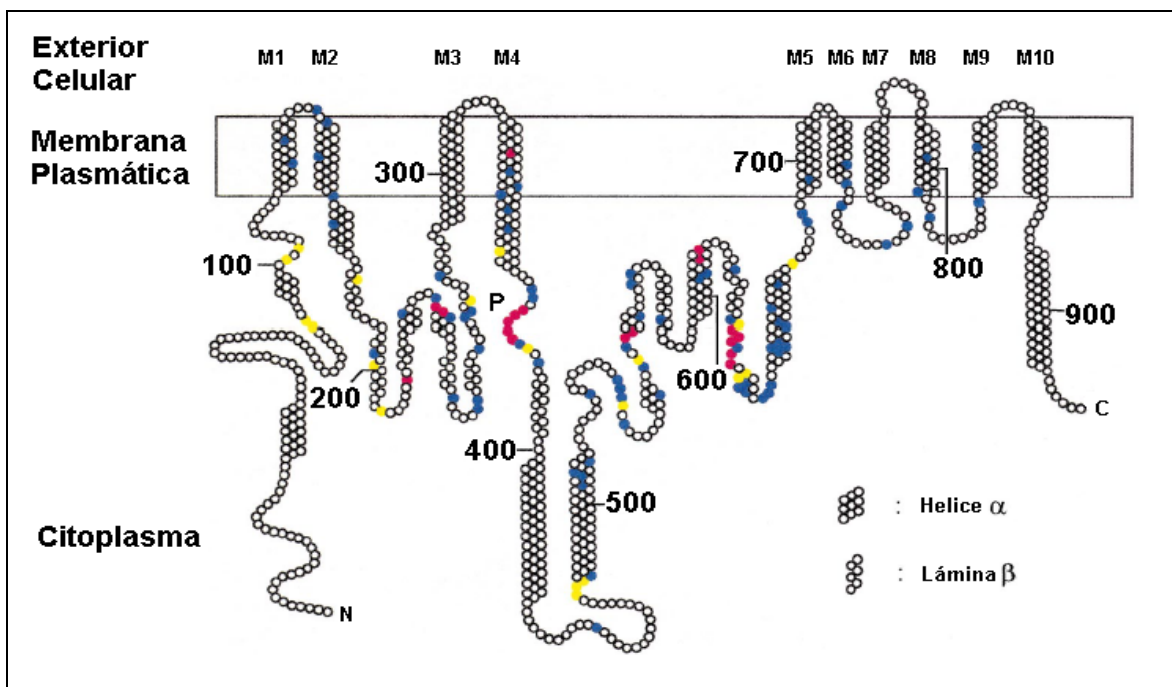


Figura 12. El modelo topológico de la ATPasa de protones de *N. crassa*. Los residuos de los aminoácidos conservados en las ATPasas se muestran en diferentes colores. En rojo los 18 aminoácidos conservados en 158 de 159 P-ATPasas conocidas. En amarillo se denotan los 19 residuos presentes en 97 P₂-ATPasas. Finalmente, en azul se ilustran los 77 aminoácidos comunes a las 32 H⁺-ATPasas caracterizadas. Los cruces transmembranales se han señalado como M1 a M10. Esquema modificado de Morsome, Slayman and Goffeau (2000).

El asa citoplásmica principal consiste de 350-450 aminoácidos que alternan en hélices α y hojas β , y contiene el sitio de fosforilación de la enzima, así como las regiones involucradas en la unión del ATP. El segmento M5 puede estar formado por 20 a 26 aminoácidos. El M6 tiene 20 ó 33 residuos, mientras que M7 y M8 cambian su longitud de 23 a 27 y de 19 a 30 aminoácidos, respectivamente

(Nakamoto, 1989). El extremo carboxilo se ha relacionado con la regulación de la enzima y contiene dos secciones hidrofóbicas (M9 y M10) que varían en longitud.

9 Los dominios funcionales de las H⁺-ATPasas

Mediante técnicas de microscopía electrónica se obtuvo la imagen tridimensional de la H⁺-ATPasa de *N. crassa* con una resolución de 0.8 nm en la conformación abierta (ver figuras 12b, 12c y 13). Este modelo se ha utilizado para las P-ATPasas que comparten 10 segmentos transmembranales y que exhiben actividad como monómeros (Auer, 1998; Scarborough, 2000; Kühlbrandt, 2002).

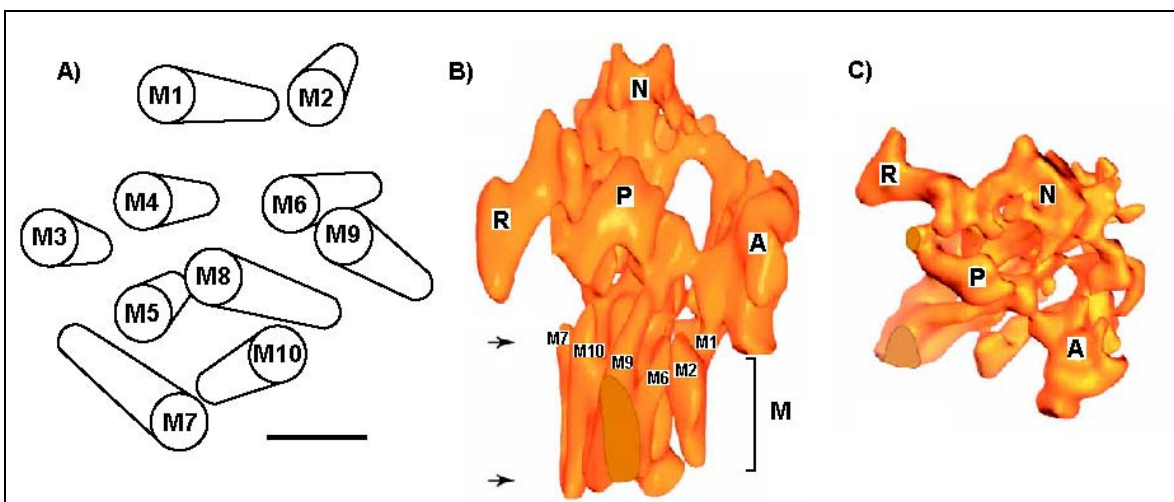


Figura 13. Los dominios funcionales y las hélices transmembranales de la H⁺-ATPasa de *N. crassa*. A) Se dibujan las 10 hélices transmembranales vistas desde el lado citoplásmico; cada cilindro representa un cruce a través de la membrana y se ha numerado de M1 a M10. La barra corresponde a 1 nm. B) Vista lateral de la enzima en estado abierto (E₂), donde se observan los 4 dominios citoplásmicos N (de unión del nucleótido), R (regulatoria), P (de fosforilación) y A (asociada al anclaje de la proteína a la membrana), además del dominio membranar (M). Las flechas indican los límites de la proteína en la membrana plasmática. C) Vista superior de la enzima, donde se ilustra el posible arreglo espacial de los dominios citoplásmicos y sus contactos. Imagen modificada de Scarborough (2000).

Con base en la estructura cristalográfica de la ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico de conejo se definieron los siguientes cinco dominios funcionales en la ATPasa de protones, que presentan independencia estructural.

Estos dominios son:

1) El dominio M (membranar), formado por los diez segmentos transmembranales,

- 2) El dominio R (de regulación), que corresponde al extremo carboxilo de la proteína,
- 3) El dominio P (de fosforilación), que corresponde a una parte de la región citoplásmica localizada entre los segmentos transmembranales 4 y 5,
- 4) El dominio N (nucleotídico), donde ocurre el pegado del nucleótido y
- 5) El dominio A (de anclaje), que se asocia con una función reguladora y de anclaje a la membrana plasmática (Morsomme, 2000; Külbrandt, 2002).

A continuación se comentan brevemente algunos aspectos interesantes de cada uno de los dominios. En la figura 13A se muestra un esquema del dominio M, que representa una cuarta parte de la masa de la proteína y que está ampliamente conservado en todas las ATPasas tipo P2. Este dominio está integrado por 10 segmentos transmembranales con estructuras de α -hélice, que se aglutinan en un paquete compacto en donde las espirales quedan distanciadas entre 0.8 y 1.3 nm, cubriendo un área de aproximadamente 3 nm x 4 nm, si se observan en posición vertical, perpendicular al plano de la membrana. Aún cuando las hélices son relativamente rectas, ninguna corre exactamente perpendicular al plano de la membrana; los ángulos de inclinación varían de 5 a 15° en los segmentos M1 a M5 y M9 y M10, mientras que M6, M7 y M8 tienen un mayor grado de inclinación (16-22°). El sitio de unión al protón en el dominio membranal está definido por los residuos de Asp⁷³⁰ y el Glu⁸⁰⁵. Cerca se localizan los grupos polares de los enlaces peptídicos de la Ile³³¹, la Ile³³² y la Val³³⁴ pertenecientes al segmento M4, así como los grupos polares de las cadenas laterales de la Tyr⁶⁹⁴ y la Ser⁶⁹⁹ en la hélice M5. Se ha demostrado por experimentos de mutagénesis dirigida que todos estos aminoácidos son esenciales para el bombeo de los protones (Morsomme, 2000; Kühlbrandt, 2002). Otros residuos ampliamente conservados en el dominio membranal de la H⁺-ATPasa fúngica son la Arg⁶⁹⁵, la His⁷⁰¹ y el Glu¹²⁹, que también resultan fundamentales para el bombeo de protones. Con el Glu¹²⁹ se han obtenido resultados contradictorios, pues se ha visto que al modificarse con carbodiimidias la actividad de la ATPasa se inhibe, lo que sugiere que este residuo participa en el transporte de protones; sin embargo, al realizarse las mutaciones

específicas de este aminoácido la actividad de la ATPasa no cambió (Sussman, 1987; Portillo, 2000).

El dominio P también está muy conservado en las P-ATPasas. Aquí se localiza el Asp³⁷⁸, que realiza el ataque nucleofílico sobre el fosfato γ del ATP y que representa el sitio de fosforilación de la enzima. Este residuo está flanqueado por los grupos carboxilo de los Asp⁶³⁴ y Asp⁶³⁸, que aportan cargas negativas e interactúan con moléculas de agua para permitir la ruptura del intermediario acil fosfato. Se piensa que el exceso de cargas negativas puede ser estabilizado por la Lis⁶¹⁵ (Morsomme, 2000). Dentro de este dominio se localizan además los residuos de Asp⁵³⁴ y Asp⁵⁶⁰, que también participan en la unión del ATP, pero que no son esenciales para la actividad de la enzima, pues al mutarse sólo cambia la afinidad por el sustrato. Este dominio está formado principalmente por hélices α y está conectado con el dominio N por dos segmentos adyacentes estrechos (ver figura 12) que permiten una rotación de 73° del dominio N sobre el P.

El dominio R contiene los residuos de Ser⁹¹³ y Thr⁹¹⁴, que son los sitios potenciales de fosforilación por una proteína cinasa. La eliminación de los últimos 11 residuos de aminoácidos genera una enzima con características cinéticas similares a una ATPasa activada por glucosa (Portillo, 1991; Mason, 1998). Por tanto, se ha propuesto que el efecto inhibitorio se debe a que esta región impide el movimiento rotatorio del dominio N, restringiendo su movilidad y su interacción con el dominio P.

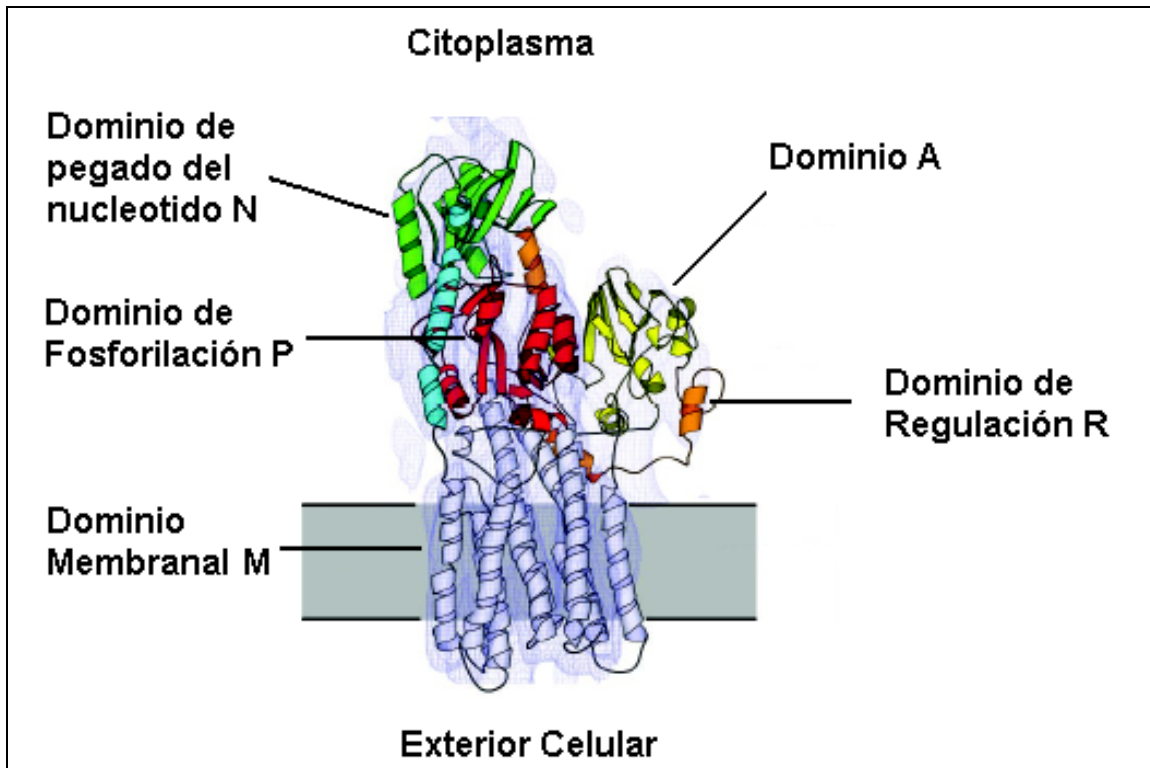


Figura 14. El modelo sobrepuesto de la estructura de la H⁺-ATPasa de *N. crassa* y la ATPasa de Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico, donde se señalan los 5 dominios conservados de las ATPasas. Imagen modificada de Kühlbrandt (2002).

La estructura cuaternaria de la ATPasa de protones es un tema no resuelto. Por ejemplo, cuando se solubiliza la proteína con detergentes se generan complejos enzimáticos organizados en octámeros y decámeros para la enzima de *S. pombe* y hexámeros para la de *N. crassa* (Auer, 1998). El tratamiento de la membrana plasmática de *N. crassa* con radiación de alta energía indica que la unidad funcional de la enzima tiene una masa molecular de 230 kDa, lo que sugiere un arreglo dímérico de la ATPasa (Bowman, 1985); sin embargo, una sola cadena polipeptídica de la ATPasa de *N. crassa* incorporada en proteoliposomas es completamente funcional para la hidrólisis de ATP (Goormaghtigh, 1986).

10 El mecanismo enzimático de la H⁺-ATPasa

Las ATPasas de protones acoplan la hidrólisis del ATP con la translocación de cationes, como entidades individuales, a través de la membrana, sin la ayuda de otra proteína de la membrana plasmática (Scarborough, 1990). Para el caso de

las H⁺-ATPasas fúngicas, la estequiometría del transporte es de un protón por cada ATP hidrolizado (Malpartida, 1981)

Estudios cinéticos detallados de la ATPasa han confirmado que el complejo Mg-ATP es el verdadero sustrato de la enzima, pero un exceso del Mg²⁺ o del ATP provoca inhibición (Koland, 1986). La afinidad de la proteína por el magnesio (K_d) depende de la concentración de KCl o NaCl, siendo de 10 μM en presencia de 25 mM de la sal y de 200 μM en ausencia de la sal. Estas variaciones de la afinidad se asocian con cambios conformacionales de la enzima, como lo muestra la disminución en la sensibilidad de la enzima hacia el inhibidor N-etilmaleimida (Brooker and Slayman, 1983) y el incremento en la fuerza de unión del complejo terbio-formicina trifosfato, análogo del Mg-ATP.

El mecanismo básico de la reacción de la H⁺-ATPasa consta de 5 pasos principales:

- 1) El ciclo comienza con la activación de la bomba mediante una fosforilación reversible del dominio R por una proteína cinasa.
- 2) Una vez activada la enzima (E₁), interactúa con el ATP a nivel del asa citoplásmica principal, al mismo tiempo que el catión interactúa con el sitio de alta afinidad localizado en el dominio M. Estas interacciones provocan un cambio conformacional en los dominios P y N, que facilitan la formación del enlace aspartil-fosfato (estado E₁P), así como el movimiento del dominio A, que conduce a un cambio en el arreglo de los segmentos transmembranales (posiblemente de M2).
- 3) Con la fosforilación del aspártico 378 en el dominio P y la liberación del ADP, hay un cambio conformacional que lleva a la enzima a un estado E₂P. Al mismo tiempo se reduce la afinidad por el protón en el sitio de pegado (aspártico 730), lo cual permite la liberación del protón en el lado extracelular.
- 4) El enlace aspartil-fosfato se hidroliza y se libera el fosfato inorgánico (E₂).

- 5) Finalmente, la enzima regresa al estado E_1 , en donde por medio de una proteína fosfatasa puede inactivarse o iniciar un nuevo ciclo de hidrólisis del ATP y transporte de protones a través de la membrana.

Los detalles de estos pasos principales, así como la naturaleza exacta de los intermediarios, es aún materia de debate, pero el esquema general que se muestra en la figura 15 es el que se acepta entre la mayoría de los diversos autores, los cuales coinciden en los siguientes puntos: A) que hay dos conformaciones de la enzima que tienen diferencias en la afinidad por los cationes, en la estabilidad térmica y en la sensibilidad a proteasas, B) la posibilidad de fosforilar a la enzima y C) la enzima es capaz de ser inhibida con el vanadato (Serrano, 1988; Möller, 1996).

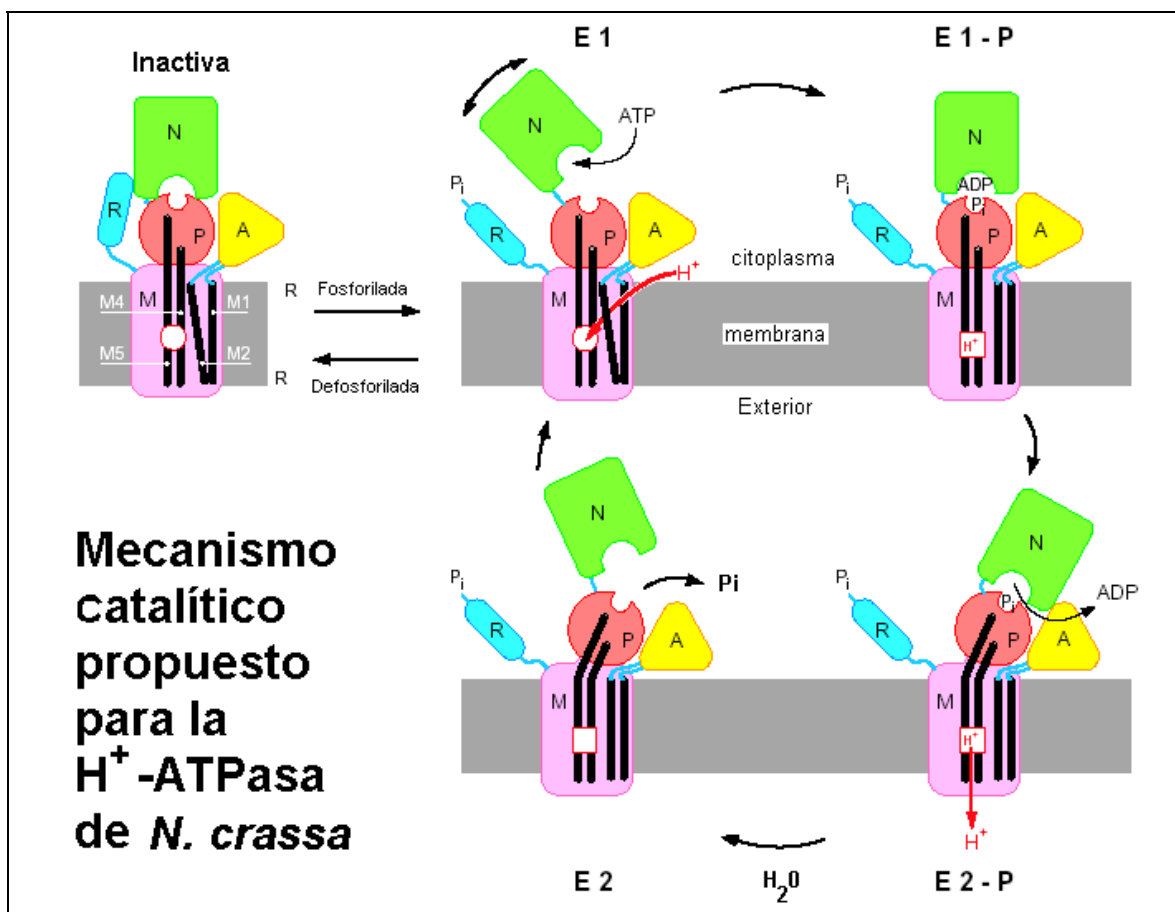


Figura 15. El mecanismo catalítico de la ATPasa de protones de *N. crassa*. Esquema modificado de Kühlbrandt (2002).

11 La Regulación de la H⁺-ATPasa

Las H⁺-ATPasas de hongos y plantas se regulan tanto a nivel transcripcional como a nivel postraducciona (Portillo, 1991; y 2000). Por ejemplo, en *S. cerevisiae* y *S. pombe* la actividad de la enzima depende de las condiciones de crecimiento (Serrano, 1988). Algunos factores que incrementan la actividad de la enzima son las fuentes de carbono fermentables como la glucosa, la maltosa y la galactosa. Asimismo, distintos agentes estresantes como las temperaturas supraóptimas, los choques térmicos, la disminución de las fuentes de carbono o de nitrógeno, las altas concentraciones de etanol, de metales, de sales o la acidificación del medio de cultivo, se han reportado como activadores de la enzima (Eraso, 1987; Benito, 1992; Hernández, 2002).

Conocer los mecanismos que regulan el funcionamiento de las H⁺-ATPasas de hongos como *U. maydis* representa un reto interesante tanto en la bioquímica como en la biología molecular y la genómica, pues no existen trabajos previos en los que se describan los parámetros cinéticos o los mecanismos que regulen la expresión génica para este tipo de proteínas en distintas condiciones de cultivo (medios ricos, mínimos, diferentes temperaturas, etc.). Actualmente en la literatura solo existe un par de trabajos realizados por Hernández y colaboradores, acerca del funcionamiento de la H⁺-ATPasa de *U. maydis*. Sin embargo, al estar secuenciado el genoma de *U. maydis*, y disponible la información en las bases de datos de la internet, el número de trabajos sobre el metabolismo intermediario y la bioenergética de este microorganismo incrementará notablemente. En este trabajo se pretende encontrar una relación entre los parámetros cinéticos de la enzima y su posible función en el metabolismo celular, cuando se cultivan las levaduras de *U. maydis* en medios de cultivo de composición distinta.

II. OBJETIVOS

Objetivo general:

- Caracterizar el funcionamiento de la ATPasa de protones de la membrana plasmática de *Ustilago maydis* desde un punto de vista cinético y realizar un análisis bioinformático de las secuencias génicas de la proteína.

Objetivos particulares:

- Obtener los parámetros cinéticos V_{max} y K_m de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática de *U. maydis*, bajo condiciones de cultivo en medio rico y en medio mínimo. Obtener la K_i por el vanadato.
- Caracterizar el crecimiento de la levadura de *U. maydis* en medios de cultivo rico y mínimo cerrados.
- Identificar la(s) secuencia(s) codificantes para la H^+ -ATPasa presente(s) en el genoma de *U. maydis*.

III. JUSTIFICACIÓN

La justificación de este proyecto se sustenta en la importancia que desempeña la H⁺-ATPasa en el metabolismo de los hongos: la enzima puede representar hasta el 15% de la proteína de la membrana plasmática, consume cerca del 20% o más del total del ATP celular y transduce en un gradiente de potencial electroquímico la energía química proveniente del ATP (Goffeau y Slayman, 1981; Serrano, 1988; Portillo, 1989 y 2000; Mason, 1998).

Este gradiente de potencial se utiliza en el transporte de iones, metabolitos y nutrientes al interior de las células, así como en la regulación del pH intracelular, por lo que la actividad de esta H⁺-ATPasa se correlaciona con las tasas de crecimiento celular, la tolerancia a metales pesados, así como en la respuesta al estrés térmico y salino (Goffeau y Slayman, 1981; Serrano, 1988; Weissman, *et al*, 1999).

Además, se sabe que el transporte de iones y nutrientes en las distintas relaciones ecológicas entre las plantas y los hongos depende, en gran medida, de la generación del gradiente de potencial electroquímico creado por las ATPasas fúngicas (Gianinazzi *et al*, 1991; Requena *et al*, 2003).

De esta manera, el tema de investigación de este proyecto se aboca al funcionamiento de la ATPasa de protones de la membrana plasmática de *U. Maydis*, cuando las levaduras se encuentran en diferentes condiciones de cultivo.

IV. HIPÓTESIS

Si la H⁺-ATPasa consume una parte importante del ATP citosólico para mantener el gradiente de potencial electroquímico que se usa en el transporte de nutrientes y otros solutos, *entonces* la membrana plasmática de las levaduras de *U. maydis* cultivadas en diferentes medios deberá tener una H⁺-ATPasa con parámetros cinéticos (K_m y V_{max}) diferentes y con una regulación genética determinada por las condiciones de cultivo.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Estrategia metodológica

La estrategia que se siguió para realizar este trabajo se ilustra en el diagrama de flujo de la siguiente figura, en donde se resaltan los pasos más importantes del método.

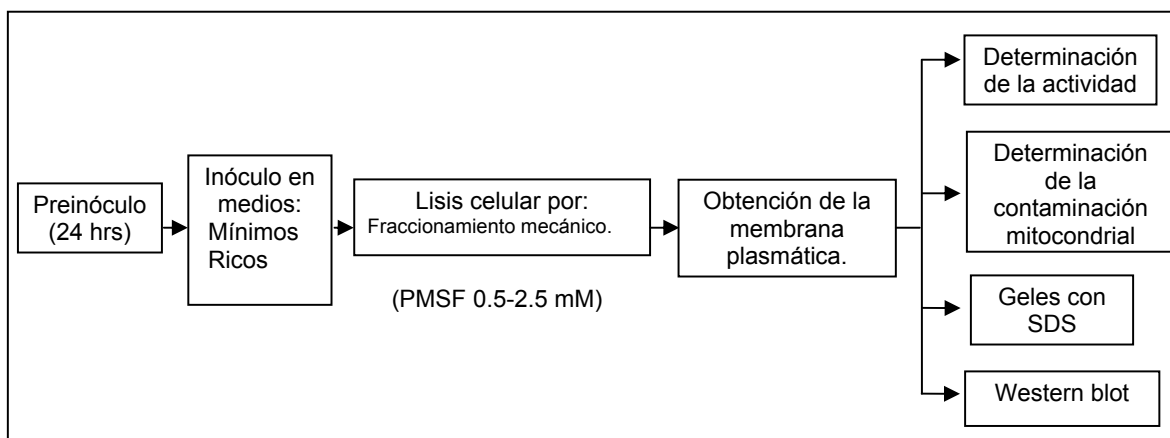


Figura 15. Diagrama de flujo seguido para el desarrollo de este trabajo. Las condiciones de cada paso se detalla adelante.

2. Cultivo de *U. maydis*

2.1 Preparación de los medios líquidos de inoculación y cultivo

Las levaduras de *U. maydis*, cepa FB2, se cultivaron en medios ricos, mínimos y minerales, en fase líquida.

2.1a Composición del medio rico de YPD

El medio rico de YPD (yeast extract, peptone, dextrose) que se utilizó para el preinoculo (0.1 L) de las levaduras y para su cultivo posterior (1 L) está compuesto por los siguientes nutrientes a las concentraciones indicadas (p/v):

Glucosa	1 %.
Extracto de levadura	1 %.
Bactopeptona	0.25 %.

2.1b Composición del medio mínimo

En la preparación de los medios mínimos para el cultivo de las levaduras de *U. maydis* (1 litro) se añadieron los siguientes nutrientes a las concentraciones indicadas (p/v):

Glucosa	1 %	(p/v)
Nitrato de Amonio (NH ₄ NO ₃)	0.3 %	(p/v)
Solución de Sales	6.25 %	(v/v)

La composición de la solución de sales para el cultivo en el medio mínimo fue:

KH ₂ PO ₄	1.6 %
Na ₂ SO ₄	0.4 %
KCl	0.8 %
MgSO ₄	0.2 %
CaCl ₂	0.1 %
Elementos traza	0.8 %

La composición de la solución de los elementos traza fue:

H ₃ BO ₃	0.006 %
MnCl ₂ -4H ₂ O	0.014 %
ZnCl ₂	0.04%
NaMoO ₄ - 2H ₂ O	0.04 %
FeCl ₃ -6 H ₂ O	0.01%
CuSO ₄ -5 H ₂ O	0.04%

2.1c Composición del medio mineral

El medio mineral para el cultivo de las levaduras de *U. maydis* tuvo la siguiente composición:

Glucosa	0.1 %,
NH ₂ CONH ₂	0.1 %,
NaCl	0.025%.

Para la preparación de cada uno de los medios de cultivo se disolvieron los nutrientes en el volumen correspondiente de agua bidestilada y se agitaron

vigorosamente, para después esterilizarse durante 20 minutos a 120° C en una autoclave. Posteriormente los medios de cultivo se enfriaron a temperatura ambiente hasta su inoculación con las levaduras.

2.2 Reactivación de la cepa e inoculación del medio YPD

Para reactivar las levaduras de *U. maydis* se utilizaron 500 µl de una suspensión de células en glicerol estéril al 50 %, almacenadas en tubos de microfuga a – 70°C, y se sembraron en 0.1 L del medio de inoculación de YPD. El preinoculo se incubó durante 24 horas a 30° C en un agitador orbital con movimiento constante a 200 revoluciones por minuto (rpm).

2.3 Cultivo de las células

Al término de las 24 horas de preincubación, se determinó la absorbencia de la suspensión celular con un espectrofotómetro (PM2DL de la marca Zeiss), utilizando un haz de luz con una longitud de onda fija a 660 nm. Posteriormente se sembraron 20 unidades de absorbencia en cada litro del medio de cultivo y se colocó cada matraz en el agitador orbital, a 30° C, durante 22-24 horas, con agitación constante a 200 rpm.

2.4 Cosecha de las levaduras

Para sedimentar a las levaduras y separarlas del medio líquido los cultivos se centrifugaron a 4,620 g durante 6 minutos (aproximadamente 5,000 rpm en el rotor SLA-1500), manteniendo la temperatura constante a 4° C. Cada pastilla colectada se lavó con agua bidestilada y se volvió a centrifugar por 6 minutos a 4,260 g. Todas las pastillas se reunieron en un sólo paquete y se determinó el peso húmedo de las levaduras cosechadas. El rendimiento promedio de los cultivos en YPD fue de 8.5 gramos de levadura por litro en 24 horas.

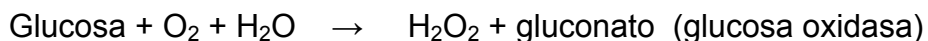
3 Cinéticas de crecimiento de las levaduras de *U. maydis*

Las curvas de crecimiento de las levaduras de *U. maydis* en los tres medios de cultivo descritos se realizaron de la siguiente manera: a partir de 0.1 L de un preinóculo de levaduras cultivadas en medio de YPD durante 24 horas, se cosecharon las células y se incubaron durante 3 horas en un medio de Trizma base 20 mM con el pH ajustado a 6.5. Las células se cosecharon y se lavaron 2 veces con la misma solución amortiguadora, para después inocular 20 unidades de cultivo por cada litro en el medio correspondiente. El crecimiento de las levaduras se siguió por 150 horas (6.25 días) y se tomaron alícuotas de 1 mililitro del medio cada 6 horas para su posterior análisis.

3.1 Determinación de la concentración de glucosa en los medios de cultivo durante la curva de crecimiento

La determinación de la glucosa se realizó de acuerdo con el método descrito por la empresa biotecnológica “Spinreact^{MR.}”. En forma breve, se disolvieron 0.05 gramos de la “solución R1” que contiene a las enzimas glucosa oxidasa (15 000 U/ L) y peroxidasa (1 000 U/ L) en 125 mililitros del “amortiguador R2”. El amortiguador R2 está compuesto por una mezcla de fenol 300 μ M y tris 92 mM pH 7.4. Se preparó una solución de referencia de glucosa 6 mM para realizar una curva patrón de glucosa que incluía las siguientes concentraciones: 0, 0.03, 0.06, 0.09 y 0.12 μ M. Se incubó cada solución con los volúmenes correspondientes de las enzimas durante 30 minutos y se leyó la absorbencia de las soluciones a una longitud de onda de 505 nm.

Las reacciones enzimáticas en las que se basa la determinación colorimétrica de la glucosa, de acuerdo con el “Método de Trinder”, son las siguientes:



En estas reacciones acopladas, la quinona que se produce es un cromóforo que se detecta a simple vista en tonos rosas y su formación se cuantifica determinando la absorbencia de las soluciones a 505 nm.

Para determinar la concentración de glucosa en el medio de cultivo se tomaron muestras de 20 μ l de los sobrenadantes que se obtuvieron a los diferentes tiempos de la curva de crecimiento y se diluyeron 10 veces para que los valores de absorbencia cayeran dentro de la curva patrón de la glucosa. La determinación de glucosa de cada muestra analizada se realizó por triplicado.

3.2 Lectura del pH de los medios de cultivo durante la curva de crecimiento

La determinación del pH de cada muestra se realizó con un microelectrodo de "Hana instruments". La lectura del valor de pH se realizó en cada uno de los triplicados de las muestras.

4. Obtención de la membrana plasmática a través de la ruptura mecánica con perlas de vidrio

Para romper la pared celular de las levaduras se resuspendieron las células en el amortiguador Tris-HCl 50mM, pH 7.2 (20 ml de amortiguador por cada 4 gramos de células y 7 μ l de β -mercaptoetanol). La suspensión se incubó durante 10 minutos a 30° C en un baño térmico y se centrifugó a 4,260 g durante 5 minutos.

Por cada 4 gramos de células obtenidas en el cultivo se añadieron 20 ml de una solución de sacarosa 0.33 M, EGTA 1 mM pH 7.2. La suspensión de células se transfirió a una cámara de homogenización a 4° C y se añadió un volumen de perlas de vidrio (de 0.45 – 0.5 mm de diámetro). Segundos antes de comenzar la ruptura mecánica de las células en una licuadora especializada (Bead-Beater de la empresa Biospec Products Inc.), se agregó 1 mM del inhibidor de serin proteasas fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO).

Las células se fragmentaron con pulsos de 1 minuto, alternando con descansos de 60 segundos, hasta completar 6 minutos de ruptura. La suspensión celular resultante se separó por decantación y una pequeña muestra se llevó al microscopio invertido (Nikon, DIAphot 300) para verificar la ruptura de las células.

La suspensión de células rotas se centrifugó a 4,260 g durante 5 minutos. Al término de esta centrifugación se rescató el sobrenadante y se centrifugó por 30 minutos a 10,000 rpm en el rotor SS-43 (17,200 g), para separar la fracción mitocondrial. El sobrenadante se centrifugó de nueva cuenta, ahora por 45 minutos a 18,000 rpm en el mismo rotor (38,720 g), para obtener un paquete de membranas plasmáticas que se resuspendió en un volumen mínimo del amortiguador Tris-EGTA 1 mM pH 7.2. Se determinó la concentración de proteína y se cuantificó la actividad de hidrólisis del ATP producido por la H⁺-ATPasa (ambos métodos se describen adelante).

4.1 Obtención de la membrana plasmática a partir de esferoplastos

Una vez concluido el tiempo de cultivo de las levaduras de *U. maydis*, se cosecharon las células a 5,000 rpm en el rotor SLA-1500 (4,260 g) durante 6 minutos. Enseguida, por cada 4 gramos de células se añadieron 20 ml del medio de incubación (manitol 400 mM, trizma-base 50 mM, EDTA 2 mM y EGTA 2 mM pH 7.4) y 10 µl de β-mercaptoetanol y se incubaron con agitación constante durante 10 minutos en el baño térmico a 30° C. Posteriormente, las células se cosecharon y se lavaron dos veces con el amortiguador de incubación para después ser resuspendidas con 250 ml del amortiguador de lisis (sulfato de amonio 0.6 M) por cada 5 gramos de células (provenientes de la centrifugación de 1 litro de suspensión).

Para obtener los esferoplastos se adicionaron 0.25 g de enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (de la empresa biotecnológica “Sigma Chemical Company”) por cada 250 ml de la suspensión de células y se incubaron a temperatura ambiente con agitación constante durante 30 minutos. Al finalizar el lapso de ruptura, se añadió 1 mM de PMSF-DMSO a partir de una solución 0.5 M y se confirmó la ruptura de la pared celular observando los esferoplastos en el microscopio invertido Nikon DIAphot 300 a un aumento de 400 X en fase II.

Los esferoplastos se cosecharon por centrifugación a 1075 g (3,500 rpm en el rotor SS34) por 10 minutos y el paquete se resuspendió en 25 ml del medio de aislamiento (sacarosa 800 mM, tris 10 mM, EDTA 1mM, pH 7.0) y las células se

lavaron dos veces con el mismo medio. Enseguida se añadió 1 ml del coctel de inhibidores de proteasas de Sigma por cada 100 ml de suspensión de esferoplastos. El espectro de acción de este coctel de inhibidores incluye a las proteasas de serina y cisteína, aminopeptidasas y proteasas ácidas. Durante este paso también se añadió 1 mM de PMSF a la suspensión de esferoplastos. Este compuesto se clasifica como un inhibidor de proteasas de serina, de acetilcolinesterasas, de trombinas y de proteasas de cisteína. En la misma forma, también se añadió 1 mM del compuesto DIFP (diisopropil fluorofosfato) a la suspensión celular.

A continuación, esta solución se maceró ligeramente en un homogenizador de vidrio, aproximadamente 30 veces, y se verificó la ruptura de las células en el microscopio óptico. La suspensión se centrifugó a 1,000 g (3 000 rpm en el rotor SS34) durante 6 minutos para eliminar los esferoplastos enteros remanentes y se centrifugó el sobrenadante durante 20 minutos a 18,500 g (12,500 rpm en el rotor SS34) para sedimentar las mitocondrias. Finalmente el sobrenadante se centrifugó a 40,905 g (18,500 rpm en el rotor SS-34) durante 45 minutos, para obtener la fracción membranal, que se resuspendió en el amortiguador de dilución (1 mM tris-EGTA pH 7).

5 Purificación de la ATPasa con un gradiente zonal de sacarosa

Con el fin de obtener una preparación más pura, la membrana plasmática cruda que se obtuvo en el paso anterior se sometió a una centrifugación zonal en un gradiente discontinuo de densidad formado por diferentes concentraciones de sacarosa. Este método se basa en el comportamiento de las partículas en un campo gravitacional que se genera al aplicar una fuerza centrífuga y permite separar los componentes de una muestra (Alberts, et al, 1994; Darnell et al, 1990). Para realizar la purificación de la membrana plasmática con el gradiente de sacarosa se prepararon 100 mililitros de las siguientes soluciones:

Solución A: sacarosa 52% (p/v), pH 7.2:

Sacarosa	52 %.
Trizma base	10 mM

EDTA	1 mM
------	------

EGTA	1mM
------	-----

Solución B: sacarosa 74% (p/ v), pH 7.2:

Sacarosa	74 %.
----------	-------

Trizma base	10 mM.
-------------	--------

EDTA	1 mM.
------	-------

EGTA	1 mM.
------	-------

De esta forma, la membrana plasmática cruda que se obtuvo luego de la ruptura de las células con las perlas de vidrio, se diluyó y se llevó, con la solución A, a una concentración de proteína de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Simultáneamente se preparó el gradiente de sacarosa con 1.5 y 4 ml de las soluciones A y B, respectivamente, quedando la solución más concentrada en el fondo del tubo.

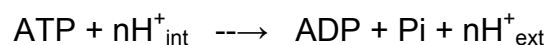
La suspensión de membranas plasmáticas se colocó encima de la solución A y se centrifugó a 139,000 g durante 4 horas a 4° C (40,000 rpm, en el rotor 65 Ti). Se colectó la banda que se forma entre las dos soluciones de sacarosa, que corresponde a la membrana plasmática; ésta se diluyó con la solución EGTA- Tris 1 mM pH 7.2 y se centrifugó una hora a 139,000 g durante 4 horas a 4° C (40,000 rpm, en el rotor 65 Ti). La pastilla resultante se resuspendió en un volumen mínimo de Tris-EGTA 1 mM pH 7.2 con glicerol al 10% (v/v).

6 Determinación de proteína

La concentración de proteína se determinó utilizando el método de Lowry y colaboradores, modificado por Bensadoun y Weinstein (1976). Se utilizaron estándares de albúmina de suero bovino (BSA) de la empresa Sigma Chemical Company.

7 Determinación de la actividad de la H⁺-ATPasa

La ATPasa de protones de la membrana plasmática de las levaduras cataliza la siguiente reacción:



en donde el valor de “n” representa la estequiometría de los protones transportados desde el interior de las células (int) hacia el periplasma o exterior (ext) celular, por cada molécula de ATP utilizada (H^+ /ATP). Por tanto, se puede determinar la actividad enzimática de la ATPasa por medio de la cuantificación del fosfato inorgánico (Pi) que se libera, acoplado el ensayo de actividad al método colorimétrico para el Pi propuesto originalmente por Fiske y Subbarow en 1925.

8 Ensayo de actividad de la H^+ -ATPasa

La figura 16 muestra la estrategia que se siguió para determinar la actividad específica de las fracciones membranales enriquecidas en la actividad de la H^+ -ATPasa. La reacción de hidrólisis del ATP se inició al diluir 25 veces una alícuota de 10 μ l de una suspensión de la ATPasa o de membrana plasmática en 250 μ l de la solución de ensayo de ATPasa, con un sistema regenerador de ATP. La mezcla se incubó a 30° C por 30-120 minutos y la reacción de la ATPasa se detuvo con 50 μ l de ácido tricloroacético al 30% (concentración final 7% p/v) y los tubos se colocaron en hielo para evitar la hidrólisis del ATP.

Las dos soluciones que se utilizaron en los ensayos de actividad se describen a continuación:

a) Medio de incubación. Una solución acuosa de MES-KOH 50 mM, glicerol al 15% (v/v) con el pH ajustado a 6.0. El volumen final de esta solución fue de 130 μ l y la concentración de proteína varió dependiendo de la preparación, de 0.6 a 3.4 μ g / μ l.

b) Solución de ensayo de la H^+ -ATPasa. Esta solución contenía: Na_2ATP 5 mM, $MgSO_4$ 10 mM, MES 10 mM, azida de sodio 5 mM y fosfoenolpiruvato 5 mM con un sistema regenerador de ATP. El pH final de la mezcla se ajustó a 6.0 con hidróxido de potasio (KOH).

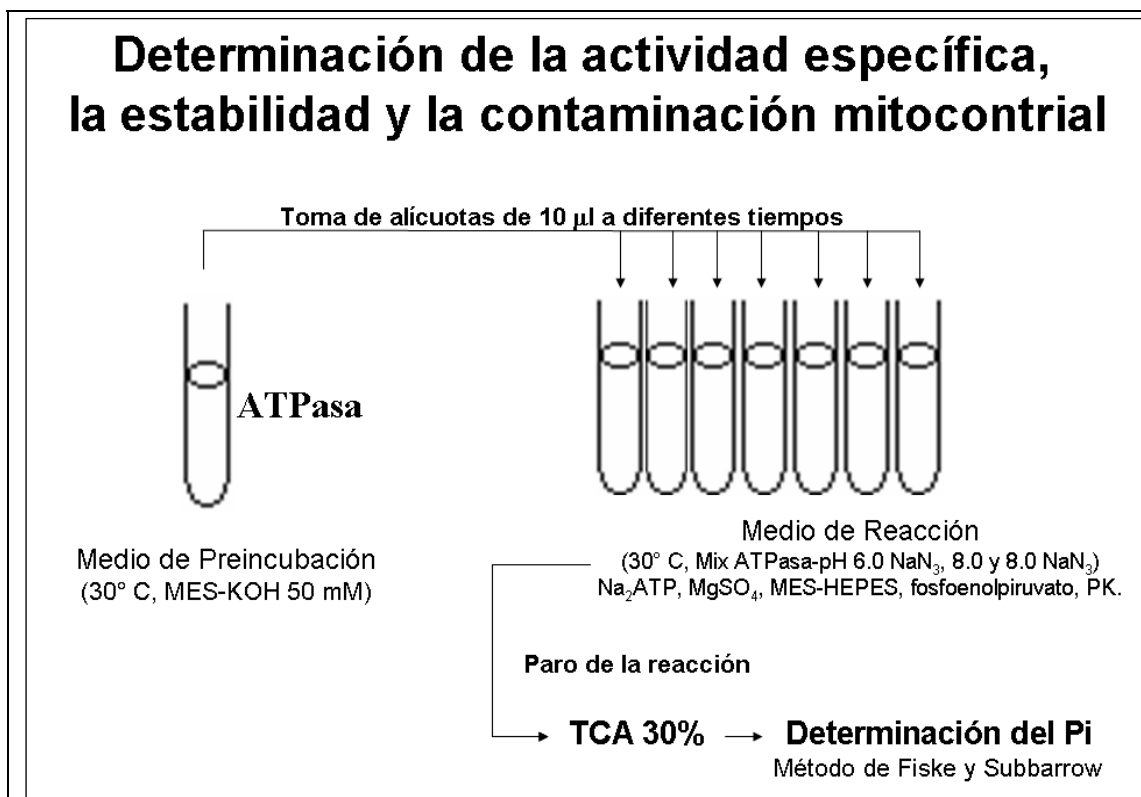


Figura 16. Esquema general para evaluar la estabilidad y actividad específica de la H⁺-ATPasa de *U. maydis*. Para determinar la actividad específica y la estabilidad enzimática se utilizó el medio de reacción de la Mix ATPasa pH 6.0 con NaN₃ y el medio de preincubación descrito. Sin embargo, para la determinación de la contaminación mitocondrial se utilizaron los tres medios de reacción señalados: Miz ATPasa pH 6.0 con NaN₃, Mix ATPasa pH 8.0 sin NaN₃ y Mix ATPasa pH 8.0 con NaN₃, y se evaluó la contaminación mitocondrial siguiendo la fórmula: {(actividad a pH 8- actividad a pH 8 con NaN₃) x 100} / {(actividad a pH 6 – (actividad a pH 8- act. pH 8 NaN₃)}.

Si bien el medio de ensayo se utilizaba fresco, podía también almacenarse a -20° C en alícuotas de 100 µl que se iban descongelando conforme se realizaban los ensayos de actividad. Al momento de cada ensayo se añadió piruvato cinasa de músculo de conejo (5µl/ml de reacción) al medio de incubación para completar el sistema regenerador de ATP, pues los ensayos se realizaron siempre por tiempos largos, de 30 o hasta 120 minutos.

8.1 Determinación de los parámetros cinéticos de la H⁺-ATPasa

Para la determinación de los parámetros cinéticos de la H⁺-ATPasa de las fracciones membranales enriquecidas con la actividad de esta enzima, se siguió la estrategia que se describe a continuación y que se resume en la figura 17. Se

preparó un medio de reacción con la siguiente composición: una solución de MES 40 mM (como concentración final) con un pH ajustado a 6.5 con NaOH, 5 mM de $MgCl_2$, una concentración variable de Mg-ATP (se utilizó una solución equimolar de Mg-ATP), glicerol al 5 % y la membrana plasmática a una concentración de 1 a 25 μg por cada 250 μl de solución.

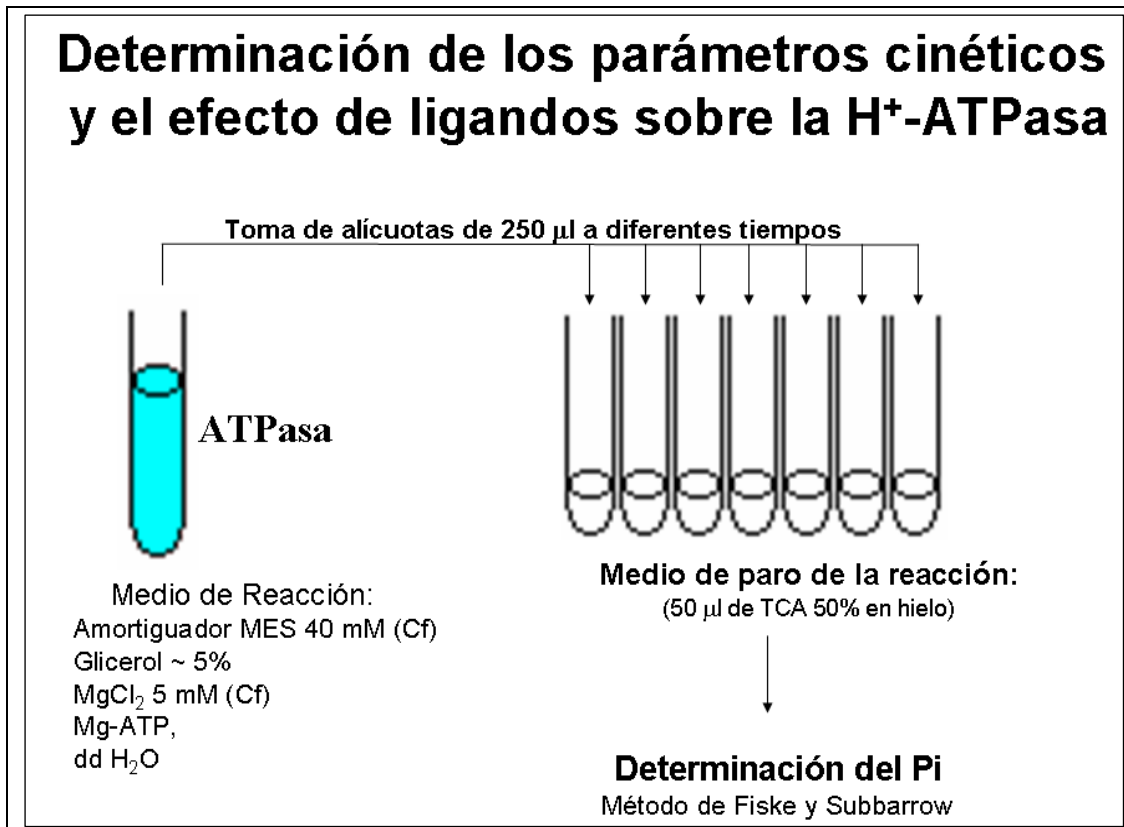


Figura 17. Esquema general para determinar los parámetros cinéticos y el efecto de los ligando de la H^+ -ATPasa de *U.maydis*.

La reacción de hidrólisis del sustrato Mg-ATP se inició con la adición de la membrana plasmática. A diferentes tiempos se tomaron alícuotas del medio de reacción y se colocaron en tubos que contenían 50 μl de TCA dispuestos previamente en hielo. La determinación del fosfato inorgánico liberado se realizó utilizando el método de Fiske y Subbarrow que se describe en la siguiente sección.

8.2 Método colorimétrico para la determinación de Pi

El fosfato inorgánico (Pi) liberado durante el ensayo de actividad se determinó por el método de Fiske y Subbarrow (1925), que se basa en la formación de un complejo de molibdato-fosfato (de color amarillo) que al reducirse con el sulfato de *p*-metil amino fenol (ELON) produce una coloración azul. A cada uno de los tubos donde se detuvo la reacción de la ATPasa se añadió 1.7 ml de agua bidestilada, 250 μ l de una solución de molibdato-ácido sulfúrico y 250 μ l de sulfato de ELON. La mezcla se dejó reposar por 30 minutos a temperatura ambiente, al término de los cuales se leyó la densidad óptica a una longitud de onda de 660 nm en un espectrofotómetro. Las soluciones para la cuantificación del Pi se prepararon en la siguiente forma: Molibdato-ácido sulfúrico (aforado a un 1 litro): molibdato de amonio 50 g, H₂SO₄ 111 ml, ddH₂O: 800 mililitros. Solución de ELON (aforar a 1 litro): sulfato de ELON 10 g, bisulfito de sodio 30 g.

9 Estabilidad de la enzima a diferentes valores de pH

Para determinar el efecto de diferentes condiciones de acidez y basicidad sobre la estabilidad de la H⁺-ATPasa de *U. maydis*, se conservó la estructura general del ensayo mostrado en la figura 16. La temperatura se mantuvo a 30° C y la única modificación fue el amortiguador del medio de incubación, que se ajustó a diferentes valores de pH. Para estos experimentos se preparó una mezcla de MES-HEPES que se ajustó con KOH a valores de pH de 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 y 8.75. La concentración final de cada amortiguador en el ensayo fue de 25 mM.

9.1 Efecto del pH sobre la actividad de la enzima

Para estudiar el efecto del pH sobre la actividad de la enzima, se siguió el esquema general señalado en la figura 17, es decir, se incubó a la enzima en una solución con 5 mM MgCl₂, glicerol al 5 %, NaCl 100 mM y distintas concentraciones de Mg-ATP. Se tomaron alícuotas de 250 μ l a distintos tiempos y se mezclaron con 50 μ L de ácido tricloroacético al 30 %, para detener la reacción de la ATPasa. El fosfato liberado se determinó con el método de Fiske y Subbarrow y se comparó la actividad de la enzima en las diferentes condiciones

en tiempos menores a 5 minutos. Para evaluar la estabilidad de la enzima, se tomaron alícuotas de 250 μ l en diferentes tiempos durante 45 minutos de cada una de las condiciones señaladas.

10 Efecto de cationes mono y divalentes sobre la actividad de la ATPasa

Los ligandos fisiológicos que se probaron sobre la actividad de la H⁺-ATPasa fueron el Mg²⁺, el Na⁺ y el K⁺. Para evaluar el efecto de estos cationes se tuvo el cuidado de verificar la concentración de cada uno de los cationes presentes en el medio de reacción de la H⁺-ATPasa. De esta forma se evitó el enmascaramiento de efectos por acumulación de otros iones distintos a los que se analizaban. En cada caso, se varió la concentración de uno de los iones y se mantuvo constante la concentración de los demás iones en el medio.

11 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes

La composición de proteínas de cada una de las preparaciones se estudió por medio de electroforesis en condiciones desnaturalizantes, con geles de acrilamida y bisacrilamida. La electroforesis se realizó de acuerdo con el método de Laemmli (1970). El gel separador (de resolución) consistió de acrilamida al 10%, bisacrilamida al 0.27%, tris/HCl 0.3755 M, pH 8.8 y SDS al 0.1%. El gel concentrador (de empaquetamiento) contenía acrilamida al 4%, bisacrilamida al 0.1%, tris/HCl 0.9375 M pH 6.8 y SDS 0.1%. La polimerización se inició con la adición de persulfato de amonio al 0.067 % y TEMED 0.33 %.

El amortiguador de corrida contenía glicina 0.2 M, tris 25 mM y SDS al 0.1 %. Los geles se corrieron a 100 V durante 3 horas y se tiñeron con una solución de azul de Coomassie al 0.25%, metanol al 40% y ácido acético glacial al 7%. Para desteñir los geles se utilizó una solución de metanol al 40% y ácido acético glacial al 7%. Los geles se secaron por 1-2 días envueltos en una membrana de celofán. El peso molecular aproximado de la proteína se obtuvo al comparar la movilidad electroforética de la H⁺-ATPasa con la de los estándares de peso molecular.

III. RESULTADOS

1. Cinética de crecimiento de *Ustilago maydis*

Las levaduras de *Ustilago maydis* se cultivaron a 30° C en recipientes cerrados (cultivo en batch) utilizando diferentes medios de cultivo para estudiar su crecimiento. Los medios que se probaron fueron: medio rico de YPD, medio mínimo y medio mineral. La composición de cada medio de cultivo se describió en la sección de Materiales y Métodos. En términos generales se encontró que las levaduras de *U. maydis* crecen de manera semejante en los medios mínimos y de YPD durante las primeras 30 horas de cultivo, aunque los parámetros cinéticos que describen la velocidad de crecimiento (k) y el tiempo de duplicación celular (g) son ligeramente mayores en el medio de YPD, en comparación con el medio mínimo (ver tabla 1). Este cambio en los parámetros cinéticos se ve reflejado en el hecho de que en el medio de YPD la cantidad de biomasa que se obtiene es, veces mayor a la cantidad de biomasa que se obtiene a partir de cultivos en medio mínimo.

Tabla 1. Descripción de las tasas de crecimiento, los tiempos de generación y el incremento en la biomasa de las levaduras de *U. maydis* en los diferentes medios de cultivo. Los parámetros que describen el comportamiento de las curvas de crecimiento están abreviados según la nomenclatura de uso general en donde: k es la velocidad de crecimiento (número de generaciones / hora); g es el tiempo de generación (horas) y Δgr representa el incremento en biomasa (gramos / hora - litro).

	Primera fase de crecimiento:			Segunda fase de crecimiento:		
	k	g	gr	k	g	gr
YPD	0.262 ± 0.042	2.64 ± 0.149	0.443 ± 0.044	0.013 ± 0.017	49.91 ± 0.525	0.151 ± 0.017
Mínimo	0.230 ± 0.023	3.01 ± 0.328	0.321 ± 0.013	0.025 ± 0.046	27.73 ± 0.333	0.312 ± 0.046
Mineral	0.188 ± 0.018	5.12 ± 0.302	0.15 ± 0.018	----	----	----

Sin embargo, en la segunda fase de crecimiento los cultivos de medio mínimo presentan mayores valores en los parámetros de cultivo celular en comparación con los cultivos en medios de YPD (comparar la velocidad de crecimiento $-k-$ y el tiempo de duplicación- $g-$ de la tabla 1), lo que conduce a que

a las 60 horas de cultivo, la cantidad de biomasa obtenida con ambos medios sea prácticamente idéntica (datos no mostrados). Para el caso de los cultivos de medio mineral, se encontró un crecimiento exponencial típico que presenta su fase estacionaria a partir de las 20 horas de cultivo. Las velocidades de crecimiento y los tiempos de duplicación celular para cada una de las fases de crecimiento obtenidas en los tres medios de cultivo se enumeran en la tabla 1.

1.1 Consumo de glucosa y variación del pH del medio de cultivo

Se analizaron los cambios en la concentración de glucosa externa y la variación en el pH durante cada fase de la cinética de crecimiento en las primeras 80 horas de cultivo (ver figura 1). Los resultados muestran que el consumo de glucosa fue lineal durante las primeras 80 horas de cultivo en los medios de YPD y mínimo, y que no estuvo relacionado con el tiempo de generación de las células en las dos fases de crecimiento de las curvas.

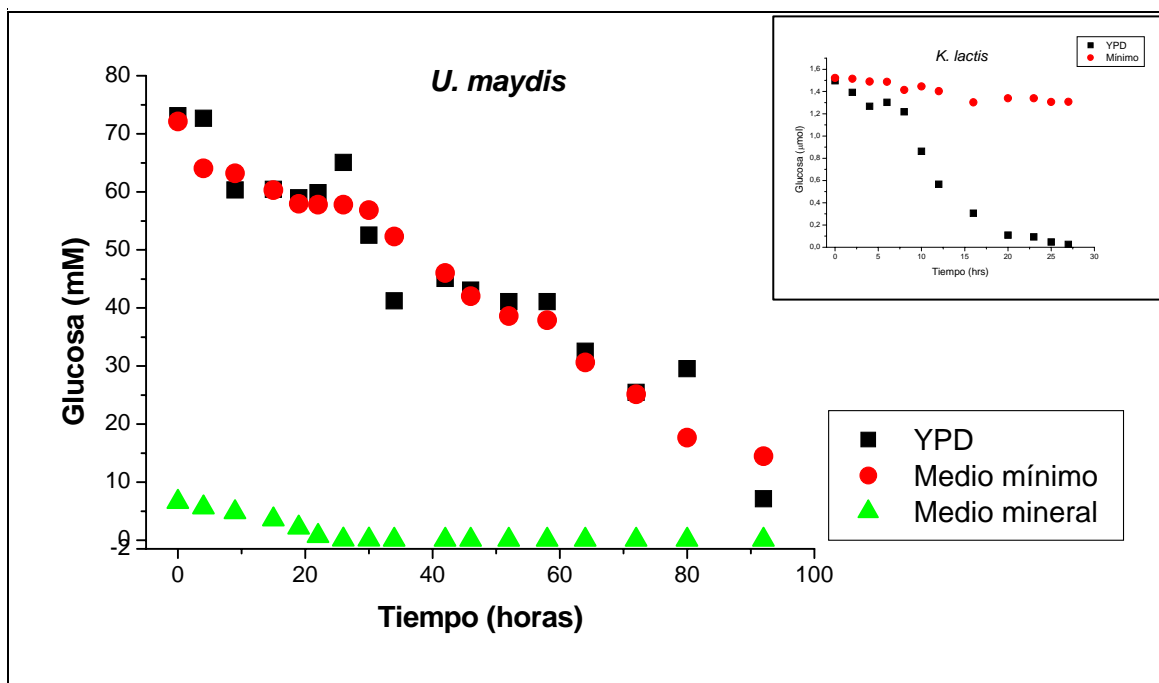


Figura 1. Consumo de glucosa de las levaduras. El método utilizado para realizar el seguimiento del consumo de glucosa durante la cinética de crecimiento es descrito en los materiales y métodos. En el recuadro superior derecho se muestra el patrón de consumo de glucosa de las levaduras del hongo ascomiceto *K. lactis* en los medios mínimos y de YPD. Las levaduras de *K. lactis* no crecen en medios minerales.

Respecto a la variación del pH, se encontró que en el medio de YPD no hay cambio durante las primeras 20 horas de cultivo, pero entre las 20 y las 40 horas el pH del medio se incrementa en 1.5 unidades y permanece constante a pH 6 durante todo el cultivo (ver figura 3). En el medio mínimo la variación del pH del medio semeja el comportamiento típico de otras levaduras (como *S. cerevisiae* y *K. lactis*), es decir, se acidifica en 2.2 unidades de pH conforme incrementa el tiempo de cultivo. La variación del pH en el medio mineral es compleja: se acidifica en 1.5 unidades durante las primeras 20 horas de cultivo y en seguida comienza a basificarse lentamente hasta asintotizarse a pH de 7.5 (ver figura 2).

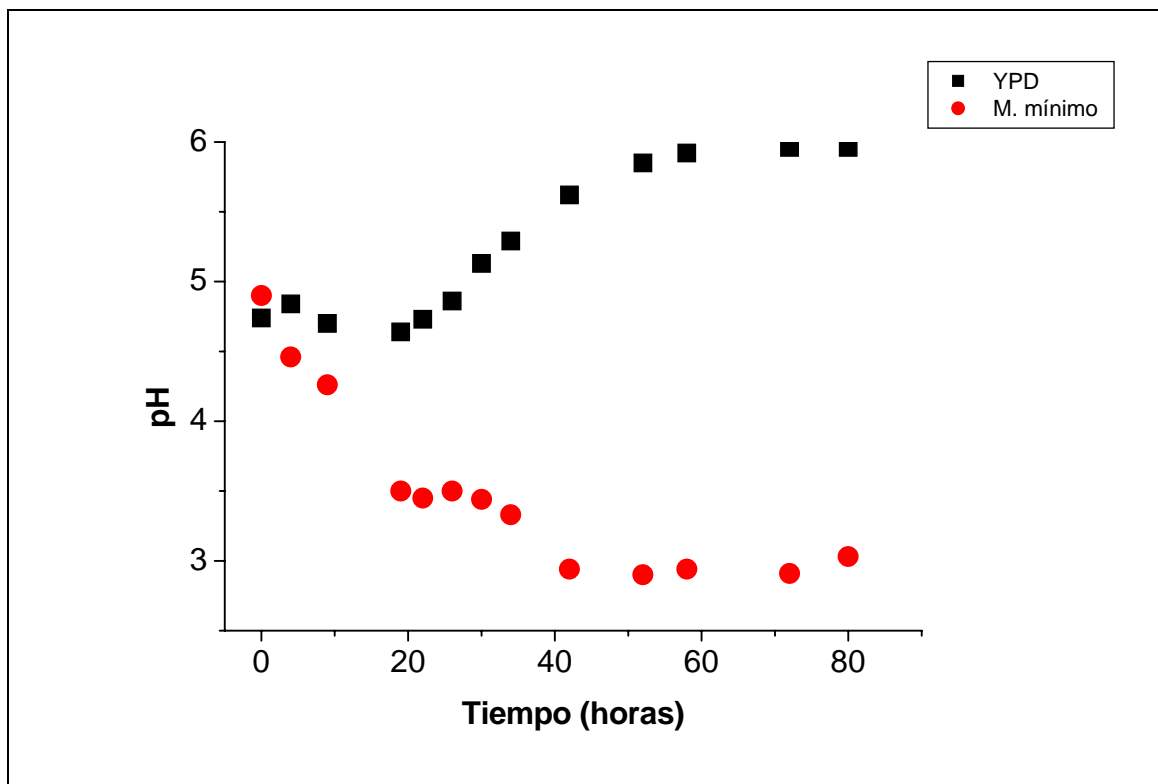


Figura 3. Seguimiento del pH en los medios de cultivo mínimo y de YPD durante la cinética de crecimiento de las levaduras de *U. maydis*. La composición de cada uno de los medios de cultivo utilizado fue descrita en los materiales y métodos.

Con el fin de hallar el pH óptimo para el crecimiento de las levaduras de *U. maydis* en los medios de YPD y mínimo, se decidió cultivar a las levaduras en medios no amortiguados cuyo pH se ajustó a diferentes valores. A partir de estos experimentos se encontró que las levaduras de *U. maydis* muestran un crecimiento preferencial según la composición del medio de cultivo (ver figuras 5 y

6). Cuando se cultivan en medios de YPD las levaduras muestran menores tiempos de duplicación (g) en medios con un valor de pH entre 5 y 8, mientras que en los medios mínimos las levaduras crecen mejor en medios con pHs ligeramente ácidos, tienen el mejor tiempo de duplicación en el intervalo de pH de 3 a 6.

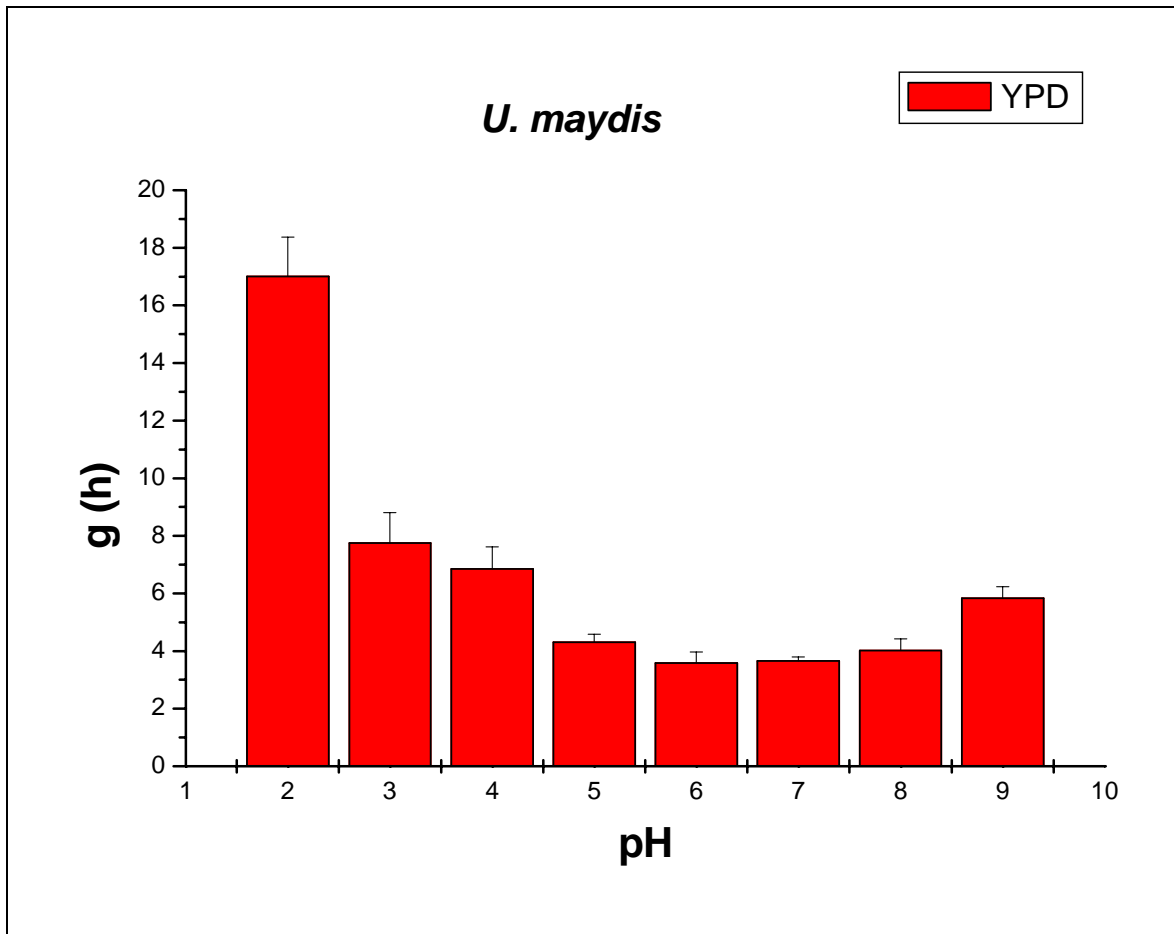


Figura 4: Análisis del tiempo de generación (horas⁻¹) de las levaduras de *Ustilago maydis* cultivadas en medios de YPD ajustados a diferentes pHs.

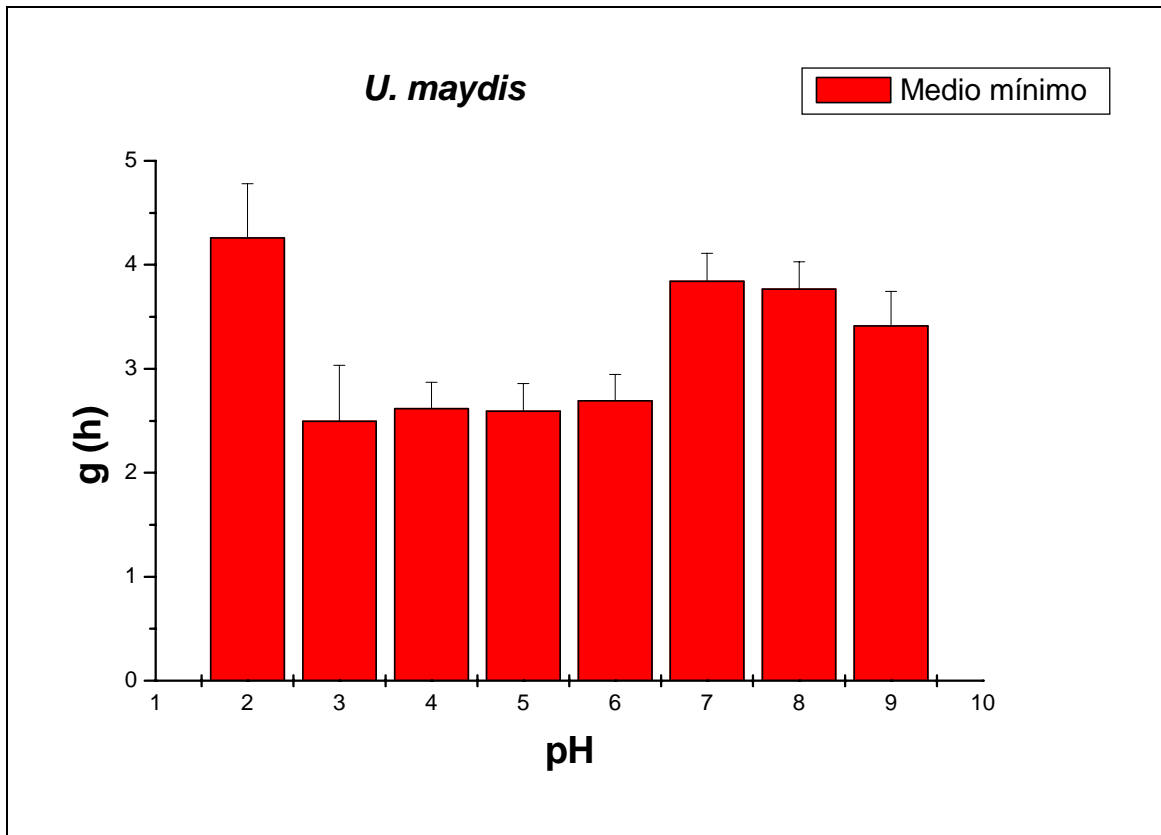


Figura 5: Análisis del tiempo de generación (h^{-1}) de las levaduras de *Ustilago maydis* cultivadas en medios mínimos ajustados a diferentes pHs.

1.2 Cambio del pH del medio en diferentes medios mínimos no amortiguados

A partir de los resultados encontrados, se evaluó el cambio en el pH del medio externo en los medios de YPD y mínimo no amortiguados. Los resultados se muestran en los paneles a y b de la figura 6.

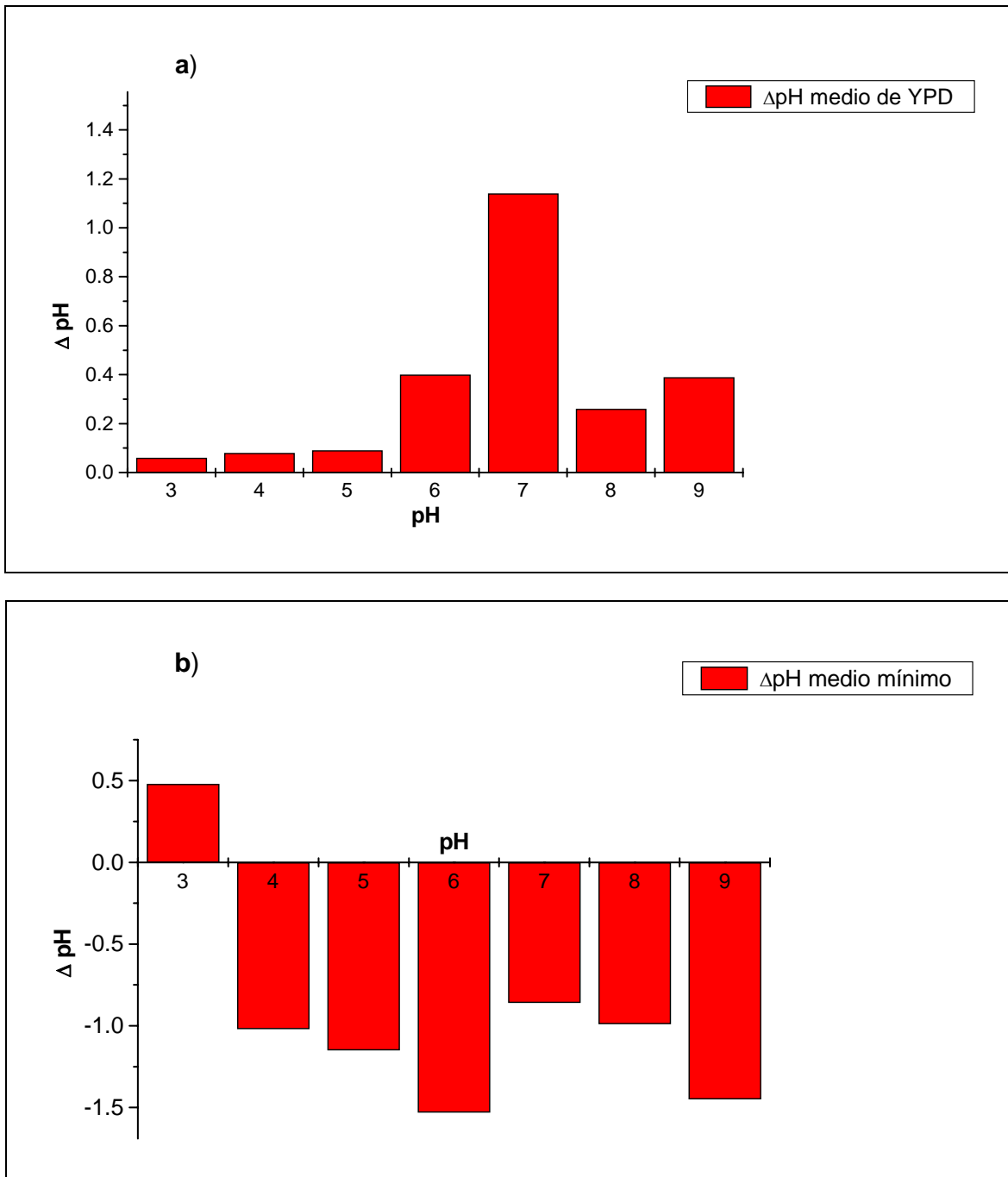


Figura 6. Cambio en el pH de los medios de YPD y mínimo no amortiguados como resultado del cultivo de las levaduras de *U. maydis*. El tiempo seleccionado para evaluar el Δ pH fueron las primeras 13 horas de cultivo.

A partir de los resultados se observa que la variación en el pH durante el crecimiento de las levaduras de *Ustilago maydis* en medios cerrados depende de la composición del medio: los medios mínimos se acidifican y los medios de YPD se alcalinizan, en las primeras 13 horas de cultivo de las levaduras de *U. maydis*.

2. Obtención de la membrana plasmática de levaduras de *U.maydis* cultivadas en medio mínimo a pH 5.5

2.1 Rompimiento de las levaduras y obtención de fracciones membranales sin contaminación mitocondrial

Para la obtención de la membrana plasmática de las levaduras de *U. maydis* se probaron diversas maneras de romper a las células. En la tabla 2 se resumen los resultados con los diferentes métodos de ruptura de las levaduras cultivadas en medio de YPD.

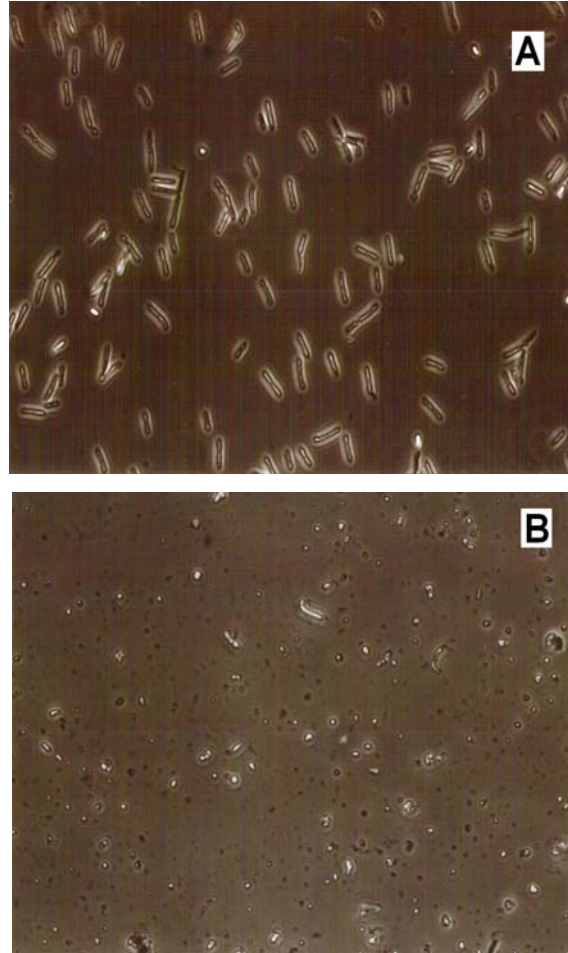
Tabla 2. Comparación de la actividad específica y la contaminación mitocondrial de cada una de las membranas plasmáticas de las levaduras de *U. maydis* rotas por diferentes métodos. La determinación del fosfato inorgánico producido fue realizada siguiendo el método de Fiske y Subbarrow descrito en los Materiales y Métodos.

	Método de fraccionamiento celular			
	Perlas de vidrio	Esferoplastos + taladro	Esferoplastos + sonicación	Esferoplastos + ruptura manual
Actividad específica:	250 nmoles de Pi /min mg * ± 25 nmoles	500 nmoles de Pi /min mg ± 15 nmoles	449 nmoles de Pi /min mg	400 nmoles de Pi /min mg ± 30 nmoles
Proteína obtenida:	240 ± 70 mg	150 ± 36.67 mg	130 mg	24 ± 15 mg
Contaminación Mitocondrial	17.2-36% (n = 26)	9- 12% (n = 5)	35% (n = 1)	0-4% (n = 60)

Se encontró que el método que involucró la formación de los esferoplastos utilizando las enzimas líticas del hongo *Trichoderma harzianum* seguido de la ruptura manual es el mejor, ya que con éste se obtiene una preparación con escasa o nula contaminación mitocondrial, aunque el rendimiento es significativamente menor. El método para cuantificar la contaminación mitocondrial fue descrito en los Materiales y Métodos.

En la figura 7 se muestra una secuencia de tres fotografías de las levaduras de *U. maydis* cultivadas en medio mínimo, durante el proceso de digestión de la pared celular con las enzimas líticas y la ruptura manual. En estas fotografías se observa a las levaduras intactas con su forma cilíndrica característica (figura 7A), cuando las células adquieren la forma típica de los esferoplastos luego de la digestión de la pared celular (figura 7B) y finalmente, después de la ruptura

manual de los esferoplastos (figura 7C), en donde es evidente que aún permanecen esferoplastos enteros. Cabe mencionar que el método de ruptura manual fue igualmente eficaz para fragmentar las levaduras cultivadas en medio mínimo y en YPD. No se ensayaron pruebas de lisis celular para la obtención de membranas plasmáticas a partir de cultivos provenientes de medio mineral por la escasa cantidad de biomasa que se obtiene a partir de estos medios.



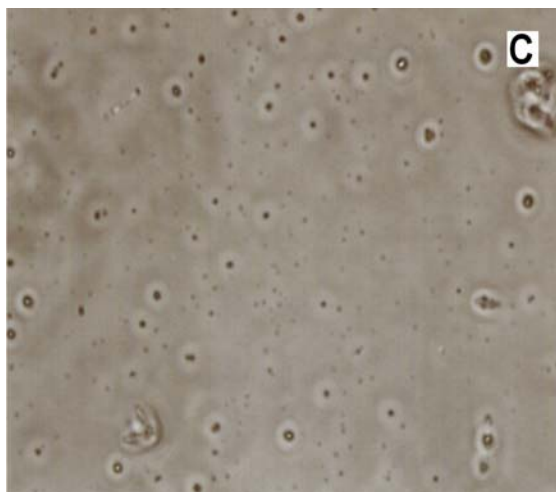


Figura 7. Secuencia fotográfica del proceso de lisis de las levaduras de *U. maydis* a través del fraccionamiento mecánico de los esferoplastos. En el panel A se muestran las levaduras intactas cultivadas en medio mínimo. En el panel B se exhiben los esferoplastos de *U. maydis* formados luego de 20 minutos de la exposición a las enzimas líticas de *T. harzianum*. En el panel C se observa el aspecto de la suspensión celular luego del fraccionamiento mecánico manual. Las tres fotografías fueron obtenidas con un aumento de 400 X en el microscopio óptico invertido Nikon DIAphot 300.

2.2 Obtención de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática de *U. maydis*

La integridad de la H⁺-ATPasa se confirmó mediante experimentos de electroforesis desnaturizante en los que se utilizó a la H⁺-ATPasa de *K. lactis* como control (datos no mostrados) e inmuno-replicas, en los que se utilizaron anticuerpos policlonales contra la ATPasa de *K. lactis*. Con estas técnicas se encontró una señal de aproximadamente 100 kDa, que corresponde con el tamaño esperado para una H⁺-ATPasa fúngica.

3. Parámetros cinéticos de la H⁺-ATPasa de membrana plasmática de levaduras cultivadas en medios mínimos y de YPD

Después de estandarizar el método para obtener una preparación de membrana plasmática libre de contaminación mitocondrial y estable para el manejo en los ensayos cinéticos, se procedió a la caracterización de la cinética de saturación de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática por el sustrato Mg-ATP. Los resultados de estos experimentos se muestra en la figura 8 y los valores de las constantes cinéticas se resumen en la tabla 3. El gráfico de Eisenthal-Cornish

Bowden fue seleccionado para mostrar estos resultados por la rápida visualización que permite para el análisis simultáneo de los parámetros cinéticos de K_m y V_{max} , en comparación con los gráficos directos de actividad específica contra concentración de sustrato (que generaría las típicas curvas “Michaelianas”), y además, los datos son vertidos directamente en el gráfico y no necesitan de tratamientos posteriores (como es el caso de los gráficos de Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee, Hanes, etc.). Sin embargo, es necesario señalar aquí que estos gráficos serán posteriormente utilizados en este trabajo, según su practicidad para la interpretación de cada dato.

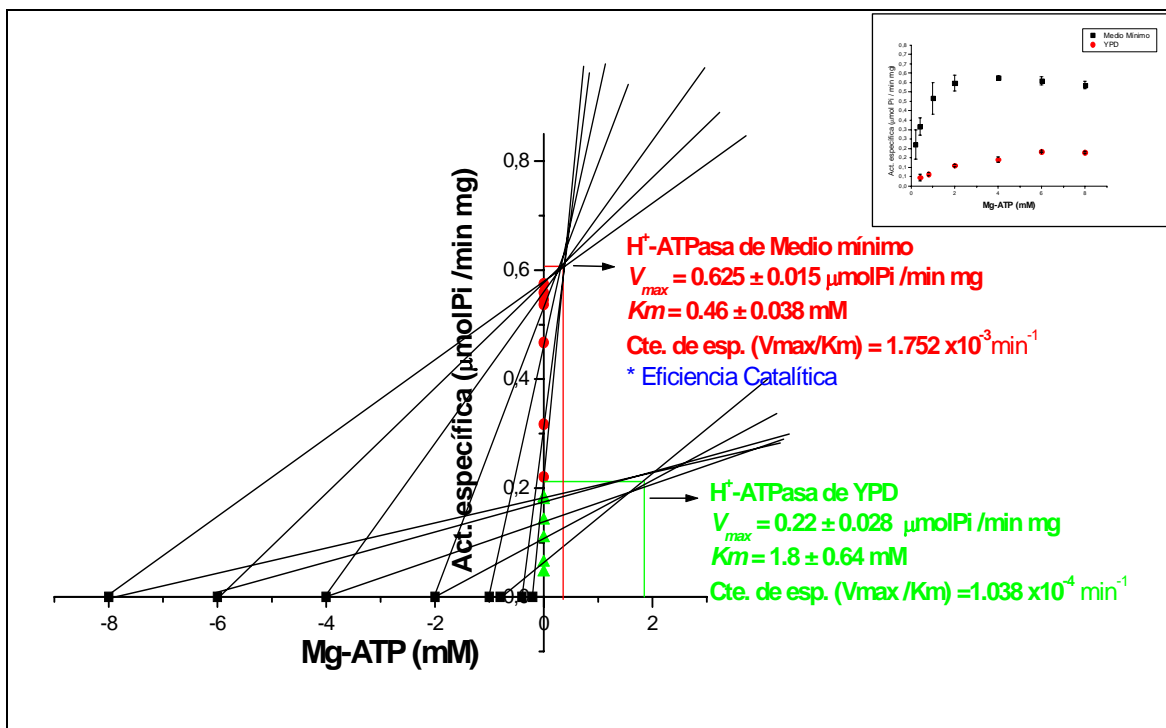


Figura 8. Gráfico de Eisenthal-Cornish Bowden para visualizar los parámetros cinéticos de las curvas de saturación de las H⁺-ATPasas de membranas plasmáticas provenientes de levaduras de *U. maydis* cultivadas en medios mínimos o en YPD. Las condiciones para realizar las cinéticas de saturación por el sustrato Mg-ATP fueron las siguientes: Mes-KOH 125 mM, pH 6.5, glicerol 10 %, 30° C. La concentración del catión monovalente K⁺ fue de 65 mM. La concentración de enzima utilizada en todos los ensayos cinéticos fue de 20 µg de proteína por cada 250 µl del medio de reacción. Los parámetros cinéticos fueron obtenidos a partir del ajuste no lineal de los datos con el programa Origin 6.0. La presencia de inhibición por sustrato se presentó únicamente en las H⁺-ATPasas provenientes de cultivo en medio de YPD, lo que se ve reflejado en la presencia de al menos dos puntos de intersección en el primer cuadrante de los trazos respectivos. En el recuadro superior derecho se muestran las curvas de Michaelis-Menten resultantes de graficar los datos con las desviaciones estándar de cada punto.

Tabla 3. Compendio de los parámetros cinéticos de las H⁺-ATPasas provenientes de levaduras de *U. Maydis* y *K. lactis* cultivadas en medios de YPD y mínimos. Las tres preparaciones de membrana plasmática de ambas levaduras fueron obtenidas siguiendo el protocolo descrito en la sección de Materiales y Métodos. Los ensayos de actividad fueron realizados en las condiciones de Mes-KOH 125 mM, pH 6.5, glicerol 10 %, 30° C, 65 mM K⁺.

	V_{max} ($\mu\text{mol Pi /min mg}$)	Km (mM)	Cte. de especificidad (V_{max}/Km) ($\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
<i>U. maydis</i> Medio Mínimo	0.625 \pm 0.15	0.46 \pm 0.04	1.752 x 10 ⁻³
<i>U. maydis</i> YPD	0.22 \pm 0.028	1.8 \pm 0.64	0.104 x 10 ⁻³
<i>K. lactis</i> YPD	1.85 \pm 0.32	1.12 \pm 0.37	1.65 x 10 ⁻³

Se observa que el parámetro cinético de la H⁺-ATPasa que más cambios experimenta es la constante de especificidad (V_{max}/Km), que es 16.8 veces mayor en los medios mínimos. En forma semejante, la constante de Henri-Michaelis-Menten, la Km , incrementa más de seis veces en las H⁺-ATPasas provenientes de cultivos en medios de YPD, mientras la V_{max} incrementa casi tres veces su valor en las levaduras cultivadas en medios mínimos.

Para comparar los parámetros de las H⁺-ATPasas de levaduras de *U. maydis* con H⁺-ATPasas de otros organismos, se hicieron ensayos de actividad para H⁺-ATPasas obtenidas a partir de cultivos de *Kluyveromyces* cosechadas al cabo de 24 horas de cultivo en medio de YPD. Se encontró que la H⁺-ATPasa de *U. maydis*, proveniente de cultivos en medio de YPD, posee una constante de especificidad 15.86 veces menor a la enzima de *K. lactis*. En la misma manera, la V_{max} es 8.4 veces mayor, mientras la Km es 1.6 veces menor. Parámetros cinéticos semejantes se han reportado para H⁺-ATPasas de otros hongos como *S. cerevisiae* y *N. crassa* (Möller, 1996, Serrano, 1988 y Goffeau, 1981).

Para los experimentos que se describen en adelante se seleccionaron las membranas plasmáticas provenientes de las levaduras de *U. maydis* cultivadas en medios mínimos debido a las siguientes razones:

1. No se ha reportado en la literatura trabajo alguno sobre las propiedades de la H⁺-ATPasa de las levaduras de *U. maydis* cultivadas en medios mínimos.

Los únicos reportes que se tienen sobre esta enzima son actividades específicas realizadas en cultivos de 48 horas en medios completos a 25 °C, en presencia de 0.025 % de etanol (Hernández, 2002).

2. Resulta interesante conocer cuáles son los mecanismos que gobiernan el cambio en los parámetros cinéticos de las H⁺-ATPasas cuando las levaduras de *U. maydis* se someten al estrés nutricional de los medios mínimos.
3. La actividad enzimática de esta H⁺-ATPasa es mucho más eficiente y por tanto más práctica de seguir con los métodos colorimétricos utilizados en el laboratorio.

4 Efecto del pH sobre la actividad de la H⁺- ATPasa de membrana plasmática proveniente de levaduras de *U. maydis* cultivadas en medio mínimo

En una primera inspección del efecto del pH sobre la actividad de la enzima, se estudió la actividad de ésta en diferentes amortiguadores, a una concentración de 5 mM de una mezcla equimolar del sustrato Mg-ATP y un exceso de 5 mM de Mg²⁺. Los datos muestran que la H⁺-ATPasa tiene una mayor actividad específica a pH de 6.5 (figura 13).

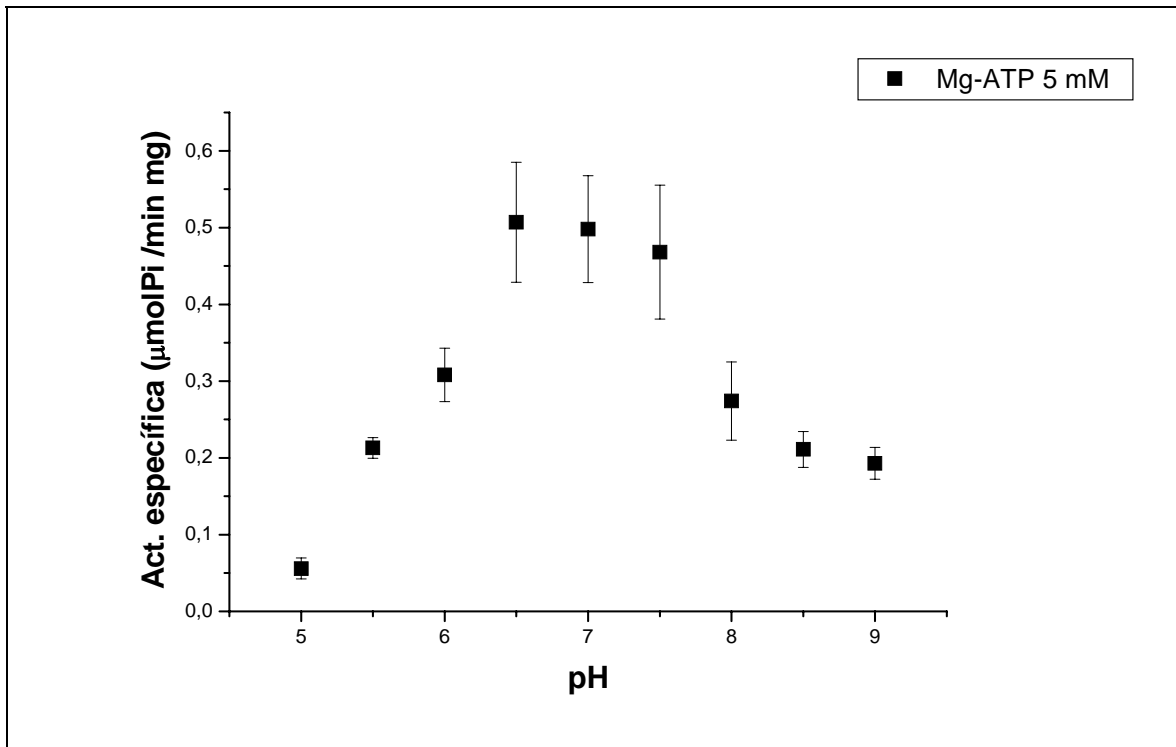


Figura 9. Efecto del pH sobre la actividad de la H^+ -ATPasa de las levaduras de *U. maydis* cultivadas en medios mínimos. La concentración de proteína utilizada en todos los ensayos cinéticos fue de 20 μ g de proteína por cada 250 mililitros del medio de reacción. Las condiciones del ensayo son 5 mM de Mg-ATP, 40 mM de Na^+ , 5 mM de Mg^{2+} a 30 ° C.

A partir del resultado anterior se ensayaron cinéticas de saturación por el sustrato Mg-ATP en el intervalo de pH 5.0 a 9.0. Las concentraciones de Mg-ATP utilizadas en cada ensayo fueron 0.2, 0.4, 0.8, 1 y 2 mM, que corresponden a los cocientes 0.57, 0.1.14, 1.6, 2.28 y 5.7 $[S]/K_m$ para la H^+ -ATPasa a un pH de 6.5.

Los parámetros de K_m y V_{max} de cada condición se resumen en la tabla 3 y en los regráficos de Dixon-Webb, V_{max} vs pH y V_{max}/K_m vs pH, de las figuras 14 y 15. Es conveniente mencionar que, dentro del error experimental, se obtuvieron cinéticas michaelianas en todos los valores de pH ensayados.

Tabla 4. Compendio de los parámetros cinéticos K_m , V_{max} y la constante de especificidad (el cociente V_{max}/K_m) de las cinéticas de saturación por el sustrato Mg-ATP realizado a diferentes intervalos de pH con preparaciones enriquecidas en actividad de la H^+ -ATPasa de membrana plasmática proveniente de cultivos de levaduras de *U. maydis* en medios mínimos.

	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol Pi /min mg}$)	V_{max}/K_m
pH 5.5	0.95 ± 0.56	0.73 ± 0.22	0.76
pH 6.0	1.36 ± 0.35	1.51 ± 0.21	1.11
pH 6.5	1.3 ± 0.36	1.47 ± 0.22	1.13
pH 7.0	1.56 ± 0.91	1.57 ± 0.26	0.99
pH 7.5	1.92 ± 0.69	1.43 ± 0.25	0.49
pH 8.0	2.1 ± 0.22	1.33 ± 0.07	0.63
pH 8.5	2.27 ± 0.24	0.54 ± 0.08	0.23

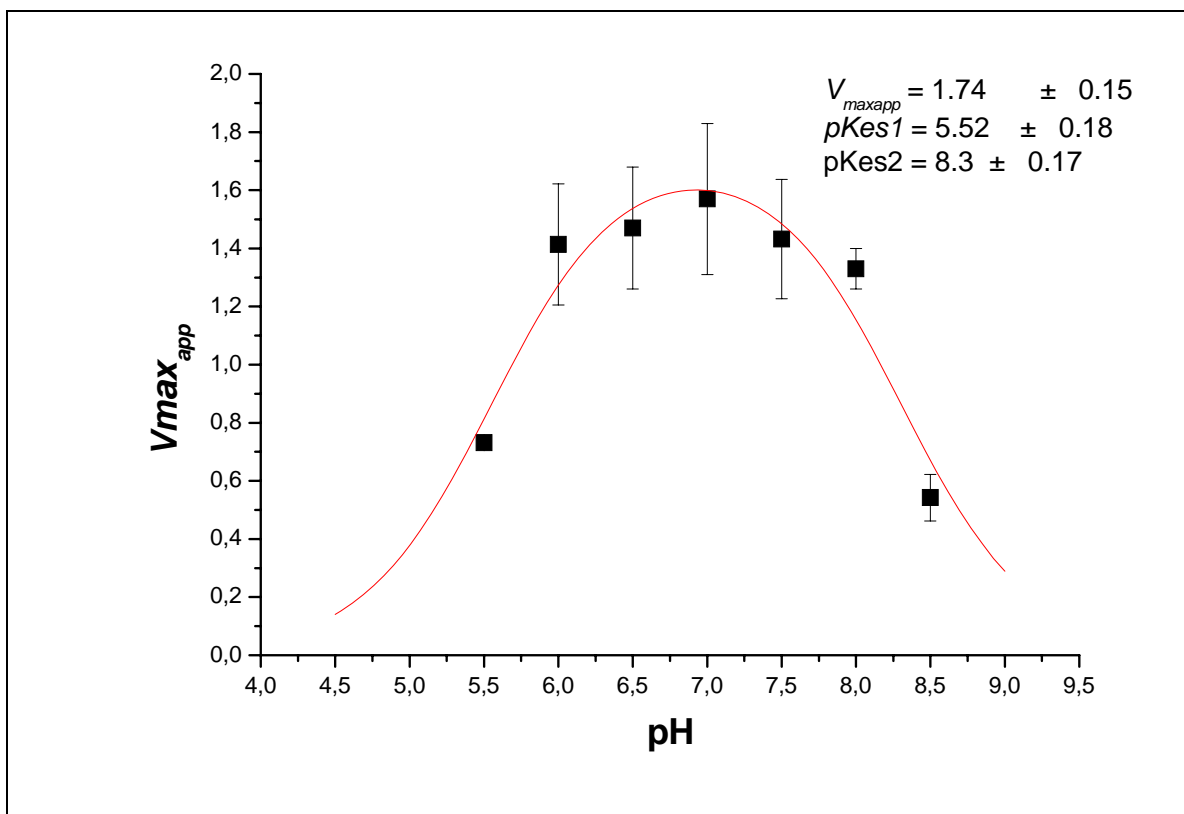


Figura 10. Regráfico de Dixon-Webb de la V_{maxapp} vs pH, que muestra los cambios de la velocidad máxima aparente (V_{maxapp}) al variar el pH del medio de reacción. Las condiciones del medio de reacción son: 5 mM de Mg-ATP, 40 mM de Na^+ , 5 mM de Mg^{2+} , glicerol 10 % a 30 ° C. La concentración de enzima utilizada en todos los ensayos cinéticos fue de 20 μg por cada 250 μl del medio de reacción.

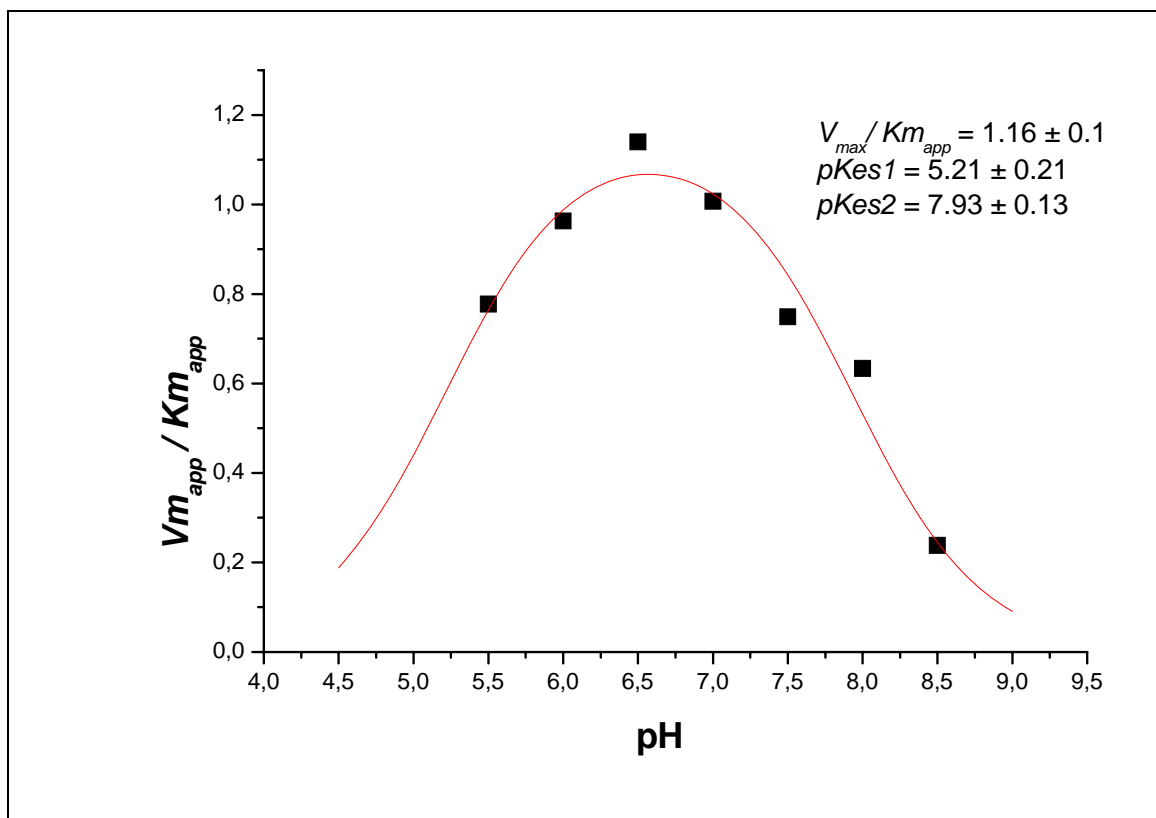


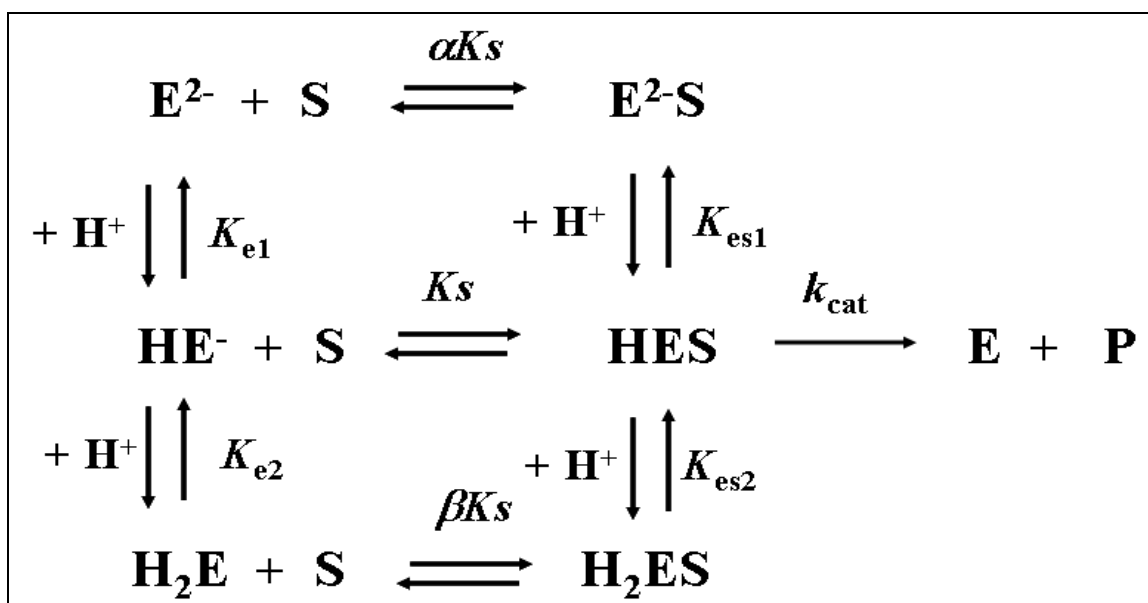
Figura 11. Regráfico de Dixon-Webb del cociente V_{max_app} / K_{m_app} vs el pH (que representa la constante de especificidad para algunos autores) que señala gráficamente el pH óptimo de la actividad de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática de levaduras de *U. maydis* obtenidas en las condiciones descritas. Las condiciones del ensayo fueron detalladas en los Materiales y métodos y resumidas en el pie de figura del gráfico anterior.

Con los resultados del efecto del pH sobre los parámetros cinéticos de la H^+ -ATPasa de *U. maydis* cultivadas en medios mínimos se pueden concluir los siguientes puntos:

- El “pH óptimo” para la H^+ -ATPasa es de 6.5, ya que a este pH se presenta la mayor actividad cuando se fija la concentración de Mg-ATP a 5 mM. También el cociente de V_{max}/K_m (la eficiencia catalítica para algunos autores) tiene un máximo a este pH.
- Se propone la participación de al menos dos grupos químicos importantes para la unión del Mg-ATP y para la catálisis de la enzima. El pK del primer grupo es de 5.5, que puede corresponder al pKa de un residuo de histidina (cuyo pKa en solución es de 6.04) o del grupo carboxilo de un residuo de

aspártico (pKa de 3.9) o de glutámico (pKa 4.07) que esté ubicado en un ambiente hidrofóbico. El segundo pKa es 8.2 y se propone que el pKa corresponde al grupo sulfhidrilo de la cadena lateral de un residuo de cisteína (pKa 8.33) o al grupo amino de un residuo de lisina (pKa 10.79) inmerso en un ambiente hidrofóbico. Se abundará más sobre este punto en la sección correspondiente a la discusión de los resultados.

Para explicar el efecto del pH sobre el funcionamiento de la enzima se planteó el siguiente modelo cinético, que incluye dos grupos protonables de la enzima con constantes de disociación K_{e1} y K_{e2} , cuya afinidad por los protones puede cambiar al unirse el sustrato a la enzima (K_{es1} y K_{es2}). En este modelo se propone que la única forma de la enzima con actividad catalítica es el complejo HES.



A partir de este modelo se obtuvo la ecuación de velocidad que se muestra enseguida:

$$\mathbf{V}_i = \frac{\mathbf{V}_m \mathbf{[S]}}{\frac{\mathbf{K}_s (1 + \frac{\mathbf{[H]} + \mathbf{K}_{e2}}{\mathbf{K}_{e1}})}{\mathbf{K}_{e1} \mathbf{[H]}} + \mathbf{S} \frac{(1 + \frac{\mathbf{[H]} + \mathbf{K}_{es2}}{\mathbf{K}_{es1}})}{\mathbf{K}_{es1} \mathbf{[H]}}}$$

4.1 Efecto del pH sobre la estabilidad de la enzima

Para verificar que los cambios en la actividad al variar el pH de la solución no se debían a fenómenos de inactivación de la enzima, se preincubó a ésta en soluciones amortiguadas a diferentes valores de pH, a 30°C, y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos para ensayar la actividad a 30°C en el medio estándar de Mg-ATP, a pH de 6.0. Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 12.

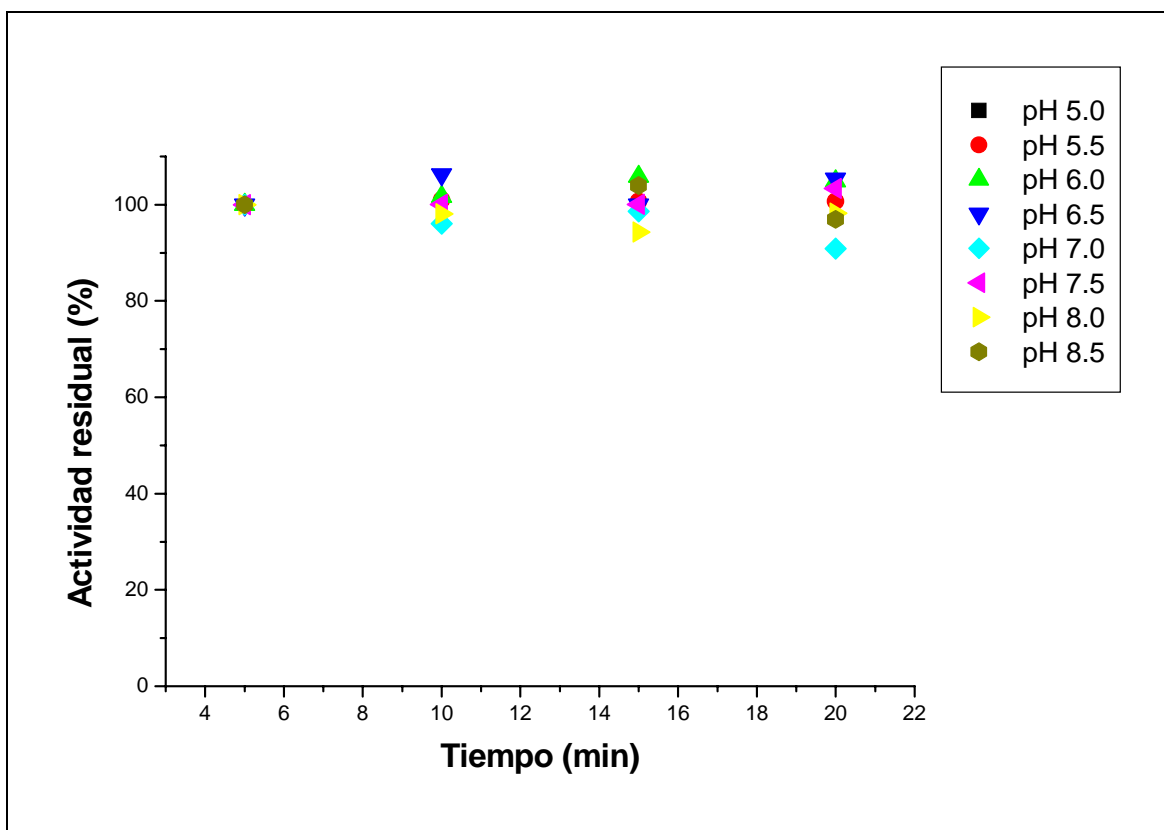


Figura 12. Efecto del pH sobre la estabilidad de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática de levaduras de *U. maydis* cultivadas en medios mínimos. Salvo los puntos de pH extremos de 5 y 8.75 la enzima fue estable en todo el intervalo de pH observado. Las condiciones del ensayo son Mg-ATP 5 mM, 40 mM de Na⁺, 5 mM de Mg²⁺, 30 ° C.

Como se puede ver, la enzima mantuvo su actividad con el tiempo a todos los valores de pH ensayados, por lo que se puede concluir que los cambios en la actividad con el pH se deben a la protonación y desprotonación de grupos de la enzima.

5 El efecto del Na^+ sobre la actividad de la H^+ -ATPasa

Para conocer el efecto del catión monovalente Na^+ sobre la actividad de la H^+ -ATPasa se realizaron ensayos previos en donde se encontró que a 30°C , pH 6.5 y 5 mM de Mg-ATP, este catión activa a la enzima en un intervalo de concentraciones entre 20 y 80 mM, mientras que a concentraciones más altas, el Na^+ inhibe parcialmente a la enzima (resultados no mostrados).

Un análisis detallado para caracterizar la activación de la H^+ -ATPasa se muestra en el gráfico de Lineweaver-Burk (figura 17):

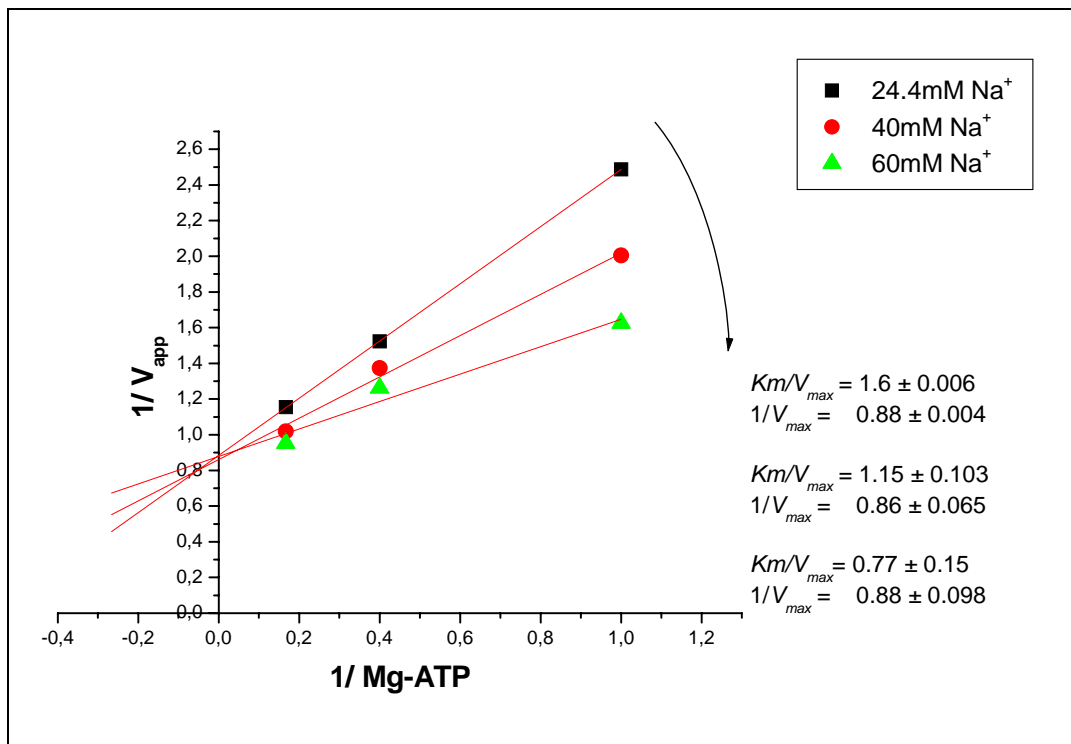
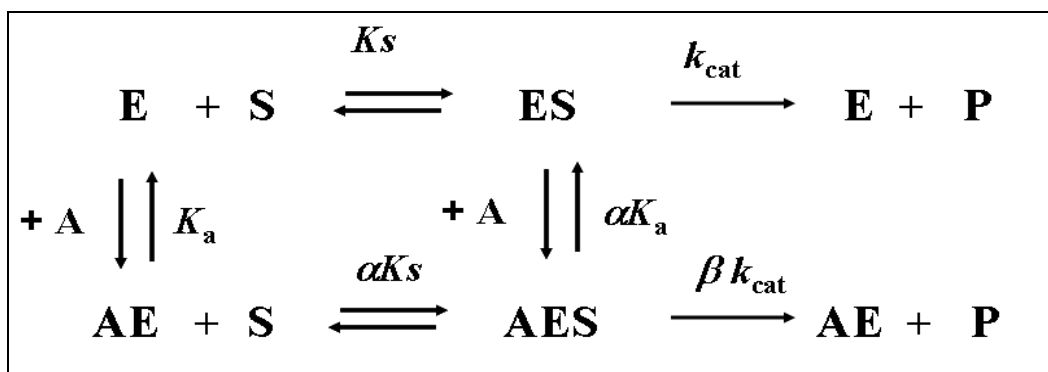


Figura 13. Gráfico de Lineweaver-Burk de las cinéticas de saturación de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática de levaduras de *U. maydis* cultivadas en medios mínimos por el sustrato Mg-ATP a diferentes concentraciones milimolar de Na^+ . Las condiciones del ensayo fueron descritas en los pies de texto de las dos figuras anteriores.

Se observa que el principal efecto del catión monovalente ocurre sobre la Km . Un aumento en la concentración del ión, por debajo de 80 mM, incrementa la afinidad de la enzima por el sustrato. El modelo que se plantea para explicar la

activación no esencial de este catión monovalente sobre el funcionamiento de la H⁺-ATPasa es el siguiente:



En este modelo E representa a la enzima libre, A el activador no esencial (el Na⁺) y S el sustrato Mg-ATP; ES, AE y AES representarían a los diferentes complejos que puede formar la enzima.

A partir de este esquema se deriva la siguiente ecuación:

$$\mathbf{V}_i = \frac{V_m \mathbf{S} (1 + \beta ([\mathbf{A}]/\alpha K_A))}{K_s(1 + [\mathbf{A}] / K_A) + \mathbf{S}(1 + [\mathbf{A}] / \alpha K_A)}$$

la cual se introdujo en el programa de cálculo Origin (versión 6.0) con el fin de realizar un ajuste global de los datos experimentales, obteniéndose los parámetros de $V_{max} = 1.18 \pm 0.36$, $\beta = 1$, $\alpha = 0.04 \pm 0.02$ y una $K_a = 169.8 \pm 34.78$.

6 El efecto del K⁺ sobre la actividad de la H⁺-ATPasa

También se evaluó el efecto del ión monovalente K⁺, añadido en la forma de KCl, sobre la actividad de la H⁺-ATPasa. Los resultados se muestran en la figura 18, con el gráfico de Eadie-Hofstee.

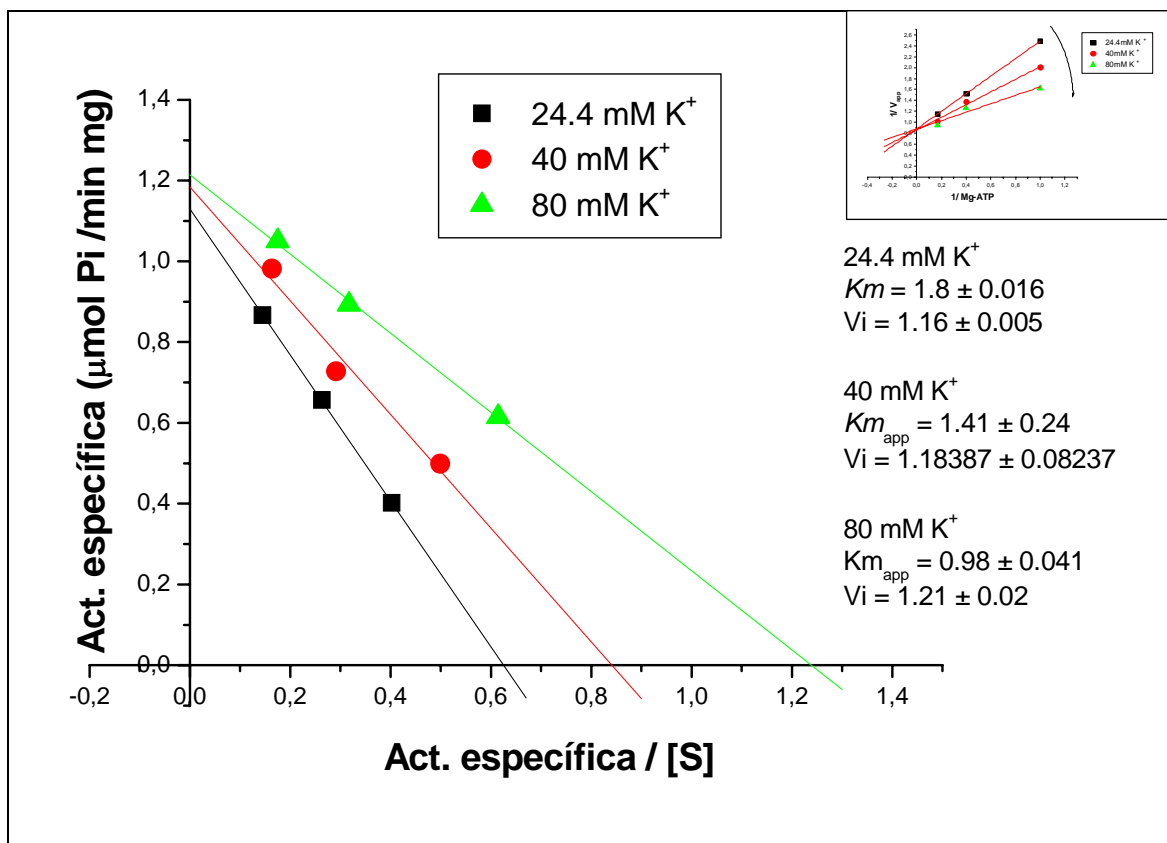


Figura 14. Gráfico de Eadie-Hofstee de las cinéticas de saturación de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática de levaduras de *U. maydis* cultivadas en medios mínimos por el sustrato Mg-ATP a diferentes concentraciones de K⁺ (mM). Las condiciones del ensayo fueron descritas en las figuras anteriores. En el recuadro se muestra el gráfico de dobles recíprocos correspondiente a este experimento.

Se observa que el K⁺ ejerce un efecto similar al del Na⁺ sobre la actividad de la H⁺-ATPasa: tiende a incrementar la afinidad de la enzima por su sustrato, mientras la V_{max} permanece casi inalterada. También el potasio ejerce un efecto inhibitorio parcial a concentraciones superiores a 80 mM.

Para explicar la activación no esencial de este catión sobre la afinidad de la enzima se utilizó el mismo modelo y la misma ecuación que se usó para explicar el efecto del Na⁺. A partir del ajuste global de los datos, utilizando el programa Origin (versión 6.0) y el modelo de activación no esencial sobre la actividad de la H⁺-ATPasa, se obtuvo una K_a de 135.37364 ± 17.56 mM y un parámetro α de 0.04029 ± 0.01403 ; al igual que con el sodio, la V_{max} se mantuvo constante ($\beta = 1$).

7 Efecto del Mg-ADP sobre la actividad de la H⁺-ATPasa

Con el fin de caracterizar el efecto del Mg-ADP sobre la actividad de la H⁺-ATPasa se realizaron experimentos en los cuales se mantuvieron fijas las concentraciones de Mg-ATP y de Mg²⁺ libre en 5 mM y se varió al Mg-ADP. Los resultados se muestran en los gráficos de Hanes-Wolff, que sirvió para visualizar el tipo de inhibición y de Dixon, para encontrar gráficamente el valor de la K_i (figuras 19 y 20).

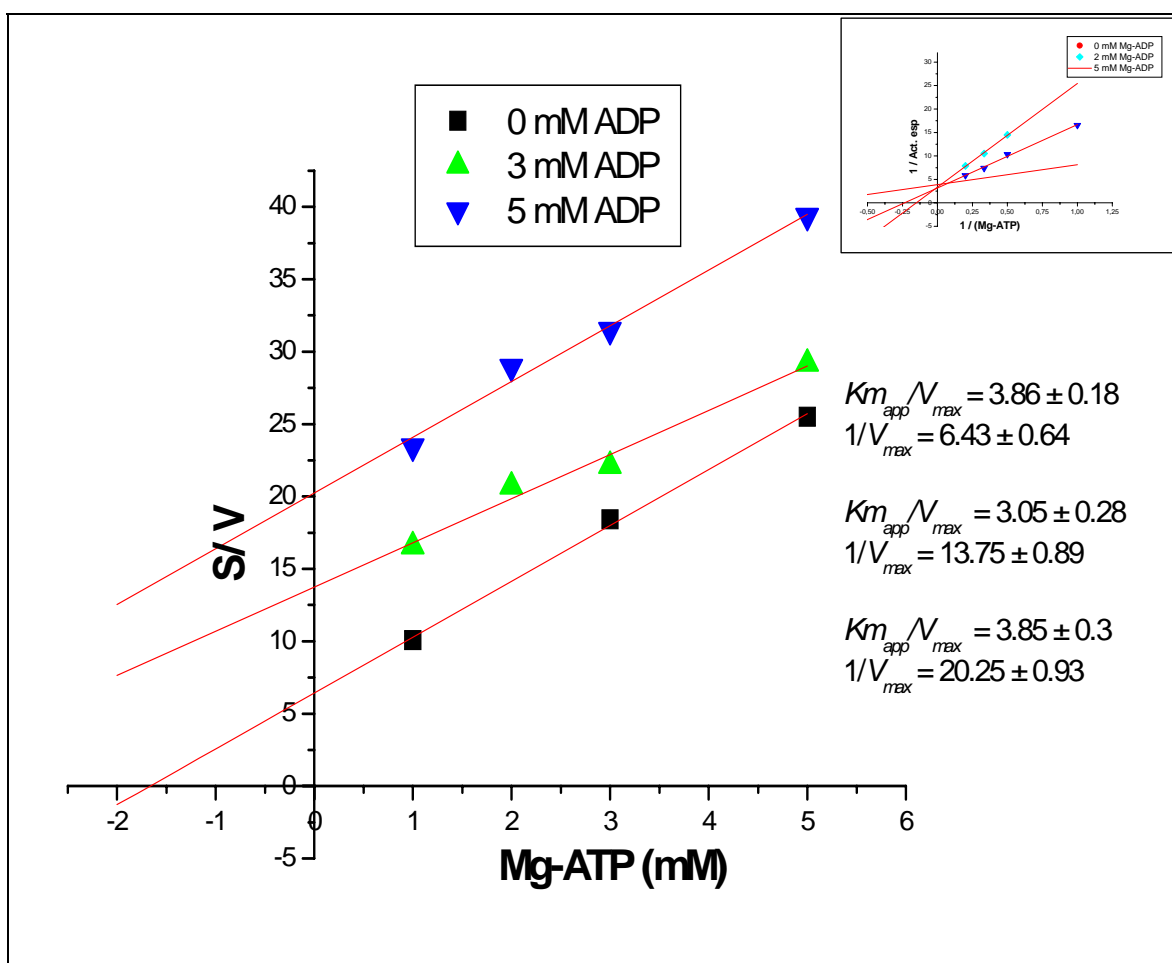


Figura 15. Gráfico de Hanes-Wolff para caracterizar el efecto del inhibidor competitivo Mg-ADP sobre la H⁺-ATPasa de levaduras de *U. maydis* cultivadas en medios mínimos. Las condiciones del ensayo fueron 40 mM de Na⁺, 5 mM de Mg²⁺, 30° C. En el recuadro se coloca el gráfico de Lineweaver-Burk correspondiente a este experimento.

En el gráfico de Hanes-Wolff se observan rectas paralelas, consistente con una inhibición competitiva clásica o lineal. Con el gráfico de Dixon se obtuvo una K_i de 1.25 mM.

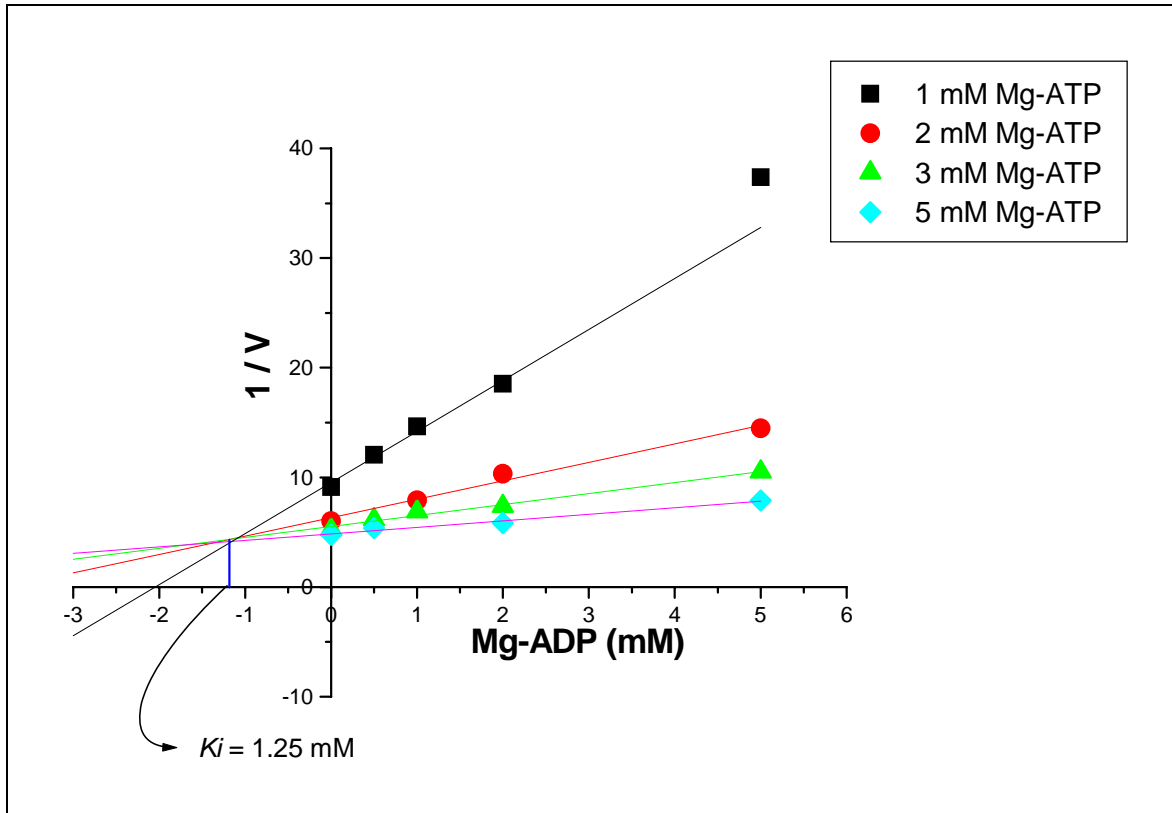


Figura 16. Gráfico de Dixon para determinar la K_i del Mg-ADP sobre la H^+ -ATPasa de levaduras de *U. maydis* cultivadas en medios mínimos.

8 Efecto del vanadato (VO_4) sobre la actividad de la H^+ -ATPasa

Con el fin de obtener el tipo de inhibición dado por el vanadato se realizaron cinéticas de saturación con el sustrato Mg-ATP a concentraciones fijas de vanadato menores a 10 μ M. En el gráfico de Scatchard (figura 17) se muestra el patrón esperado para una inhibición competitiva lineal. Al realizar el ajuste global de los resultados con el programa Origin (versión 6.0) se obtuvo una K_i para el vanadato de $0.94 \pm 0.44 \mu$ M.

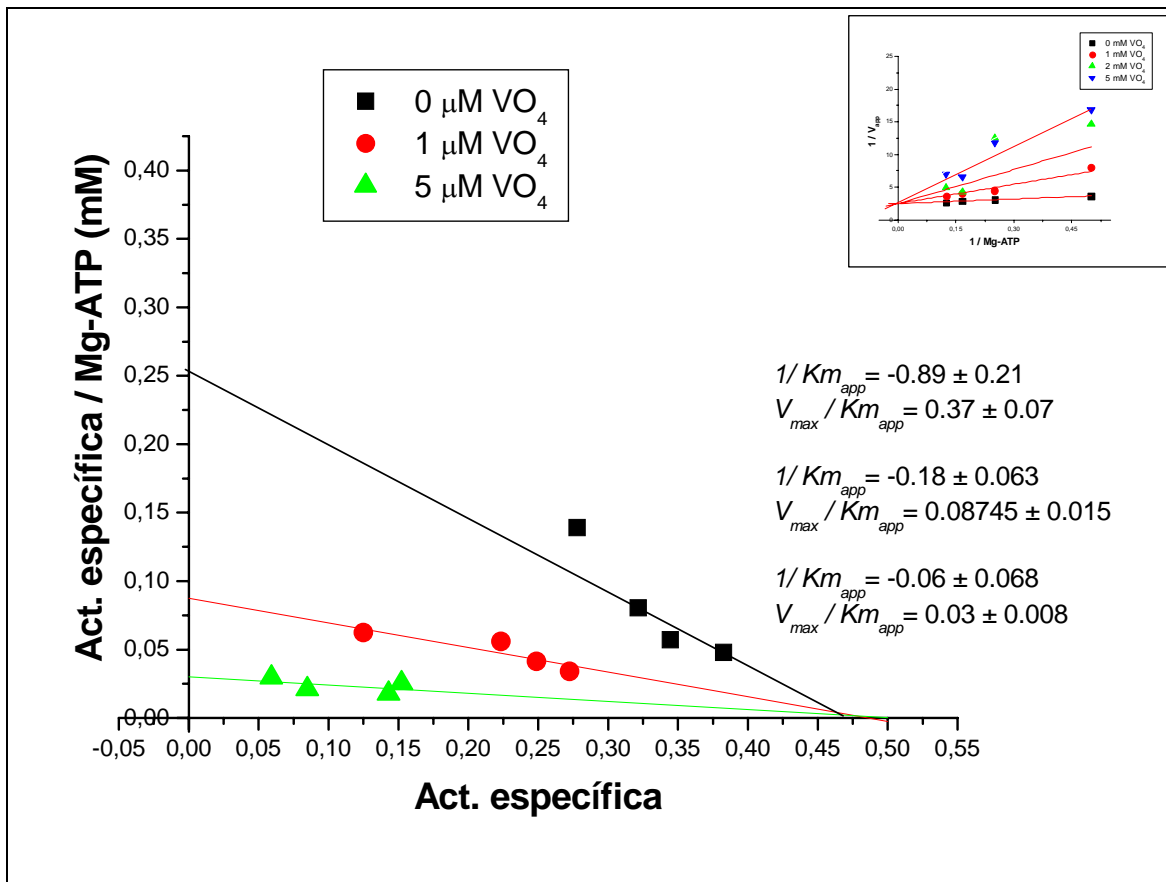
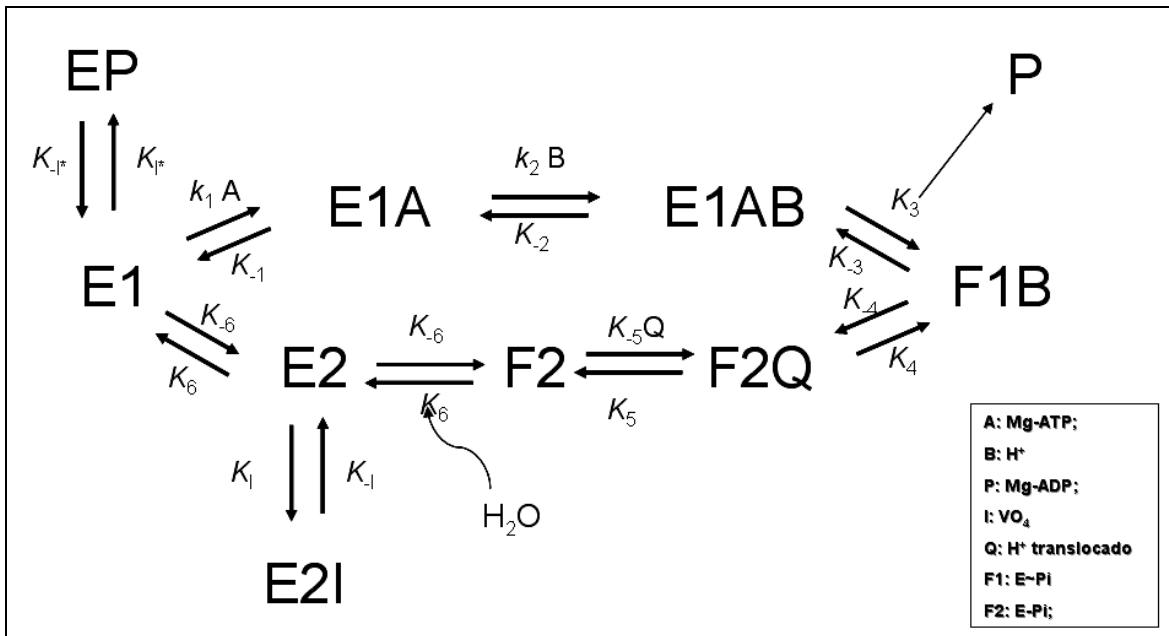


Figura 17. Gráfico de Scatchard para visualizar el efecto de dos concentraciones diferentes de Vanadato (VO_4) sobre los parámetros cinéticos de H^+ -ATPasas provenientes de membranas plasmáticas de levaduras de *U. maydis* cultivadas en medios mínimos. Las condiciones del ensayo permanecen en 40 mM de Na^+ , Mg^{2+} 5 mM, 30° C, pH 6.5. En el recuadro se muestra el gráfico de Lineweaver-Burk correspondiente a este experimento.

Que el vanadato se comporte como un inhibidor competitivo del sustrato Mg-ATP condujo al planteamiento del siguiente modelo en estado estacionario para la H^+ -ATPasa de *U. maydis*.



Este modelo puede describirse como un sistema BiBiUniUni Iso ping-pong en donde los sustratos entrantes son el Mg-ATP, el protón (en el lado citoplásmico) y el agua, mientras que los productos son el Mg-ADP, el fosfato inorgánico y el protón translocado. En este modelo se propone que los pasos que comunican a la forma de la enzima E2I con la E1A deben estar en equilibrio rápido para explicar de esta manera que el vanadato se comporte como un inhibidor competitivo para el sustrato Mg-ATP.

9. La Genómica comparativa de las H⁺-ATPasas de *U. maydis*

9.1 Resultados de los Alineamientos Básicos Locales Múltiples (BLAST)

Con el fin de encontrar las secuencias génicas que codifican para la H⁺-ATPasa de *U. maydis* se utilizó la base de datos del genoma de *U. maydis* de la cepa 521. El genoma de este hongo se secuenció con la técnica de “whole-genome shotgun” en los años 2003 y 2004 por diferentes grupos de investigación de las empresas biotecnológicas “Broad Institute”, “Bayer CropScience AG”, y “Exelixis Inc”, además de la participación de la Universidad de Georgia en los E. U. A. y la Universidad Británica de Columbia en Canadá. El genoma completo se

encuentra disponible en la página de “*Ustilago maydis* Genome Project” con la siguiente dirección en la Internet:

www.broad.mit.edu.annotation/funqi/ustilago_maydis/background.html

Los resultados de la “búsqueda de alineamientos básicos locales múltiples” (BLAST, por las siglas en inglés de “Basic Local Alignment Search”), utilizando la secuencia de aminoácidos de la H⁺-ATPasa de *S. cerevisiae* (que tiene la clave de acceso P05030) para encontrar posibles polipéptidos (BLASTP) y secuencias de nucleótidos del genoma (TBLASTN) de *U. maydis* con mayor parecido a la H⁺-ATPasa de *S. cerevisiae* arrojaron alineamientos múltiples con los mismos “hits” o resultados de “alto puntaje”.

Compendio de la información obtenida a través de las Búsquedas Locales de Alineamientos Múltiples (BLASTP y TBLASTN)					
Gen cromosoma	Clave del gen:	Información acerca de la secuencia:	Start:	End:	Score:
UM02581.1	1.86 (scaffold 5)	hypothetical protein	78933	81869	+ 825 e-0.0
UM01205.1	1.42 (scaffold 2)	conserved hypothetical protein	126512	129406	- 455 e-128
UM00204.1	1.2 (scaffold 1)	hypothetical protein	492365	495742	+ 194 6e-50
UM05038.1	1.186 (scaffold 15)	hypothetical protein	64587	67979	- 190 1e-48
UM04461.1	1.157 (scaffold 12)	hypothetical protein	224926	228078	+ 190 1e-48
UM06433.1	1.248 (scaffold 24)	hypothetical protein	88462	91701	+ 172 3e-43
UM02081.1	1.76 (scaffold 4)	hypothetical protein	21717	24746	- 143 2e-34
UM00227.1	1.66 (scaffold 3)	hypothetical protein	43631	46801	- 97 2e-20
UM03470.1	1.3 (scaffold 1)	hypothetical protein	99270	103187	- 79 5e-15
UM04065.1	1.116 (scaffold 8)	hypothetical protein	48704	52720	- 64 1e-10
UM00372.1	1.141 (scaffold 10)	hypothetical protein	100082	103816	- 49 4e-06
UM05268.1	1.6 (scaffold 1)	hypothetical protein	75306	79697	- 48 1e-05
UM01019.1	1.34 (scaffold 2)	hypothetical protein	132976	136269	- 43 3e-04

Figura 18. Compendio de la información obtenida a través de las búsquedas de alineamientos locales múltiples (BLASTP y TBLASTN) utilizando la secuencia de residuos de aminoácidos de la H⁺-ATPasa de *S. cerevisiae* contra el genoma de *U. maydis*. En la primera columna se señala la sección del genoma de *U. maydis* donde se localiza la secuencia que codifica para un polipeptido similar a la H⁺-ATPasa de *S. cerevisiae*. La segunda columna señala la clave de identificación del gen. La tercera columna muestra la información disponible en la base de datos acerca de cada secuencia particular del genoma de *U. maydis*. La

cuarta y quinta columnas marcan los sitios de inicio y término de la secuencia de nucleótidos que codifica para las secuencias de residuos de aminoácidos similares a la H⁺-ATPasa. La sexta columna muestra los valores de “e” que es un número exponencial complejo que refleja la probabilidad de encontrar una secuencia en el genoma de *U. maydis* idéntica a la H⁺-ATPasa generada por eventos de “azar” y no por eventos evolutivos.

9.2 Análisis filogenético de las tres primeras secuencias del genoma de *U. maydis* que se obtuvieron con BLASTP y TBLASTN.

Para continuar con el análisis del genoma de *U. maydis* se obtuvo cada una de las secuencias que resultaron de los alineamientos locales múltiples del BLASTP y TBLASTN. BLASTP permite ubicar proteínas previamente identificadas por otros autores a través de métodos automáticos o de manera manual, mientras TBLASTN posibilita hacer un análisis sobre el genoma (la secuencia de DNA) de *U. maydis*. Como ambas técnicas arrojaron resultados idénticos, podemos afirmar que “muy probablemente” no existen genes adicionales, que codifiquen para H⁺-ATPasas, en el genoma de *U. maydis* a los reportados aquí. Cada una de las secuencias que se muestra en la figura 19 se analizó de manera individual y se encontró que únicamente las dos primeras (Q4PFA8 y QPBD2) corresponden a polipéptidos que codifican para H⁺-ATPasas de localización en membranas plasmáticas (ver apéndice figura). Las secuencias restantes, que muestran un menor puntaje en similitud con la H⁺-ATPasa de *S. cerevisiae*, corresponden a otro tipo de ATPasas (la mayoría son ATPasas tipo P), que translocan tanto protones como cationes mono y divalentes (datos no mostrados).

Como se puede ver en la figura 20, las dos primeras secuencias génicas del genoma de *U. maydis* corresponden a H⁺-ATPasas fúngicas, que quedan agrupadas dentro de clados de grupos fúngicos que consisten con la clasificación de Herrera y Ulla, Alexopoulos y Mims y del NCBI mostrados en la introducción de este trabajo. Es importante notar que ambas secuencias de H⁺-ATPasas se agrupan en clados distintos, uno de los cuales queda flanqueado por las H⁺-ATPasas de hongos (ver gen Q4PBD2 en la figura 20), mientras la segunda secuencia (gen Q4PFA8) queda fuera del grupo de los hongos, en una rama más cercana a las rodofitas y las plantas vasculares. Para el caso del tercer hit, que tiene la clave de acceso EAK 81589, correspondiente al gen UM00204, la proteína

se agrupa dentro de un clado correspondiente a ATPasas de calcio (datos no mostrados).

Las claves de acceso para las tres primeras secuencias de los alineamientos locales múltiples son: Q4PBD2 para la secuencia 1.86 (gen UM02581.1), Q4PFA8 para la secuencia 1.42 (UM01205.1) y EAK81589 para la 1.2 (UM00204.1). No está de más mencionar que estos mismos resultados surgen si se toma como patrón de comparación a la secuencia de la H⁺-ATPasa de *K. lactis*. Las tres primeras secuencias se sometieron a un análisis detallado con los programas AlignX y Clustal W, los cuales permiten identificar familias de proteínas y detectar similitudes, además de calcular porcentajes de similitud e identidad entre diversas secuencias de aminoácidos o cadenas de polinucleótidos (genes y marcos de lectura abiertos –ORF’s y URF’s). Para realizar el correcto análisis filogenético de las secuencias de *U. maydis* se realizaron alineamientos múltiples con 156 secuencias de H⁺-ATPasas provenientes de diferentes organismos, que incluyen arqueobacterias, eubacterias, plantas y hongos (ver figura 20).

señalada con la clave QPFA8 (gen UM1205.1) presenta mayor similitud con las H⁺-ATPasas de tipo vegetal, con las que forma un grupo polifilético, mientras que las H⁺-ATPasas tipo fúngicas, incluida la H⁺-ATPasa QPBD2 (UM02581.1) de *U. maydis*, forman un grupo monofilético bien definido.

10. Análisis de las dos secuencias de H⁺-ATPasas presentes en el genoma de *U. maydis*

Para visualizar la semejanza entre las dos secuencias de H⁺-ATPasas presentes en el genoma de *U. maydis* se muestra la siguiente matriz de puntos (figura 26):

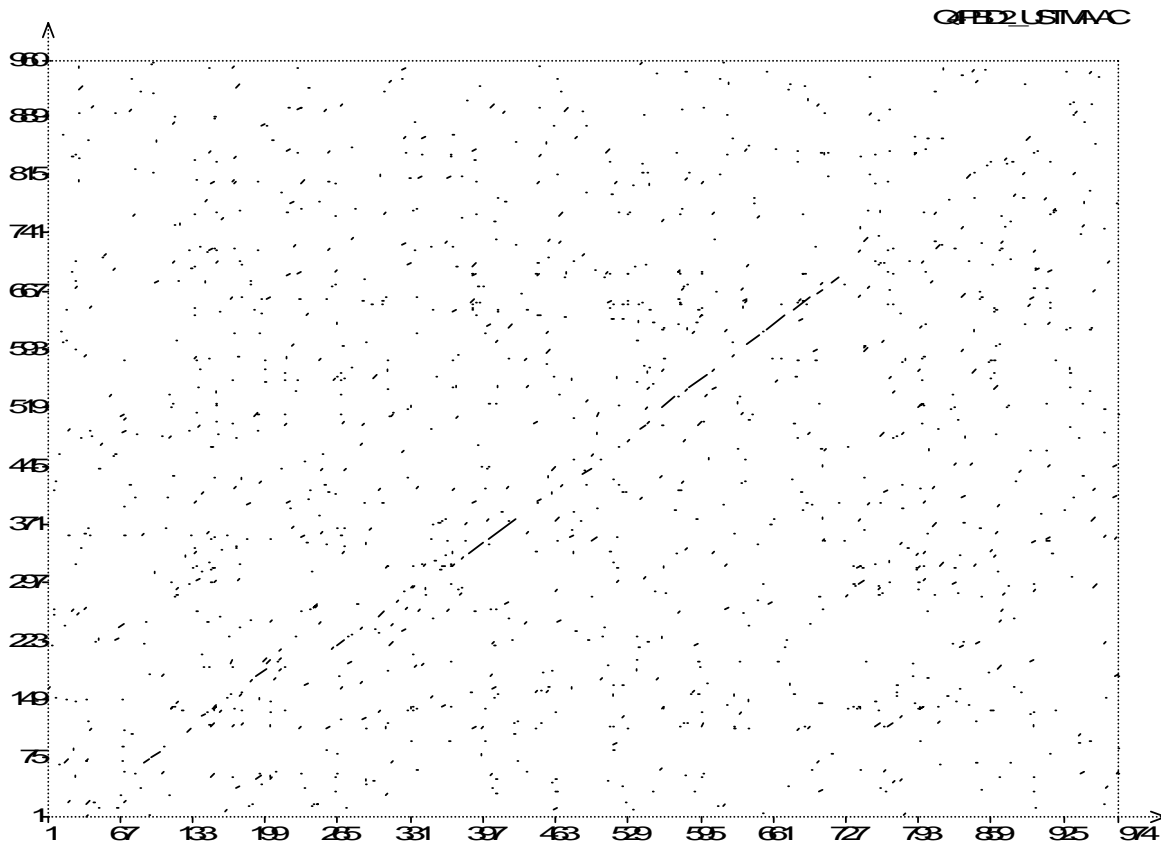


Figura 20. Análisis de matriz de puntos (Dot Matrix Analysis) para la comparación entre las secuencias Q4PBD2_USTMA vs Q4PFA8_USTMA que codifican para las H⁺-ATPasas de *U. maydis*. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias arrojada por el programa fue de 32.2 %, mientras la similitud entre ambas secuencias está tasada en 48.1%. Esta matriz de puntos fue realizada con los algoritmos disponibles en el paquete de softwares biotecnológicos de la “Vector NTI SUITE 6.0”.

Se observa un porcentaje de identidad relativamente bajo (32 %) y una similitud del 48 % entre las dos secuencias. Este tipo de análisis también puede presentarse a través de gráficos descriptivos con alineamientos “cuantitativos”,

cuando se consideran valores numéricos para indicar los grados de similitud e identidad entre diversas secuencias, o “cualitativos”, cuando se consideran las características químicas de los residuos de aminoácidos.

En el primer panel de la figura 22 se muestra el alineamiento cuantitativo de las dos secuencias de H⁺-ATPasa de *U. maydis*. En este tipo de gráfico se asignan valores de 0 a 1 a cada residuo de aminoácido presente en ambas secuencias, dependiendo de si éstos son idénticos, similares o débilmente parecidos en las secuencias alineadas. En el segundo panel de la misma figura se observa un gráfico de “complejidad absoluta”, que considera un puntaje mayor a cero cuando los residuos de aminoácidos pareados presentan una gran similitud y valores negativos cuando no presentan similitud.

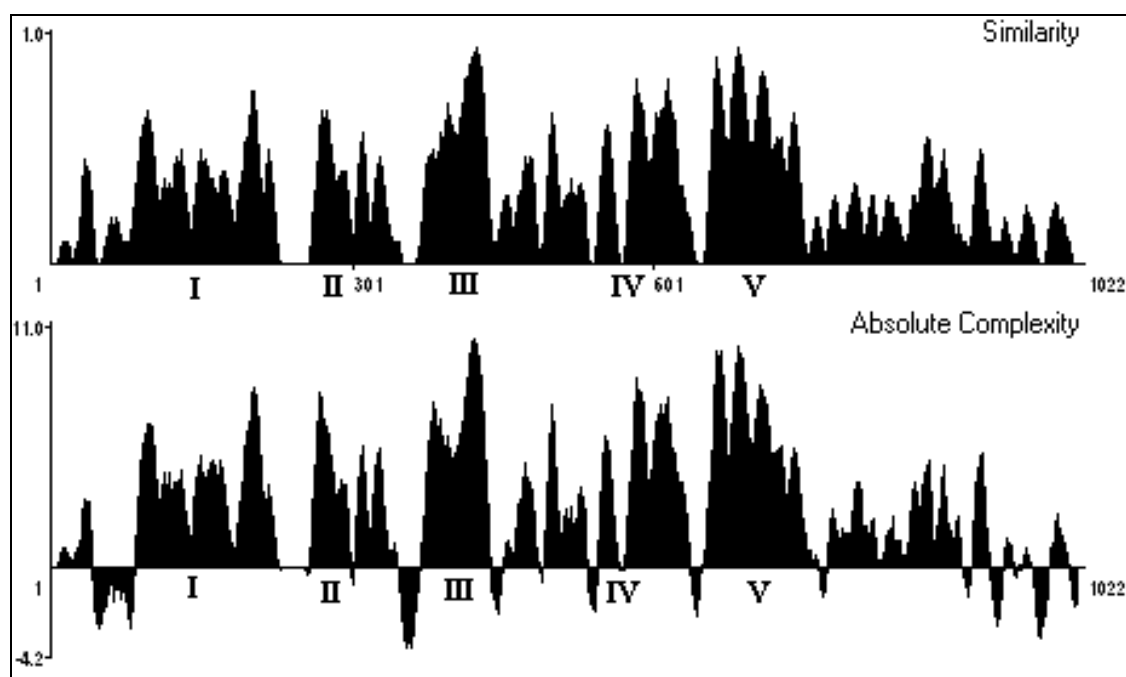


Figura 21. Gráficos de similitud y complejidad absoluta que resultan de la comparación de las dos H⁺-ATPasas codificadas por los ORF's del genoma de *U. maydis*.

En ambos gráficos es evidente que existen 4 regiones bien conservadas entre las dos secuencias de H⁺-ATPasas de *U. maydis*. Estas regiones, señaladas con números romanos, corresponden a la primera sección del dominio M (I y II), al dominio de fosforilación (III) y al dominio de unión del nucleótido (IV).

También se compararon las dos secuencias de las H⁺-ATPasas presentes en el genoma de *U. maydis* contra las H⁺-ATPasas de *S. cerevisiae* y *K. lactis*, así como contra la H⁺-ATPasa de la zanahoria *Daucus carota* (algunos de estos análisis no se muestran, pero se comentan brevemente). Los resultados para la ATPasa de *S. cerevisiae*, que se visualizan en las figuras 23 y 24 y se resumen en la tabla 6, muestran que la secuencia Q4PBD2 de la H⁺-ATPasa de *U. maydis* tiene un mayor grado de similitud y de identidad con la H⁺-ATPasa de *S. cerevisiae* que con la otra secuencia de *U. maydis* (Q4PFA8).

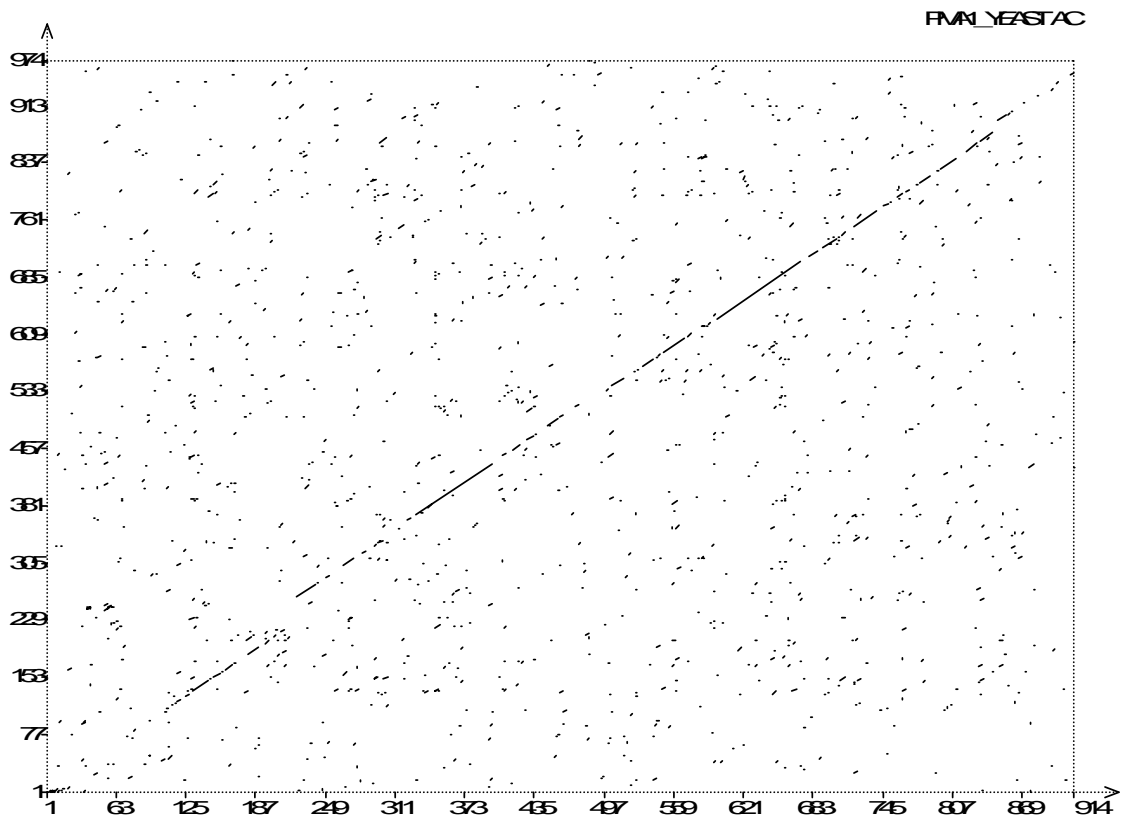


Figura 22. Matriz de puntos para la comparación de las secuencias de la H⁺-ATPasa de *S. cerevisiae* (codificada por el gen PMA1) versus la H⁺-ATPasa Q4PBD2 de *U. maydis*, que corresponde al primer "hit" de ambos BLAST. El porcentaje de identidad entre ambas secuencias es de 48.78 % y la similitud es de 63.43 %. La matriz de puntos muestra en el eje de las ordenadas la secuencia "PMA1_YEASTAC" de *S. cerevisiae* versus la secuencia "Q4PBD2_USTMA" de *U. maydis* colocada sobre el eje de las abscisas.

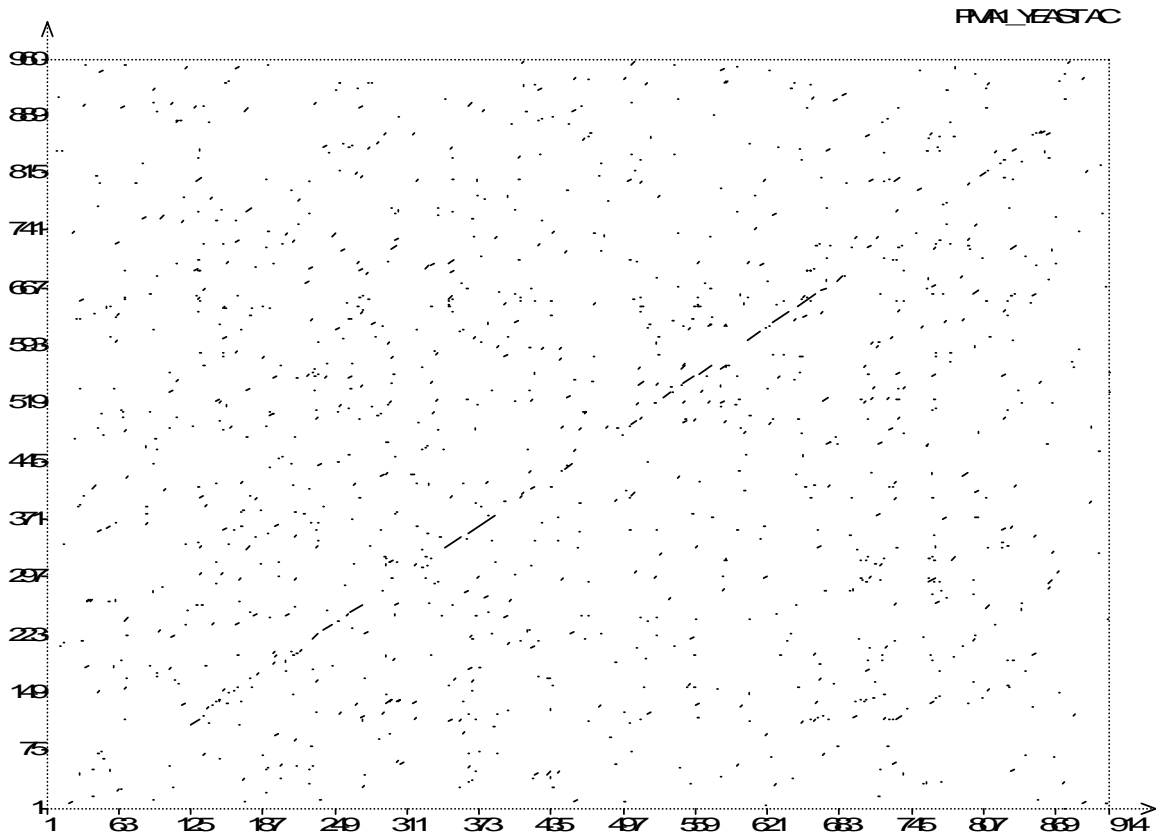


Figura 23. Matriz de puntos para la comparación de las secuencias de la H⁺-ATPasas (codificada por el gen PMA1) de *S. cerevisiae* versus la H⁺-ATPasa Q4PFA8. El porcentaje de identidad entre ambas secuencias es de 32.12 %, mientras la similitud es tasada en 50 %. La matriz de puntos muestra en el eje de las ordenadas la secuencia “PMA1_YEASTAC” de *S. cerevisiae* versus la secuencia “Q4PFA8_ USTMA” de *U. maydis* colocada sobre el eje de las abscisas.

Tabla 5. Compendio de los porcentajes de identidad y similitud entre las dos secuencias de H⁺-ATPasas de *U. maydis* y las H⁺-ATPasas de *S. cerevisiae*, *K. lactis*, una H⁺-ATPasa tipo vegetal y la ATPasa de Calcio de Conejo. Ambos valores, de identidad y similitud, se obtuvieron a través de los algoritmos de matrices de similitud BLOSUM62. Cuando se utilizan algoritmos de otras matrices de similitud como PAM250, PAM120, PAM40, DAYHOFF, GONNET, MATCH se obtienen parámetros de identidad y valores de similitud semejantes.

Identidad/ Similitud	Q4PFA8	Q4PBD2	PMA1_YEAST	PMA1_KLULA	Q75N96_DAUCA
Q4PFA8	-	-	-	-	-
Q4PBD2	0.3220175 0.4810863	-	-	-	-
PMA1_YEAST	0.3212121 0.5000000	0.4878788 0.6343434	-	-	-
PMA1_KLULA	0.3226804 0.5010309	0.4889113 0.6330645	0.8572985 0.9150327	-	-
Q75N96_DAUCA (ATPasa vegetal)	0.4808853 0.6458753	0.2996219 0.4480151	0.2917485 0.4528487	0.3020000 0.4640000	-
CaATPase (ATPasa tipo P1)	0.2020295 0.3459410	0.1952337 0.3593034	0.2099237 0.3769084	0.2167153 0.3838678	0.1753794 0.3161889

VI. DISCUSIÓN

1. Caracterización de las curvas de crecimiento de las levaduras de *U. maydis* en diferentes medios de cultivo cerrado (cultivo en Batch)

A partir de las cinéticas de crecimiento de las levaduras de *U. maydis* en medios de cultivo de YPD y mínimos cerrados (también llamados cultivos monofásicos o no renovados), surgen varios hechos interesantes cuando se comparan con otros hongos. Las cinéticas de crecimiento de las levaduras de *U. maydis* en los medios de YPD y mínimo no se ajustan a una curva exponencial simple, como es el caso de las cinéticas de crecimiento de las levaduras *K. lactis* y *S. cerevisiae* (Tyson, *et al*, 1979; Goffeau, 1981; Vanoni, *et al*, 1983; Serrano 1988), sino presentan al menos dos tasas de incremento celular separadas por una pseudo-fase estacionaria. Se descarta que esta fase pseudo estacionaria sea debida a un cambio diauxico en el metabolismo de las levaduras de *U. maydis* pues la concentración de glucosa en el medio entre las 20 y las 35 horas de cultivo es superior a 40 mM, lo que representa un exceso en la fuente de carbono que no concuerda con la aparición del cambio del catabolismo de la hexosa hacia el consumo de etanol (Fernandes y Correia, *et al*, 2003).

La primera fase de crecimiento de las levaduras de *U. maydis* es lenta en comparación con la tasa de incremento de las levaduras de *K. lactis* y *S. cerevisiae*. El tiempo de generación celular de las levaduras de ambos ascomycotas cultivadas en medio de YPD es de 108 ± 8.5 minutos (ver tabla I del apendice), mientras las levaduras de *U. maydis* requieren entre 149.5 y 167.3 hrs. En cultivos en medio de YPD las levaduras de *K. lactis* presentan una constante de velocidad de crecimiento k de $0.366 \pm 0.012 \text{ h}^{-1}$ (resultados no mostrados), mientras en las levaduras de *U. maydis* es de 0.262 h^{-1} durante la primera fase de crecimiento exponencial. En este sentido, se sabe que algunos hongos fitopatógenos secretan metabolitos que inhiben el crecimiento de otros hongos y en la misma forma regulan su densidad celular actuando como “sensores

poblacionales” (Martinez-Espinoza, *et al* 2002; Del Sorbo, *et al*, 2000; Nafsika *et al*, 1996) que permiten regular la densidad de las células fúngicas. En el caso de las levaduras de *U. maydis* es necesario determinar con precisión cada uno de los compuestos orgánicos que son secretados durante el cultivo en los medios cerrados de YPD. Para la segunda fase de crecimiento en el medio de YPD las levaduras de *U. maydis* presentan cambios en los parámetros cinéticos que describen su crecimiento. Incrementa el tiempo de duplicación en los medios de YPD a 49.91 hrs, mientras en el medio de mínimo requiere de 27 hrs para duplicar la densidad celular del medio. Este cambio en los parámetros cinéticos en ambas fases de cultivo condujo a analizar detalladamente el consumo de glucosa así como el cambio en el pH del medio.

A partir del seguimiento del consumo de la glucosa en los diferentes medios de cultivo se pueden señalar al menos cuatro puntos importantes: a) las velocidades de crecimiento de las levaduras de *U. maydis* en los cultivos en medios de YPD y mínimos no muestran una relación directa con el consumo de la glucosa del medio; b) en estos medios de cultivo la velocidad de consumo de la glucosa es constante, con un valor de 0.53 ± 0.04 gramos de glucosa por hora en las primeras 80 horas de cultivo; c) la fase estacionaria para las levaduras de *U. maydis* se alcanza cuando la concentración de glucosa en los medios de cultivo es menor a 0.1 mM; d) el único medio de cultivo en el que las levaduras de *U. maydis* presentaron un crecimiento exponencial típico fue el medio mineral, en donde el crecimiento estuvo relacionado con la concentración de la glucosa en el medio.

Respecto a las fuentes de nitrógeno del medio mínimo como factor limitante del crecimiento de las levaduras de *U. maydis*, queremos resaltar que se ensayaron cinéticas de crecimiento en medios mínimos con diferentes cantidades de nitrato de amonio, urea y/o de sales nitrogenadas (resultados no mostrados) pero las cantidades de biomasa y los parámetros μ y k fueron semejantes, por lo que se concluyó que la fuente de nitrógeno era el factor limitante. Se probó añadir fuentes de nitrógeno más elaboradas a los medios mínimos, como aminoácidos, con lo que se incrementó la cantidad de biomasa obtenida, pero también se incrementaba la de fuente de carbono.

Tomando en conjunto los resultados anteriores podemos proponer la siguiente conclusión parcial:

- Las levaduras de *U. maydis* presentan una gran capacidad biosintética. Son capaces de crecer en medios con fuentes de nitrógeno y carbono muy limitadas, lo que contrasta con la incapacidad de las levaduras de *K. lactis* para consumir glucosa en medios mínimos e incrementar su biomasa de manera notable (ver recuadro superior derecho de la figura 1 de los resultados).

Por esta razón consideramos que:

Las denominaciones de medios mínimo y rico deben ser modificadas según los requerimientos nutricionales de las levaduras de *U. maydis*. Los resultados indican que los medios mínimos tradicionales para las levaduras de *K. lactis* y *S. cerevisiae* ofrecen todos los requerimientos necesarios para conseguir grandes cantidades de biomasa con las levaduras de *U. maydis*. Es necesario resaltar que aún cuando los parámetros cinéticos obtenidos durante la primera fase de cultivo en el medio mínimo son menores a los que se generan en el medio de YPD, al cabo de 60 horas de cultivo, luego del cambio en los parámetros cinéticos μ y k , ambos medios pueden proporcionar cantidades de biomasa semejantes para las levaduras de *U. maydis*.

1.1 Las levaduras de *U. maydis* alcalinizan el medio de YPD

A diferencia de lo que ocurre con las levaduras de los hongos ascomycotas *S. cerevisiae* y *K. lactis*, que acidifican los medios de YPD desde las primeras horas de su cultivo (Gancedo y Eraso, 1987; Serrano, 1988; Amigo, L, 1993), las levaduras de *U. maydis* no disminuyen el pH del medio, sino que lo alcalinizan, independientemente del valor de pH inicial del medio. Este resultado sugiere la necesidad de replantear el papel de la H⁺-ATPasa de *U. maydis* durante su crecimiento en la forma levadura. Es decir, si la actividad de la H⁺-ATPasa es importante para la generación del gradiente de potencial electroquímico de protones en la membrana plasmática, entonces habrá que determinar la diferencia

de potencial eléctrico a ambos lados de la membrana plasmática que se necesita para activar los mecanismos de transporte de nutrientes durante las diferentes fases del crecimiento de las levaduras de *U. maydis*. Resultados de nuestro grupo de trabajo señalan que en la forma de micelio, la diferencia en el pH (ΔpH) en ambos lados de la membrana plasmática no es mayor a 0.5 unidades.

Sin embargo, esta diferencia en el gradiente electroquímico debe ser suficiente para el funcionamiento de los mecanismos de transporte de los nutrientes a través de la membrana plasmática, pues los micelios de *U. maydis* consumen la glucosa del medio e incrementan su biomasa.

En su defecto, si la H^+ -ATPasa no desempeña un papel preponderante en la generación del gradiente electroquímico de protones en este tipo de medio de cultivo, y por ende, no se requiere para transportar los nutrientes del medio externo al citosol, habría que estudiar los mecanismos de transporte de nutrientes que no dependen del gradiente electroquímico de protones.

Para el caso del medio mínimo, los cambios que se registraron en el pH durante el crecimiento de las células son semejantes a lo que ocurre con las levaduras de *K. lactis* y *S. cerevisiae* cultivadas en medios de YPD. Es decir, en los medios mínimos el pH del medio externo tiende a disminuir conforme las levaduras crecen. Es importante mencionar que la acidificación del medio ocurre independientemente del pH inicial del medio de cultivo, lo que pareciera señalar que las levaduras de *U. maydis* tienden a ajustar el pH del entorno dependiendo de la composición del medio de cultivo, probablemente para incrementar su tasa crecimiento. Además, la acidificación de los medios mínimos puede relacionarse con la alta actividad específica, la eficiencia catalítica y la V_{max} asociadas con las H^+ -ATPasas provenientes de cultivos en medio mínimo, que son mayores que las de las H^+ -ATPasas provenientes de cultivos de YPD.

A partir del seguimiento de los cambios en el pH del medio de cultivo durante el crecimiento de las levaduras de *U. maydis* se pueden mencionar tres conclusiones parciales:

1. Las levaduras de *U. maydis* presentan una amplia tolerancia al pH del medio, independientemente si el cultivo se lleva a cabo en medio mínimo o de YPD.

2. Según el pH y la composición del medio de cultivo se favorece la velocidad de crecimiento y disminuyen los tiempos de duplicación de manera característica. Para el medio mínimo los tiempos de generación y las velocidades de crecimiento de las levaduras *U. maydis* son mejores a pHs ácidos (3-6), mientras que en el medio de YPD entre pH 6 y pH 8.

3. Dependiendo de la composición del medio de cultivo, las levaduras ajustan el pH, independientemente del pH inicial de cada medio. En el medio mínimo las levaduras de *U. maydis* tienden a acidificar el pH del medio llegando a tener valores cercanos a pH 3; mientras en los medios de YPD el pH del medio tiende a 8.

Estos resultados contrastan en forma notable con los resultados que se obtienen con a partir del cultivo de las levaduras de *S. cerevisiae* (Vanoni, et al, 1979, Eraso y Gancedo, 1987) y *K. lactis* (datos experimentales no mostrados) que típicamente acidifican el medio en torno a $\text{pH } 3.5 \pm 0.75$, mientras su pH interno permanece dentro del intervalo de 6 y 7.5. Se propone que esta diferencia de potencial electroquímico de al menos 3 unidades de pH, son suficientes para la activación de los sistemas de transporte secundario de las levaduras de *S. cerevisiae* (Amigo, L., et al, 1993).

2. La obtención de la membrana plasmática de las levaduras de *U. maydis*

Con el fin de obtener una buena preparación de membrana plasmática de las levaduras de *U. maydis* se decidió probar los métodos de extracción que se utilizan con las levaduras de *S. cerevisiae* y *K. lactis*. Se encontró que al romper las células con las perlas de vidrio se obtenía una preparación de membrana plasmática con una contaminación mitocondrial superior al 30 %. En primera instancia se decidió “limpiar” estas membranas plasmáticas por medio de un gradiente zonal de doble fase de sacarosa. Las concentraciones de sacarosa para formar el gradiente se describieron en la sección correspondiente de los

Materiales y Métodos. Sin embargo, las fracciones resultantes del gradiente de sacarosa no se enriquecieron con la actividad de la H⁺-ATPasa y mantuvo una alta contaminación mitocondrial. Aún cuando se presentaron zonas del gradiente con un incremento en la actividad específica de la enzima, éstas presentaban al menos un 15-23 % de contaminación mitocondrial. Otro problema asociado a la utilización del gradiente de doble fase de sacarosa fue que se recuperaba apenas el 3-8 % de la proteína inicial y se perdía casi la totalidad de la actividad de la H⁺-ATPasa. Apenas se obtenía un 0.3 % de las Unidades ($\mu\text{mol Pi/ min}$) iniciales de ATPasa.

El principal problema de la técnica de ruptura mecánica con las perlas de vidrio no era la contaminación mitocondrial, que se podía controlar con el uso de inhibidores específicos para las ATPasas tipo F, tipo V y fosfatasa ácida, sino el alto grado de proteólisis de la ATPasa que se detectaba por medio del Western Blott. Es decir, en lugar de encontrarse las marcas de fluorescencia en la posición esperada, de 100 a 120 kDa, las bandas en la inmuno replica se encontraron cerca de los 29 kDa. De esta manera, durante la primera fase del proyecto los esfuerzos para encontrar una técnica que permitiera obtener una fracción membranal con actividad de la H⁺-ATPasa se centraron en inhibir la proteólisis de la enzima. Para esto, durante los pasos de ruptura celular se probaron diversas concentraciones del inhibidor PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) que actúa sobre proteasas de serina (quimiotripsina, tripsina), acetilcolinesterasas, trombinas y proteasas de cisteína (trombina). También se probaron diferentes concentraciones de un "coctel" de proteasas que contiene los siguientes compuestos: AEBSF, que actúa sobre proteasas de serina (tripsina y quimiotripsina); aprotinina, que inhibe las proteasas de serina (plasmina, tripsinógeno, urocinasa y kallicreina); leupeptina, que actúa sobre las proteasas de serina y cisteína (calpaína, papaína, catepsina B); bestatina, que inhibe aminopeptidasas (aminopeptidasas de leucina y de alanina); pepstatina, que actúa sobre proteasas ácidas (pepsina, renina, catepsina D y quimosinas B); E-64, que inhibe a proteasas de cisteína (calpaína, papaína, catepsina B, y catepsina L). Otro de los inhibidores que se utilizó durante la ruptura mecánica con perlas de

vidrio fue el compuesto DIFP, que actúa sobre proteasas de serina, acetilcolinesterasas, catepsina G, factor de coagulación Xa, elastasa de leucocito, elastasa pancreática, calicreina tisular, plasmina, subtilisina y trombina. Sin embargo, a pesar de la presencia conjunta de estos inhibidores durante la ruptura mecánica de la célula, siempre se obtuvo una H⁺-ATPasa rota.

Por tanto, se decidió ensayar variaciones en la ruptura celular que fueran más suaves. La técnica que mejores resultados arrojó fue una modificación del método de Waterfield y Sisler (Waterfield, W, F y Sisler H. D, 1988), que consiste en la generación de esferoplastos de *U. maydis* y su posterior ruptura con un homogenizador de vidrio con un vástago de teflón. Los esferoplastos se formaron utilizando las enzimas líticas del hongo *Trichoderma harzianum* y posteriormente se rompieron en medios iso-osmóticos. Los resultados muestran que con este método la actividad específica de la H⁺-ATPasa se incrementaba y que la contaminación mitocondrial en las membranas plasmáticas disminuía. Asimismo, la intensidad de la banda cercana a los 100 kDa se incrementaba en los ensayos de Western blott, independientemente de la presencia o ausencia de los inhibidores de proteasas. Sin embargo, por precaución siempre se trabajó la ruptura celular de las levaduras en presencia de 1 mM de PMSF.

Estos datos sugieren que en las levaduras de *U. maydis* existen diversos tipos de proteasas que no se inhiben por los compuestos comerciales ensayados y que la ruptura suave de las células de *U. maydis* evita la proteólisis de la H⁺-ATPasa, lo que permite intuir la presencia de algún organelo donde se localizan las proteasas del hongo. Sin embargo, no existen reportes en la literatura que refieran la existencia de algún proteosoma en las células de basidiomycotas (Herrera y Ulloa 1998, Alexopoulos y Mims, 1985).

Un punto importante que se debe señalar es que la modificación de la técnica de Waterfield para la obtención de la membrana plasmática de *U. maydis* dista mucho de ser la mejor, pues presenta un bajo rendimiento y por ende, una escasa recuperación de la actividad de la H⁺-ATPasa de *U. maydis*. Este bajo rendimiento se debe a que al haber poca ruptura de las levaduras, también disminuye la cantidad de membrana plasmática que puede ser recuperada. La cantidad de

proteína membranal que se obtuvo en las preparaciones rondaba entre los 4 y los 23 miligramos por litro de cultivo, en los mejores casos.

Por otro lado, la determinación de los parámetros cinéticos resultaba complicada, pues las membranas presentan poca actividad de ATPasa. Diez o hasta veinticuatro veces menores que la actividad específica de las H⁺-ATPasas de *K. lactis* (Goffeau, 1981; Serrano, 1988; Möller, 1996; Portillo, 2000). Es decir, además de obtener poca proteína de la ruptura de las levaduras de *U. maydis*, esta enzima tiene poca actividad de hidrólisis de ATP, lo que condujo irremediablemente a un problema técnico importante que complicó la determinación de los parámetros cinéticos de la H⁺-ATPasa. Normalmente se necesitaba añadir 25 µg de proteína por cada 250 microlitros del medio de reacción de la H⁺-ATPasa para tener actividades de hidrólisis de ATP suficientemente grandes para ser detectadas con el método colorimétrico de Fiske y Subbarrow (1925). De esta manera, en una curva típica de saturación de la H⁺-ATPasa con el sustrato Mg-ATP se utilizaban hasta 1.2 mg de proteína, lo que representaba una buena proporción de la preparación obtenida.

3. Los parámetros cinéticos de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática de las levaduras de *U. maydis*

Después de estandarizar los métodos para la obtención de preparaciones de membranas plasmáticas libres de contaminación mitocondrial y con una ATPasa que se mantenía estable, se procedió a caracterizar la cinética de saturación de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática por el sustrato Mg-ATP. Los resultados muestran varios aspectos interesantes:

- Los parámetros cinéticos V_{max} , K_m y el cociente V_{max}/K_m (de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática de *U. maydis* son distintos cuando las levaduras se cultivan en medios de YPD o mínimos.
- La constante de especificidad (V_{max}/K_m), es 16.8 veces mayor para las H⁺-ATPasas provenientes de los medios mínimos es un orden de magnitud mayor ($1.752 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$), en comparación con las preparaciones provenientes de medios de YPD ($0.104 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$).

-
- El valor de la V_{max} se incrementa tres veces en las preparaciones que provienen de cultivos en medios mínimos (donde la V_{max} tiene valores de 0.618 $\mu\text{mol Pi /min mg}$) en comparación con las preparaciones provenientes de medios ricos de YPD (cuya V_{max} es de 0.238 $\mu\text{mol Pi /min mg}$).
 - La afinidad de las enzimas por el sustrato Mg-ATP aumenta 6.5 veces en los medios mínimos (Km de 0.35 mM) en comparación con las preparaciones provenientes del cultivo en medios de YPD (Km de 2.29 mM).

Estos resultados son interesantes ya que se esperaba que los valores de la V_{max} de la H^+ -ATPasa y de la afinidad en los medios ricos de YPD se incrementara en comparación con los medios mínimos. La hipótesis que subyacía a este pensamiento giraba en torno al siguiente enunciado: *si la H^+ -ATPasa de las levaduras de *U. maydis* funciona de manera semejante a las H^+ -ATPasas de las levaduras de *K. lactis*, de *S. cerevisiae* y de *N. crassa* entonces en las preparaciones de membranas plasmáticas de *U. maydis* provenientes de medios mínimos debería haber menos actividad en comparación con las membranas que provenían de cultivos en medios de YPD, ya que la H^+ -ATPasa consume gran proporción del ATP celular (Gancedo y Eraso, 1987; Becher, *et al*, 1992; Amigo, L, 1988, Portillo, F, 2000). En el caso del hongo ascomycota *N. crassa*, esta enzima puede usar hasta un 30 % del ATP celular (Goffeau, 1981) lo que no sería benéfico para la célula en condiciones de aparente escasez alimenticia.*

En este sentido, la mayoría de los reportes de la literatura indican que la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática de los hongos se activa en condiciones de predominancia en el catabolismo de fuentes de carbono exógenas (Sychrová y Kotyk, 1985; Eraso y Gancedo, 1987; Becher, *et al*, 1992; Begoña, *et al*, 1992; Amigo, *et al*, 1993; Portillo, 2000), principalmente hexosas (Sychrová, y Kotyk, 1985), o en condiciones de estrés en fuentes de nitrógeno (Begoña, *et al*, 1992).

Sin embargo, los resultados mostrados en este trabajo señalan que ante un aparente déficit alimenticio se incrementa la actividad de la H^+ -ATPasa en la membrana plasmática de *U. maydis*. Este punto, paradójicamente también puede ser sustentado en términos energéticos, pues un incremento en la actividad de la

H⁺-ATPasa de la membrana plasmática de *U. maydis* puede reeditar en una mayor captación de nutrientes, a costa de una inversión de ATP. Además, este incremento en la actividad de la H⁺-ATPasa puede estar asociado a la disminución del pH que se produce cuando las células se cultivan en el medio mínimo, lo cual contrasta con la alcalinización que se observa en el medio de YPD.

Por otro lado, la actividad específica de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática de las levaduras cultivadas en medios de YPD que se encontraron en este trabajo difieren de las reportadas por Hernández y colaboradores (Hernández, 2002). Sin embargo, aunque los valores de K_m y V_{max} obtenidos por este grupo son distintos (1.68 ± 0.19 mM y 3.6 ± 0.29 $\mu\text{mol de Pi/ min x mg de proteína}$, respectivamente), a los obtenidos en este trabajo (0.61827 ± 0.1496 y 0.35276 ± 0.02754 para la V_{max} y la K_m , respectivamente). Es necesario mencionar que Hernández realizó los experimentos a 37°C (Hernández, 2002), mientras los ensayos cinéticos realizados por nuestro grupo de trabajo se hicieron a 30° C. También es importante resaltar el hecho de que no se habían reportado modificaciones en los parámetros cinéticos de la H⁺-ATPasa de las levaduras de algún hongo Basidimycota, como *U. maydis* como respuesta a diferentes condiciones de cultivo.

Estos resultados dieron lugar a varias preguntas interesantes: ¿El incremento en la actividad de la H⁺-ATPasa y los cambios en sus parámetros cinéticos en las levaduras cultivadas en medios mínimos se debe a que se activa la proteína o a que se induce la expresión de un gen distinto para cada condición? ¿Qué mecanismos gobiernan la activación y/o la inducción enzimática? ¿Cómo se regula la actividad de esta enzima en las levaduras de *U. maydis*?, si las secuencias de sus dos genes de la H⁺-ATPasa presentan variaciones en el extremo carboxilo terminal cuando se comparan con otras H⁺-ATPasas de otras levaduras.

4. El efecto del pH sobre la actividad y la estabilidad de la H⁺-ATPasa de levaduras de *U. maydis* cultivadas en medio mínimo

Para caracterizar el efecto del pH sobre la actividad y la estabilidad de la enzima se probaron diferentes medios con valores de pH entre 5 y 8.75. Para conseguir estos valores de pH se utilizaron soluciones formadas con una mezcla equimolar de 125 mM de los amortiguadores MES-HEPES y se mantuvo fija la temperatura de los ensayos a 30 °C. Los pKas de cada amortiguador a 25 °C son 6.1 para el MES y 7.48 HEPES.

En una primera fase se realizaron experimentos para estudiar la estabilidad de la enzima en todo el intervalo de pH ensayado. Salvo en los extremos del intervalo, pH 5 y 8.75, en donde se presentaron fenómenos de inactivación de la enzima, en todas las demás condiciones la H⁺-ATPasa mantuvo su actividad en función del tiempo, al menos durante los 40 minutos del ensayo, lo cual indica que la enzima no perdió su conformación nativa en el intervalo de pH de 5.5 a 8.25.

Cuando se estudió el comportamiento de la V_{max} y el cociente V_{max}/K_m con respecto al pH se encontró que el funcionamiento de la enzima puede ser modelado con un esquema de “tres pisos de un sistema monoprótico” según la nomenclatura de Jeremy R. Knowles (Knowles, 1976) en donde sólo existe una forma catalítica de la enzima.

Es decir, según el modelo planteado en este trabajo, la H⁺-ATPasa puede presentar tres estados que unen al sustrato y uno para la etapa catalítica que da lugar a la formación del producto, que corresponden a las formas E²⁻, H₂E y HE del modelo descrito en la sección 4 de los resultados. De estas tres formas, únicamente el estado monoprotonado de la enzima (correspondiente a la forma HES del modelo propuesto) es capaz de realizar la hidrólisis del complejo Mg-ATP, y los otros dos estados, E²⁻S y H₂ES, no son catalíticos. Puesto que se obtuvieron valores de pKa similares en los gráficos de Dixon-Webb de V_{mapp} vs pH y V_{mapp}/K_{mapp} vs pH se puede sugerir que la unión del sustrato a la enzima no altera el micro-ambiente del sitio activo de la enzima, y que es muy probable que los residuos de aminoácidos implicados en la unión del sustrato también estén involucrados en la catálisis de la enzima.

Como se mencionó en la sección de resultados, se puede proponer tentativamente a la histidina y a la lisina como los residuos de aminoácidos que participan en la unión del Mg-ATP y en la catálisis enzimática. Por otro lado, se descarta que sea el grupo sulfhidrilo de un residuo de cisteína el involucrado en la inhibición de la enzima a valores de pH superiores a 7.92, pues en experimentos previos realizados por nuestro grupo de investigación (Guerra, *et al.* 1995) se encontró que la modificación química de la ATPasa con el metil metano tiosulfonato (MMTS), un reactivo específico para grupos sulfhidrilo, no inhibe la actividad de la H⁺-ATPasa. En la misma forma, a través de mutaciones dirigidas se encontró que ninguno de los residuos de cisteína de la H⁺-ATPasa de *S. cerevisiae* es esencial para el funcionamiento de la enzima (Morsome, *et al.*, 2000). De esta manera, se puede proponer que el pKa de 7.92 corresponde a un residuo de lisina localizado en un ambiente hidrofóbico, pues ninguno de los residuos de cisteína parecen ser fundamentales para la actividad catalítica de la enzima.

5. Efecto de los cationes monovalentes Na⁺ y K⁺ sobre la actividad de la H⁺-ATPasa

Los dos cationes monovalentes que se probaron tuvieron el mismo efecto sobre los parámetros cinéticos de la H⁺-ATPasa. Ninguno de los dos alteró de forma notable la V_{max} de la enzima (el valor calculado de β es cercano a 1). Sin embargo, la K_m disminuyó al aumentar la concentración de los cationes. Este resultado se observa claramente en los gráficos de Lineweaver-Burk y Eadie-Hoffstee mostrados en los resultados (ver figuras 13 y 14). Al realizar el ajuste global utilizando un modelo de activación no esencial se obtuvo, para el parámetro α , un valor de 0.04432 ± 0.01307 y 0.04029 ± 0.01403 para el Na⁺ y el K⁺, respectivamente. La constante de afinidad (K_a) por los cationes fue de 169.8 ± 34.78 mM y 135.37 ± 17.56 mM para el Na⁺ y el K⁺, respectivamente.

Es importante mencionar que para realizar el ajuste global de los datos se fijó el valor β igual a 1, pues la variación de los valores de V_{max} permanecían prácticamente idénticos, dentro del error experimental.

6. Efecto del Mg-ADP sobre la actividad de la H⁺-ATPasa

Puesto que el Mg-ADP es uno de los productos de la reacción que cataliza la H⁺-ATPasa y debido a que la concentración de este nucleótido en el citosol es similar a la del Mg-ATP, se procedió a realizar la caracterización cinética pertinente, de donde resultó un patrón de inhibición competitivo con una K_i de 1.25 mM para el Mg-ADP, semejante a la K_m del sustrato Mg-ATP. Algo que vale la pena mencionar de este dato es que en la literatura no se ha reportado, para la H⁺-ATPasa de *U. maydis* un valor de K_i para este inhibidor. El valor de la K_i del Mg-ADP para la H⁺-ATPasa de *U. maydis* es similar a los reportados para otras H⁺-ATPasas de levaduras, como las de *K. lactis* y *S. cerevisiae* (Serrano, 1988 y Portillo, 2000).

7. Efecto del vanadato (VO₄) sobre la actividad de la H⁺-ATPasa

El vanadato, al igual que el Mg-ADP, se comportó como un inhibidor competitivo del sustrato Mg-ATP, pero con una afinidad tres órdenes de magnitud mayor, ya que el vanadato semeja el estado de transición de la reacción de desfosforilación de la enzima. En los resultados se planteó un modelo mixto en estado estacionario y equilibrio rápido, que permite explicar el hecho de que el vanadato, que corresponde al segundo producto del sistema bi-bi, liberado por la forma de la enzima E1AB, se comporte como un inhibidor competitivo con el sustrato, que se une a la forma E1 de la enzima. El valor de la K_{ic} para el vanadato fue de $0.938 \pm 0.43 \mu\text{M}$. Hernández y colaboradores (Hernández, 2002) reportaron una K_i de $6.28 \pm 2.57 \mu\text{M}$. Los valores de K_i para el vanadato, obtenidos para las H⁺-ATPasas de otras levaduras como *S. cerevisiae* y *N. crassa*, se encuentran en el orden de 0.5 a 9 μM (Goffeau, 1981, Serrano, 1988, Mölller, 1996).

8 La genómica comparativa de las H⁺-ATPasas de *U. maydis*

8.1 Evolución molecular por duplicación génica

En las ciencias biológicas se acostumbra reconocer diferentes niveles de organización o jerarquía de los componentes de la vida. Estos niveles de organización biológica permiten detectar clara e inequívocamente la diversidad de tipos y patrones estructurales y morfológicos en función del ambiente (adaptaciones o relaciones estructura-función), la continuidad de la información genética (mecanismos de la herencia) y por supuesto la evolución biológica.

A nivel molecular los eventos de duplicación génica y genómica representan los mecanismos más importantes que pueden conducir a la aparición de nuevos genes, pues una vez que existe un duplicado genético de algún transcrito que desempeña alguna función biológica, alguna de las duplicaciones génicas puede experimentar altas tasas de mutación sin que haya una pérdida o cambio en la función del transcrito original, pero sí implicando la aparición de variantes genéticas en un taxón (taxa, unidad biológica que está representada por un conjunto de organismos que pueden presentar recombinación genética).

En contraparte, los cambios puntuales en ausencia de una duplicación genómica, ya sean transiciones, transversiones, inserciones o deleciones, no representan la principal fuerza de la evolución génica, pues gran parte de ellos conllevan “altos factores de riesgo” en los organismos. Por ejemplo, si se altera la función o estructura de un transcrito que realiza una función biológica vital (como un RNAt, un RNAr o alguna proteína), y no existe un duplicado genético de esa secuencia mutada, ese cambio puede ser letal según el entorno en donde se encuentre el organismo, lo que conduciría a la desaparición de los taxones portadores de esa mutación y por consecuencia al abatimiento o “purga” de mutaciones deletéreas, siempre que no exista un “rescate” de la función que desempeñaba el transcrito original.

En su defecto, si los cambios o alteraciones genéticas no alteran la función del transcrito original mutado, o si conducen a incrementos en los niveles de adaptación y adecuación biológica, pueden conducir a la aparición de

autapomorfías (novedades evolutivas que se presentan en un único taxón), apomorfías y sinapomorfías (caracteres derivados a partir de un estado ancestral o plesiomórfico que se presenta en uno o más taxones, respectivamente) características y determinantes de los clados monofiléticos. De esta manera, a partir de un evento de duplicación génica puede plantearse la existencia de al menos tres caminos evolutivos para los genes duplicados: a) la adquisición de nuevas funciones (neofuncionalización), b) la adquisición de funciones secundarias, que pueden estar asociadas al desarrollo ontogénico o a la compartimentalización celular (subfuncionalización) y c) la pérdida de la función original para originar pseudogenes (no funcionalización) (Roth, C., 2006).

En este sentido, a partir de los alineamientos locales múltiples realizados con las secuencias de aminoácidos de las H⁺-ATPasas, se encontraron eventos de duplicación génica como los principales motores de la evolución biológica de cada clado (grupo monofilético o conjunto de taxones que comparten un ancestro común único). Por ejemplo, todos los asco, basidio y glomero mycotas presentan un duplicado de la H⁺-ATPasa.

8.2 Alineamientos Básicos Locales Múltiples (BLAST) de las H⁺-ATPasas de *U. maydis*

La herramienta de los alineamientos básicos locales múltiples constituye un gran apoyo para el hallazgo de similitudes e identidades en secuencias de aminoácidos o de genes, a través de métodos estadísticos. Con el uso de este tipo de herramientas se encontró que existen dos variantes genéticas (alelos) que codifican para H⁺-ATPasas de membrana plasmática en el genoma de *U. maydis*, mientras que las secuencias restantes, arrojadas por los alineamientos, corresponden muy probablemente a ATPasas que transportan otro tipo de cationes. Estos resultados se confirmaron a través de las herramientas de búsquedas seriadas disponibles en los portales electrónicos de “expasy proteomics server” y de la “NCBI”.

Además, los árboles filogenéticos que resultaron del análisis evolutivo confirmaron que únicamente las dos primeras secuencias arrojadas por ambos

BLAST correspondían a H⁺-ATPasas del tipo P2. Por ejemplo, cuando se analizó la tercera secuencia (señalada en el gen bank con la clave UM00204.1) se encontró que tenía una similitud mayor con la Ca²⁺-ATPasa de retículo sarcoplásmico de conejo, también de la subfamilia P2 de ATPasas, que con las H⁺-ATPasas de los hongos y las plantas (ver figura del apéndice).

9. Grados de similitud y divergencia entre las dos secuencias de H⁺-ATPasas presentes en el genoma de *U. maydis*.

9.1 Las dos H⁺-ATPasas localizadas en el genoma de *U. maydis* son homólogas

El porcentaje de identidad y similitud entre las dos secuencias de H⁺-ATPasas presentes en el genoma de *U. maydis* fue del 32.2 % y 48.1 %, respectivamente. Estos dos parámetros sugieren que ambas proteínas tienen un origen común, es decir, que son homólogas, pues los valores de identidad son mayores al límite de identidad de 30 %, que se utiliza en la literatura especializada como “el porcentaje mínimo de identidad” entre dos proteínas que pueden ser consideradas “muy posiblemente” homólogas.

Al comparar las secuencias de las dos H⁺-ATPasas de *U. maydis*, el número aproximado de residuos de aminoácidos que son idénticos y que están localizados en la misma posición en ambas proteínas es de 296, que representa al 32.2 % de los 920 residuos de aminoácidos de las H⁺-ATPasas fúngicas típicas. De esta manera, la probabilidad de que ocurra este evento como un producto del azar implica considerar las posibilidades de combinación de los 20 residuos de aminoácidos que forman parte de las H⁺-ATPasas fúngicas en estas 296 posiciones. Como la combinación y el arreglo de los residuos de aminoácidos es la misma en ambas secuencias, esto ocurriría una vez en 20²⁹⁶ opciones (1/ 20²⁹⁶), lo que prácticamente resulta imposible, por lo que se concluye que “muy posiblemente” ambas secuencias son descendientes de una proteína ancestral única, pues probabilísticamente resulta imposible explicar este alto grado de identidad entre ambas proteínas como producto del azar.

9.2 Existen zonas de alta conservación entre las dos H⁺-ATPasas de *U. maydis*

Es claro que las mutaciones o cambios evolutivos en los genes de las dos H⁺-ATPasas de *U. maydis* son en su mayor parte conservativos, es decir, no se altera el perfil o carácter polar o hidrofóbico de los residuos de aminoácidos. Esto se puede constatar a través del parecido en los perfiles de hidropatía (datos no mostrados). Además, los gráficos de alineamientos pareados (Dot blot) y el gráfico de configuración absoluta (figuras 21 a 23) muestran que estos cambios evolutivos están localizados principalmente en la región carboxilo terminal de la proteína, mientras que las regiones amino terminal y los dominios centrales de las H⁺-ATPasas corresponden a zonas de alto grado de conservación.

Estas regiones de alta conservación corresponden a dominios en donde se localizan los sitios de fosforilación de la enzima (sitio P) y los dominios necesarios para la inserción de la proteína en la membrana plasmática. En contraparte, los sitios de regulación de las H⁺-ATPasas, localizados en los extremos carboxilo terminal, han divergido mucho y sólo se conserva, de manera parcial, el carácter hidrofóbico de los residuos de aminoácidos de esa zona.

En un análisis más detallado se observa que la divergencia en la región carboxilo terminal es mayor para la secuencia Q4PFA8 que para la secuencia Q4PBD2 (datos no mostrados), que comparte un 48.78 % de identidad con la H⁺-ATPasa de *S. cerevisiae*. Estas divergencias evolutivas son fáciles de visualizar en las figuras 22 y 23, en donde se observa la variación en los patrones moteados arrojados en las matrices de puntos resultantes de confrontar a la H⁺-ATPasa de *S. cerevisiae* contra ambas secuencias de *U. maydis*.

10. Implicaciones evolutivas de la divergencia de las dos secuencias de de H⁺-ATPasas presentes en el genoma de *U. maydis*

10.1 La Evolución como un proceso biológico reconocible en los distintos niveles de organización biológica

La evolución biológica puede entenderse como el cambio heredable de las propiedades de poblaciones génicas u organísticas o grupos de poblaciones. La evolución a *grosso modo* consiste en la descendencia con modificación y frecuentemente incluye la diversificación a partir de un ancestro común. No todos los cambios evolutivos implican diversificación o variación (molecular o morfológica), sino también pueden conllevar el mantenimiento de la función original con cambios en el fenotipo fisiológico y molecular como respuesta a las variaciones del entorno (hipótesis de la Reina Roja de Van Valen).

Además, el proceso de la evolución biológica está regulado por procesos como la selección natural, la adaptación, la deriva génica y los flujos migratorios a nivel macro evolutivo y con eventos de evolución concertada, conversión génica y duplicaciones génicas y genómicas, a nivel molecular.

Para entender los procesos evolutivos a nivel molecular y bioquímico es necesario reconocer que dentro de los distintos niveles de organización biológica (desde las biomoléculas hasta las biomas), las entidades susceptibles de experimentar evolución pueden comportarse como “vehículos portadores de información genética” o como “unidades autorreplicantes” de la información que portan. Como ejemplo de entidades vehiculares o transportadoras de la información genética están todas las entidades biológicas autónomas bien definidas espacial y temporalmente que, *per se*, no constituyen entidades evolutivas en términos estrictos, pues los cambios que experimentan no son susceptibles de ser heredados (por ejemplo, las mutilaciones y los cambios en la pigmentación de la dermis en un reptil, a nivel organísmico, o el plegamiento erróneo y las modificaciones postraduccionales en las proteínas).

En oposición a las unidades transportadoras de la información genética, dentro de las entidades replicadoras se encuentran todas aquellas unidades auto-duplicantes que pueden experimentar cambios en su información genética y que pueden transmitir estas modificaciones de manera “vertical” en el tiempo a través de los mecanismos de la herencia, y que se comportan como entidades genéticas independientes, espacial y temporalmente definidas.

Sin embargo, es necesario mencionar que las entidades autorreplicantes necesitan de unidades vehiculares para su existencia y permanencia espacial y temporal. Como ejemplos de entidades autorreplicantes están los cromosomas y los genes. El caso de los virus como entidades replicantes-no vehiculares escapa del objetivo de la discusión de este trabajo por lo que no será abordado.

Regresando a la discusión original de entidades vehiculares y autorreplicantes, resulta obligado mencionar que los cladogramas realizados con las secuencias proteicas de las H⁺-ATPasas (figura 20) únicamente reflejan de manera indirecta el proceso de la evolución de los genes codificantes para las H⁺-ATPasas. Para ser estrictos con el lenguaje, con los cladogramas realizados en este trabajo no se puede interpretar aspectos de la evolución de las H⁺-ATPasas, pues las proteínas no son entidades replicadoras autónomas, sino producto de la expresión génica. Sin embargo, al estudiar los cambios en la estructura primaria de las H⁺-ATPasas, se puede descubrir algunos aspectos de la evolución genómica y génica de los organismos que tengan estas proteínas.

10.2 Algunas aclaraciones sobre la sistemática filogenético o cladística

Para ser coherentes con las premisas de la sistemática filogenética o cladística, se acepta en este trabajo que las clasificaciones naturales de los seres vivos deben basarse en el reconocimiento de sus relaciones genealógicas, que se reflejan en los cladogramas o árboles filogenéticos que se construyen con el análisis de ciertos caracteres morfológicos o moleculares (genéticos y proteicos).

En este sentido, también se acepta el criterio de comparación con el grupo externo (o grupo hermano para otros autores), que supone que los estados plesiomórficos (más ancestrales) son aquellos presentes en algunos de los integrantes del grupo en estudio y en los del grupo externo que se localizan en la raíz o nodo basal que constituye la base o punto de partida del proceso evolutivo. En la misma forma, los caracteres apomórficos (derivados) sólo se hallan en ramales terminales, no vinculados estrechamente con el grupo externo que comparten nodos que los agrupan en ramas internas en ocasiones terminales.

Con estas aclaraciones necesarias, se puede comenzar con la discusión de la información que se obtiene de los cladogramas.

10.3 Información derivada de los árboles filogenéticos realizados con las H⁺-ATPasas

Para el análisis filogenético de las 156 secuencias de H⁺-ATPasas obtenidas del Gen Bank se realizaron más de 35 diferentes construcciones de árboles filogenéticos cladísticos (cladogramas) utilizando diferentes algoritmos que se basan en fundamentos evolutivos distintos. Los programas de cómputo que se utilizaron para la realización de los alineamientos múltiples y la construcción de los árboles filogenéticos fueron AlignX, Clustal X, Clustal W y Mega 3.1. De las construcciones taxonómicas que se muestran en las figuras 24 y 25 es importante resaltar varios puntos:

Primero: la familia de H⁺-ATPasas fúngicas se sobrelapa parcialmente con los grupos taxonómicos propuestos en la división taxonómica Eumycota de Alexopoulos y Mims, Herrera y Ulloa (ver figura 1 de la introducción), y las clasificaciones moleculares cladísticas para los eucariontes que se reporta en la página del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos (NCBI por sus siglas en inglés). Es decir, en nuestras construcciones filogenéticas, la familia de H⁺-ATPasas de los hongos se divide en dos grandes grupos: Ascomycotas y Basidiomycotas, lo que es consistente con las subdivisiones de Ascomycotina y Basidiomycotina que conforman a los Eumycotas de Alexopoulos y Mims, Herrera y Ulloa.

Segundo: además de los grupos mencionados, en los cladogramas de la H⁺-ATPasa también están representadas las divisiones de Glomeromycotas, Mixomycotas y Oomycotas, que coinciden con las subdivisiones plasmodiophoromicetes, mixomicetes y acraciomicetes de los hongos “inferiores” de Herrera y Ulloa.

Tercero: los árboles filogenéticos que se obtuvieron con los algoritmos de “mínima evolución” y “máxima parsimonia” muestran una gran diversificación en los primeros días del establecimiento de las entidades celulares, pues las

distancias evolutivas del origen de cada grupo a partir del ancestro común, que estaría más relacionado con el grupo hermano representado por las Ca^{2+} -ATPasas son pequeñas (resultados no mostrados). En cambio, las distancias evolutivas que condujeron a la diversificación y diferenciación de los grupos son largas. Esto permite inferir que “apenas ocurrió la separación de los eucariontes y procariontes sucedieron eventos evolutivos que condujeron al establecimiento “temprano” de grupos de protoctistas, los cuales rápidamente condujeron, por eventos de “selección direccional”, a los filums o reinos de plantas talofitas (representadas por la rodofita *Cyanidium caldarium*, señalada en los árboles con la clave “O04956_CYACA”), y traqueofitas (representadas por todas las plantas vasculares), otro filum condujo a la diversificación temprana de los hongos, representados en las clases de glomeromycotas (representadas por el género *glomus*, clave “GLOMO”), ascomycotas (representadas ampliamente en la parte derecha del árbol por organismos como *Candida albicans*, *Saccharomices cerevisiae* y *Aspergillus fumigatus*, entre muchos otros) y basidiomycotas”. Además, en esta diversificación temprana también se observa el establecimiento de grupos de organismos que aún son controversia dentro de las clasificaciones actuales, como los Mixomycotas, los cuales se han agrupado como “protistas no fotosintéticos” por algunos autores (como Lynn Margulis y Marlene V. Schwartz) o como entidades fúngicas inferiores (según las clasificaciones de Ulloa y Herrera y de Alexopoulos y Mims con las que son consistentes los cladogramas generados).

Cuarto: se encontró que las dos secuencias de H^+ -ATPasas presentes en el genoma de *U. maydis* muy probablemente son producto de una duplicación génica “temprana” y constituyen genes ortólogos que señalan la separación entre las clases taxonómicas de los Asco y los Basidiomycotas.

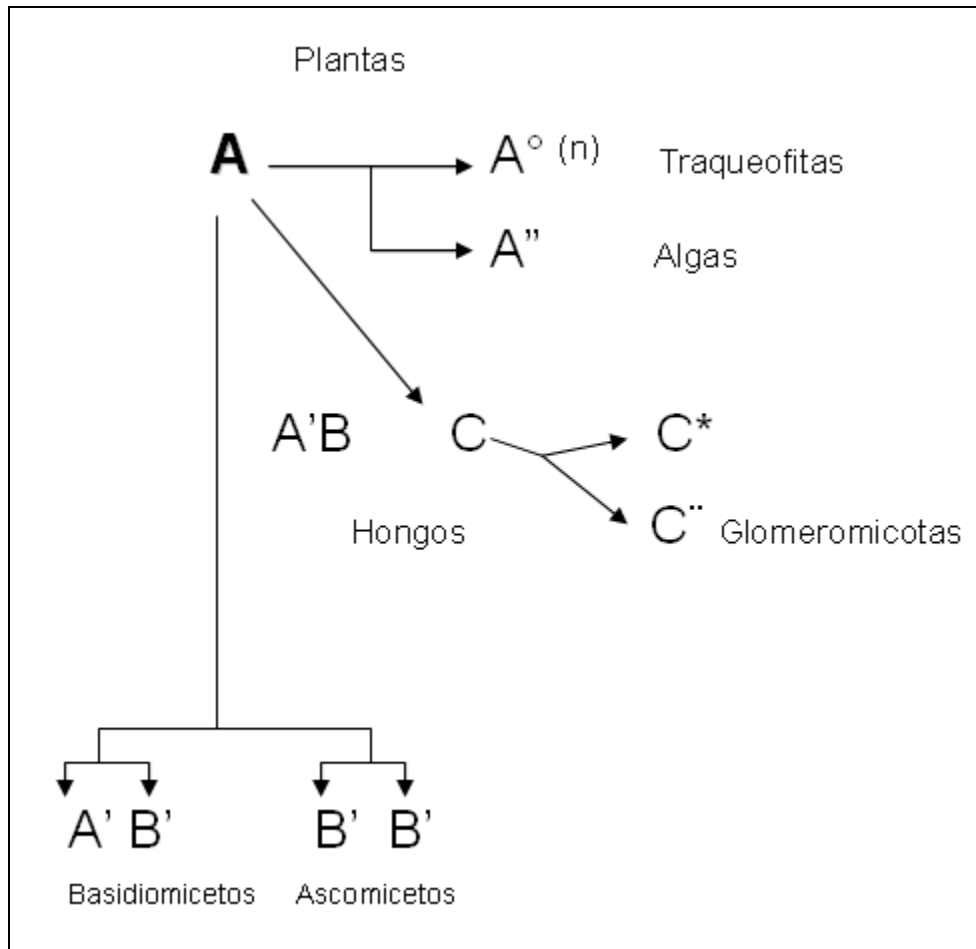
10.4 Escenarios evolutivos para explicar la presencia de dos grupos de H^+ -ATPasas de *U. maydis*

Al analizar el entorno evolutivo que rodea las secuencias de *U. maydis*, se observa que ambas están flanqueadas por las H^+ -ATPasas de *Cryptococcus neoformas* y *Uromyces fabae* (señaladas con la clave CRYNE y UROFA,

respectivamente), hecho que es interesante pues al parecer únicamente los hongos basidiomicetes comparten la duplicación génica de la secuencia de la H⁺-ATPasa tipo vegetal. Además, los dos genes para las H⁺-ATPasas de los basidiomycotas caen en dos grupos bien definidos, uno de ellos está inmerso dentro de un gran ramal que incluye a los Ascomycotas y el otro se localiza en una rama definida por un nodo interno exclusivo para los Basidiomycotas.

Estos dos hechos permiten hipotetizar al menos cuatro escenarios evolutivos que pueden explicar la presencia de las H⁺-ATPasas tipo vegetal en los basidiomycotas:

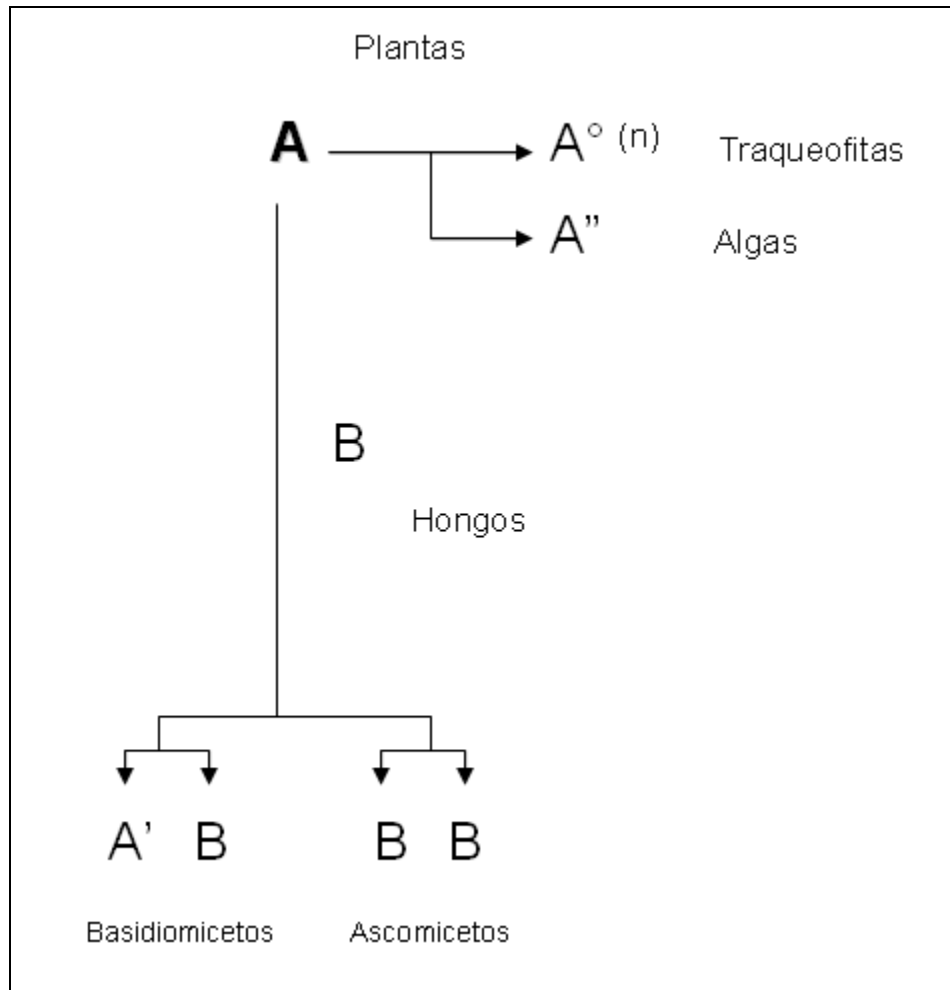
Primer escenario: las H⁺-ATPasas tipo vegetal de los Basidiomycotas son caracteres ancestrales que se perdieron en los Asco. En esta hipótesis se propone que las H⁺-ATPasas tipo vegetal son un carácter ancestral (plesiomórfico) que se hereda a los taxa derivados (convirtiéndose en un carácter simplesiomórfico). A partir de este momento, suceden eventos de duplicación génica múltiple en las plantas, mientras que en los hongos ocurre un evento único de duplicación génica. De esta manera, en los hongos una de las copias codificantes para las H⁺-ATPasas tipo vegetal experimenta mutaciones que conducen a la aparición de las H⁺-ATPasas tipo fúngicas, compartidas únicamente por los Asco y Basidiomycotas (y que representa por tanto una autapomorfía dentro del reino fungi). Un paso consecutivo involucra la desaparición de las H⁺-ATPasas tipo vegetal en los Ascomycotas y los Glomeromycotas, pues no existen presiones de selección que favorezcan la permanencia de estos genes en estos hongos. Posteriormente ocurren eventos de duplicación independientes para el gen de la H⁺-ATPasa tipo fúngica en los Ascomycotas, pero en los Basidiomycotas se conserva la H⁺-ATPasa ancestral tipo vegetal y no ocurren más eventos de duplicación génica para las secuencias de las H⁺-ATPasas.



Segundo escenario: las H^+ -ATPasas tipo vegetal de los Basidiomycotas son resultado de convergencia evolutiva (paralelismo homoplásico). En este escenario se propone que el ancestro multicelular común a las plantas y a los hongos tenía una H^+ -ATPasa ancestral (carácter plesiomórfico) que se hereda a sus descendientes (constituyendo un carácter simplesiomórfico). En seguida cada uno de los grupos de hongos y plantas comienza a diversificarse y a experimentar tasas de mutación y duplicación génica de manera independiente, lo que origina a las copias múltiples de las H^+ -ATPasas tipo vegetales y las duplicaciones génicas características de las H^+ -ATPasas fúngicas de los Asco y Glomeromicotas.

En términos evolutivos estas nuevas H^+ -ATPasas de los Asco y Glomeromicotas constituyen autapomorfías (novedades evolutivas) para cada clado, pero representan sinapomorfías (novedades evolutivas compartidas en dos o más taxa) para cada uno de los taxa involucrados en cada clado de talofitas,

traqueofitas y hongos. De esta manera, se puede intuir que en un tiempo evolutivo reciente los Basidiomycotas pudieron experimentar cambios en una de las copias de la H^+ -ATPasa presente en su genoma que condujeron, debido a procesos de adaptación a condiciones ambientales y presiones de selección semejantes, a la convergencia en una H^+ -ATPasa que semeja a las enzimas tipo vegetal.



Tercer escenario: la H^+ -ATPasa tipo vegetal de los Basidiomycotas constituye una reversión homoplásica a la enzima ancestral presente en el ancestro común a las plantas y los hongos. Esta hipótesis es idéntica en los planteamientos a la segunda hipótesis o segundo escenario evolutivo. Pero a diferencia éste, implica que las mutaciones en una de las copias de los genes de las H^+ -ATPasas tipo fúngicas encontradas en los Basidiomycotas regresa a un

estado que recuerda al carácter ancestral que se ubica en la raíz o nodo de los hongos y las plantas. Esta hipótesis implica, para su validez, que las H⁺-ATPasas tipo vegetal corresponden a un carácter primitivo conservado por las plantas vasculares y talofitas actuales.

Cuarto escenario: la H⁺-ATPasa tipo vegetal de los Basidiomycotas es producto de una transferencia horizontal de genes con las plantas. Esta hipótesis permite explicar la presencia de las H⁺-ATPasas tipo vegetal en los Basidiomycotas de manera muy sencilla y parsimoniosa (de mayor simplicidad, pues implica el menor número de eventos o pasos para realizar la explicación de un fenómeno evolutivo), pero implica eventos de co-evolución y transferencia horizontal de genes entre las plantas y los Basidomycotas, lo que representan eventos evolutivos “poco probables en términos ecológicos”.

Recordemos que de los tres Basiomycotas analizados en los cladogramas, dos son parásitos de plantas, *U. maydis* y *U. fabae*, que parasitan al maíz y al haba, respectivamente. Esta hipótesis de transferencia horizontal de genes, producto de la coevolución entre los Basidiomycotas y las plantas, fue sugerida por Matthias Hahn y colaboradores (Struck, C., *et al*, 1998) en 1998 para explicar el mayor parecido entre la secuencia de la H⁺-ATPasa de *U. fabae* con las plantas y la enorme diferencia que mostraba respecto a otras H⁺-ATPasas fúngicas. En ese artículo los autores se limitan a sugerir la presencia de “eventos de co-evolución”, sin arrojar mayores datos que sustenten esta hipótesis, dejando la pregunta abierta hasta que aparezcan nuevos datos sobre H⁺-ATPasas de basidiomycotas que permitan responder esta paradoja evolutiva.

Aunque aparentemente este escenario o hipótesis evolutiva para explicar la presencia de las H⁺-ATPasas tipo vegetal en los Basidiomycotas es el más parsimonioso, recordemos que la teoría de la coevolución propuesta por Paul Elrich y Peter Raven en 1964 (y desarrollada por Rougharden en 1976, Janzen en 1980, Futuyama y Slatkin en 1983 y por Brooks y McLennan en 1991) en realidad es muy compleja, pues involucra eventos graduales de adaptación filogenético mutua (coespeciación) y modificaciones graduales de características fenotípicas compartidas (coadaptación). Es decir, los eventos de coevolución implican al

menos cuatro pasos complejos en términos fisiológicos. Se necesita la presencia de un cambio evolutivo que sea fijado en una especie y que se exprese en alguna característica fenotípica de la especie (que puede o no afectar positivamente los valores de adecuación), además es necesario también que este cambio pueda ser “sensado” por la especie acompañante (simbiótica o parasítica) y que esta especie responda con un cambio o adaptación al evento evolutivo primario, ocurrido en el simbiote u hospedero con el que interactúa ecológicamente la especie que ha coevolucionado.

Ciertamente que en la interacción ecológica entre los insectos y las plantas vasculares existen varios ejemplos de coevolución estricta y coevolución difusa (la coevolución difusa conlleva cambios coevolutivos en más de una especie que interactúa con un hospedero común, o viceversa, que la presencia de una característica evolutiva en una o más especies depende de otras características presentes en varias especies con las que se relaciona ecológicamente), empero, en los hongos aún falta trabajo por realizar para refutar o validar la coevolución entre los hongos y las plantas.

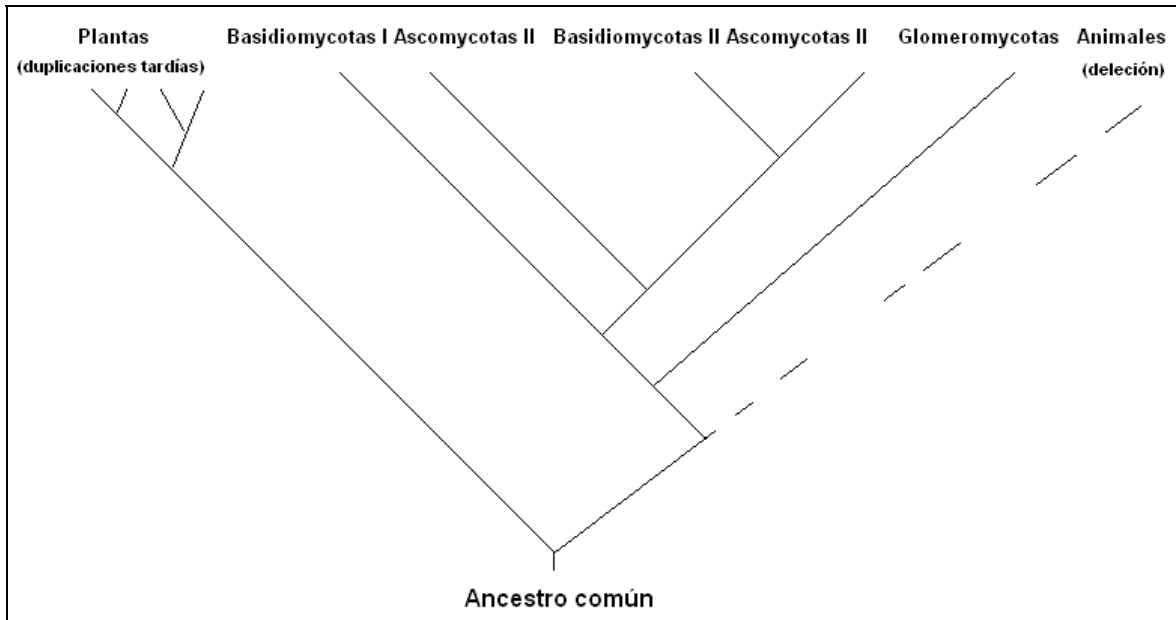
Sin embargo, si se aceptan los fenómenos de coevolución y la transferencia horizontal de genes de las plantas a los Basidiomycotas, aún permanece una pregunta ¿cómo explicar la presencia de la H⁺-ATPasa tipo vegetal en *Cryptococcus neoformans*, que es un organismo parásito causante de la meningo encefalitis de los humanos?

¿Cuál de las cuatro hipótesis o escenarios evolutivos es la más plausible?

Aparentemente la cuarta hipótesis es la más parsimoniosa, pues implica el menor número de pasos para explicar la presencia de una H⁺-ATPasa tipo vegetal en los hongos Basidiomycotas. Sin embargo, explicar la presencia de la H⁺-ATPasa tipo vegetal en un parásito actual de los humanos, implica la existencia hipotética de un ancestro Basidiomycota que fue parásito de los vegetales, a partir del cual derivó un nuevo linaje que ya no parasita a las plantas, sino a los mamíferos, algo que se antoja poco probable.

Con el fin de resolver esta paradoja y apostar por alguna de las tres hipótesis sugeridas, se realizaron alineamientos y construcciones de cladogramas

de otras 15 proteínas presentes en el genoma de los hongos Asco, Basidio y Glomeromycota, plantas vasculares y otros eucariontes “inferiores”. El resultado fue el hallazgo de evidencias de “un gran evento de duplicación génica temprana dentro de los hongos”. La historia evolutiva que se puede leer en los 15 cladogramas (ver figuras a del apéndice) favorecen la primera hipótesis que se propone para explicar la presencia de la H⁺-ATPasa tipo vegetal en los Basidiomycotas, esto es: “las H⁺-ATPasas tipo vegetal de los Basidiomycotas son caracteres ancestrales que se perdieron en los Ascomycotas”. A partir de estas evidencias cladísticas se propone el siguiente modelo para la duplicación génica de los eucariontes:



A este respecto, solo añadiremos que resulta más parsimonioso proponer la ocurrencia de un evento ancestral único de duplicación génica y/ o genómica que define al clado monofilético de los hongos, que proponer eventos de convergencia evolutiva o transferencia horizontal en basidiomycetes.

Además, esta hipótesis concuerda con la Teoría de la evolución neutral que propone que los cambios en los genes que codifican para las proteínas durante la evolución son selectivamente neutros, y que la fuerza más importante de la evolución molecular es la deriva génica; la selección natural eliminaría únicamente las mutaciones deletéreas, purgando aquellas mutaciones que conlleven menores

índices o valores de adecuación para el organismo, evidentemente afectando también la adaptación organísmica y celular en el entorno. La propuesta de la deriva génica como la principal fuerza motora de la evolución está de acuerdo con la Teoría General de la Selección Natural adaptada a la micro-evolución o evolución de entidades subcelulares.

En este sentido, creemos necesario mencionar aquí que los eventos de duplicación genómica para los tres clados fúngicos que se propone en este trabajo, se refieren un evento anterior a la duplicación génica múltiple propuesto por Wolfe y Shields, en 1997, para los ascomycotas del género *Saccharomyces*. Estos autores proponen que las levaduras de *Saccharomyces* experimentaron un evento de duplicación génica global hace 150 millones de años (teoría del ancestro tetraploide) y que este suceso de duplicación múltiple es exclusiva para este género de levaduras, pues no compete a levaduras filogenéticamente muy emparentadas como *K. lactis* o *K. waalti* (Wolfe 2006).

V. CONCLUSIONES

I.- Es necesario replantear el significado del término de medio “mínimo” para el caso de las levaduras de *U. maydis*, pues las levaduras de éste heterobasidiomicota fitopatógeno presentan una gran capacidad biosintética. Son capaces de crecer en medios con fuentes de nitrógeno y carbono muy limitadas, lo que contrasta con la incapacidad de las levaduras de los Ascomicetos *K. lactis* para crecer en medios limitados.

II.- Las levaduras de *U. maydis* presentan una amplia tolerancia al pH del medio independientemente del medio de cultivo. Sin embargo, en el medio mínimo los cultivos crecen mejor a pHs ligeramente ácidos (pH 3 a 6), mientras en el medio de YPD crecen mejor a pHs básicos (pH 5 a 8).

III.- En las condiciones de ensayo de actividad de la H⁺-ATPasa (Mes-KOH 125 mM, pH 6.5, glicerol 10 %, K⁺ fue de 65 mM 30° C), se encontró que la enzima que proviene de cultivos en medio mínimo tiene una constante de especificidad (V_{max}/K_m) 16.8 veces mayor a la enzima proveniente de medios de YPD. Además, la K_m disminuye 3,91 veces y la V_{max} incrementa casi tres veces su valor en las levaduras cultivadas en medios mínimos con respecto a los medios de YPD.

IV.- El pH óptimo para la H⁺-ATPasa proveniente de cultivos en medios mínimos es de 6.5. En esta condición se alcanza el mayor cociente V_{max}/K_m .

V.- A concentraciones menores de 80 mM los cationes monovalentes Na⁺ y K⁺ incrementan la afinidad de la enzima por el sustrato Mg-ATP, mientras la K_m no varía. Se encontraron dos pKs, que indican la participación de 2 grupos químicos fundamentales para la catálisis enzimática. El pK del primer grupo es de 5.5 que puede corresponder al pKa de un residuo de histidina o del grupo carboxilo de un residuo de aspártico o de glutámico inmerso en un ambiente hidrofóbico. El segundo pKa es 8.2. Se propone que el pKa

corresponde al grupo sulfhidrilo de la cadena lateral de un residuo de cisteína o al grupo amino de un residuo de lisina ubicado en un ambiente hidrofóbico.

VI.- Se encontró que el Mg-ADP actúa como un inhibidor competitivo contra el sustrato Mg-ATP y tiene una K_{ic} de 1.25 mM.

VII.- El vanadato muestra un patrón de inhibición competitiva contra el sustrato Mg-ATP con una K_{ic} $0.938 \pm 0.43 \mu\text{M}$, lo que conduce a plantear un modelo mixto en estado estacionario y equilibrio rápido BiBiUniUni Iso ping-pong.

VIII.- En el genoma de *U. maydis* existen dos secuencias génicas potencialmente codificantes para H^+ -ATPasas tipo P. Ambas secuencias agrupan en clados distintos, uno de los clados está localizado entre las H^+ -ATPasas fúngicas (gen UM02581,1), mientras el otro clado (donde se localiza la secuencia UM01205,1) queda más cercano a las rodofitas y las plantas vasculares, en comparación con los hongos.

IX.- Existe un mayor grado de similitud e identidad entre la H^+ -ATPasa Q4PBD2 (gen UM02581,1) con las H^+ -ATPasas tipo fúngico en comparación con la otra H^+ -ATPasa (gen UM01205,1) que muestra mayor similitud e identidad con las H^+ -ATPasas de plantas.

X.- A partir del análisis cladístico de las secuencias de las H^+ -ATPasas de eucariontes superiores y otras proteínas puede inferirse la existencia de un evento de duplicación génica previa a la diversificación de los hongos Ascomycotas y Basidiomycotas.

VII. BIBLIOGRAFIA

Alberts, B. B., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J. D. (1994) Molecular Biology of the cell. Garland Publish, Inc. New York, 1294 pp.

Alexopoulos, C.J., Mims, C, W. (1985) Introducción a la Micología. Primera edición. Ediciones Omega. España.

Agrios, G. N. (1978) Fitopatología. Tercera edición. Editorial Limusa. cfr. 493-515.

Altendorf, K., Siebers. A. and Epstein, W. (1992) The KDP ATPase of *E. coli*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 671: 228-243.

Amigo L., Moreno, E. y Lagunas, R (1993) In vivo inactivation of the yeast plasma membrane ATPase in the absence of exogenous catabolism. BBA 1151: 83-88.

Banuett, F. (1991) Genes required for filamentous growth and tumor induction by the corn smut fungus *Ustilago maydis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88: 3922-3926.

Banuett, F. (1992) *Ustilago maydis*, the delightful blight. Tig May. 8, 5, pp. 174-180.

Banuett, F. (1995) Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. Ann. Genet. 29: 179-208.

Banuett, F., and Herskowitz, I. (1996) Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. Devalopment. 122: 2965-2976.

Benito, B., Portillo, F. and Laguna, R. (1992) *In vivo* activation of the yeast plasma membrane ATPase during nitrogen starvation. FEBS Lett. 300: 271-274.

Becher dos Passos, J., Vanhalewyn, M., Lopes-Brandao, R., Castro, I., Nicoli, J. R., y Thevelein, J. M. (1992) Glucose-induced activation of plasma membrane H⁺-ATPase in mutants of the yeast *S. cerevisiae* affected in cAMP metabolism, cAMP-dependent protein phosphorylation and the initiation of glycolysis. BBA. 1136: 57-67.

Bölker, M., Urban, M., and Kahmann, R. (1992) The *a* mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. Cell. 68: 441-450.

Bölker Michael (2001) *Ustilago maydis* –a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology*. 147:1395-1401.

Bowman, B.J., Berenski, C. J. and Jung, C. Y. (1985) *J. Biol Chem*. 260: 8726-8730.

Brock Thomas, Madigan, M. T, Martinko J. M. and Parker J. (2002) *Biología de los microorganismos*. Décima edición. Pearson. Prentice Hall.

Brooker R. J. and Slayman C. W. Effects of Mg^{2+} ions on the plasma membrane (H^+)-ATPase of *Neurospora crassa*. Inhibition by N-ethylmaleimide and trypsin. (1983) *J. Biol. Chem*. 258: 148827-8832

Christensen, J. J. (1963) *Corn smut caused by Ustilago maydis*. Monograph no. 2. St Paul, MN: American Phytopathological Society.

Del Sorbo Giovanni, Schoonbeek Henk-jan and De Waard Maarten A. (2000) Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. *Fungal Genetics and Biology* 30: 1-15.

Eraso, P., and Gancedo, C. (1987) Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. *FEBS Lett*. 224: 187-192

Fernades, A. R., and Sá-Correia I. (2003) Transcription patterns of PMA1 and PMA2 genes activity of plasma membrane H^+ -ATPase in *Saccharomyces cerevisiae* during diauxic growth and stationary phase. *Yeast* 20:207-219.

Fiske, C. H., and Subbarow, Y. (1925) *J. Biol. Chem*. 66, 375–400 Gaber, R.F. *Int. Rev. Cytol*. 137, pp. 299–353.

Gianinazzi-Pearson, V., Smith, S. E., Gianinazzi, S, and Smith, F. A. (1991) Enzimatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrizas: V. Is H^+ -ATPase a component of ATP hidrolising enzyme activities in plant-fungus interfaces?. *New Phytol*. 117. 61-74.

Goffeau, A. and Slayman, C. (1981) The proton-translocating ATPase of the fungal plasma membrane. *Biochem Biphys Acta*. 639: 197-223.

Goormaghtigh, E., Chadwick, C., and Sacrborough, G. A. (1986) Monomers of the *Neurospora* plasma membrane H^+ -ATPase atalize efficient proton translocation. *Journal of Biological Chemistry*. 261. 16: 7466-7471.

Griogre Daniela and, Meade John. (2006) Functional complementation of the yeast P-Type H^+ -ATPase, PMA1, by the *Pneumocystis carinii* P-Type H^+ -ATPase PCA1. *Jour. Euk. Microb*. 53,157-164.

Guerra, Ma, G. Uribe, S. and Pardo J. P. P. (1995) Reactivity of the H⁺-ATPase from *Kluyveromyces lactis* to Sulfhydryl reagents. Arch. Biochem. Biophys. 321:101-107.

Hager, K.M., Mandala,S.M., Davenport,J.W., Speicher,D.W., Benz,E.J.Jr. and Slayman,C.W. (1986). Amino acid sequence of the plasma membrane ATPase of *Neurospora crassa*: deduction from genomic and cDNA sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83: 7693-7697.

Hennessey, J. P. Jr. and Scarborough, G. A. (1990) Direct evidence for the cytoplasmic location of the NH₂- and COOH- terminal ends of the *N. crassa*. plasma membrane H⁺-ATPase. J. Biol. Chem. 265. 1: 532-537.

Hernández, A., Cooke, D. T., and Clarkson D. T. (2002) In vivo activation of plasma membrane H⁺-ATPase hydrolytic activity by complex lipid-bound unsaturated fatty acids in *Ustilago maydis*. Eur. J. Biochem. FEBS. 269: 1006-1011.

Herrera, T. y Ulloa, M.(1998) El reino de los hongos. Micología básica y aplicada. Fondo de cultura económica. Capítulos 1, 2, 4, 8, 9 y 12. UNAM. México.

Holliday, R (1974) *Ustilago maydis*. In handbook of genetics pp.575-595. Edited by R. C. King. Plenum. New York.

Jacobs, C. W., Mattichak, S. K. and Knowles, J. F. (1994) Budding patterns during cell cycle of the maize smut pathogen *Ustilago maydis*.Can. J. Bot. 72:1675-1680.

Knowles, J.(1976). Critical reviews in biochemistry. November: 165-173.

Kühlbrandt, W., Zeelen, J. and Dietrich, J. (2002) Structure, mechanism and regulation of the *Neurospora* plasma membrane H⁺-ATPase. Science. 297: 1692-1696.

Koonin, E. V. (1997) Evidence for a family of Archaeal ATPases. Science. 275: 1489-1490.

Lutsenko, S. and Kaplan, J. H. (1995) Organization of P-Type ATPases: Significance of structural diversity. Biochemistry. 34. 48: 15608-15.

Malpartida, F., and Serrano, R. (1981) Proton translocation catalized by the purified yeast plasma membrane ATPase reconstituted in liposomas. FEBS Lett. 131: 351-354.

Mandala, S. and Slayman, C. (1989) The amino and carboxyl termini of the *Neurospora* plasma membrane H⁺-ATPase are cytoplasmically located. J. Biol. Chem. 264: 16276-16281

Martínez-Espinoza, A. D. García-Pedrajas, M. D., and Scott, E. G. (2002) The ustilaginales as plant pests and model systems. *Fung. Gen. Biol.* 35, 1-20.

Mason, A. B., Kardos, T. B., and Monk B. C. (1998) Regulation and pH-dependent expression of a bilaterally truncated yeast plasma membrane H⁺-ATPase. *Biochem. Biophys. Acta.*1372:261-271.

Medgen, K., and Hahn, M. (2003) Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *New Phytologist.* 159: 93-100.

Morsomme, P., Slayman, C., and Goffeau, A. (2000) Mutagenic study of the structure, function and biogenesis of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase. *BBA* 149: 133-157.

Morrone, J. (2005) *Sistemática, biogeografía y evolución. Los patrones de la biodiversidad en tiempo espacio.* Edit. Las prensas de Ciencias. México. D. F.

Möller, J. V., Juul, B., and Le Maire, M. (1996) Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *BBA.* 1286: 1-51.

Nafsika H. Georgopapadaku and Walsh Thomas (1996) Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 40,2 279-291.

Nakamoto, R. K., Rao, R., and Slayman C. W. (1989) Transmembrane segments of the P-type cation-transporting ATPases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*

Nelson, D. L. & Cox, M. M. (2000) *Lehninger principles of Biochemistry.* Third edition Worth publishers.

Pedersen, P. L. and Carafoli, E. (1987) Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function. *TIBS.* 12.4: 146-150.

Portillo, F., Larrinoa, I. F., and Serrano, R. (1989) Deletion analysis of yeast plasma membrane H⁺-ATPase and identification of a regulatory domain at the carboxyl-terminus. *FEBS Lett.* 247. 2: 381-385.

Portillo, F. (2000) Regulation of plasma membrane H⁺-ATPase in fungi and plants. *Biochem. Biophys. Acta.* 1469: 31-42.

Rao, R., Nakamoto, R. K., Verjovsky-Almeidas, S. and Slayman C. W. (1992) Structure and function of the yeast plasma-membrane H⁺-ATPase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 195-192.

Rao, R. and Slayman, C.W. (1996) Brambl, Marzluf (Eds.), *The Mycota*, vol. 3, Springer, Berlin, pp. 29–56.

Requena, N., Breuninges, M., Francen, P., and Ocón A. (2003) Symbiotic status, phosphate and sucrose regulate the expresión of two plasma membrane H⁺-ATPase genes from mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Plant Physiol.* 132: 1540-1549.

Scarborough, G. A. (1990) Identification of the mayor cytoplasmic regions of the *N. crassa* plasma membrane H⁺-ATPase using protein chemical techniques. *J. Biol. Chem.* 265. 25: 16145-16149.

Scarborough, G. A. (2000) Crystallization, structure and dynamics of the proton translocating P-type ATPase. *The Journal of Experimental Biology.* 203: 147-154.

Scarborough, G. A. (2000) Crystallization, structure and dynamics of the proton translocating P-type ATPase. *The Journal of Experimental Biology.* 203: 147-154.

Scarborough, G. A. (2003) Rethinking the P-type ATPase problem. *Trends in Biochemical Sciences.* Vol. 28; No. 11: 581-584.

Serrano, R. (1988) Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plants an fungi. *BBA.* 947: 1-28.

Serrano, R. (1989) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40, pp. 61–91.

Snetselarr, K. M., and Mims. (1992) C. W., Sporidial fusion and infection of maize seedings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia* 84: 193-203

Snetselaar, K. M. (1993) Microscopic observation of *Ustilago maydis* mating interactions. *Exp. Mycol.* 17:345-355.

Spellig, T., Bölker, M., Lottspeich, F., Frank, R. W and Kahmann, R. (1994) Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO.* 13:1620-1627.

Struck, C., Siebels C, Rommel, O., Wernitz, M. and Hahn M., (1998) The plasma membrane H⁺-ATPase from the biotrophic rust fungus *Uromyces fabae*: molecular characterization of the gene PMA1 and functional expression of the enzyme in yeast. *The American phytopathological Society.* 11: 458-465.

Sussman, M. R. and Slayman, C. W. (1982) Modification of the *Neurospora Crassa* plasma membrane (H⁺)-ATPase with N, N'-Dicyclohexylcarbodiimide. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol 258. No. 3: 1839-1843.

Tyson, Christina B. Lord, Peter, G., Wheals, Alan E. (1979). Dependency of size of *Saccharomyces cerevisiae* cells on growth rate. *Journal of Bacteriology*, 138: 1p. 92-98

Toyoshima C. and Nomura, H. (2002) Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature*, 418,605-611.

Vanoni M, Vai M, Popolo L and Alberghina L (1983) Structural Heterogeneity in populations of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* Dec. 1282-1291.

Voegelé, R. T., and Mendgen, K. (2003) Rust haustoria: nutrient uptake and beyond. *New phytologist*. 159, 93-100.

Waterfield, W, F y Sisler H. D, (1988) A convenient procedure for rapid release of protoplast from *Ustilago maydis*. *Biofeedback*.

Weissman, A., Berdicevsky, I., Cavari, B. Z., and Kornitzer, D. (1999) The high copper tolerance of *Candida albicans* is mediated by a P-type ATPase. *Proc. Nat. AS*. 97: 3520-3525.

White, D. G. (1999) *Compendium of corn diseases*, 3rd ed. APS Press. St. Paul.

William, J. R. and Koshland D. E. Jr. (1961) A Method for characterizing the type and number of groups involved in enzyme action. *The Journal of Biochemical Chemistry (JBC)*. 263: 1973-1979.

Wolfe, Kenneth H. (2006). Comparative genomics and genome evolution in yeasts. *Phil. Trans. R. Soc. B* 361: 403–412

VIII. APENDICE

Tabla I. Descripción de las tasas de crecimiento, los tiempos de generación y el incremento en la biomasa de las levaduras de *K. lactis* en los diferentes medios de cultivo. Los parámetros que describen el comportamiento de las curvas de crecimiento están abreviados según la nomenclatura de uso general en donde: k es la velocidad de crecimiento (número de generaciones / hora); g es el tiempo de generación (horas) y Δgr representa el incremento en biomasa (gramos / hora – litro).

Fase de crecimiento exponencial:		
	k	g
YPD	0.366 ± 0.012	1.88 ± 0.179
Mínimo	0.306 ± 0.037	2.26 ± 0.278

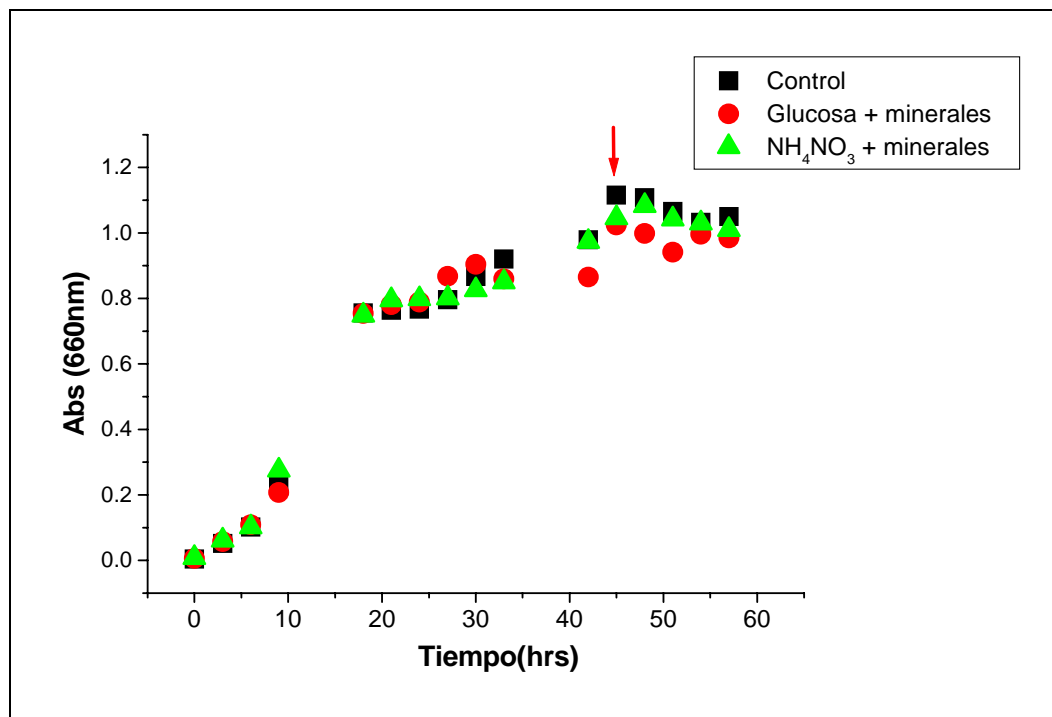


Figura I. Cinética de crecimiento de las levaduras de *U. maydis* para analizar el efecto de la adición de de 7 ml de fuentes de nitrógeno, carbono y sales exógenas durante su cultivo en medios cerrados. En la sección de materiales y métodos se describe la composición de cada uno de los medios.

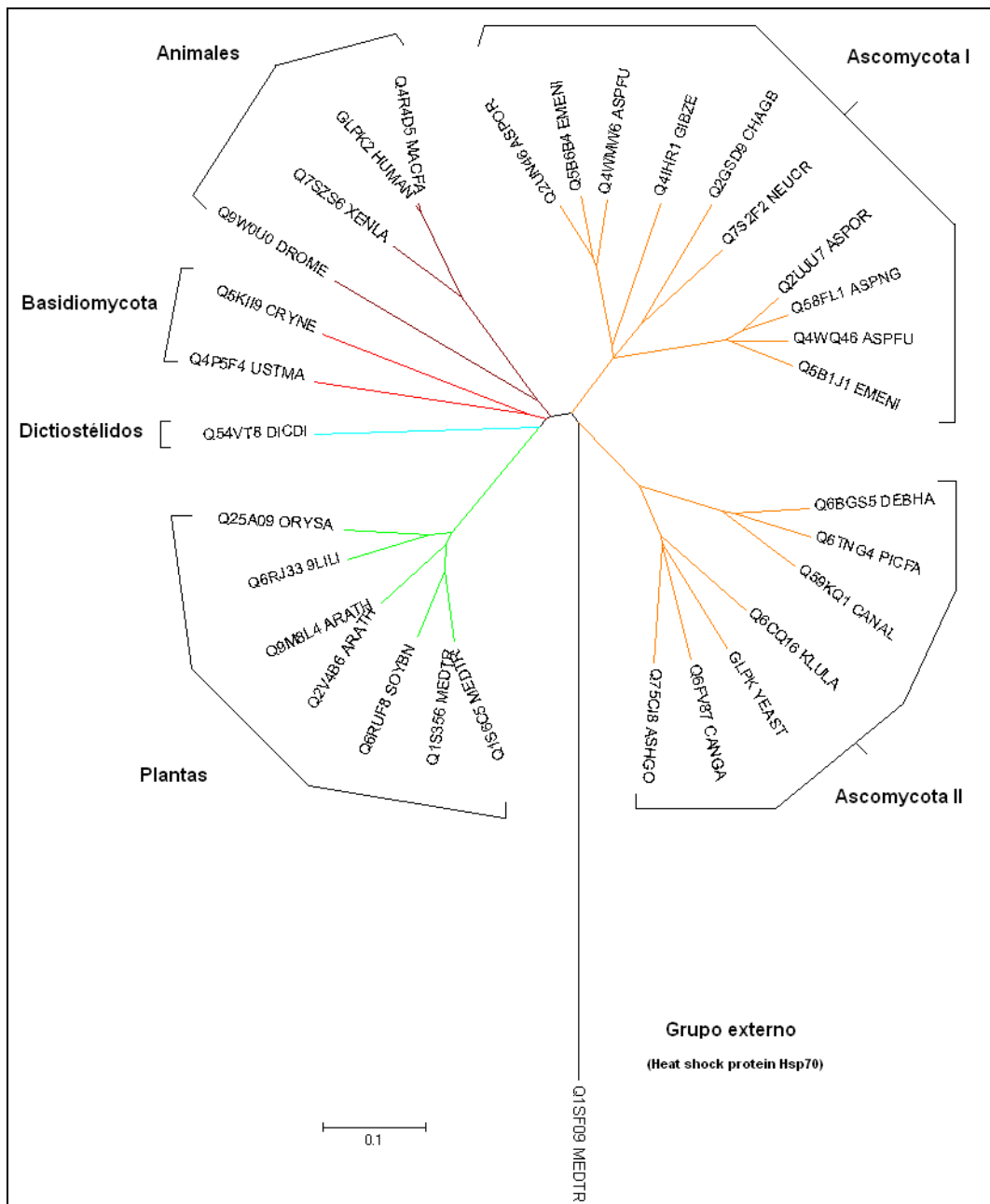


Figura III. Árbol cladista de mínima evolución mostrado en forma radiada no enraizada de 31 secuencias de la enzima glicerol cinasa. El cladograma de esta figura fue realizado utilizando una "astringencia" del 65% con las herramientas del programa MEGA 3.1, luego de ser alineadas las secuencias de manera simultánea e independiente con los programas Align X y CLUSTAL W 1.7 y ser editados los "gaps" (secciones de residuos de aminoácidos no conservadas) posteriormente con el programa BIOEDIT 7.0.

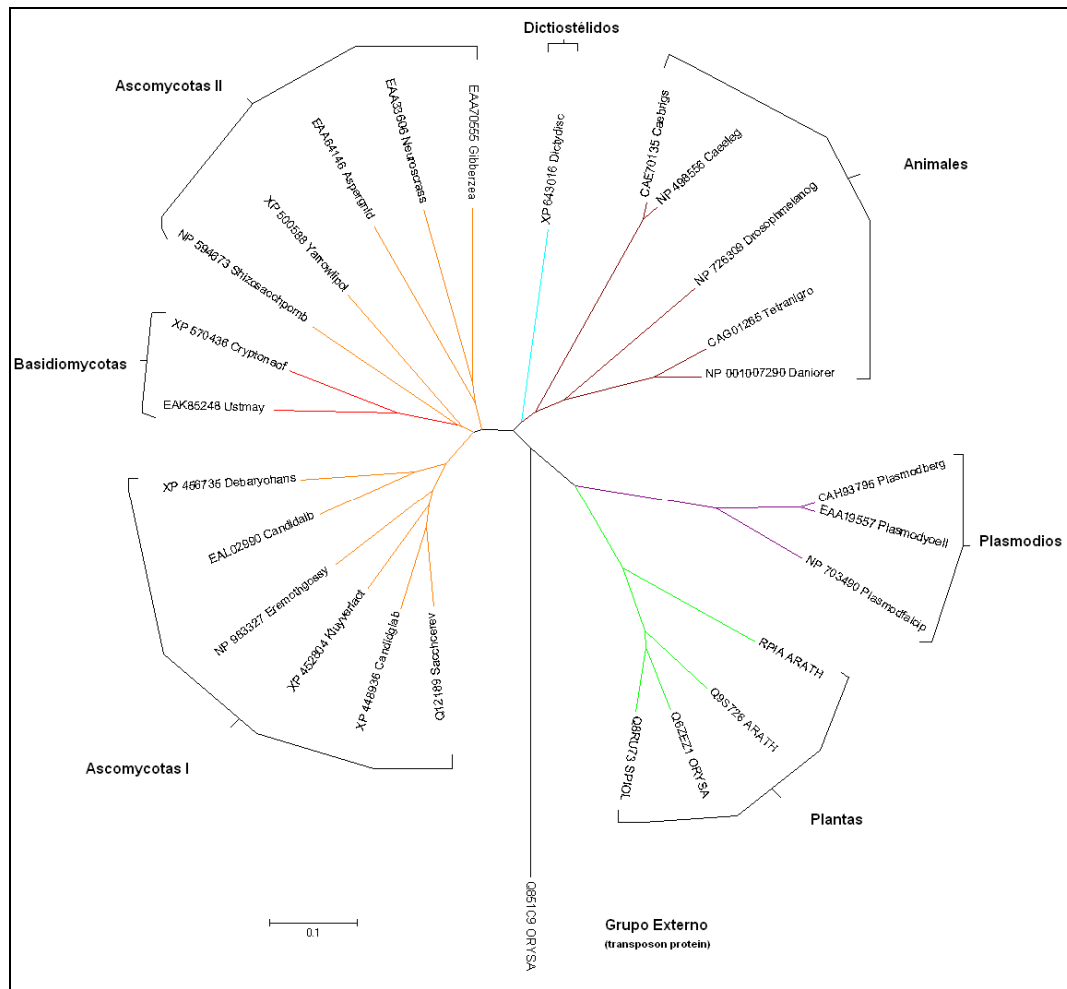


Figura IV. Árbol cladista de mínima evolución mostrado en forma radiada no enraizada de 27 secuencias de la enzima ribulosa 5-fosfato isomerasa. El cladograma de esta figura fue realizado utilizando una "astringencia" del 65% con las herramientas del programa MEGA 3.1, luego de ser alineadas las secuencias de manera simultánea e independiente con los programas Align X y CLUSTAL W 1.7 y ser editados los "gaps" (secciones de residuos de aminoácidos no conservadas) posteriormente con el programa BIOEDIT 7.0.

ABREVIATURAS

ADP	difosfato de adenosina
ATP	trifosfato de adenosina
ATPasa	Adenosintrifosfatasa
BSA	albúmina de suero bovino
DCCD	N, N'-d ciclohexilcarbodiimida
DIFP	Di-isopropil fluorofosfato
DMSO	dimetil sulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DOC	desoxicolato de sodio
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	ácido etilenglicol bis(2-aminoetileter)tetraacético
HEPES	ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etanolsulfónico
kDa	kilo daltones
MES	ácido 2(N-morfolino) enalsufónico
NAD ⁺	nicotinamida adenindinucleótido (oxidado)
NADH	nicotinamida adenindinucleótido (reducido)
NCD-4	4-ciclohexil-N'-(4-dimetilamino)naftilcarbodiimida
NEM	N-etilmaleimida
PK	piruvato cinasa
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
SDS	dodecil sulfato de sodio
TCA	ácido tricloroacético
TRIS	tris(hidroximetil)aminometano