



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



**Programa de Maestría y Doctorado
en Ciencias Bioquímicas**

Caracterización de la transición de la permeabilidad
mitocondrial en *Saccharomyces cerevisiae*

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

P R E S E N T A :

QFB. MANUEL GUTIÉRREZ AGUILAR

Tutor:

DR. SALVADOR URIBE CARVAJAL



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Reconocimientos

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección del Dr. Salvador Uribe Carvajal en el laboratorio 305 oriente del Departamento de Genética Molecular.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Salvador Uribe Carvajal Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dra. Xóchitl Pérez Martínez Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dr. Edmundo Chávez Cossio Instituto Nacional de Cardiología, SSA

Se reconoce la colaboración de la Dra. Varda Shoshan Barmatz, del National Institute for Biotechnology in the Negev, Israel por haber facilitado una estancia de investigación en su laboratorio.

Se reconoce la colaboración y asistencia de la Dra. Norma Corona de la Peña de la Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) por la colaboración en la planeación y ejecución de experimentos durante este proyecto.

Se reconoce la colaboración del Dr. Diego González Halphen, la QBP. Miriam Vázquez Acevedo y de la Dra. Yolanda Camacho Villasana por la ayuda y asesoría durante este proyecto.

Finalmente, se reconoce el apoyo técnico y logístico de Ramón Méndez, Rocío Romualdo, Leticia García y Sara Noguera.

El sustentante gozó de una beca para realizar los estudios de doctorado otorgada por CONACYT y de apoyos otorgados por la DGEP-UNAM para la realización de la presente tesis.

La defensa oral de este trabajo de tesis fue presentada el día _____.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente Dra. Marietta Tuena Sangri Instituto de Fisiología Celular,
UNAM

Vocal Dr. Edmundo Chávez Cossio Instituto Nacional de Cardiología,
SSA

Secretario Dra. Marina Gavilanes Ruiz Facultad de Química, UNAM

Suplente Dra. Ma. Soledad Funes Argüello Instituto de Fisiología Celular,
UNAM

Suplente Dr. José de Jesús García Trejo Facultad de Química, UNAM

Dedicatoria

A Isabel, Carlos y Claudine por ser los patrocinadores no oficiales de la tesis...

A Juan Cristóbal, Natasha, Carlos, Lucy (+ María Lucía) con pasión playera!

A la moglita! (Pongo el alias para que se nos haga, caray!)

A toda mi familia por ser a todo mecate

A mis amigos por existir, por la carrilla y por darle sazón a la vida ;)

Al Tenek (mi perro)

Muchas gracias a todo el equipo del laboratorio 305 Oriente del Instituto de Fisiología Celular: Daniela, Luis Alberto, Armando, Rodrigo, Ramón, Sergio, Alfredo, Juan y Gisela por haberme aguantado durante todos estos años llenos de congresos, seminarios, días buenos y malos para la ciencia. Al grupo del laboratorio 302 del departamento de Ciencias de la Vida en la Universidad Ben Gurion. En especial a Shay, Nurit, Tal, Keshet, Nir, Elanite y Danya. Muchas gracias a Jose Manuelito Solis, Julio Zapata, Bertha Zapata, Paty Zapata y sobre todo a Stephanie Henaro por su apoyo en los momentos mas difíciles! A mis amigos de la vida: Victor, Juan, Enrique, Javier, Amanda, Ixchel, Morris, Anzo y Bruce (donde quiera que estés)!

...a la Universidad Nacional Autónoma de México.

A MI PADRE LEONARDO

Tabla de Contenido

<i>Resumen</i>	9
<i>¿Qué es y para que sirve la Bioenergética?</i>	11
<i>La Mitochondria</i>	13
<i>La Hipótesis Quimiosmótica</i>	15
<i>La Fosforilación Oxidativa</i>	20
<i>La Cadena Respiratoria de <u>Saccharomyces</u></i> <i><u>cerevisiae</u></i>	20
<i>Transporte de Iones y Metabolitos en las Mitochondrias de <u>Saccharomyces</u></i> <i><u>cerevisiae</u></i>	25
<i>Canales Inespecíficos Mitocondriales</i>	33
<i>El Poro de Transición de la Permeabilidad Mitocondrial (PTP)</i>	34
<i>El Canal Inespecífico de Mitochondrias de Levadura</i> <i>(<u>scMUC</u>)</i>	38
<i>Función y Estructura del <u>scMUC</u></i>	41
<i>Hipótesis</i>	43
<i>Objetivos</i>	44

<i>Materiales y Métodos</i>	45
<i>Materiales y Reactivos</i>	45
<i>Características Genéticas de las Cepas Utilizadas</i>	45
<i>Cultivo de Levaduras</i>	46
<i>Obtención de Mitocondrias</i>	50
<i>Determinación de la Concentración de Proteína</i>	50
<i>Consumo de Oxígeno</i>	51
<i>Diferencia de Potencial Transmembranal ($\Delta\Psi$)</i>	53
<i>Hinchamiento Mitocondrial</i>	53
<i>Resultados</i>	55
<i>Discusión</i>	81
<i>Conclusiones</i>	85
<i>Referencias</i>	87

Resumen

En mitocondrias de diversas especies existe un poro inespecífico que al abrirse fomenta el transporte no selectivo de solutos, despolarizando al organelo y originando el colapso energético de la célula. En levaduras se ha observado un canal mitocondrial inespecífico también llamado *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondrial Unselective Channel (YMUC o s_c MUC). En mamíferos, a un canal probablemente equivalente se le ha denominado poro de transición de la permeabilidad (m PTP o m MUC). En la actualidad, tanto la estructura como la probable función de los MUCs son tema de estudio. En levaduras, se ha observado que cationes como el Ca^{2+} y la octilguanidina y aniones como el fosfato pueden cerrar el MUC. Sin embargo, el sitio con el cual interactúan para llevar a cabo estos efectos no ha sido establecido. Esto permitiría dilucidar la composición protéica del poro. El objetivo de esta tesis fue determinar componentes de este canal por medio de experimentos tales como medición del consumo de oxígeno, potencial transmembranal e hinchamiento de mitocondrias aisladas de *Saccharomyces cerevisiae* de cepas silvestres y mutantes carentes de ciertas proteínas mitocondriales. Se propone que tanto el Canal Aniónico Dependiente de Voltaje (VDAC) como el acarreador de fosfato mitocondrial (Pic) son componentes del s_c MUC ya que al ser eliminados genéticamente, se pierde la regulación del canal por cationes y por ligandos del acarreador de fosfato.

¿Qué es y para que sirve la Bioenergética?

En la célula existe una gran variedad de reacciones que liberan o requieren energía. La rama de la Bioquímica dedicada al estudio del flujo de energía en la célula recibe el nombre de Bioenergética. Entre algunos ejemplos de fenómenos estudiados por la Bioenergética sobresalen aquellos relacionados con la obtención de energía a partir de la oxidación de fuentes de carbono o la absorción de luz y su uso en la síntesis de intermediarios químicos que almacenan energía. Estos estudios han sido posibles gracias al refinamiento de técnicas como la medición de actividades enzimáticas en extractos celulares y en organelos aislados [Mosley y Schneider, 1959; Peña y cols., 1977]. Estas técnicas son combinadas con herramientas como la Biología Molecular, la Química de Proteínas, la Cristalografía, la Microscopía y la Bioinformática. Con esto, los estudios de organelos productores de energía tales como las mitocondrias han sido considerablemente enriquecidos y han llevado a diversos grupos de investigación a proponer modificaciones a modelos como la Teoría Quimiosmótica. Esta teoría permite predecir el comportamiento energético de la mitocondria en condiciones de homeostasis celular. Sin embargo, en algunas condiciones fisiológicas o patológicas, la mitocondria sufre cambios que no explica esta teoría. Esto ha llevado a tener que considerar a la mitocondria como un organelo inestable, pues opera muy cerca de los límites de su diseño. Esto implica que es un organelo muy susceptible a sufrir daños, con serias consecuencias para la supervivencia de la célula [Nicholls y Ferguson, 2001]. Entre los desórdenes asociados al mal funcionamiento de las mitocondrias de mamíferos, se encuentran patologías tales como el daño por isquemia-reperfusión [Correa y cols., 2007; Lemasters, 2007; Pavon y cols., 2009; Zazueta y cols., 2007], ciertos tipos de cáncer [Pedersen, 2008] y de muerte

celular inducida por virus, toxinas y desórdenes metabólicos tales como la diabetes [Fujimoto y cols., 2010; Jacotot y cols., 2000; Rigoni y cols., 2008]

Algunos de los padecimientos mencionados con anterioridad coinciden con la inducción de la transición de la permeabilidad mitocondrial: Una condición en donde la mitocondria se transforma de un organelo generador a uno consumidor de energía.

Abstract

The mitochondrial permeability transition (PT) involves the opening of a mitochondrial unselective channel (MUC) resulting in membrane depolarization and increased permeability to ions and metabolites. PT has been observed in many, but not all eukaryotic species. In some species, PT onset has been linked to cell death, although other roles, such as matrix ion detoxification or regulation of the rate of oxygen consumption have been considered. The identification of the proteins constituting these channels would help to understand the biochemistry and physiology of the resulting permeability transition. It has been suggested that the mitochondrial Voltage Dependent Anion Channel (VDAC) and the Phosphate Carrier (Pic) are components of this channel. In *Saccharomyces cerevisiae*, cations such as Ca^{2+} and octylguanidine and anions such as phosphate and decavanadate are known to close the s_c MUC. The site of interaction of such ions has not been established. To determine possible s_c MUC components, oxygen consumption, transmembrane potential and the swelling of isolated mitochondria from wild type and mutant strains were monitored under diverse conditions. In the present work, VDAC and the Pic are proposed to be components of this pore since upon deletion of such proteins some properties of the resulting channel are modified.

La Mitochondria

Una de las características más importantes de las células de origen eucarionte es la presencia de organelos con funciones específicas y de un núcleo bien definido. Entre estos organelos, figuran las mitocondrias, descubiertas en forma de gránulos en preparaciones de músculo por Kölliker (1857). El término mitocondria fue posteriormente acuñado por Carl Benda derivado de los vocablos griegos *mitos* (filamento) y *condros* (gránulo).

La estructura de la mitocondria fue dilucidada en gran parte gracias a los trabajos de Sjöstrand, en los que pudo observar que la mitocondria está compuesta por dos membranas y dos compartimentos: La membrana externa mitocondrial (MEM), la membrana interna mitocondrial (MIM), el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial [Sjostrand, 1978]. La MIM puede formar plegamientos, conocidos como crestas mitocondriales y a este tipo de membrana se le conoce como membrana cretal. Actualmente se piensa que la función de la membrana cretal es la de proveer a la mitocondria de una amplia superficie de reacción en un volumen mínimo para maximizar la eficiencia de la fosforilación oxidativa, que es uno de los procesos de mayor importancia en la mitocondria [Mannella y cols., 2001]. Recientemente se ha demostrado por medio de técnicas como la reconstrucción tridimensional por tomografía computarizada, que las crestas mitocondriales se encuentran formando túbulos que cambian constantemente en función de los requerimientos energéticos de la célula y en conjunto con procesos como la fusión y la fisión mitocondrial [Frey y Mannella, 2000]. De igual forma se ha propuesto que las mitocondrias pueden formar fibras o cables a

través del citoplasma para transportar la energía a través de la célula [Skulachev, 2001]. Esto implica que las mitocondrias interactúan con diversos componentes celulares tales como el retículo endoplásmico, el núcleo y componentes del citoesqueleto tales como la actina y la tubulina, modulando su función en coordinación con los requerimientos de la célula [Lamarca y Scorrano, 2009; Rostovtseva y Bezrukov, 2008; Rostovtseva y cols., 2008; Rostovtseva y cols., 2005; Shprung y Gozes, 2009].

Las mitocondrias contienen su propio genoma y ribosomas, sin embargo, alrededor del 2% de las proteínas mitocondriales son codificadas por el organelo. El resto de las proteínas mitocondriales son transcritas en el núcleo, traducidas en ribosomas citoplásmicos y translocadas a la mitocondria por medio de una compleja maquinaria de importación [Pfanner y cols., 1997; Pfanner y Meijer, 1997; Reinders y cols., 2006; Sickmann y cols., 2003]. Un análisis del proteoma mitocondrial ha identificado alrededor de 800 proteínas en el organelo, mientras que en el caso de humanos, han sido detectadas cerca de 1500 proteínas [Schmitt y cols., 2006]. Para que la mayoría de estas proteínas puedan ser translocadas a la mitocondria, éstas requieren una presecuencia primaria de importación [Vögtle y cols., 2009]. A pesar de que las presecuencias pueden ser considerablemente variables en extensión y composición de aminoácidos, se piensa que logran llegar a la mitocondria mediante la atracción dada por cargas formales positivas en algunos casos y con ayuda de chaperoninas en otros [Wickner y Schekman, 2005]. Un análisis extensivo del segmento N-terminal de proteínas mitocondriales sugiere que cerca del 70% de 615 proteínas mitocondriales estudiadas poseen presecuencias de entre 6 y 90 aminoácidos en el intervalo de carga neta de 3^+ a 6^+ [Vogtle y cols., 2009]. Esto hace que la proteína no plegada sea dirigida a la mitocondria y reconocida por proteínas

translocadoras en la membrana externa. Estas proteínas pertenecen al complejo de las translocasas de la membrana externa (TOM) [Rehling y cols., 2003].

Por poseer ribosomas, porinas y un genoma circular similares a los detectados en α -proteobacterias, se piensa que las mitocondrias son el producto de la endosimbiosis de un microorganismo con metabolismo respiratorio con una célula con metabolismo anaeróbico. Sin embargo, la forma como se dio este proceso no es clara y ha sido tema de constante debate [Cavalier-Smith, 2010; Gray y cols., 1999; Lang y cols., 1999]. Otra hipótesis propone que tanto la célula huésped como la α -proteobacteria manifestaban un metabolismo facultativo y la única ventaja selectiva producto de esta simbiosis fue la de la mayor eficiencia del metabolismo que representa la compartimentalización de la “mitocondria primitiva” [Cavalier-Smith, 2002]. En esta relación, la célula huésped dotó a la mitocondria primitiva de fosfatidilcolina para la síntesis de su membrana externa en vez de lipopolisacáridos. También fue necesario el establecimiento de un sistema de control de la expresión de proteínas del nuevo organelo. Para ello, se dio un proceso de migración e integración de genes mitocondriales en el genoma de la célula huésped. Una vez expresadas, las proteínas eran importadas a la mitocondria mediante una maquinaria de importación de proteínas la cual probablemente fue una adaptación de la maquinaria de exportación de proteínas de la bacteria [Cavalier-Smith, 2006; Endo y cols., 2003]. A pesar de las múltiples ventajas tanto energéticas como metabólicas obtenidas a partir de esta asociación simbiótica [Dyall y cols., 2004], la presencia de un organelo altamente oxidativo en el interior de la célula eucariote ancestral suponía daños constantes a macromoléculas y por ende a la estabilidad del organismo. En este sentido, la producción de defensas antioxidantes y la aparición de mecanismos de muerte celular programada

(apoptosis) fueron surgiendo en los organismos mas aptos para subsistir [Gomes y cols., 2008; Pereira y cols., 2008].

La Hipótesis Quimiosmótica

A pesar de haber sido descubierta desde hace 150 años, la función de la mitocondria en la célula permaneció desconocida durante cerca de un siglo. El trabajo pionero de Lehninger y Kennedy en el campo de la Bioenergética celular logró demostrar que la mitocondria es el sitio en el que numerosos substratos como ácidos grasos y nucleótidos de nicotinamida son oxidados para fosforilar moléculas de ADP y formar el ATP utilizado en múltiples procesos celulares. Estos resultados contribuyeron al desarrollo del conocimiento en el campo de la fosforilación oxidativa mitocondrial [Hogeboom y cols., 1947; Hogeboom y cols., 1948; Kennedy y Lehninger, 1950]. Sin embargo la conexión entre la oxidación de substratos y la fosforilación del ADP no era evidente y dio origen a varias propuestas entre las que destacan la teoría conformacional de Boyer, la Hipótesis química de Slater y la entonces Hipótesis Quimiosmótica de Mitchell [Nicholls y Ferguson, 2001]. En la actualidad, esta última es la que ha recibido mas soporte experimental [Heberle y cols., 1994] y es hoy conocida como la Teoría Quimiosmótica [Mitchell y Moyle, 1967; Mitchell y Moyle, 1969]. Esta puede ser resumida en cuatro postulados:

- 1) La ATPasa localizada en las membranas mitocondriales funge como factor acoplante entre la translocación de protones a través de la membrana y la síntesis de ATP a partir de ADP + Pi.

- 2) Los sistemas óxido-reductores localizados en las membranas mitocondriales catalizan el flujo de equivalentes reductores entre sustratos con diferente potencial redox acoplándolo a la translocación de protones a través de la membrana.
- 3) En las membranas mitocondriales existen sistemas acarreadores-translocadores de sustratos específicos que permiten el intercambio regulado de aniones con OH^- y cationes contra H^+ . La función normal de estos sistemas es permitir la entrada y salida de metabolitos esenciales para preservar la homeostasis del organelo sin colapsar el potencial de membrana.
- 4) Los sistemas descritos en 1, 2 y 3 se localizan en una membrana especializada la cual permite el acoplamiento de los procesos anteriores al poseer una baja permeabilidad a protones, aniones y cationes en general.

Inicialmente, la hipótesis quimiosmótica dio lugar a un acalorada polémica debido a que en la década de los sesenta, la existencia de un potencial de membrana en la mitocondria no era un fenómeno ampliamente aceptado o demostrado [Bernardi, 1999]. Sin embargo, en la actualidad es comúnmente reconocido que la conservación de la energía en la mitocondria depende de la separación de cargas a través de las membranas mitocondriales. Los equivalentes reductores (usualmente en forma de piridín nucleótidos reducidos) son utilizados por complejos enzimáticos para generar un flujo vectorial de protones a través de una membrana relativamente impermeable, lo cual origina una diferencia de potencial electroquímico de protones que se traduce en trabajo y se conoce como fuerza protonmotriz [Bernardi y cols., 1998; Mitchell y Moyle, 1967]. Ésta puede ser deducida en términos termodinámicos:

a) Al considerar el cambio en la energía de Gibbs (ΔG) a partir de la transferencia de 1 mol de protones a través de una membrana de concentración $[H^+]_A$ a una concentración $[H^+]_B$ tenemos que:

$$\Delta G = 2.3 RT \log_{10} ([H^+]_A/[H^+]_B) \quad (1)$$

donde R es la constante de los gases y T la temperatura del proceso.

b) La translocación de protones genera un valor diferencial tanto de concentración como de carga, por lo tanto, el cambio en la energía de translocación también estará afectado por la diferencia de cargas a través de la membrana:

$$\Delta G = -mF\Delta\Psi \quad (2)$$

donde “m” es el número de moles implicados en el proceso, “F” es la constante de Faraday y $\Delta\Psi$ es la diferencia de cargas entre dos compartimentos.

c) Esto significa que la energía libre asociada a la translocación de 1 mol de protones estará establecida tanto por el componente químico como el eléctrico descritos anteriormente por lo que al sumar (1) y (2) tenemos:

$$\Delta G \text{ (kJmol}^{-1}\text{)} = 2.3 RT \log_{10} ([H^+]_A/[H^+]_B) - F\Delta\Psi \quad (3)$$

d) Debido a que ΔG es la expresión del gradiente electroquímico de protones, es común encontrarlo definido como $\Delta\mu_{\text{H}^+}$. En el caso específico del gradiente electroquímico de protones, es mucho más fácil considerar la diferencial como una diferencia de pH ó ΔpH , por lo tanto tenemos:

$$\Delta\mu_{\text{H}^+} = 2.3 RT \Delta\text{pH} - F\Delta\Psi \quad (4)$$

e) Para poder comparar con relativa facilidad la energía debida al gradiente electroquímico de protones con las diferencias de potencial redox de las especies oxidadas por los sistemas óxido reductores anclados en la membrana (postulado 2), Mitchell acuñó el término fuerza protón-motriz la cual es medida en unidades de voltaje. Esto es posible al dividir la ecuación (4) por la constante de Faraday (96485.32 Cmol⁻¹). Por lo tanto, cuando sustituimos R y T por 8.3 kJ/mol y 298.15 obtenemos:

$$\Delta p \text{ (mV)} = -(\Delta\mu_{\text{H}^+})/F \quad (5)$$

$$\Delta p \text{ (mV)} = \Delta\Psi - 59\Delta\text{pH} \quad (6)$$

A esta última expresión se le conoce como fuerza protón motriz y permite determinar el trabajo que puede llegar a desarrollar la mitocondria. Una forma de convertir dicho potencial en energía, es mediante la síntesis de moléculas cuya hidrólisis genere energía como es el caso del trifosfato de adenosina (ATP). La síntesis de este tipo de moléculas en membranas biológicas puede ser explicada, de acuerdo con los puntos 1 y 2 de la Teoría Quimiosmótica, mediante una analogía con un circuito eléctrico: En

ambos sistemas se origina una diferencia de potencial, el cual puede ser expresado en unidades de milivoltios [Nicholls y Ferguson, 2001]. La corriente en ambos “circuitos” está regida por la ley de Ohm y por lo tanto, en ambos sistemas se puede originar un corto circuito. En el caso de una batería, uniendo ambos polos con un cable, y en el caso de una membrana biológica, con un protonóforo (un agente soluble en membranas con una elevada constante de protonación). Aunque la analogía no es del todo cierta, la mitocondria presenta un comportamiento no óhmico. Esto permite comprender de una manera más sencilla el funcionamiento de un circuito protónico (Fig. 1).

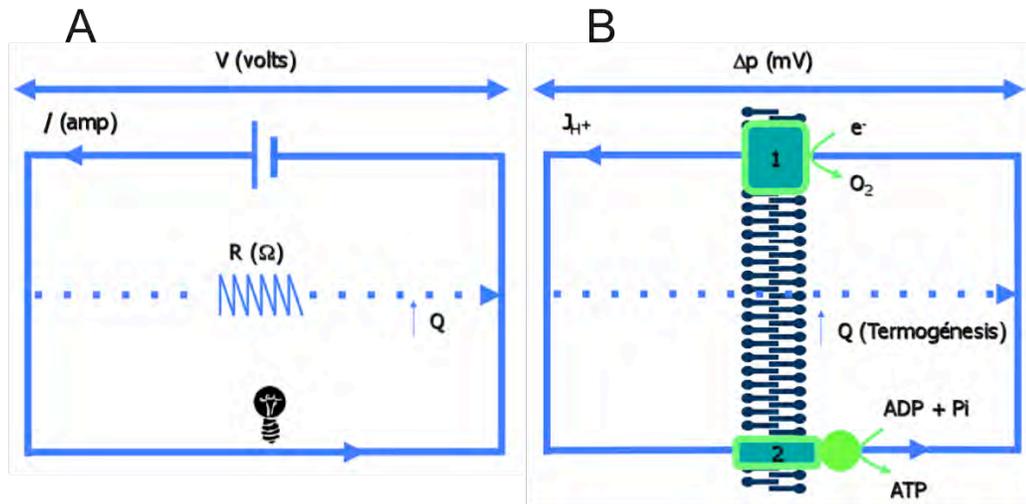


Fig. 1. Analogía entre un circuito eléctrico (A) y electroquímico de protones (B). En ambos casos, una diferencia de potencial eléctrico (A) y electroquímico (B) puede ser utilizada en un circuito para que el flujo controlado de corriente (A) y protones (B) pueda ser utilizado para generar trabajo en forma de luz (A) y ATP (B). Al inducir un corto circuito mediante un cable con una resistencia (A) o por medio de un protonóforo que pueda transportar los protones a través de una membrana (B) se induce una disipación del trabajo en forma de calor. (1) La corriente de protones es generada por una bomba dependiente de la oxidación de sustratos respiratorios y la consiguiente reducción de aceptores finales como el O_2 . (2) El gradiente electroquímico es utilizado para la síntesis de ATP (Modificado de Nicholls y Ferguson, 2001).

En las membranas tanto mitocondriales como tilacoidales, no sólo se mantiene el flujo de protones, sino que también se transportan iones y metabolitos mediante

uniportadores, simportadores y antiportadores. Esto es de particular relevancia debido a que el transporte de una especie presentará diversos requerimientos en función de las condiciones de cada uno de los compartimentos por los que se lleve a cabo.

La Fosforilación Oxidativa

En la mitocondria, la producción de ATP está acoplada a una cascada de reacciones redox que ocurren en el espacio crestal de la membrana interna. La donación de electrones se lleva a cabo desde especies con potencial de óxido-reducción más negativo hacia especies con uno menos negativo. En *S. cerevisiae*, esta cascada de reacciones es catalizada por 5 diferentes enzimas y dos complejos enzimáticos. Entre estas enzimas destacan las deshidrogenasas alternas de NADH, glicerol-3-Pi deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa. Por otra parte, *S. cerevisiae* tiene dos bombas primarias cuya función es la de translocar protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembranal. El gradiente electroquímico de protones generado, es “descargado” por un complejo enzimático denominado complejo F_0F_1 , ATPsintasa o complejo V que lo utiliza para la síntesis de ATP. En ausencia de un gradiente de protones preestablecido, el complejo V hidroliza al ATP formando $ADP + Pi$ con el consiguiente bombeo de H^+ en dirección vectorial contraria a la usada para la síntesis [Nicholls y Ferguson, 2001].

La Cadena Respiratoria de Saccharomyces cerevisiae

La levadura del pan presenta una cadena respiratoria con los sitios (bombas primarias) II, III y los complejos respiratorios del II al V. Sin embargo, este microorganismo presenta ciertas diferencias en cuanto a los componentes respiratorios presentes con respecto a otros organismos como en mitocondrias de mamíferos. Una de las diferencias más evidentes, es la ausencia del complejo respiratorio I también llamado NADH:Ubiquinona óxido reductasa. En su lugar, la levadura *S. cerevisiae* expresa tres NADH deshidrogenasas alternas: una en la parte interna de la membrana interna mitocondrial, también conocida como Nd1p, y dos en la parte externa de la membrana interna mitocondrial conocidas como Nde1p y Nde2p [Bunoust y cols., 2005]. Las NADH deshidrogenasas alternas se caracterizan por no translocar protones [Grandier-Vazeille y cols., 2001; Luttk y cols., 1998]. Adicionalmente, *S. cerevisiae* expresa otras tres deshidrogenasas que favorecen la reducción de moléculas de ubiquinona situadas en una poza bien localizada: Una alcohol deshidrogenasa matricial Adh3, la succinato deshidrogenasa del ciclo de Krebs (complejo II) y una glicerol-3-Fosfato deshidrogenasa. Esta última cataliza la oxidación de una molécula de NADH y la reducción de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a una molécula de glicerol-3-fosfato (G3P). El G3P difunde por una lanzadera a la membrana interna mitocondrial y reduce una molécula de flavina del complejo respiratorio II como se describirá a continuación. Este proceso regenera una molécula de DHAP, la cual difunde al espacio intermembranal [Bunoust y cols., 2005]. En condiciones aerobias, estas deshidrogenasas constituyen sistemas para regular el exceso de NADH mitocondrial, oxidándolo tanto en el espacio intermembranal, como en la matriz mitocondrial y alimentando a la cadena de transporte de electrones.

La cadena respiratoria también puede ser alimentada de electrones provenientes del Ciclo de Krebs: El complejo respiratorio II está involucrado en la oxidación de una molécula de succinato para producir fumarato. Los electrones son canalizados a través de otras tres subunidades del complejo II, transfiriendo los electrones del succinato a la CoQ, formando una molécula de quinol con la ayuda de una molécula de un dinucleótido de flavina y adenina unida covalentemente a 3 centros de Rieske y a un citocromo que absorbe a 560 nm. Este complejo no contribuye a la generación de Δp de manera directa pues no transloca protones. El transporte de electrones en este complejo puede ser inhibido por malonate, el cual es un dicarboxilato sintético [Hagerhall, 1997]. Los electrones del quinol son donados al complejo respiratorio III ó ubiquinol:citocromo c óxido reductasa, regenerando la quinona.

El complejo III de la cadena transportadora de electrones cataliza la transferencia de un electrón de una molécula de ubiquinol a un centro de Rieske, el cual transfiere el electrón ganado al citocromo c_1 . La oxidación parcial de la molécula de ubiquinol origina un radical: Ubisemiquinona. Este radical reside en el sitio N del complejo respiratorio (del lado cercano a la matriz mitocondrial) en donde es oxidado para reducir secuencialmente a dos citocromos del tipo b : Uno con máximo de absorción a 566 nm, el cual transfiere el electrón ganado al citocromo b_{560} . En un segundo ciclo redox, otra molécula de quinol (producido por una de las 6 deshidrogenasas mencionadas con anterioridad) reduce el centro de Rieske y transfiere el electrón al citocromo c_1 . El segundo electrón reduce a la molécula de semiquinona formada con anterioridad para formar una molécula de quinol usada para reiniciar el ciclo. Esta transferencia está acoplada a la translocación de los protones donados por cada molécula de quinol durante

las oxidaciones. A este mecanismo se le denomina Ciclo Q. Su función es inhibida por antimicina, la cual actúa en el sitio N (citocromo b_{566}) y por mixotiazol o estigmatelina en el sitio P [Trumpower, 1990]. El citocromo *c* es una proteína periférica en la cara externa de la membrana interna mitocondrial, encargada de la transferencia de electrones entre el complejo III y el IV, también llamado citocromo oxidasa.

La citocromo oxidasa es la enzima terminal de la cadena de transporte de electrones. Su función es la de favorecer la reducción de medio mol de O_2 para generar un mol de H_2O . [Babcock, 1999; Zhen y cols., 1999]. Los protones translocados son obtenidos de la matriz mitocondrial (lado N) de la membrana, mientras que los electrones donados por el citocromo *c* provienen del espacio intermembranal o lado P a través de dos canales: D y K nombrados por los aminoácidos correspondientes y que son esenciales para la translocación. Esto es de particular relevancia debido a que se está generando una diferencia de pH, por un lado producto de la reducción del $\frac{1}{2} O_2$ a H_2O y por otro, debido a la translocación de protones al espacio intermembranal [Saraste, 1999]. Como fue mencionado con anterioridad, el proceso concluye cuando el aceptor final de electrones (en este caso el O_2) es reducido. El gradiente de protones formado a través de la membrana interna mitocondrial es utilizado por el complejo V ó ATPsintasa para sintetizar ATP.

La F_1F_0 ATPasa es la enzima encargada de la síntesis de trifosfato de adenosina (ATP) a partir de difosfato de adenosina (ADP) y fosfato (Pi) gracias a la fuerza protón-motriz generada por la translocación de protones a través de la subunidad F_0 a nivel de la

cadena respiratoria. Cuando no existe dicha fuerza protonmotriz, la ATPasa cataliza la hidrólisis del ATP a ADP [Abrahams y cols., 1994].

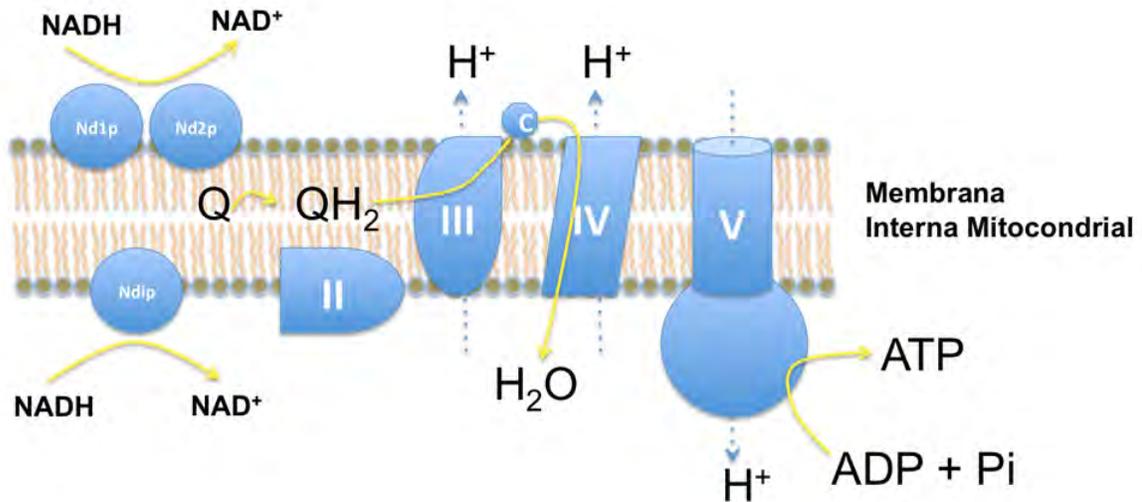


Fig. 2. Complejos enzimáticos de la membrana interna mitocondrial de *S. cerevisiae* asociados a la fosforilación oxidativa. *S. cerevisiae* no presenta complejo I (NADH:ubiquinona óxido reductasa), pero tiene dos NADH deshidrogenasas externas (Nde1p y Nde2p) y una interna (Ndi1p). El complejo II es la succinato deshidrogenasa. El gradiente de protones generado en los complejos III y IV (ubiquinol-citocromo *c* óxido reductasa y citocromo oxidasa) es utilizado en la síntesis de ATP por la ATP sintasa (complejo V). La línea continua esquematiza el flujo de los electrones. Las flechas discontinuas, la dirección de la translocación de los protones. Q: poza de quinonas. QH₂: quinol. C: citocromo *c*.

Transporte de Iones y Metabolitos en las Mitocondrias de *S. cerevisiae*

De acuerdo al tercer postulado de la Hipótesis Quimiosmótica, el establecimiento de una diferencia de potencial a través de la membrana interna en la mitocondria sirve para favorecer el transporte de cationes como el K⁺ y de aniones como Pi, nucleótidos, dinucleótidos y dicarboxilatos mediante sistemas transportadores con elevada especificidad de sustrato [Castrejon y cols., 1997; Mitchell y Moyle, 1967]. Esto hace

posible que procesos y vías tales como el intercambio de Na^+ , K^+ y H^+ , la biosíntesis de aminoácidos, el ciclo del glioxilato y la biogénesis mitocondrial puedan llevarse a cabo y con ello contribuir a la homeostasis celular [Barros y cols.; Gosling y Duggan, 1971; van der Laan y cols., 2010; Welihinda y cols., 1993].

Una gran variedad de compuestos transportados desde o hacia la mitocondria deben de atravesar la membrana externa mitocondrial. Este proceso es facilitado por la presencia de un canal denominado Porina mitocondrial, VDAC o Por1 en *S. cerevisiae* [Colombini, 2004; De Pinto y cols., 2003]. Debido a la alternancia de residuos no polares en la estructura primaria de VDAC, se piensa que esta proteína presenta una estructura en forma de barril β [Forte y cols., 1987a; Forte y cols., 1987b]. Este tipo de estructura es común entre proteínas formadoras de canales tanto en procariontes como eucariontes inferiores y superiores. Los espectros de dicroísmo circular realizados en el VDAC purificado de *Neurospora crassa* apoyan esta hipótesis y sugieren que VDAC es muy similar a una porina bacteriana (Fig. 3).

La porina cambia su estado conformacional dependiendo del voltaje [Colombini, 2004; Tan y Colombini, 2007]. A bajos voltajes (del orden de ± 10 mV) se induce el estado abierto, con afinidad por aniones sobre cationes. Al incrementar el potencial sobre los 30 mV, VDAC cambia al estado conformacional cerrado y la permeabilidad se invierte, siendo más permeable para cationes que para aniones [Casadio y cols., 2002a; Casadio y cols., 2002b]. Entre las características de este canal destacan la inespecificidad con la que una gran cantidad de moléculas son transportadas. Sin embargo, dentro de esta aparente falta de selectividad, destaca la especificidad parcial del canal hacia los aniones

transportados. De esta característica se desprende el nombre de Canal Aniónico Dependiente de Voltaje (por sus siglas en inglés, VDAC) con el que comúnmente se refiere a esta proteína [Mannella y Kinnally, 2008; Shoshan-Barmatz y cols., 2006]. A pesar de ser un canal predominantemente aniónico, estudios electrofisiológicos han demostrado que VDAC puede presentar múltiples estados de subconductividad en donde la selectividad por cationes puede llegar a ser mayor que incluso para aniones [Bathori y cols., 2006]. En este sentido, la interacción de la mitocondria con cationes como el Ca^{2+} ha sido relacionada con una señal a través de la cual la mitocondria disminuye su motilidad a través del aparato citoesquelético, particularmente cerca de los sitios de contacto mitocondria-retículo endoplásmico [Hajnoczky y Hoek, 2007; Hajnoczky y cols., 2007]. En *S. cerevisiae* existen 2 isoformas de VDAC, de las cuales sólo Por1 es funcional [Antos y cols., 2001b; Sanchez y cols., 2001]. A pesar de ser una de las proteínas más estudiadas en la mitocondria, su estructura siempre ha sido tema de debate [Colombini, 2009; Rostovtseva y cols., 2005]. Sin embargo, la gran mayoría de los grupos de investigación dedicados al estudio de esta proteína membranal piensa que VDAC es un canal tipo barril compuesto por láminas beta y un sensor de voltaje que le permite modificar su estado de permeabilidad hacia aniones o cationes [Selivanov y cols., 1998; Tikunov y cols., 2010]. Se ha obtenido un modelo de VDAC de ratón y de humano usando difracción de rayos X y resonancia magnética nuclear (Fig. 3) [Bayrhuber y cols., 2008; Ujwal y cols., 2008]. Los resultados arrojados por ambas técnicas coinciden en que VDAC es un barril β compuesto por 19 láminas y una hélice α en el extremo N-terminal, el cual puede operar como un sensor de voltaje al presentar residuos cargados que interactúan con sitios opuestos dentro del poro para inducir ya sea

el estado abierto o cerrado [Ujwal y cols., 2008]. Actualmente se acepta que el estado cerrado de VDAC tiene preferencia por cationes, mientras que en su estado abierto, la porina tiene una relación de transporte anión/catión de 1.75 [Choudhary y cols., 2009]. Se piensa que el estado fisiológico es un estado entrecerrado presente cuando VDAC interactúa con proteínas del citoesqueleto tales como la tubulina y enzimas glicolíticas como la enolasa y la hexocinasa [Brandina y cols., 2006; Pedersen, 2008; Rostovtseva y Bezrukov, 2008]. Algunos grupos sugieren que esta interacción puede optimizar la eficiencia de procesos tales como la glucólisis y la apoptosis [Pedersen, 2008; Rostovtseva y Bezrukov, 2008]. Finalmente, existe evidencia que sugiere que VDAC es una proteína involucrada en la liberación de moléculas de citocromo *c* durante la apoptosis, mediante un mecanismo dependiente del sensor de voltaje en una probable conformación hexamérica [Mader y cols., 2010; Ujwal y cols., 2009]. Durante este fenómeno de permeabilización de la membrana externa mitocondrial, se pueden liberar factores activadores de caspasas, catalizando la formación del apoptosoma [Shoshan-Barmatz y cols., 2010]. Este proceso es dependiente de ATP y se piensa que es un eslabón río arriba de la permeabilización extensiva de la membrana interna mitocondrial debida a la apertura de un canal inespecífico [Lemasters, 2007; Lemasters y Holmuhamedov, 2006; Malhi y cols., 2006; Tan y Colombini, 2007]. Durante este proceso, la entrada masiva de iones K^+ con sus respectivos contraiones y agua provocan hinchamiento mitocondrial.

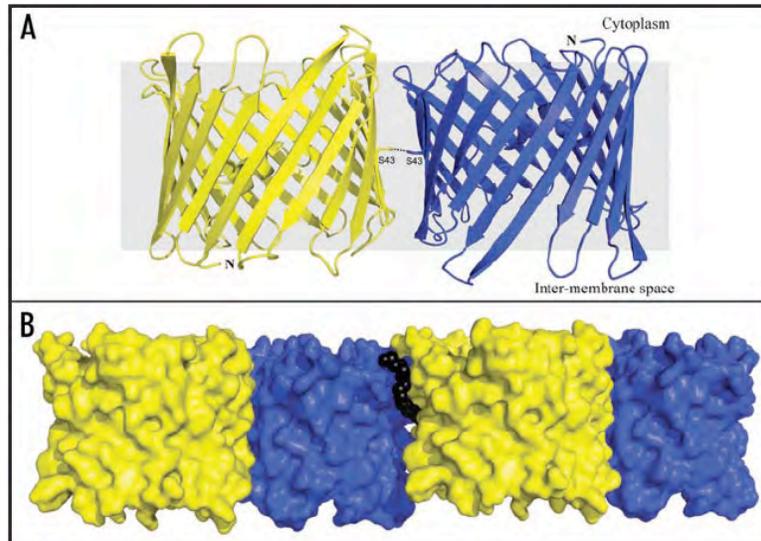


Fig. 3. El Canal Aniónico Dependiente de Voltaje o Porina Mitocondrial. *S. cerevisiae* expresa dos isoformas del barril β de las cuales solo la isoforma 1 presenta actividad de canal al ser reconstituida en experimentos de electrofisiología [Antos, 2000]. (A) Actualmente se piensa que la unidad estructural mínima son los homohexámeros con orientación antiparalela. En respuesta al estímulo adecuado, estos canales forman un megacanal en la membrana externa que permite la translocación de citocromo *c* al citoplasma para llevar a cabo el proceso apoptótico. [Ujwal y cols., 2009; Shoshan-Barmatz y cols., 2010]. (B) Representación de canales en orientación antiparalela en modelo de superficies atómicas (Imagen tomada de Ujwal y cols., 2009).

En la célula, el K^+ es el catión más abundante. Tanto en mamíferos como levaduras puede llegar a alcanzar concentraciones cercanas a 120 mM en la mitocondria [Diwan y Lehrer, 1977; Rasheed y cols., 1984]. Las variaciones en los niveles de este catión originan fenómenos tales como la modulación en el volumen mitocondrial asociada a la actividad respiratoria, en donde las mitocondrias transitan de la forma condensada (menor volumen y actividad energética) a la ortodoxa (mayor volumen y actividad energética) y viceversa [Garlid y cols., 2003; Garlid y Paucek, 2003; Halestrap, 1994]. Estudios sobre el transporte de K^+ en las mitocondrias de *S. cerevisiae* demostraron que el catión tiende a acumularse en el organelo, incrementando la respiración mitocondrial y la síntesis de ATP [Uribe y cols., 1991]. Estos resultados sugirieron la presencia de un sistema de transporte del catión en mitocondrias de

levadura. En el caso de *S. cerevisiae*, la presencia de un sistema uniportador de K^+ , acoplado a un sistema antiportador K^+/H^+ han sido descritos [Castrejon y cols., 2002; Manon y Guerin, 1992; Manon y Guerin, 1995; Manon y cols., 1995]. En mamíferos y levaduras este antiportador es modulado por cationes divalentes tales como Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} y Sr^{2+} [Manon y Guerin, 1992; Manon y Guerin, 1995; Manon y cols., 1995; Nakashima y cols., 1982; Nakashima y Garlid, 1982; Roucou y cols., 1995]. Este sistema antiportador ha sido aislado y reconstituido en proteoliposomas, en donde se logró demostrar (por un ensayo espectrofotométrico de hinchamiento) que este sistema, al igual que el de mamíferos, es sensible a dicitohexilcarbodiimida, propranolol y quinina [Manon y Guerin, 1992]. Tanto en mamíferos como en levaduras, el antiportador es modulado por el pH del medio, ya que a valores inferiores a 7, se inhibe y a mayores se activa [Beavis y Garlid, 1990; Beavis y cols., 1993]. Dentro de la batería de compuestos que inhiben el antiporte K^+/H^+ , se encuentran compuestos con una gran variedad de funciones farmacológicas como antiarrítmicos, antidepresivos, antihistamínicos y anestésicos. Estos últimos probablemente ejercen su efecto al modificar la fluidez de la membrana [Garlid y cols., 1986]. A pesar de que *S. cerevisiae* cuenta con un sistema uniportador de K^+ sensible a Mg^{2+} y a quinina, su identidad proteica permanece desconocida [Castrejon y cols., 2002]. Este sistema puede ser detectado en condiciones energéticas favorables para la homeostasis mitocondrial, i.e. cuando el $\Delta\Psi$ es elevado y la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial es altamente específica. En estas condiciones, la adición de Zn^{2+} incrementa considerablemente la entrada de K^+ a la mitocondria. Esto puede ser interpretado como un efecto posterior a la inhibición del antiporte K^+/H^+ [Castrejon y cols., 2002; Manon y Guerin, 1993]. En todos los casos,

los sistemas pueden ser descritos de acuerdo a la Teoría Quimiosmótica en función de la suma o resta de los gradientes electroquímicos para cada una de las especies transportadas. Cuando el transporte de algún soluto origina un incremento en el $\Delta\Psi$, se dice que es un transporte de tipo electrogénico. En caso de que el transporte disipe el gradiente eléctrico generado, se conoce como un transporte de tipo electroforético. Finalmente, cuando el mecanismo no origina modificación alguna en los valores de $\Delta\Psi$, se conoce como transporte electroneutro [Nicholls y Ferguson, 2001].

Para llevar a cabo la síntesis de ATP, *S. cerevisiae* hace uso de un sistema transportador de Mg^{2+} . En condiciones normales, este sistema transportador es expresado por el gen *MFMI* [Kolisek y cols., 2003]. El producto se ancla a la membrana interna mitocondrial formando homooligómeros. En condiciones normales, el transporte de Mg^{2+} a la mitocondria de levadura presenta cinéticas muy veloces, las cuales son dependientes de $\Delta\Psi$. El transporte es sensible a hexaaminas de cobalto (III) y en ausencia de $\Delta\Psi$, el sistema expulsa Mg^{2+} [Kolisek y cols., 2003]. Entre sus funciones también destaca la regulación del transporte de ATP producido por la actividad glicolítica. Durante la biosíntesis de mitocondrias, este transporte es activado por Ca^{2+} [Traba y cols., 2008].

Otro catión de importancia fisiológica en *S. cerevisiae*, es el Ca^{2+} . A pesar de carecer de un sistema de transporte mitocondrial para esta especie química, experimentos han demostrado que este catión permea lentamente a través de las membranas mitocondriales [Uribe y cols., 1992]. Una vez en la matriz, el catión podría interactuar con enzimas del ciclo de Krebs y componentes alternos de la cadena respiratoria como las deshidrogenasas de NADH [Guerrero-Castillo y cols., 2009]. Adicionalmente, los

incrementos detectados en los niveles de Ca^{2+} citosólico en *S. cerevisiae* han sido relacionados con procesos dependientes de energía tales como la apoptosis y el apareamiento inducido por la feromona α [Severin y cols., 2008]. Ésto sugiere que a pesar de que las mitocondrias de la levadura del pan se diferencian de las de mamífero por la ausencia de un sistema uniportador de Ca^{2+} sensible a rojo de rutenio, el Ca^{2+} sigue presentando efectos en la modulación de la fisiología mitocondrial [Perez-Vazquez y cols., 2003]. Estudios recientes han encontrado que la liberación de calcio en mitocondrias de levadura es activada por factores como una elevada fuerza iónica, nucleótidos libres, agentes quelantes de metales y un elevado pH [Bradshaw y Pfeiffer, 2006a; Bradshaw y Pfeiffer, 2006b]. Finalmente, el calcio actúa induciendo una transición en el nivel de permeabilidad en la membrana interna mitocondrial en mamíferos, de ser selectiva a no selectiva [Haworth y Hunter, 1979; Hunter y Haworth, 1979a; Hunter y Haworth, 1979b]. Un trabajo sugiere que esta estructura podría corresponder al receptor de rianodina (RyR). Este trabajo es interesante, ya que documenta que el transporte puede ser completamente inhibido por ligandos clásicos del RyR, el cual al parecer no está presente en organismos como *S. cerevisiae* [Beutner y cols., 2001]. En contraposición, el Ca^{2+} inhibe la transición de la permeabilidad mitocondrial en la levadura [Perez-Vazquez y cols., 2003]. Sin embargo, en presencia de ETH129, un ionóforo de Ca^{2+} , el catión puede inducir una transición [Yamada y cols., 2009].

Otra especie de suma importancia para las mitocondrias de *S. cerevisiae* es el fosfato inorgánico (Pi). El anión se caracteriza por ser acumulado en grandes proporciones en la matriz mitocondrial en forma de polifosfato de Ca^{2+} o hidroxapatita,

que es insoluble, y osmóticamente inactivo [Hall, 2009]. El transporte de Pi en la mitocondria de *S. cerevisiae* fue descubierto y demostrado por el grupo de Bernard Guerin [de Chateaubodeau y cols., 1974; de Chateaubodeau y cols., 1976]. En esta serie de trabajos, se identificó el transporte de fosfato en mitocondrias aisladas. Adicionalmente se demostró que igual que en mitocondrias de mamíferos, el transporte era sensible a compuestos organomercuriales como el ácido mersálico. Esta característica permitió mas tarde dilucidar el mecanismo de transporte tanto en mitocondrias aisladas, como en experimentos de reconstitución del acarreador [Palmieri y cols., 1993a; Palmieri y cols., 1993b]. De estos experimentos se logró concluir que el transporte de fosfato no era sensible a maleimidias debido a la ausencia de la C42, la cual se encuentra presente en otros acarreadores como en el de *Bos taurus* [Guerin y cols., 1990]. Al introducir la mutación puntual T42C, el transporte se hizo altamente sensible a maleimidias [Phelps y cols., 1991; Phelps y Wohlrab, 1991]. De igual forma se localizaron las cisteínas reactivas con mercuriales y se determinó que éstas podrían ser C28, C134 y C300. De estos residuos, la C28 se ha considerado fundamental para la conversión del acarreador de fosfato en un canal aniónico no selectivo [Schroers y cols., 1998; Schroers y cols., 1997]. A pesar de que en la actualidad no existe un modelo a partir de los cristales del acarreador de fosfato mitocondrial, un análisis de secuencia sugiere que éste forma parte de la familia de acarreadores mitocondriales (MCF) [Phelps y cols., 1991; Phelps y Wohlrab, 1991]. En *S. cerevisiae* existen dos isoformas, de las cuales solo la codificada por el gen *MIR1* es expresada en condiciones óptimas de crecimiento. Cuando las levaduras son sometidas a temperaturas cercanas a 37°C, se expresa la isoforma 2 codificada por el gen *PIC2* [Hamel y cols., 2004].

Entre los iones transportados a través de las membranas mitocondriales, sobresalen los nucleótidos de adenina (adNT's). Éstos son translocados por una proteína de 30 kDa mejor conocida como la translocasa de adenín nucleótidos (ANT) [Nury y cols., 2006]. Esta proteína fue identificada en ensayos de transporte de adenín nucleótidos utilizando dos inhibidores denominados atractilósido y bongkrekato [Pfaff y cols., 1965; Vignais y cols., 1973]. Posteriormente los grupos de Martin Klingenberg y de Reinhart Krämer lograron por separado aislar y determinar las características de esta proteína reconstituida en proteoliposomas [Klingenberg y cols., 1985; Krämer y Klingenberg, 1982; Krämer y Klingenberg, 1985]. Al igual que el Pic, el ANT pertenece a la familia de los acarreadores mitocondriales. En *S. cerevisiae*, existen tres isoformas codificadas por los genes *AAC1*, *AAC2* y *AAC3*. Las mutantes nulas en las tres isoformas pueden crecer en medios fermentativos no represivos tales como caldos de cultivo ricos en galactosa. Sin embargo, las levaduras con estas mutaciones no pueden crecer en condiciones anaerobias [Drgon y cols., 1991]. El grupo del Dr. Brandolin logró cristalizar el ANT purificado de mitocondrias de *S. cerevisiae* [Pebay-Peyroula y cols., 2003]. Los cristales, con una resolución de 2.2 Å, permitieron identificar una celda unitaria de una monómero con seis segmentos transmembranales y tres hélices matriciales. Estos seis segmentos al parecer surgieron de dos eventos de duplicación de una unidad inicial de dos hélices transmembranales. Durante estos eventos se preservó la firma PX(D/E)XX(K/R) en cada una de las duplicaciones y que es propia de todos los acarreadores pertenecientes a la MCF [Pebay-Peyroula y cols., 2003]. Se piensa que la prolina inicial de cada firma es el blanco de isomerasas matriciales (ciclofilinas) que permiten la conversión entre un acarreador (transporte específico) y un canal (transporte

inespecífico). Los acarreadores de nucleótidos presentan adicionalmente la secuencia RRRMMM [Nury y cols., 2006]. Se piensa que esta proteína (y todos los acarreadores en general) sufren cambios conformacionales durante los ciclos de translocación en forma de giro [Robinson y cols., 2008].

Canales Inespecíficos Mitocondriales

En una gran variedad de especies, se ha detectado la apertura de canales inespecíficos mitocondriales (MUC) que contribuyen al desacoplamiento del organelo y a la muerte celular. Un análisis detallado del MUC sugiere que se trata de una entidad conservada a través de la evolución y no de una convergencia [Azzolin et al., 2010b] (Fig. 4). Estos canales han sido detectados en mamíferos, peces, invertebrados, plantas y levaduras. La modulación de estos canales en función de las condiciones específicas del medio en el que se desarrolla cada organismo probablemente ha dado lugar a la variabilidad en la modulación de cada MUC.

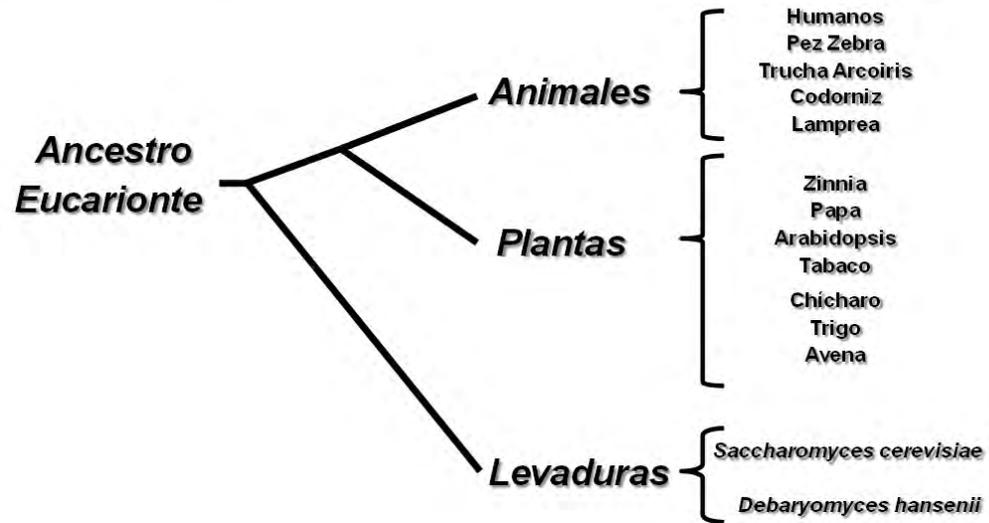


Fig. 4. Distribución de los canales inespecíficos mitocondriales en el dominio eucarionte. En la actualidad, los MUCs han sido detectados tanto en animales como en plantas y levaduras. Las características de cada canal varían con respecto al organismo en donde sean estudiados. Estas diferencias podrían emerger como un medio de adaptación al entorno en donde cada organismo se desarrolla. Actualmente se sabe que estos canales son mas parecidos entre plantas y animales por la sensibilidad a inhibidores clave tales como la ciclosporina A. La figura no representa un diagrama filogenético.

El Poro de Transición de la Permeabilidad Mitocondrial (PTP)

El daño celular/mitocondrial debido al incremento repentino en la conductividad de la membrana interna mitocondrial a iones y moléculas cuya masa no exceda los 1.5 kDa ha sido ampliamente reportado [revisado en Baines, 2010]. Este incremento en la conductividad ha sido asociado a la apertura de un poro inespecífico llamado Poro de Transición de la Permeabilidad Mitocondrial (PTP). En la actualidad, tanto la función como la probable estructura de este poro son temas de intensa polémica. Sin embargo, el consenso apoya la noción de que la apertura de este poro durante los períodos de reperfusión post-isquémica, así como durante el almacenamiento, reperfusión de órganos

y distrofias musculares daña a las células [Azzolin y cols., 2010a; Theruvath y cols., 2006]. Sin embargo, la apertura controlada o “parpadeo” de este poro ha sido relacionada con la detoxificación de iones Ca^{2+} de la matriz mitocondrial al citoplasma [Petronilli y cols., 1999]. Esto podría ser utilizado por la célula para incrementar la actividad de la cadena de transporte de electrones y aumentar el recambio de equivalentes de semiquinona, disminuyendo la reducción parcial del O_2 para generar superóxido [Korshunov y cols., 1997].

El PTP es objeto de estudio constante y periódicamente son reportados nuevos efectores de este canal. Entre los efectores destacan los iones Ca^{2+} , los ligandos de ciclofilinas como la Ciclosporina A y el estrés oxidativo [Halestrap, 2009a; Halestrap y Pasdois, 2009]. El PTP también es modulado por pH del medio, Mg^{2+} y los nucleótidos de adenina [Bernardi, 1999].

Existe evidencia sobre la participación del complejo formado por el translocador de nucleótidos de adenina (ANT) y la ciclofilina D (CypD) en la transición de la permeabilidad y de que tanto el carboxiatractilósido como el ácido bongkrékico actúan como inhibidores de este proceso [Baines y cols., 2005; Halestrap, 1991]. Adicionalmente, mediante el uso de columnas de afinidad con CypD anclada, se ha logrado retener al ANT y a VDAC en estudios *in vitro* (Fig. 5) [Crompton y cols., 1998].

Se ha demostrado que durante la apoptosis, la apertura del PTP es necesaria para inducir la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN nucleolar, y que la ciclosporina A (CsA) es un fármaco que puede inhibir dichos procesos al unirse a la ciclofilina D (CypD) [Kroemer y cols., 1995]. En la actualidad se ha propuesto que la

CypD interactúa con el ANT y probablemente con el Pic. Estos modelos sugieren que el Ca^{2+} ocasiona un incremento en la actividad de rotamasa o peptidil prolil cis-trans isomerasa en la CypD, lo cual origina cambios conformacionales en el estado del ANT (o del Pic) desencadenando la apertura de un poro inespecífico [Baines y cols., 2005; He y Lemasters, 2002]. La inducción del PTP resulta en la liberación de Ca^{2+} a la matriz mitocondrial, el colapso energético de la mitocondria y finalmente en la muerte celular. Sin embargo, se ha propuesto que la muerte celular experimentada en estas condiciones (apertura del PTP) no necesariamente desemboca en la muerte por apoptosis sino por necrosis [Malhi y cols., 2006]. Esto puede ser debido a que la abrupta disminución en los niveles celulares de ATP imposibilitan la ejecución de este proceso [Li y cols., 2004; Liu y cols., 1996]. Una característica muy particular del poro de transición de la permeabilidad (PTP) es la fluctuación entre un estado abierto y otro cerrado, lo que ha hecho que se postule que el cambio en el estado de apertura del PTP tiene como finalidad modular la homeostasis de iones Ca^{2+} implicados en la transducción de diversas señales, la importación de polipéptidos citoplásmicos o la termogénesis debida a la disipación del gradiente de protones. En mamíferos, un agente desencadenante de la apertura del PTP, es el ión Ca^{2+} [Crompton y cols., 1987]. Sin embargo, un grupo italiano demostró que al inhibir la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria adicionando Rojo de Rutenio, se inhibe la apertura del PTP por agentes desacoplantes [Bernardi y cols., 1993]. Este descubrimiento es de vital importancia, ya que en mitocondrias de *S. cerevisiae* el Ca^{2+} inhibe la transición de la permeabilidad en un sitio externo [Perez-Vazquez y cols., 2003]. Esto podría reforzar la hipótesis de que la transición de la permeabilidad es un fenómeno conservado en eucariontes [Azzolin y cols., 2010b].

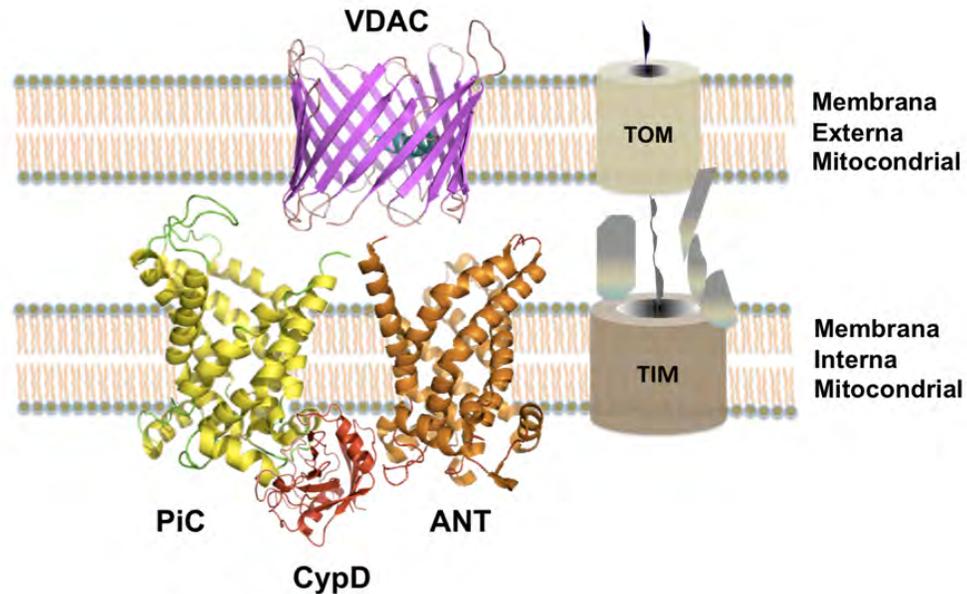


Fig. 5. Estructura probable del Poro de Transición de la Permeabilidad en mitocondrias de mamíferos. La porina (VDAC) en la membrana externa mitocondrial ha sido sugerida como un blanco en donde el rojo de rutenio y el Ca^{2+} pueden modular la transición. El translocador de adenín nucleótidos (ANT) ha sido recientemente involucrado en la transición desde un punto de vista regulatorio. El acarreador de fosfato (PiC) ha sido recientemente sugerido como el componente a través del cual son transportados los solutos y metabolitos durante la transición. La ciclofilina D ha sido considerada como un componente regulador del poro. La maquinaria de translocación de proteínas (TIM y TOM) ha sido considerada como un probable componente del poro con base a sus propiedades electrofisiológicas. (Modelos generados con Pymol: The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC.)

El Canal Inespecífico de las Mitocondrias de Levadura (*ScMUC*)

Los primeros reportes describiendo que la mitocondria sufre un incremento en la permeabilidad inespecífica a iones y metabolitos surgieron hace casi 20 años [Guerin y cols., 1994; Prieto y cols., 1995; Prieto y cols., 1996; Prieto y cols., 1992]. En estos trabajos se evidenció la presencia de un poro activado por ATP e inhibido por ADP y fosfato inorgánico (Pi). A este poro se le denominó la vía de desacoplamiento de la levadura (YUP), poro de transición de la permeabilidad de la levadura (yPTP) o canal

inespecífico de las mitocondrias de levadura (YMUC). Debido a que en otras levaduras han sido reportados MUCs [Cabrera-Orefice y cols., 2010], en el presente trabajo se optó por llamarlo el canal inespecífico mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae* (s_c MUC). El s_c MUC puede estudiarse aprovechando que esta levadura es un organismo de fácil manipulación con protocolos bien establecidos para generar transformaciones estables y mutantes condicionales. Por ser una levadura aeróbica facultativa, esta levadura es capaz de crecer incluso con mitocondrias carentes de varias proteínas implicadas en procesos como la fosforilación oxidativa [Sherman, 2002]. Esto hace a *S. cerevisiae* un modelo ideal para dilucidar los componentes del s_c MUC y poder determinar si son equivalentes al PTP [Manon y cols., 1998].

Control del s_c MUC

Es importante mencionar algunas similitudes y diferencias del s_c MUC y del PTP. Al comparar ambos poros se observa que ambos son principalmente aniónicos y permiten el paso de moléculas de hasta 1.5 kDa de masa molecular. Algunas hipótesis sugieren que ambos poros atraviesan las membranas interna y externa de la mitocondria por lo que pueden estar localizados en los sitios de contacto de las membranas interna y externa [Manon y cols., 1998]. Existen hipótesis que también sugieren que el mPTP es un fenómeno exclusivamente de la membrana interna mitocondrial [Shoshan-Barmatz y cols., 2006]. La regulación de la apertura del PTP es diferente al del s_c MUC (Tabla 1) pues el Pi cierra el s_c MUC pero abre el PTP [Castrejon y cols., 1997; Halestrap y Pasdois, 2009]. El ATP abre el s_c MUC pero cierra el PTP, el ADP cierra el s_c MUC pero abre el PTP [Manon y cols., 1998]. Mientras el Mg^{2+} cierra ambos poros, el Ca^{2+} abre el

PTP pero cierra el s_c MUC [Hunter y Haworth, 1979a; Manon y Guerin, 1998]. Por otro lado, el carboxiatractilósido y el ácido bongkrékico cierran tanto el PTP como el s_c MUC [Halestrap y Brenner, 2003]. La ciclosporina A (CsA) cierra el PTP a nivel de CypD [Baines y cols., 2005] pero no tiene actividad en el s_c MUC. Finalmente, la hexil y octilguanidina cierran el s_c MUC [Perez-Vazquez y cols., 2003] y resultados expuestos en esta tesis sugieren que esto sucede a nivel de VDAC.

Tabla 1. Efectores del s_c MUC y el PTP. Ambos poros son regulados por distintos metabolitos y compuestos de igual forma en algunos casos, y en forma contraria en otros. ANT: Translocador de Nucleótidos de Adenina, VDAC: Porina, UC: Uniportador de Calcio. Los signos - y + denotan un efecto inhibitorio y activatorio respectivamente.

<i>Modulador</i>	<i>Blanco</i>	<i>Efecto</i>	<i>MUC(s)</i>
Atractilósido	ANT	+, -	PTP (+), s_c MUC (-)
Rojo de Rutenio, Azido Rutenio	UC, VDAC	-	PTP
Ciclosporina A, Sangliferina A	Ciclofilina D	-	PTP
Decilubiquinona	Desconocido	-	PTP, s_c MUC
Ca ²⁺ , Cd ²⁺ , Pb ²⁺	Desconocido	+	PTP, s_c MUC
Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Zn ²⁺ , Sr ²⁺	VDAC	-	PTP, s_c MUC
Alquilaminas	VDAC, ANT	-	PTP, s_c MUC

Existen otros efectores que abren el poro en condiciones de deficiencia de Pi entre los que destacan el etanol y el NADH. Al igual que el Pi, otros aniones tales como el arsenato, el sulfato [Cortes y cols., 2000], el propionato y el decavanadato [Roucou y cols., 1995] cierran el s_c MUC. A concentraciones fisiológicas, los cationes divalentes, no abren al s_c MUC [Jung y cols., 1997]. Estas concentraciones pueden variar en función de las interacciones que la mitocondria presente con otros orgánulos como el retículo endoplásmico rugoso. Este organelo es considerado como el almacén de Ca²⁺ en la

célula, y la liberación de este catión hacia la mitocondria [Rizzuto y cols., 2004] podría llegar a abrir el PTP. En esas condiciones el s_c MUC puede permanecer en su estado cerrado puesto que se ha comprobado que 0.1 mM Ca^{2+} o Mg^{2+} cierran el canal inespecífico [Perez-Vazquez y cols., 2003]. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que en presencia de el ionóforo de Ca^{2+} ETH129, se puede desencadenar una transición de la permeabilidad insensible al efector específico del s_c MUC dVO₄ [Yamada y cols., 2009]. Ésto sugiere que el Ca^{2+} libre en la matriz mitocondrial es también tóxico para las mitocondrias de levadura y hace suponer que la transición de la permeabilidad mitocondrial puede ser un fenómeno conservado [Azzolin y cols., 2010b]. En ausencia de este ionóforo electroforético, el Ca^{2+} cierra el s_c MUC, sin embargo no se sabe a qué nivel sucede este efecto ya que las mitocondrias de *S. cerevisiae* parecen carecer de un uniportador de Ca^{2+} sensible a rojo de rutenio como el expresado en mitocondrias de mamíferos [Mironova y cols., 1994].

Función y Estructura del s_c MUC

Actualmente no se cuenta con una teoría ampliamente aceptada sobre el significado fisiológico y la estructura del canal inespecífico de las mitocondrias de levadura. Sin embargo, se han propuesto funciones tales como la regulación de la síntesis de ATP, o la disipación de energía en forma de calor [Dejean y cols., 2000; Prieto y cols., 1992]. En cuanto a su estructura, ha sido relativamente difícil dilucidar qué componentes forman a este poro, ya que en múltiples experimentos con diversas mutantes nulas, el canal inespecífico sigue detectándose [Roucou y cols., 1997]. Entre las proteínas mutadas figura Por1. Como se mencionó con anterioridad, este canal permeabiliza la membrana

externa a iones y metabolitos [De Pinto y cols., 2003]. A pesar de que la eliminación de esta proteína no es letal, esta delección lleva a una reducción considerable en la internalización de sustratos respiratorios como el NADH, sin embargo, se ha registrado permeabilidad residual en este tipo de levaduras probablemente debida a otras vías de internalización de metabolitos como la constituida por el barril β Tom40 [Lee y cols., 1998].

Los primeros estudios que evidenciaron la existencia de un canal inespecífico en las mitocondrias de levadura fueron publicados por un grupo español [Prieto y cols., 1992]. En estos trabajos se demostró que la adición de ATP en niveles fisiológicos ocasionaba cambios en la mitocondria tales como la inducción del hinchamiento. Sin embargo se demostró posteriormente que el nucleótido actuaba extramitocondrialmente ya que seguía teniendo efecto en presencia de inhibidores de la translocación de ATP [Roucou y cols., 1995]. Posteriormente, experimentos del grupo de Bernard Guerin demostraron que estos inhibidores tenían un efecto parcial en la inducción de la transición de la permeabilidad, ya que en presencia de atractilósido había una disminución en el incremento en la respiración activado por la adición de ATP. Estos experimentos también demostraron que en presencia de ácido bongkrékico, las mitocondrias de levadura incrementan su velocidad de consumo de oxígeno [Roucou y cols., 1997]. Estos resultados sugieren que el ATP podría estar actuando a nivel del translocador de adenín nucleótidos, sin embargo en este mismo trabajo, el grupo de Guerin demostró que las mitocondrias de una cepa con delecciones en los genes que codifican para las tres isoformas del ANT seguían siendo susceptibles a los efectos tóxicos del ATP [Roucou y cols., 1997]. Ésto significa que los componentes del scMUC

siguen siendo un tema no resuelto y su identificación proporcionaría información de suma relevancia para la comprensión de los MUCs.

HIPÓTESIS

Si la transición de la permeabilidad mitocondrial en *S. cerevisiae* es regulada por Ca^{2+} , Pi, Mg^{2+} y octilguanidina, entonces el $s_c\text{MUC}$ podría ser considerado como un modelo para el estudio del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial de otras especies.

OBJETIVOS

GENERAL

- Determinar el sitio de interacción de los diversos efectores que controlan la apertura y cierre del s_c MUC, el poro de transición de la permeabilidad mitocondrial en la levadura.

PARTICULARES

- Determinar si los efectos del Ca^{2+} , Mg^{2+} y PO_4^{3-} sobre el s_c MUC son sinérgicos.
- Evaluar el efecto del Ca^{2+} y octilguanidina en el s_c MUC de mitocondrias aisladas de una cepa silvestre de *S. cerevisiae* y de una mutante isogénica carente de la porina mitocondrial.
- Evaluar el efecto del mersalil en el s_c MUC de mitocondrias aisladas de una cepa silvestre y una mutante isogénica carente del acarreador de fosfato en *S. cerevisiae*.
- Determinar si el s_c MUC puede ser abierto en las mutantes carentes de VDAC y Pic.

Materiales y Métodos

Materiales y Reactivos

Todos los compuestos utilizados fueron de grado reactivo analítico. El CaCl₂ , MES, manitol, MgCl₂ , albúmina sérica y safranina-o fueron de Sigma-Aldrich, Co. Las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas fueron donadas por el Dr. Fred Sherman de la Universidad de Rochester, EUA.

Características Genéticas de las Cepas de Saccharomyces cerevisiae

1) Cepa Industrial

- *La Azteca* (Adquirida periódicamente en una panadería ubicada en 19°19'22.00"N 99°09'31.34"W).

2) Cepas Auxotróficas

- B-7553: MATa CYC1⁺ cyc7-738::CYH2 ura3-52 his3-Δ1 leu2-3, 112trp1 289cyh2
- BY-4741 MATa; his3 Δ1; leu2 Δ0; met15Δ0; ura3Δ

3) Mutantes Isogénicas

- ΔPor1 (B-10610) MATa CYC1⁺ cyc7-738::CYH2 ura3-52 his3-Δ1 leu2-3, 112trp1 289cyh2 por1-Δ4::TRP1
- ΔPic (BY-4741) MATa; his3 Δ1; leu2 Δ0; met15 Δ0; ura3 Δ0; YJR077c::KANMX4

Tanto la cepa B-7553 como BY-4741 son cepas auxotróficas frecuentemente utilizadas y su Mating Type es “a” (*MATa*). Para efectos prácticos, estas cepas serán designadas como “silvestres” aunque en términos estrictos no lo sean. La cepa B-7553 tiene auxotrofías a uracilo, histidina, triptófano y leucina [Sánchez y cols., 2001]. Por otro lado, la cepa BY-4741 tiene auxotrofías a histidina, leucina, metionina y uracilo. Estas auxotrofías permiten reemplazar los genes de interés con “cassettes” y seleccionar las transformantes por crecimiento en ausencia y presencia de estos nutrientes.

Las cepas mutantes tienen el mismo marco genético que las “silvestres” respectivas, pero presentan deleciones individuales realizadas por recombinación homóloga en donde se eliminó el gen *PORI* que codifica para VDAC y el gen *MIRI* que codifica para el acarreador de fosfato Pic. Finalmente, en estas recombinaciones se usó un cassette de interrupción con un marcador de auxotrofia a triptofano y de resistencia a geneticina (kanamicina), por lo que sólo las cepas mutantes crecen en medio sin triptofano y con kanamicina [Gutiérrez-Aguilar y cols., 2010; Sánchez y cols., 2001].

Cultivo de Levaduras

Todas las cepas usadas fueron sembradas periódicamente en medio sólido YPD (Extracto de levadura 1%, peptona de gelatina 2%, dextrosa 2% y agar 2%). De aquí se inoculó una asada en un matraz con 50 mL de precultivo YPD líquido (Extracto de levadura 1%, peptona de gelatina 2% y dextrosa 2%) y se incubó a 30°C durante 24 h. Los 50 mL se inocularon en matraces con 1 L de medio YPlac (Extracto de levadura 1%, peptona de gelatina 1%, (NH₄)₂SO₄ 0.12%, KH₂PO₄ 0.1%, ácido láctico 2% y pH 5.5) a 30°C durante 24 h con agitación constante (Diagrama 1) para las cepas del marco B-

7553. La mutante B-10610 fué resembrada periódicamente en medio mínimo Trp⁻. Esto con la finalidad de corroborar la presencia del cassette *TRP*. Las cepas del marco BY4741 fueron sembradas en 50 mL de precultivo YPD y el crecimiento se llevó a cabo en medio YPGal (Extracto de levadura 1%, peptona de gelatina 2% y galactosa 2%) a 30°C durante 24 h. Esto se debe a que la cepa Δ Pic no es capaz de crecer con sustratos respiratorios [Zara y cols., 1996].

Para los estudios que utilizaron levaduras de la cepa industrial, fue necesario cultivar a las células durante 8 h en medio rico [De Kloett, 1961], lavarlas 2 veces con agua destilada y ayunar a las células durante 16 h previas a la obtención de mitocondrias [Pérez-Vázquez y cols., 2003].

Obtención de mitocondrias

Se llevó a cabo por el método enzimático [Guerin y cols., 1990]. Una vez obtenido alrededor de 6 L de cultivo, se cosecharon las células lavándolas tres veces por centrifugación en un rotor Sorvall GSA a 5000 rpm (4073 g) por 5 min. Después de la última centrifugación, se determinó el peso seco de las levaduras para mantener igualdad de condiciones durante el aislamiento de las levaduras [Guerin y cols., 1990]. Las células fueron resuspendidas en el buffer SH (Tris 0.1 M, β -mercapto-etanol 0.5 M a pH= 9.3 ajustado con NaOH) a una proporción de 20 mL/g de células (Diagrama 1), y se incubaron durante 15 min a 30°C en agitación (200 rpm). Al terminar la incubación en buffer SH, se lavaron las células 4 veces por centrifugación a 5000 rpm durante 5 min con el buffer de lavado KCl (KCl 0.5 M, Tris 10 mM pH 7 ajustado con HCl) (Diagrama 1). Una vez lavadas, las células se resuspendieron en 10 mL/g de peso en medio de

digestión (sorbitol 1.35 M, EGTA 1 mM, ácido cítrico 10 mM, NaH_2PO_4 10 mM, Na_2HPO_4 10 mM, pH 5.8), al que se le agregaron 10 mg de zimoliasa/g de peso de levaduras [Daum y cols., 1982]. Para evaluar el porcentaje de células que perdieron la pared, se preparó una dilución 1 a 10 de la muestra a lisar y se midió su absorbancia. Después de añadir la zimoliasa, se midió la absorbancia de la suspensión en una dilución de 1 a 100 a partir de los 30 min y durante cada 10 min. Cuando la absorbancia de la muestra fue tan baja como la de la dilución 1 a 10, se asumió que el 90% de las células habían perdido la pared convirtiéndose en esferoplastos. La lógica de esta medición radica en que los esferoplastos no absorben a 600 nm y por lo tanto se puede evaluar la ruptura de estos en función de la disminución de la absorbancia. Este procedimiento ha sido corroborado con ayuda de un microscópio.

Homogenización y centrifugación diferencial

Una vez obtenidos los esferoplastos, la muestra se lavó 3 veces a 12000 rpm en un rotor Sorvall SS34 durante 8 min con buffer de lavado de esferoplastos (Sorbitol 0.75 M, manitol 0.4 M, Tris 10 mM, BSA 0.1 %, pH 6.8) para eliminar la zimoliasa remanente (Diagrama 1). La pastilla fue resuspendida con agitadores de teflón y posteriormente se homogenizó (sin lisar los esferoplastos) en un homogenizador Potter de vidrio con un émbolo delgado para evitar la ruptura de los esferoplastos.

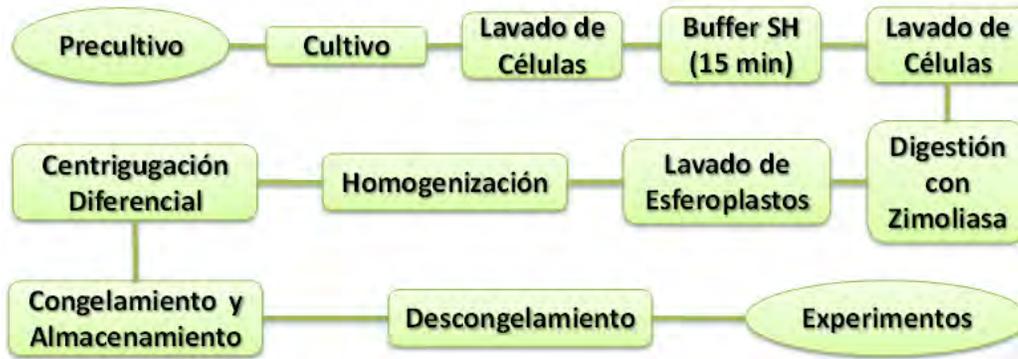


Diagrama 1. Obtención de mitocondrias por el método de digestión de la pared celular con zimoliasa. Las casillas ovaladas indican el inicio y final del proceso, los rectángulos, cada proceso del protocolo.

Al finalizar los tres lavados con buffer de lavado de esferoplastos, éstos se resuspendieron en buffer de homogenización (manitol 0.6 M, EGTA 2 mM, Tris 10 mM, BSA 0.2% y pH 6.8) y se rompieron los esferoplastos utilizando un homogenizador Potter con un émbolo ajustado, empleando 15 elevaciones del vástago (Diagrama 1).

Una vez obtenido el homogenado, se transfirió a 12 tubos de centrífuga de rotor SS34 y se centrifugó a 2500 rpm por 5 min. El sobrenadante fue centrifugado a 12000 rpm durante 10 min. El precipitado obtenido se resuspendió en buffer de recuperación de mitocondrias (manitol 0.6 M, EGTA 2 mM, Tris 10 mM, pH 6.8), se transfirió a 6 tubos de rotor SS34 y se centrifugó a 2500 rpm por 5 min. Se separó el sobrenadante y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min (Diagrama 1).

Las mitocondrias obtenidas en el botón, fueron resuspendidas con un pincel en 3 gotas de buffer de recuperación de mitocondrias, homogenizadas (para evitar diferencias en la concentración) y fueron transferidas a una jeringa de 5 mL con una aguja # 21 Plastipak. Se fueron vaciando gota a gota sobre N₂ líquido, agitando para evitar la

formación de agregados. Las mitocondrias fueron almacenadas en tubos Nunc Cryo de 1.8 mL en congelación a -70°C en un congelador REVCO hasta el momento de ser empleadas para los experimentos (Diagrama 1) [Guerin y cols., 1990].

Descongelación de Mitocondrias

Para poder hacer uso de las mitocondrias, se vació una alícuota (de unas 10 o 15 perlas) en un tubo de ensayo de vidrio delgado y se descongeló en un baño María a ebullición por unos segundos y rápidamente se enfrió el tubo de ensayo al sumergirlo en hielo. Posteriormente las mitocondrias fueron homogenizadas para evitar la formación de agregados. Este paso es crítico para obtener mitocondrias acopladas. La inmersión en baño María debe ser en agua hirviendo y no debe durar más de dos segundos. Todos los experimentos se llevaron a cabo con mitocondrias descongeladas (Fig 6).

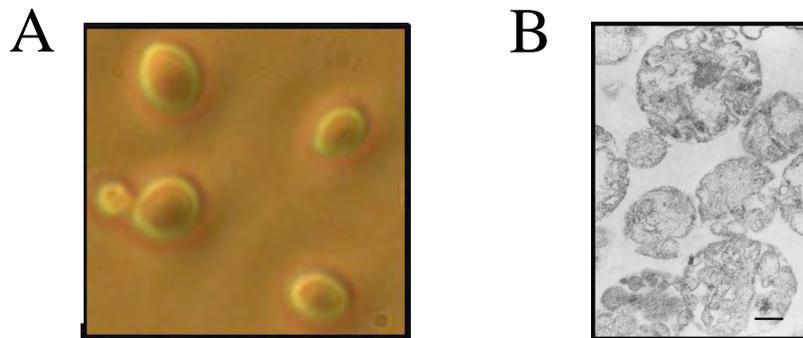


Fig. 6. Micrografías óptica y electrónica de las (A) levaduras y las (B) mitocondrias aisladas durante un protocolo rutinario. B: La barra representa 200 nm.

Determinación de Proteína

La concentración de proteínas mitocondriales fue determinada por medio del método de Gornal (biuret), utilizando albúmina sérica bovina como estándar [Gornal, 1949].

Funcionalidad Mitocondrial

El uso de mitocondrias almacenadas a -70°C fue implementado hace 10 años durante una colaboración entre los grupos del Dr. Guerin y el Dr. Wohlrab y es práctica común [Guerin y cols., 1990]. Típicamente, las mitocondrias de levadura funcionan perfectamente hasta 40 días después de su almacenamiento. Las mitocondrias utilizadas en este estudio mostraron alto cociente respiratorio U/4, capacidad para sintetizar ATP y un $\Delta\Psi$ estable (ver los experimentos control en cada inciso de los resultados).

Función del $s_c\text{MUC}$

Una característica común del $s_c\text{MUC}$, tanto en las cepas industriales como en las cepas de laboratorio, ha sido la habilidad del Pi para regular su apertura. En todas las cepas en que se ha medido el efecto del Pi hasta la fecha, se ha observado que a bajas concentraciones de Pi, el $s_c\text{MUC}$ permanece abierto, mientras que a 2 mM y arriba de esta concentración, el $s_c\text{MUC}$ se cierra.

En las cepas de *S. cerevisiae* usadas en este estudio, se observó que las mitocondrias resuspendidas en un soporte isoosmótico y en presencia de 4 mM Pi, no presentan hinchamiento mitocondrial. En otras palabras, el $s_c\text{MUC}$ está cerrado en esas condiciones, mientras que a 0.4 mM Pi el $s_c\text{MUC}$ está abierto. Estos datos se incluyen como controles en todos los experimentos descritos en esta tesis.

Consumo de Oxígeno

En mitocondrias recién descongeladas, se midió la velocidad de consumo de oxígeno en dos estados: Estado 4 y Estado desacoplado (Estado U) (Fig. 7, ver mas adelante). Se usó un oxímetro YSI 5300 equipado con un electrodo de Clark acoplado a un registrador analógico. Se usó una cámara de 3 mL con camisa de agua recirculante en baño a 30°C, utilizando una concentración final de mitocondrias de 0.5 mg/mL [Estabrook, 1967]. El medio de reacción fue manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH 6.8 ajustado con TEA y 10 μ L/mL de etanol como sustrato respiratorio.

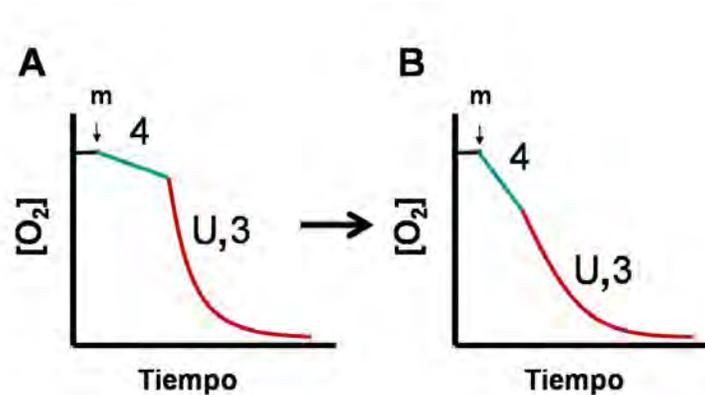


Figura 7. Consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas de *S. cerevisiae*. Este fue medido en tres Estados: Estado 4 o en ausencia de ADP, en Estado 3 (en presencia de ADP) o en Estado desacoplado (U). El control respiratorio (3/4) y la relación U/4 se obtuvieron al dividir las velocidades de consumo de oxígeno entre los Estados 3/4 ó U/4 respectivamente. Una relación cercana a 2 indicaba que la muestra de mitocondrias se encontraba acoplada (A). En cambio una relación cercana a 1 indicaba desacoplamiento (B). La letra “m” indica el momento de adición de las mitocondrias.

El consumo de oxígeno por la cadena respiratoria está regulado principalmente por el potencial transmembranal. Cuando el potencial transmembranal es elevado, el consumo de oxígeno es lento. A esta condición se le conoce como estado de reposo de la cadena respiratoria y se le llama Estado 4. Cuando se abate el potencial transmembranal, la cadena respiratoria aumenta su actividad y se acelera el consumo de oxígeno. Un

mecanismo de abatimiento del potencial transmembranal es la fuga controlada de H^+ hacia el interior de la matriz a través de la F_1F_0 ATP sintetasa, hecho que ocurre durante la síntesis de ATP. Éste es el Estado fosforilante o Estado 3. En el Estado desacoplado (uncoupled) la caída de $\Delta\Psi$ se da por la fuga de H^+ mediada por un protonóforo. La diferencia entre el Estado 4 y los estados acelerados indica que la mitocondria es capaz de sostener un potencial transmembranal adecuado y de reaccionar a la pérdida de ese potencial. Por ello una medida de integridad mitocondrial es el cociente $U/4$ o Edo. 3 /Edo. 4. Esta medida es adimensional y solo constituye un indicador de la eficiencia de la fosforilación oxidativa en las mitocondrias aisladas.

En este protocolo se decidió utilizar el agente desacoplante FCCP en vez de ADP, debido a que la cepa B-10610 al carecer de la VDAC, tiene un sistema de transporte de ADP deficiente. Así, se midió un cociente $U/4$ que se calculó dividiendo la actividad respiratoria del Estado U sobre la del Estado 4. Estrictamente hablando, éste no es un control respiratorio, ya que no se evalúa la fosforilación oxidativa (respiración acoplada a la síntesis de ATP) sino la capacidad respiratoria en ausencia o presencia de un desacoplante.

Potencial Transmembranal

El potencial transmembranal fue determinado en un espectrofotómetro de doble haz en modo dual (511-533 nm) utilizando anaranjado de safranina como cromóforo y su incorporación a las membranas energizadas. El espectrofotómetro de doble haz en modo dual se usa para medir los cambios de absorbancia específicos que sufre un indicador (colorante). Por lo general, se usan dos longitudes de onda: Una donde se observa un

cambio máximo y otra en la que no se observan cambios y que corresponde al punto isobéptico. El detector del espectrofotómetro mide la absorbancia en ambas longitudes de onda y resta el isobéptico de la de cambio máximo. Así se elimina cualquier cambio inespecífico. La safranina-o es un catión hidrofílico que tiene un punto de cambio máximo de absorbancia en respuesta a la polaridad del medio a 511 nm y un isobéptico a 533 nm. Por ello, la safranina-o es atraída hacia la membrana proporcionalmente al potencial transmembranal, cambiando su absorbancia a 511 nm. Cualquier cambio inespecífico dado por difracción de la luz que incida en las mitocondrias, turbidez u otros factores es detectado a 533 nm y restado del valor registrado a 511 nm. Para promover el colapso del potencial, se añadió FCCP 1 mM [Åkerman y Wikström, 1976].

Hinchamiento y Contracción Mitocondrial

Las mitocondrias se comportan como osmómetros, es decir, cuando aumenta la concentración de solutos en su interior captan agua para compensar el aumento en la presión osmótica y viceversa: Si pierden osmolitos, exportan agua y se contraen. Ópticamente, el hinchamiento-deshinchamiento mitocondrial puede seguirse porque la mitocondria hinchada se vuelve transparente y la turbidez de la suspensión decrece.

El hinchamiento mitocondrial fue evaluado monitoreando el cambio en la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro Aminco DW2000 en modo "split". Se utilizó una celda de cuarzo de 2 mL. y se adicionó buffer de manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH 6.8 (TEA). El sustrato respiratorio fue etanol 5µL/mL.

Resultados

1. El efecto del Ca^{2+} sobre el $s_c\text{MUC}$ es incrementado en presencia de Mg^{2+} y Pi en mitocondrias aisladas de *S. cerevisiae*.

Experimentos previos del laboratorio demostraron la modulación de la apertura del $s_c\text{MUC}$ por cationes tales como el Ca^{2+} y también por alquilguanidinas, las cuales son cationes orgánicos [Perez-Vazquez y cols., 2003]. Las alquilaminas inhiben la apertura del canal inespecífico en ausencia de un potencial de membrana $\Delta\Psi$. Por otro lado, los efectos acoplantes del Ca^{2+} dependen del potencial, ya que en mitocondrias hinchadas, el catión no cierra al $s_c\text{MUC}$. Las concentraciones requeridas del catión son dos órdenes de magnitud por encima de los niveles fisiológicos de Ca^{2+} [Carafoli, 2010; Carafoli y cols., 1970; Perez-Vazquez y cols., 2003]. Para poder establecer si los efectos acoplantes del Ca^{2+} pudieran tener algún significado fisiológico, se decidió evaluar si el catión podía inhibir la apertura del $s_c\text{MUC}$ a niveles fisiológicos de Ca^{2+} , utilizando concentraciones no inhibitorias de Mg^{2+} y Pi en el medio de reacción.

Se evaluaron los efectos del Ca^{2+} y el Pi en ausencia y presencia de Mg^{2+} sobre el control respiratorio de las mitocondrias de *S. cerevisiae* de una cepa industrial (Fig. 8). El control respiratorio (CR) es una medida que permite evaluar la capacidad de las mitocondrias para llevar a cabo la fosforilación oxidativa midiendo el consumo de oxígeno en presencia de un sustrato respiratorio y posteriormente al añadir ADP al medio de reacción. La relación entre las velocidades de consumo de oxígeno obtenidas entre el Estado 3 y el Estado 4 permite determinar por lo tanto si el $s_c\text{MUC}$ influye en la fosforilación oxidativa de las mitocondrias de levadura. Si los valores son cercanos a 2,

es indicativo de acoplamiento. Un valor cercano a 1 sugiere desacoplamiento. Las mitocondrias de levadura en presencia de Pi 4 mM típicamente exhibieron un CR de 2.2 el cual no fue modificado al adicionar Ca^{2+} o Mg^{2+} (Resultados no mostrados). Al disminuir la concentración de Pi de 0.2 a 0.4 mM, el CR disminuyó a valores cercanos a 1.1 y 1.2 (Fig.1A). Al incrementar la concentración de fosfato a 1 mM Pi, el CR= 1.5. En presencia de 0.2 a 1.0 mM de Pi, la adición de Ca^{2+} propició un incremento dependiente de la concentración en el CR de la siguiente manera: En presencia de Pi 0.2 mM, la presencia de 1 mM de Ca^{2+} resultó en un CR de 1.7 (Fig. 8A). En presencia de 0.4 mM de Pi, el efecto del Ca^{2+} fue mayor ya que se obtuvo un CR de 1.8 con 0.8 mM del catión. Al incubar la muestra de mitocondrias con Pi 0.6 mM se obtuvo un CR de 2.0 con 0.8 y 1 mM de Ca^{2+} . A mayores niveles de Pi, la adición de Ca^{2+} no originó un incremento en los niveles del CR registrado. Es importante mencionar que estas concentraciones de Ca^{2+} son consideradas como no fisiológicas [de la Fuente y cols., 2010]. Estos resultados sugieren que el Ca^{2+} incrementa la eficiencia de la fosforilación oxidativa en sinergismo con Mg^{2+} y Pi.

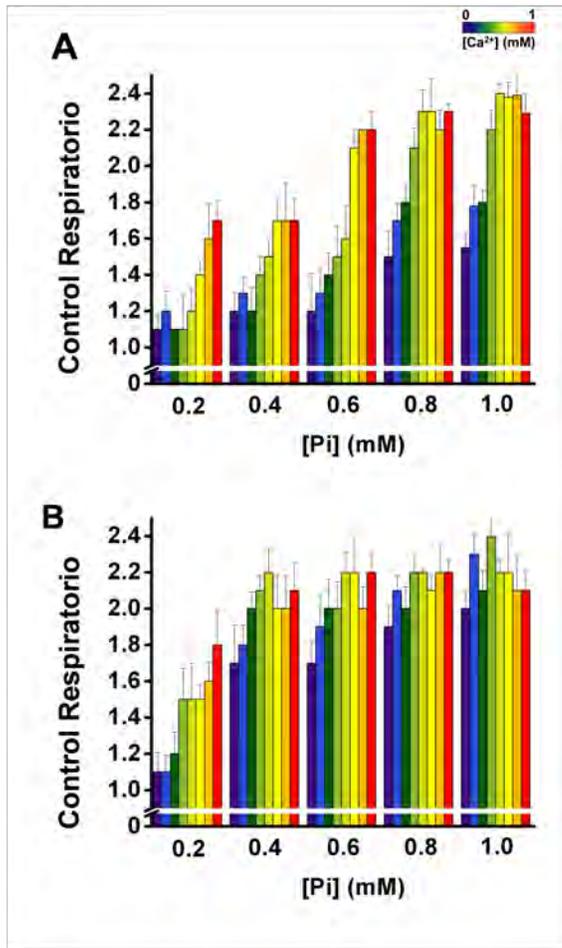


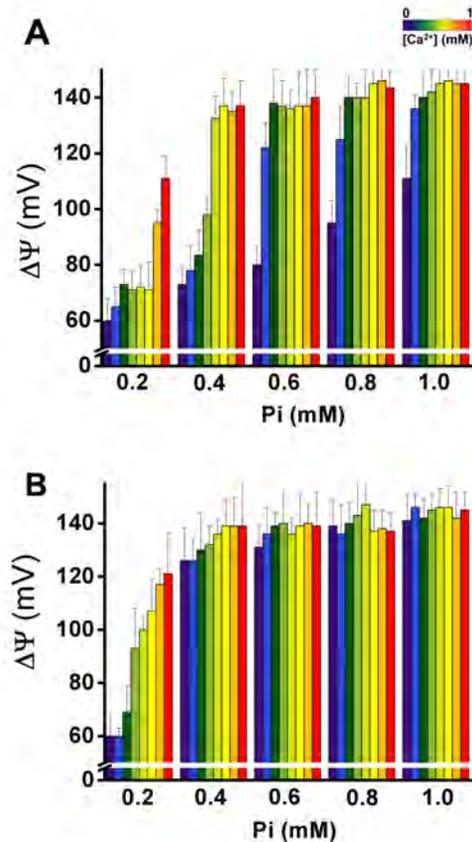
Figura 8. En mitocondrias aisladas de *S. cerevisiae*, la concentración de Ca^{2+} requerida para incrementar el Control Respiratorio disminuye cuando hay Mg^{2+} y Pi en el medio. **Condiciones experimentales:** manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH 6.8 ajustado con TEA y 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de etanol como sustrato respiratorio. El Estado 3 se indujo al añadir 150 μM de ADP y el control respiratorio se obtuvo al dividir las velocidades de consumo de oxígeno entre los Estados 3 y 4. Las concentraciones de Ca^{2+} utilizadas fueron 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mM progresivamente (barras de azul a rojo). En B, se adicionó 0.5 mM de Mg^{2+} en todos los casos.

Si el efecto del Ca^{2+} puede ser optimizado por Mg^{2+} y Pi, entonces es probable que la presencia de estos dos efectores del $s_c\text{MUC}$ origine un incremento en la capacidad del Ca^{2+} para acoplar la fosforilación oxidativa. En presencia de Mg^{2+} 0.5 mM, el efecto acoplante del Ca^{2+} fue mas evidente (Fig. 8B). En presencia de Pi 0.2 mM y ausencia de Ca^{2+} , el CR registrado fue de 1.0. Sin embargo este control llegó a un máximo de 1.8 aún en Pi 0.2 mM cuando el Ca^{2+} fue 1.0 mM. Esto sugiere que las mitocondrias de *S. cerevisiae* pueden ser acopladas con mayor eficiencia en presencia de Ca^{2+} , Mg^{2+} y Pi [Castrejon y cols., 1997]. Al incrementar la concentración de Pi en el medio de reacción, el CR aumentó a 1.7 incluso en ausencia de Ca^{2+} (Fig. 8B). Al adicionar 0.05 mM de

Ca^{2+} , el CR registrado se incrementó a 1.9 (Fig. 8B). Este valor es muy importante ya que sugiere que la fosforilación oxidativa (y probablemente el $s_c\text{MUC}$) pueden ser efectivamente modulados por niveles micromolares de Ca^{2+} . A mayores niveles de Ca^{2+} y Pi, el control respiratorio de las mitocondrias siempre fue cercano a 2.0. Este último valor es indicativo de una muestra de mitocondrias acopladas. Al incrementar los niveles de Pi, el CR de las mitocondrias siempre fue cercano a 2.0 (Fig. 8B).

El efecto acoplante sugerido por los resultados de oximetría, fue analizado midiendo el efecto del Ca^{2+} , Mg^{2+} y Pi sobre el potencial transmembranal mitocondrial ($\Delta\Psi$) (Fig. 9). En presencia de Pi 0.2 mM y con una concentración de Ca^{2+} de 0 a 0.6 mM, el $\Delta\Psi$ registrado fue de 60 mV (Fig. 9A). Al aumentar la concentración de Ca^{2+} entre 0.8 y 1.0 mM, el potencial registrado fue de 95 y 110 mV respectivamente. Estos niveles de potencial tienen cierta correlación con los obtenidos para el CR en las mismas condiciones (Fig. 9A). En presencia de Pi 0.4 mM el potencial registrado fue de 70 mV. Este incrementó proporcionalmente con la concentración de Ca^{2+} de tal manera que de 0.05 a 1 mM Ca^{2+} , el potencial registrado fue cercano a 140 mV. Este resultado presenta concordancia con los obtenidos para consumo de oxígeno (Fig. 8A). Al incrementar la concentración de Pi a 0.6 mM, el $\Delta\Psi$ registrado fue de 80 mV y la presencia de Ca^{2+} en el medio de reacción ocasionó un aumento en los niveles de $\Delta\Psi$ de tal forma que en presencia de 0.05 mM de Ca^{2+} , el $\Delta\Psi$ fue de 120 mV. La presencia de mayores concentraciones de Ca^{2+} dieron como resultado un potencial de 140 mV en todos los casos (Fig. 9A).

Figura 9. En mitocondrias aisladas de *S. cerevisiae*, la concentración de Ca^{2+} requerida para incrementar el $\Delta\Psi$ disminuye cuando hay Mg^{2+} y Pi en el medio. Condiciones experimentales: Como en la Fig. 8, excepto que se adicionó safranina-O $10\mu\text{M}$. Se utilizó FCCP $6\mu\text{M}$ para colapsar el potencial y poder determinar el valor de $\Delta\Psi$ en función del cambio en absorbencia a 533nm dentro de una curva patrón preestablecida. Las concentraciones de Ca^{2+} utilizadas fueron 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mM progresivamente (barras de azul a rojo). En B, se adicionó 0.5 mM de Mg^{2+} .



Una vez que se observó que los efectos del Ca^{2+} y el Pi eran aditivos (sinérgicos), se optó por determinar si el Mg^{2+} en el sistema podría aumentar el efecto observado [Perez-Vazquez y cols., 2003] (Fig. 2B). Cuando las mitocondrias fueron incubadas en presencia de Pi 0.2 mM y Mg^{2+} 0.5 mM y en presencia de Ca^{2+} $0, 0.05$ y 0.1 mM , el $\Delta\Psi$ registrado fue de 93 mV (Fig. 9B). Al adicionar Ca^{2+} al medio de reacción, el $\Delta\Psi$ observado fue estable y con un valor de 120 mV . En presencia de Pi desde 0.4 hasta 1.0 mM , el potencial fue elevado, con valores entre 120 y 140 mV . En estas condiciones el Ca^{2+} no incrementó el $\Delta\Psi$ registrado (Fig. 9B). Estos experimentos sugieren que el Pi, Mg^{2+} y Ca^{2+} presentan efectos sinérgicos sobre el $s_c\text{MUC}$. Esto sugiere que estos iones operan desde un punto de vista fisiológico.

Una vez que se observó que el Ca^{2+} y el Pi presentan efectos sinérgicos con el Mg^{2+} , se decidió determinar si el Mg^{2+} podría presentar efectos sinérgicos al fijar los niveles de Ca^{2+} y Pi. Para ello se efectuaron experimentos de medición de $\Delta\Psi$ (Fig. 10). Estos experimentos se llevaron a cabo en dos condiciones de Pi: 0.4 y 0.8 mM (Fig. 10, círculos y cuadros). Y en ausencia o presencia de 0.6 mM Ca^{2+} (Fig. 10 símbolos con y sin relleno respectivamente).

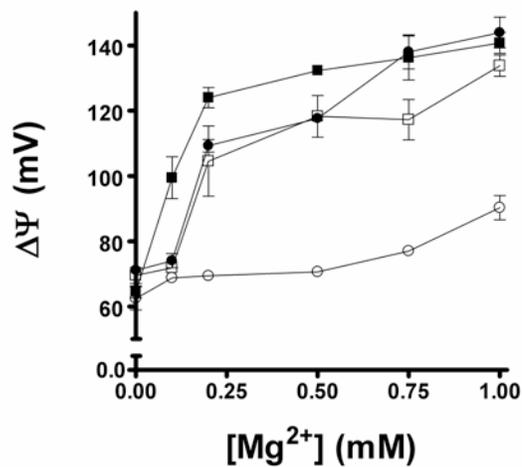


Figura 10. En mitocondrias aisladas de *S. cerevisiae*, el Mg^{2+} incrementa el $\Delta\Psi$ en sinergismo con Pi en el medio. Condiciones experimentales: Como en la Fig. 8, se adicionó safranina-O 10 μM para monitorear los cambios en absorbancia y relacionarlos con el potencial de membrana mitocondrial. Se utilizó FCCP 6 μM para colapsar el $\Delta\Psi$ y transformar los datos de absorbancia a unidades de voltaje utilizando una curva patrón. (○) 0.4 mM Pi, (●) 0.4 mM Pi + 0.6 mM Ca^{2+} , (□) 0.8 mM Pi (■) 0.8 mM Pi + 0.6 mM Ca^{2+} .

Al incubar a las mitocondrias con 0.4 mM de Pi, los niveles de potencial se vieron modificados parcialmente al incrementar de 63 a 90 mV en presencia de Mg^{2+} 0 a 1 mM (Fig. 10, círculos vacíos). Al incubar a la muestra de mitocondrias con 0.6 mM de Ca^{2+} , los niveles de $\Delta\Psi$ se modificaron considerablemente (Fig. 10, círculos llenos). En estas condiciones se detectó el efecto sinérgico del Mg^{2+} ya que al cambiar la concentración de Mg^{2+} de 0.1 a 0.2 mM, los niveles de $\Delta\Psi$ variaron de 74 a 110 mV (Fig. 10, círculos llenos). Al incrementar los niveles de Mg^{2+} en el medio de reacción, el $\Delta\Psi$ aumentó de 110 a 140 mV. Al aumentar la concentración de Pi en el medio de reacción a 0.8 mM, los resultados fueron muy similares a los reportados con 0.4 mM de

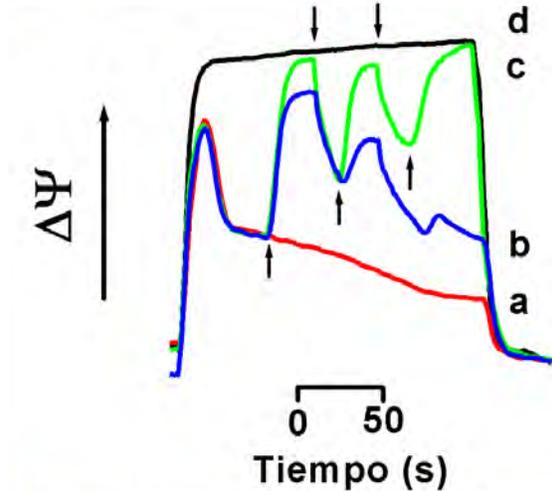
Pi y 0.6 mM Ca^{2+} exceptuando aquellos obtenidos en presencia de 0.75 y 1 mM de Mg^{2+} en los que el $\Delta\Psi$ observado fue de 120 y 133 mV respectivamente. En presencia de 0.8 mM de Pi y 0.6 mM de Ca^{2+} , los valores de potencial registrados fueron los mayores, ya que con 0.1 mM de Mg^{2+} , se registró un potencial de 122 mV (Fig. 10, cuadrados llenos). Estos experimentos sugieren que tanto el Mg^{2+} como el Ca^{2+} ejercen sus efectos sinérgicos con Pi al variar sus concentraciones en las mitocondrias aisladas.

2. *El $s_c\text{MUC}$ se abre y cierra reversiblemente en proporción a las fluctuaciones en la concentración de Ca^{2+} . Efecto parcial del Mg^{2+} .*

Una de las preguntas más interesantes sobre la regulación del $s_c\text{MUC}$ es si éste puede abrirse y cerrarse alternativamente. Ésto podría aportar información sobre si estos efectores pueden regular su apertura y con ello la homeostasis mitocondrial. Para ello se decidió llevar a cabo experimentos de medición del $\Delta\Psi$ en mitocondrias aisladas en donde se añadiera ya sea Ca^{2+} o Mg^{2+} posteriores a la activación del $s_c\text{MUC}$ por restricción de fosfato, y ver si sus efectos acoplantes pueden ser suprimidos por la adición de un agente quelante (Fig. 11). Al incubar a las mitocondrias con Pi 0.4 mM, el $\Delta\Psi$ registrado fue inestable y disminuyó con respecto al control (Fig. 11, trazos a y d). Al adicionar Mg^{2+} 0.3 mM a los 50 s, se registró un incremento en el $\Delta\Psi$ sensible a la adición de EGTA 0.3 mM (Fig. 11, trazo b). A los 100 s se añadió un segundo pulso de Mg^{2+} , sin embargo el incremento sobre el $\Delta\Psi$ fue menor que en el pulso anterior. El $\Delta\Psi$ y la sensibilidad a Mg^{2+} y EGTA disminuyeron con cada adición (Fig. 11, trazo b). Al llevar a cabo los mismos experimentos utilizando Ca^{2+} se observó que el efecto sobre el $\Delta\Psi$ era mayor, aunque el sistema era cada vez mas insensible al EGTA (Fig 11, trazo c).

Figura 11. En mitocondrias aisladas de *S. cerevisiae*, el s_c MUC puede ser activado e inhibido por cationes divalentes y por quelación de estos metales. Modulación del $\Delta\Psi$.

Condiciones experimentales: Manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH 6.8 ajustado con TEA y 10 μ L/mL de etanol como sustrato respiratorio mas 5 μ M de safranina. Los trazos mostrados muestran cambios en la densidad óptica (y por lo tanto en el $\Delta\Psi$) en forma semicuantitativa (a, trazo rojo). Trazo en presencia de 0.4mM de Pi (s_c MUC abierto). Las flechas que apuntan hacia arriba indican la adición de 300 μ M de Mg^{2+} (b, trazo azul), 300 μ M de Ca^{2+} (c, trazo verde) o de ningún catión en el medio de reacción (a). Las flechas que apuntan hacia abajo indican la adición de 300 μ M de EGTA. (d, trazo negro) El experimento en presencia de 4 mM de Pi representa el Estado cerrado del s_c MUC. El colapso del potencial se



3. *En ausencia de la porina mitocondrial, se pierde la regulación del s_c MUC por cationes.*

Una meta importante de este proyecto es la de identificar los componentes estructurales del s_c MUC. En reportes del grupo de Bernardi, se sugiere que el PTP de mamíferos presenta un sitio en donde los cationes divalentes (incluido el Ca^{2+}) inhiben la apertura del canal [Bernardi y cols., 1993]. El grupo de Shoshan Barmatz identificó una serie de aminoácidos en VDAC en donde probablemente se ejerce este efecto [Israelson y cols., 2007]. Para determinar si las alquilguanidinas inhiben la apertura del s_c MUC a nivel de la porina, se llevaron a cabo experimentos de consumo de oxígeno en presencia de etanol como sustrato respiratorio (Estado 4) y en presencia de 6 μ M del agente desacoplante FCCP (Tabla 2).

Tabla 2. En las mitocondrias aisladas de la cepa Δ Por1, la octilguanidina carece de efecto sobre la relación respiratoria U/4 en mitocondrias aisladas de *Saccharomyces cerevisiae*. Condiciones experimentales: manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH 6.8 ajustado con TEA y 10 μ L/mL de etanol como sustrato respiratorio. En presencia de 4 mM de Pi, el ScMUC se encuentra cerrado; al disminuir la concentración a 0.4 mM de Pi, se induce el estado abierto del s_c MUC. En estas condiciones se adicionó 12.5 μ M de Octilguanidina (OG) y 10 μ M de decavanadato de sodio (dVO₄). Las velocidades de consumo de oxígeno están dadas en nat O (min*mg prot)⁻¹.

[Pi] (mM)	Silvestre			Δ Por1		
	Estado U	Estado 4	U/4	Estado U	Estado 4	U/4
4	377 \pm 7	185 \pm 6	2.0	398 \pm 12	253 \pm 12	1.6
0.4	326 \pm 4	311 \pm 18	1.1	344 \pm 11	344 \pm 11	1.0
0.4 + OG	328 \pm 13	204 \pm 9	1.6	338 \pm 10	338 \pm 10	1.0
0.4 + dVO ₄	302 \pm 15	211 \pm 5	1.5	313 \pm 16	313 \pm 16	1.0

En presencia de fosfato (Pi) 4 mM, la velocidad de consumo de oxígeno fue de 185 \pm 6 nat O(min*mg prot)⁻¹. Sin embargo, al adicionar FCCP al medio de reacción, la velocidad de consumo de oxígeno se incrementó a 377 \pm 7 nat O(min*mg prot)⁻¹. Esto significa que la capacidad máxima respiratoria fue exactamente dos veces mayor a la registrada en condiciones normales, por lo que se asume que el s_c MUC se encontraba cerrado (Tabla 2). Al llevar a cabo un experimento de consumo de oxígeno pero con niveles de fosfato diez veces menor, la velocidad en Estado 4 se incrementó a 311 \pm 18 nat O(min*mg prot)⁻¹. La adición de FCCP al medio de reacción incrementó muy poco esta velocidad al registrar 326 \pm 4 nat O(min*mg prot)⁻¹. Esto indica que antes de la adición del desacoplante las mitocondrias ya se encontraban muy cerca de su máxima capacidad respiratoria y por lo tanto el cociente de 1.1 (U/4), probablemente debido a la apertura del s_c MUC (Tabla 2). A estos niveles de Pi, pero en presencia de octilguanidina (OG) 12.5 μ M la capacidad respiratoria en Estado 4 fue de 204 \pm 9 nat O(min*mg prot)⁻¹ y en presencia de FCCP se incrementó a 328 \pm 13 natgO/mg.prot.min dando una relación U/4 de 1.6. Esto aporta evidencia de que la octilguanidina contrarresta parcialmente los

efectos de la restricción de Pi en el medio de reacción, lo cual está de acuerdo con resultados previos del laboratorio [Pérez-Vázquez y cols., 2003]. Como control, al adicionar el inhibidor selectivo del s_c MUC decavanadato (dVO_4), la relación U/4 fue de 1.7. Esto sugiere que los efectos de la octilguanidina en el consumo de oxígeno de mitocondrias aisladas ocurrieron a nivel del s_c MUC. Posteriormente se llevaron a cabo los mismos experimentos en las mitocondrias aisladas de la cepa mutante Δ Por1 (Tabla 2). Igual que en la cepa silvestre, el consumo de oxígeno en presencia de Pi 4 mM, ocasionó una velocidad en el consumo de oxígeno de 253 ± 12 nat O(min*mg prot) $^{-1}$. La adición de FCCP 6 μ M incrementó esta velocidad a 398 ± 12 nat O(min*mg prot) $^{-1}$ y por lo tanto la relación U/4 fue de 1.6. En presencia de una concentración de fosfato de 0.4 mM, la velocidad de consumo de oxígeno en Estado 4 se incrementó a 344 ± 11 nat O(min*mg prot) $^{-1}$ y la adición de FCCP no incrementó el consumo de oxígeno, lo cual sugiere que bajo esas condiciones, las mitocondrias ya se encontraban desacopladas (Tabla 2). La adición de OG ó dVO_4 no disminuyeron estadísticamente la respiración en Estado 4 ni alteraron el valor de la relación U/4 que para todos los casos fue de 1.0. Esto sugiere que en ausencia de VDAC, la octilguanidina y el dVO_4 pierden su efecto, probablemente debido a que esa proteína es el sitio de acción de estas moléculas.

Para poder discriminar entre un efecto directo de la octilguanidina sobre la cadena respiratoria y un efecto a nivel del s_c MUC, se decidió medir el efecto de la OG sobre la diferencia de potencial en la membrana interna mitocondrial usando el anaranjado de safranina como indicador (ver Materiales y Métodos) en las cepas silvestre y Δ Por1 (Fig 12).

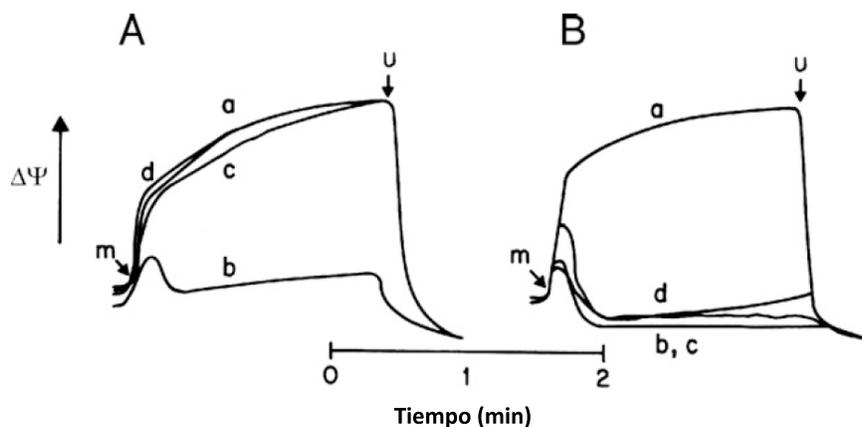


Figura 12. En las mitocondrias aisladas de la cepa Δ Por1, la octilguanidina carece de efecto sobre el potencial de membrana $\Delta\Psi$ en mitocondrias aisladas de *S. cerevisiae*. Condiciones experimentales: Manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH 6.8 ajustado con TEA y 10 μ L/mL de etanol como sustrato respiratorio. (A) cepa silvestre, (B) cepa Δ Por1. Los experimentos fueron a: s_c MUC cerrado con 4mM Pi, b: s_c MUC abierto con 0.4 mM Pi, c: OG 12.5 μ M y c: dVO₄ 10 μ M. (U): Al final de cada trazo, se adicionó FCCP 6 μ M.

En presencia de Pi 4 mM, las mitocondrias presentaron un potencial de membrana ($\Delta\Psi$) máximo el cual fue abatido a los 2 min al adicionar FCCP al medio de reacción (Fig. 12A, trazo a). Las mitocondrias incubadas con Pi 0.4 mM no pudieron establecer un potencial estable, el cual disminuyó considerablemente con respecto al tiempo (Fig. 12A, trazo b). En estas condiciones, la presencia de OG 12.5 μ M o dVO₄ 10 μ M restableció los niveles de $\Delta\Psi$ -sensible a FCCP (Fig. 12A, trazos c y d). Al llevar a cabo los mismos experimentos, pero en las mitocondrias de la cepa Δ Por1, se observó que éstas establecieron un $\Delta\Psi$ máximo con Pi 4 mM (Fig. 12B, trazo a). Al disminuir la concentración de Pi un orden de magnitud, el potencial de membrana cayó (Fig. 12B, trazo b). En estas condiciones, la presencia de OG ó dVO₄ no originó un incremento en el $\Delta\Psi$ (Fig. 12B, trazos c y d).

La apertura del poro de transición de *S. cerevisiae* origina hinchamiento de los organelos [Prieto y cols., 1992]. Para obtener mayor evidencia sobre la probable inhibición del s_c MUC por octilguanidina, se optó por probar sus efectos en el hinchamiento de las mitocondrias inducido por la adición de KCl al medio de reacción (Fig. 13). En presencia de Pi 4 mM, las mitocondrias de la cepa silvestre presentaron un patrón de hinchamiento residual (Fig. 13A, trazo a). Sin embargo, al llevar a cabo el mismo experimento a concentraciones bajas de fosfato, el hinchamiento detectado fue considerablemente mayor (Fig. 13A, trazo b). En estas mismas condiciones pero en presencia de OG 12.5 μ M, el hinchamiento fue considerablemente inhibido (Fig. 13A, trazo c). Cuando se llevó a cabo la misma serie de experimentos en las mitocondrias aisladas de la cepa mutante Δ Por1, se observaron los siguientes resultados: En presencia de Pi 4 mM, la suspensión de mitocondrias presentó un patrón de hinchamiento basal, el cual aumentó considerablemente cuando la suspensión de mitocondrias se incubó con Pi 0.4 mM (Fig. 13A, trazos a y b respectivamente). Al adicionar OG, el patrón de hinchamiento fue similar al registrado en condiciones del s_c MUC abierto (Pi 0.4 mM).

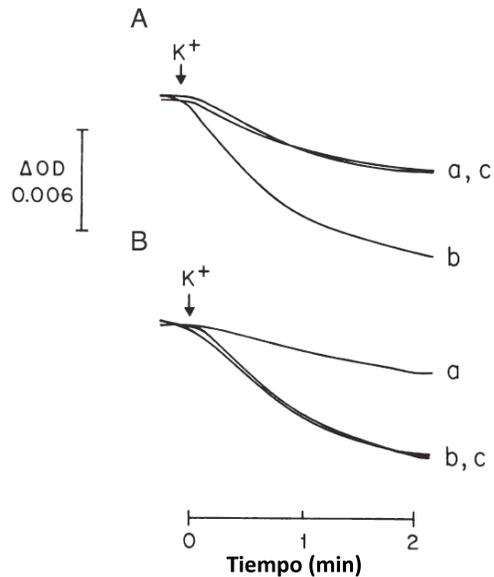


Figura 13. En las mitocondrias aisladas de la cepa Δ Por1, la octilguanidina carece de efecto sobre el hinchamiento en mitocondrias aisladas de *S. cerevisiae*.

Condiciones experimentales: Manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH 6.8 ajustado con TEA y 10 mL/mL de etanol como sustrato respiratorio. El hinchamiento se inició al adicionar 20mM KCl (K^+) al medio de reacción (A) cepa silvestre, (B) cepa Δ Por1. Los experimentos fueron a: s_c MUC cerrado con 4 mM Pi, b: s_c MUC abierto con 0.4 mM Pi, c: OG 12.5 μ M.

4. Posible Participación del Acarreador de Fosfato como parte de la estructura del s_c MUC.

Experimentos previos del laboratorio demostraron que el compuesto organomercurial mersalil, utilizado como un inhibidor del transporte de fosfato induce la transición de la permeabilidad [Cortes y cols., 2000]. Sin embargo en estos estudios no se comprobó si este compuesto activaba la transición en la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial por una vía inespecífica (daño membranal) o por una vía relacionada con el s_c MUC. Para ello fue necesario llevar a cabo experimentos de potencial de membrana en tres condiciones: 1) Control (s_c MUC cerrado), 2) En presencia de mersalil y 3) En presencia de mersalil + dVO_4 . 1) En experimentos control (s_c MUC cerrado) las mitocondrias presentaron un potencial de membrana elevado, constante y sensible al

desacoplante FCCP (Fig. 14A y B trazo a). 2) En presencia de 5 nmoles*(mg prot)⁻¹ de mersalil no se observó una disminución en el $\Delta\Psi$ (Fig. 14A trazo b). Al incrementar los niveles de mersalil de 10 a 200 nmoles*(mg prot)⁻¹ en la suspensión de mitocondrias, los niveles de $\Delta\Psi$ fueron disminuyendo en forma inversamente proporcional a la concentración de mersalil (Fig. 14A trazos c-e). 3) También se llevaron a cabo los mismos experimentos en presencia de dVO₄ 10 μ M (inhibidor selectivo del _{sc}MUC) (Fig. 8B). En el control (_{sc}MUC cerrado), las mitocondrias establecieron un $\Delta\Psi$ constante y sensible a FCCP (Fig. 8B, trazo a). En presencia de dVO₄, los niveles de $\Delta\Psi$ registrados fueron elevados, independientemente de la concentración de mersalil utilizada (Fig. 14B, trazos b-e).

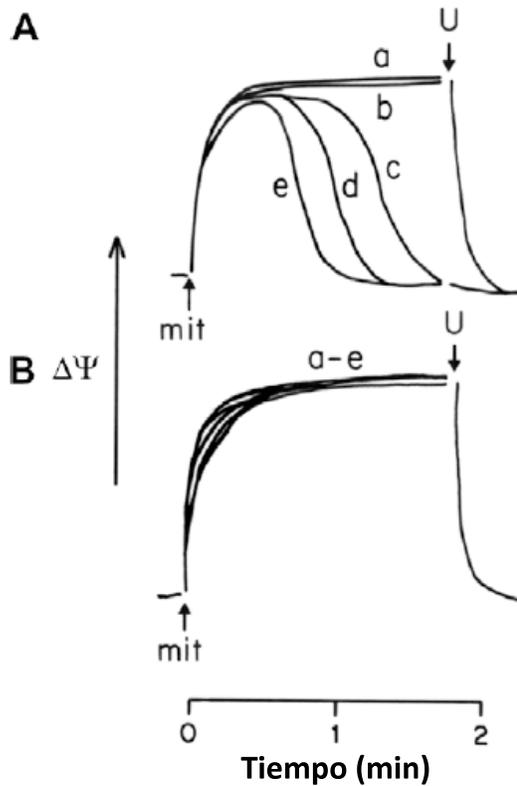


Figura 14. En mitocondrias de *S. cerevisiae* el mersalil induce el colapso en el $\Delta\Psi$. Condiciones experimentales: Manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH 6.8 ajustado con TEA y 10 mL/mL de etanol como sustrato respiratorio. (A) -dVO₄, (B) +10 μ M dVO₄. Los experimentos fueron a: _{sc}MUC cerrado con 4mM Pi, b: 4mM Pi + 5, c: 10, d: 80, e: 200 nmoles *(mg proteína)⁻¹ de mersalil

Para poder verificar que los efectos tóxicos del mersalil sensibles a dVO_4 estaban relacionados con la inducción del estado abierto del s_cMUC y no a nivel de algún componente de la cadena respiratoria, se llevaron a cabo experimentos de hinchamiento mitocondrial (Fig. 15). Esto permite evaluar si en las mitocondrias se origina una disminución en el $\Delta\Psi$ aunado al hinchamiento del organelo y por lo tanto a una probable inducción del s_cMUC sensible a dVO_4 .

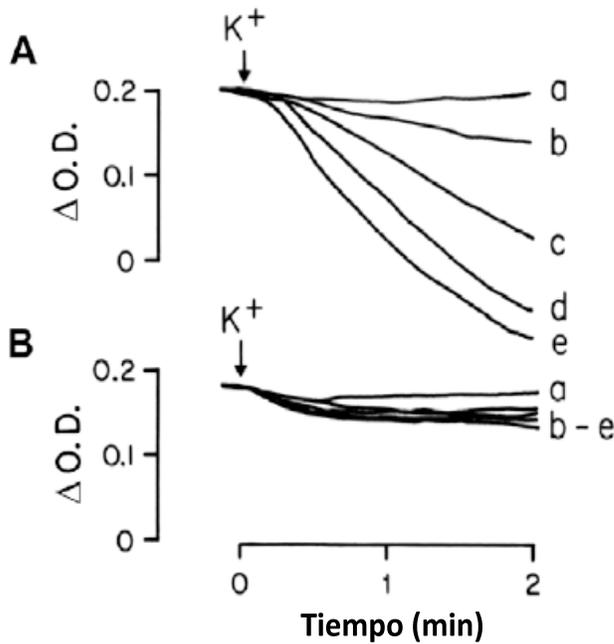


Figura 15. En mitocondrias de *S. cerevisiae* el mersalil induce hinchamiento de las mitocondrias. Condiciones experimentales: Manitol 0.3 M, MES 5 mM, pH 6.8 ajustado con TEA y 10 mL/mL de etanol como sustrato respiratorio. En ausencia (A) o presencia (B) de 10 μ M dVO_4 . Los experimentos fueron a: s_cMUC cerrado con 4mM Pi, b: 4mM Pi + 5, c: 10, d: 80, e: 200 nmoles \cdot (mg proteína) $^{-1}$ de mersalil

En experimentos control, las mitocondrias no presentaron hinchamiento (Fig. 15A,B, trazo a). Sin embargo, al adicionar mersalil a diferentes concentraciones se detectó un patrón de hinchamiento dependiente de la concentración. En presencia de mersalil 5 nmoles \cdot (mg prot) $^{-1}$, las mitocondrias presentaron un patrón de hinchamiento mayor al control. Al incrementar la concentración de mersalil a 10 nmoles \cdot (mg prot) $^{-1}$, el hinchamiento registrado fue considerablemente mayor (Fig. 15A, trazo b). En presencia de mersalil 20 nmol.mg.prot se registró un patrón de hinchamiento llegando a un máximo

en presencia de mersalil $200 \text{ nmoles} \cdot (\text{mg prot})^{-1}$ (Fig. 15A, trazo e). Estos resultados indicaron que el mersalil inducía la transición de la permeabilidad. Para poder discernir si esta permeabilidad era a nivel de apertura del $s_c\text{MUC}$, se llevaron a cabo los mismos experimentos pero en presencia de $10 \mu\text{M}$ de dVO_4 (Fig. 15B). En experimentos control, las mitocondrias no presentaron hinchamiento (Fig. 15B, trazo a). En presencia de mersalil, los resultados indican que no hubo hinchamiento de las mitocondrias cuando el $s_c\text{MUC}$ fue inhibido por dVO_4 (Fig 15B, trazos b-e).

Debido a que los organomercuriales presentan inespecificidad, ya que potencialmente reaccionan con cualquier sulfhidrilo expuesto de las proteínas, existe la probabilidad de que el mersalil haya reaccionado con componentes de la cadena respiratoria o con las membranas mitocondriales. Esto implicaría que la disminución en el potencial de membrana y el aumento en el hinchamiento de las mitocondrias haya sido producto del daño a un nivel no relacionado con el $s_c\text{MUC}$, el cual por alguna razón podría ser estabilizado por dVO_4 . Para descartar lo anterior, se llevaron a cabo experimentos de consumo de oxígeno en presencia de diferentes concentraciones de mersalil y del inhibidor específico del $s_c\text{MUC}$ dVO_4 (Tabla 3).

Tabla 3. En las mitocondrias aisladas de la cepa BY4741 de *S. cerevisiae*, el mersalil induce una disminución en la relación respiratoria U/4. Condiciones experimentales: 4mM de Pi, manitol 0.6 M , MES 5 mM , pH 6.8 ajustado con TEA y $10 \mu\text{L/mL}$ de etanol como sustrato respiratorio. El consumo de oxígeno está dado en $\text{nat O}(\text{min} \cdot \text{mg prot})^{-1}$.

[Mersalil] (nmol*mg prot ⁻¹)	dVO ₄ 0 μM			dVO ₄ 10 μM		
	Estado U	Estado 4	U/4	Estado U	Estado 4	U/4
0	551 ± 14	182 ± 14	3.0	561 ± 16	184 ± 20	3.1
5	646 ± 11	247 ± 9	2.6	583 ± 43	181 ± 12	3.2
10	562 ± 19	232 ± 20	2.4	674 ± 18	217 ± 16	3.1
20	568 ± 28	299 ± 75	2.0	567 ± 16	208 ± 19	2.7
80	618 ± 13	337 ± 31	1.9	553 ± 22	230 ± 18	2.4
160	690 ± 31	615 ± 14	1.1	577 ± 20	268 ± 32	2.2
200	634 ± 26	666 ± 12	1.0	559 ± 12	256 ± 12	2.2

En mitocondrias de levadura, la transición de la permeabilidad mitocondrial origina un incremento en el consumo de oxígeno en el Estado respiratorio 4 (en ausencia de ADP) [Perez-Vazquez y cols., 2003]. Esto significa que las mitocondrias son insensibles al incremento en la respiración originado por el protonóforo FCCP a medida que el s_c MUC se abre. En Estado 4 y en presencia de 4mM de Pi en el medio de reacción, las mitocondrias presentaron una velocidad en el consumo de oxígeno de 182 ± 14 nat O(min*mg prot)⁻¹. En presencia de FCCP, la velocidad incrementó a 551 ± 14 nat O(min*mg prot)⁻¹. Esto dio como resultado una relación U/4 de 3.0 y es indicativo de una preparación de mitocondrias acopladas (Tabla 3). Al añadir 5 nmoles*(mg prot)⁻¹ de mersalil, la velocidad de consumo de oxígeno en Estado 4 incrementó a 247 ± 9 nat O(min*mg prot)⁻¹ y la relación U/4 fue de 2.6. En presencia de mersalil a una concentración de 10 nmoles*(mg prot)⁻¹, la relación U/4 fue de 2.4. Esta relación disminuyó a 2.0 con mersalil 20 nmoles*(mg prot)⁻¹; a 1.9 con mersalil 80 nmoles*(mg prot)⁻¹; a 1.1 con mersalil 160 nmoles*(mg prot)⁻¹ y llegando al mínimo de 1.0 en presencia de mersalil 200 nmoles*(mg prot)⁻¹. Es importante recalcar que a esta última concentración de mersalil, el transporte de fosfato es inhibido al 100% [Cortes y cols.,

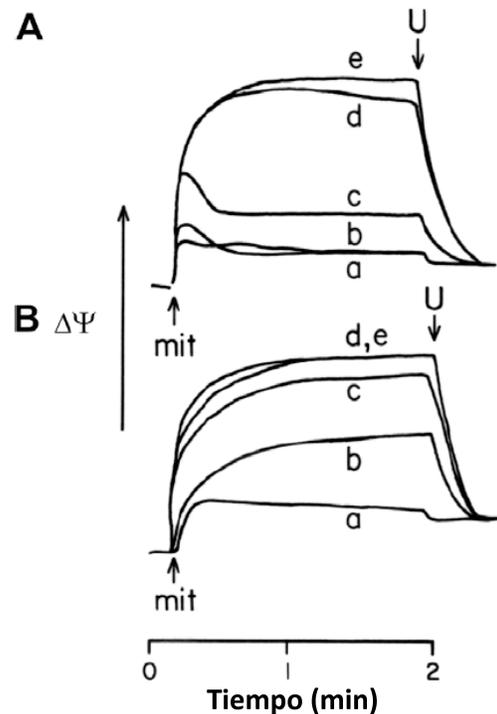
2000]. Al llevar a cabo los mismos experimentos en presencia de 10 μM de dVO_4 , se observó que las mitocondrias fueron más resistentes a los efectos tóxicos del mersalil (Tabla 3). La respiración en ausencia de mersalil y presencia de dVO_4 en Estado 4 fue de $184 \pm 20 \text{ nat O}(\text{min} \cdot \text{mg prot})^{-1}$, un valor muy similar al reportado en ausencia de dVO_4 . La velocidad en Estado desacoplado fue de $561 \pm 16 \text{ nat O}(\text{min} \cdot \text{mg prot})^{-1}$ y el cociente U/4 fue de 3.1. Este valor no se modificó en presencia de 5 ó 10 $\text{nmol} \cdot (\text{mg prot})^{-1}$ de mersalil. Al incrementar el mersalil a 20 y 80 $\text{nmol} \cdot (\text{mg prot})^{-1}$, la relación U/4 disminuyó a 2.7 y 2.4, respectivamente. Finalmente, en presencia de mersalil a una concentración de 200 $\text{nmol} \cdot (\text{mg prot})^{-1}$, la relación U/4 fue de 2.2, indicativo de una muestra de mitocondrias con mayor acoplamiento (Tabla 3).

5. Las mitocondrias de la cepa ΔPic son resistentes al efecto acoplante del fosfato.

Dado que el mersalil es un compuesto ampliamente usado como inhibidor del transporte de fosfato, se pensó que el efecto sobre el $s_c\text{MUC}$ se dio a nivel del acarreador de fosfato (Pic). Con esto en mente, se decidió caracterizar las propiedades bioenergéticas de las mitocondrias aisladas de una cepa carente de Pic. De acuerdo con resultados reportados en la literatura, estas mitocondrias no son capaces de establecer un potencial de membrana en presencia de un sustrato respiratorio [Zara y cols., 1996]. Por ello se decidió establecer un potencial de membrana por adición de ATP bloqueando la cadena respiratoria con CN^- [Roucou y cols., 1995]. Aún en estas condiciones, la ausencia de P_i ocasionó un colapso en el $\Delta\Psi$ (Fig. 16A, trazo a). La adición de P_i 1 a 4 mM no tuvo un efecto considerable sobre el $\Delta\Psi$ (Fig. 16A, trazos b,c). Fue necesario añadir P_i 10 mM para obtener un $\Delta\Psi$ elevado (Fig. 16A trazo d). En presencia de P_i 20 mM, el potencial

fue elevado y estable (Fig 16A trazo e). Es importante mencionar que estos dos últimos trazos son cantidades no fisiológicas de Pi [Wallace y cols., 1994].

Figura 16. En mitocondrias de *S. cerevisiae* de la cepa $\Delta\Pi c$, se modifica la sensibilidad a Pi pero no a dVO_4 . Condiciones experimentales: Manitol 0.6 M, MES 5 mM, KCl 20 mM, pH 6.8 ajustado con TEA, 0.5 mM CN^- , 2 mM ATP. (A) $-dVO_4$, (B) $+10 \mu M dVO_4$. a: 1 mM Pi, b: 2 mM Pi, c: 4 mM Pi, d: 10 mM Pi, e: 20 mM Pi.



En presencia de dVO_4 $10 \mu M$, la ausencia de fosfato tuvo efectos marginales en el $\Delta\Psi$ (Fig. 16B, trazo a). Sin embargo, al añadir fosfato 1 mM los valores de $\Delta\Psi$ fueron mucho mayores y estables (Fig. 16B, trazo b). En presencia de 4 mM de Pi, el potencial fue muy similar a los valores máximos reportados (Fig. 16B, trazo c). Finalmente, en

presencia de fosfato 10 o 20 mM, los valores de $\Delta\Psi$ fueron máximos y no variaron con respecto al tiempo (Fig. 16B, trazos d, e).

Para verificar la probable presencia del s_c MUC en las mitocondrias de la cepa Δ Pic, se llevaron a cabo experimentos de hinchamiento mitocondrial (Fig. 17). En ausencia de Pi, el hinchamiento registrado fue máximo (Fig. 17A, trazo a). La adición de Pi 1mM prácticamente no modificó el patrón de hinchamiento (Fig. 17A, trazo b). En presencia de 4 mM Pi, las mitocondrias de esta cepa se hincharon a un nivel medio, comparado con el trazo en ausencia de Pi (Fig. 17A, trazos a y c). En presencia de 10 y 20mM de Pi, no se registró hinchamiento (Fig. 17A, trazos d y e).

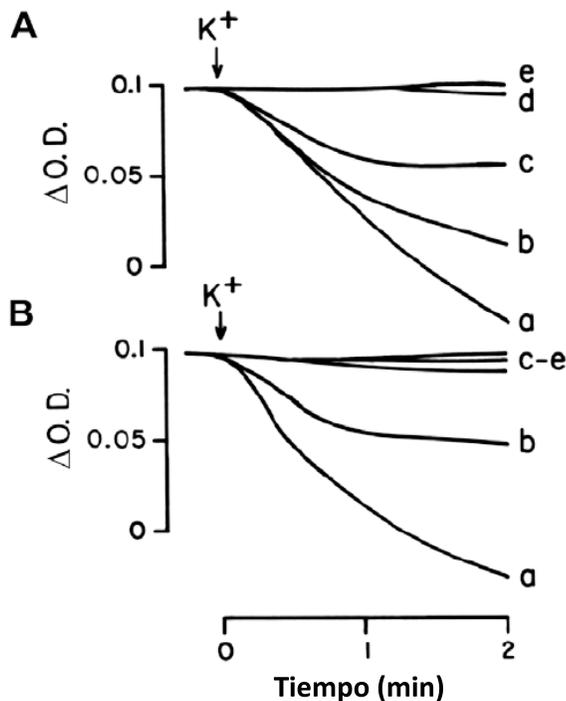


Figura 17. En mitocondrias de *S. cerevisiae* de la cepa Δ Pic, se sigue detectando permeabilidad a KCl sensible a dVO_4 . Condiciones experimentales: manitol 0.3 M, MES 5 mM, pH 6.8 ajustado con TEA, 0.5 mM CN^- , 2 mM ATP. Los experimentos fueron llevados en ausencia (A) o presencia (B) de $10 \mu M dVO_4$. Los experimentos fueron a: 0 mM Pi, b: 1 mM Pi, c: 4 mM Pi, d: 10 mM Pi, e: 20 mM Pi.

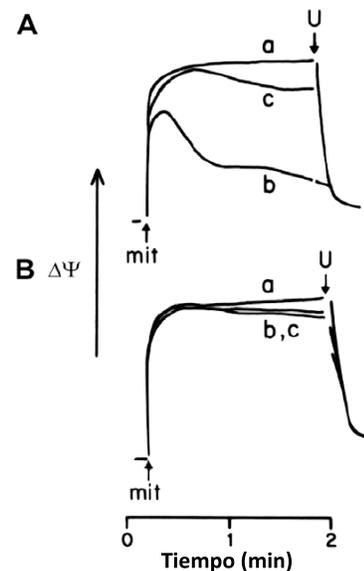
El hinchamiento de las mitocondrias de esta cepa también fue sensible a la presencia de $10 \mu M dVO_4$ (Fig. 17B, trazos b-e). El hinchamiento se redujo considerablemente al adicionar 1 mM de Pi al medio de reacción (Fig. 17B, trazo b). Éste fue completamente

inhibido a mayores concentraciones (Fig. 17B, trazos c-e). Éstos resultados sugieren que el ATP y la ausencia de Pi desencadenan la transición de la permeabilidad mitocondrial aún en las mitocondrias de la cepa Δ Pic.

6. Las mitocondrias de la cepa Δ Pic son resistentes al efecto tóxico del mersalil.

Estudios previos del laboratorio demostraron que la inhibición del transporte de fosfato desencadena hinchamiento y una pérdida del potencial de membrana mitocondrial [Cortes y cols., 2000]. Para poder establecer si el blanco a través del cual el mersalil induce la apertura del s_c MUC es el acarreador de fosfato, se optó por probar el efecto de este compuesto en mitocondrias de la cepa Δ Pic (Fig. 18). Los experimentos fueron llevados a cabo en presencia de 20 mM de Pi (partiendo de los datos obtenidos en la Fig. 17), 0.5 mM CN^- y 2 mM ATP para establecer un $\Delta\Psi$ mediado por la hidrólisis de ATP [Roucou y cols., 1995]. En condiciones estándar (4 mM Pi, etanol y sin ATP las mitocondrias de la cepa Δ Pic) no generan un potencial estable.

Figura 18. En mitocondrias de *S. cerevisiae* de la cepa Δ Pic, se modifica la sensibilidad a mersalil. **Condiciones experimentales:** 20 mM Pi, Manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH 6.8 ajustado con TEA, 0.5 mM CN^- , 20 mM KCl y 2 mM ATP. (A) Cepa silvestre, (B) Cepa Δ Pic. Los experimentos fueron a: Control, b: 200 nmoles $(mg\ prot)^{-1}$ de mersalil y c: Mersalil + 10 μ M dVO_4 .



Los experimentos fueron llevados a cabo en tres condiciones: 1) Control positivo (s_c MUC cerrado), en la cual las mitocondrias establecen un potencial de membrana elevado y constante, 2) En presencia de 200 nmoles*(mg prot)⁻¹ de mersalil y 3) En presencia de mersalil y dVO₄ 10 μM. Los experimentos control llevados a cabo en las mitocondrias aisladas de la cepa silvestre (Fig. 18A, trazo a) demostraron que en condiciones control, las mitocondrias establecen un elevado potencial de membrana sensible al desacoplante FCCP. Al adicionar mersalil 200 nmoles*(mg prot)⁻¹, el potencial de membrana de las mitocondrias disminuyó considerablemente (Fig. 18A, trazo b). Al igual que en experimentos anteriores (Fig. 12), el potencial fue restituido a niveles similares al experimento control al adicionar 10 μM de dVO₄ (Fig. 18A, trazo c). Al llevar a cabo los mismos experimentos en las mitocondrias de la cepa ΔPic, se observó que éstas establecían un ΔΨ constante y elevado en condiciones control (Fig. 18B, trazo a). En forma opuesta a los experimentos realizados en la cepa silvestre, al adicionar 200 nmoles*(mg prot)⁻¹ de mersalil, el potencial registrado fue muy similar al experimento control (Fig. 18B, trazo b). Estos valores de potencial no fueron modificados al adicionar dVO₄ (Fig. 18B, trazo c).

Para reafirmar estos resultados, se efectuaron experimentos de hinchamiento mitocondrial para evaluar el efecto del mersalil en mitocondrias de la cepa ΔPic (Fig. 19).

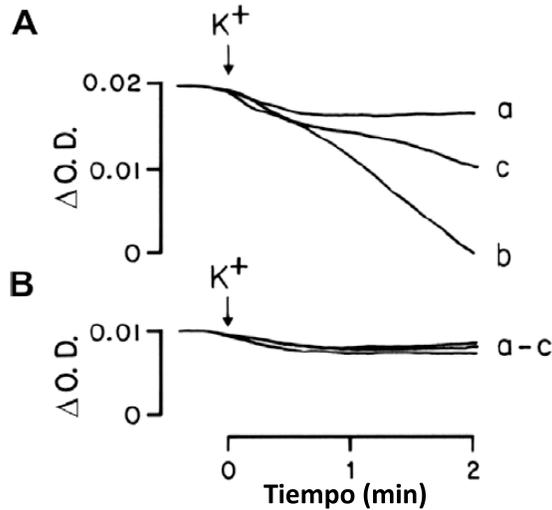


Figura 19. En mitocondrias de *S. cerevisiae* de la cepa Δ Pic, se modifica la sensibilidad a mersalil. **Condiciones experimentales:** Manitol 0.3 M, MES 5 mM, pH 6.8 ajustado con TEA, 0.5mM CN^- , 2mM ATP. K^+ denota la adición de 20 mM de KCl. (A) Cepa silvestre, (B) Cepa Δ Pic. Los experimentos fueron a: Control, b: 200 nmoles.mg.prot de mersalil y c: Mersalil + 10 μ M dVO₄.

En condiciones control, las mitocondrias presentaron un patrón de hinchamiento basal (Fig. 19A, trazo a). Al adicionar 200 nmoles*(mg prot)⁻¹ de mersalil, el hinchamiento registrado fue mayor al registrado en el experimento control (Fig. 19A, trazo b). Este patrón de hinchamiento disminuyó en presencia de dVO₄ (Fig. 19A, trazo c). Al llevar a cabo los experimentos de hinchamiento en la cepa Δ Pic, se registró un hinchamiento basal en condiciones control (Fig. 19B, trazo a), sin embargo la adición de mersalil o dVO₄ no modificó el patrón de hinchamiento (Fig. 19A, trazos b y c), lo que concuerda con los experimentos de $\Delta\Psi$ llevados a cabo en las mismas condiciones (Fig. 18).

7. Las propiedades de exclusión molecular del *s_cMUC* de la cepa Δ Pic son distintas al de la cepa silvestre isogénica.

En los primeros trabajos sobre la caracterización de la transición de la permeabilidad mitocondrial en mamíferos [Haworth y Hunter, 1979; Haworth y Hunter, 1980; Hunter y Haworth, 1979a; Hunter y Haworth, 1979b] y levaduras [Jung

y cols., 1997], se midió el tamaño del poro de transición por exclusión molecular. Estos experimentos se basan en la presión osmótica que puede ejercer cualquier molécula impermeable a través de una membrana porosa que permita el flujo de agua a través de ella. Entre las moléculas más utilizadas destacan los dextranses y polietilenglicoles de elevada masa molecular. Con estos experimentos se determinó que el PTP de mamíferos y el s_c MUC permiten el transporte de moléculas con una masa menor a 1.5 kDa [Bernardi y Forte, 2007; Bernardi y Rasola, 2007; Jung y cols., 1997]. Esto quiere decir que las moléculas de mayor masa no podrán ser transportadas a través de estos poros, originando la salida de agua de los organelos para compensar la diferencia en la concentración de estas moléculas. En estos experimentos, usualmente se permite que las mitocondrias se hinchen, induciendo la apertura del s_c MUC ya sea por adición de ATP o por depleción de los niveles de Pi [Manon y Guerin, 1997; Pérez-Vázquez y cols., 2003]. Posteriormente se adicionan las moléculas que originen contracción incrementando las masas moleculares de estas y procurando mantener las mismas condiciones de osmolaridad, ya que no son osmolitos ideales ($1\text{mOsMol} \neq 1\text{mM}$). Con esto en mente, se llevó a cabo una titulación para determinar el tamaño del s_c MUC en la cepa silvestre y la mutante ΔPic (Fig. 20), para comparar los tamaños de poro obtenidos con los reportados en la literatura [Jung y cols., 1997].

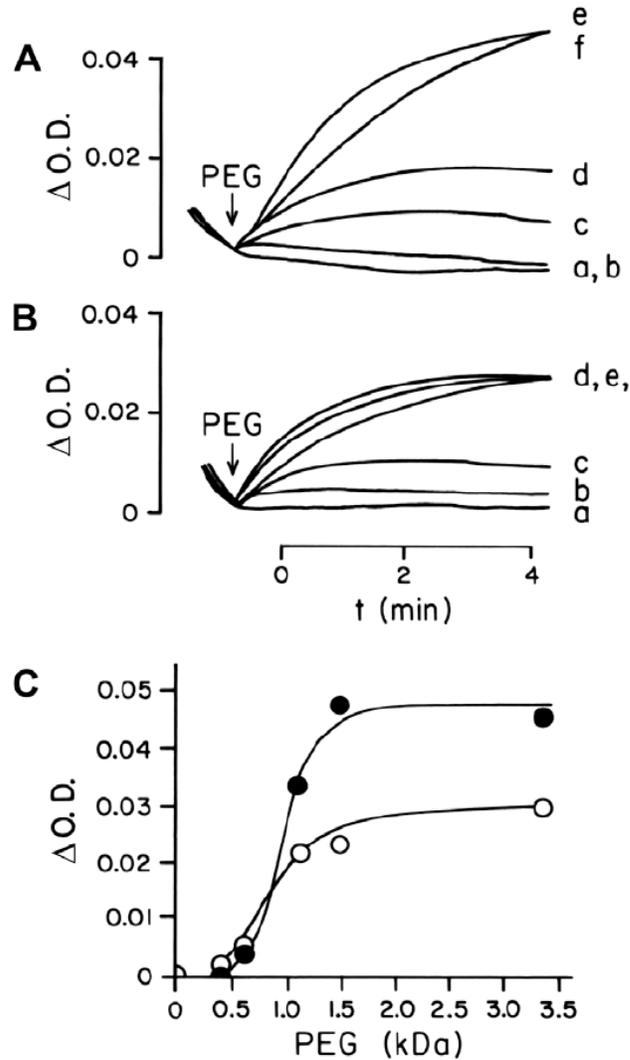


Figura 20. Propiedades de exclusión molecular de las mitocondrias de las cepas silvestre y Δ Pic. Condiciones experimentales: Manitol 0.3 M, MES 5 mM, pH 6.8 ajustado con TEA, 0.5mM CN^- , 2mM ATP. (A) Cepa silvestre, (B) Cepa Δ Pic, (C) Ajuste de los datos a un modelo sigmoide. a: Sin PEG, b: PEG 0.4 kDa, c: PEG 0.6 kDa, d: PEG 1.1 kDa, e: PEG 1.45 kDa y f: PEG 3.35 kDa. Círculos opácos: WT; Círculos blancos: Δ Pic.

En ausencia de PEG, las mitocondrias no presentaron un incremento en la absorbencia el cual es proporcional a la contracción de las mitocondrias (Fig. 20A trazo a). Al añadir PEG de 0.4 kDa, las mitocondrias de la cepa silvestre no presentaron contracción (Fig. 20A trazo b).

En presencia de un PEG de 0.6 kDa, la suspensión de mitocondrias presentó un patrón de contracción inferior al 50% (Fig. 20A trazo c). Al incrementar la masa del PEG a 1.1 kDa (Fig. 20A trazo d), las mitocondrias presentaron un patrón de contracción mayor, llegando a un máximo en presencia de PEG de 1.5 kDa (Fig. 20A trazo e). Al incrementar la masa de PEG a 3.35 kDa, el patrón de contracción fue más lento que con PEG 1.5 kDa, sin embargo este comportamiento ha sido reportado tanto para mamíferos como para levaduras [Haworth y Hunter, 1979; Jung y cols., 1997]. Al llevar a cabo esta titulación para las mitocondrias de la cepa Δ Pic, se observó que no hubo contracción en

ausencia de PEG (Fig. 20B trazo a). Sin embargo, estas fueron más sensibles que la silvestre a la adición de PEG de 0.4 kDa (Fig. 20B trazo b). En presencia de PEG de 0.6 kDa, las mitocondrias presentaron un patrón de contracción mucho mayor, llegando a un máximo en presencia de PEG 1.1 kDa (Fig. 20B trazos c y d). La adición de PEG de 1.45 y 3.35 kDa no incrementó el patrón de contracción en comparación con el registrado en presencia de PEG de 1.1 kDa [Fig. 20B trazos e y f]. Esto sugiere que el poro ya no permite la entrada de moléculas con masa igual a 1.1 kDa. Al regraficar las diferencias máximas en la absorbencia registrada producto de la contracción con PEGs y ajustar los datos a un modelo de una curva sigmoide, se pudo estimar la masa media para la obtención de un patrón medio de contracción (Fig. 20C). Del modelo, se obtuvo que para la cepa silvestre, el s_c MUC permite el paso de solutos con una masa media de 1.12 ± 0.06 kDa. Este dato es similar al determinado por otros grupos de investigación [Jung y cols., 1997]. Para las mitocondrias de la cepa Δ Pic, el tamaño medio máximo de contracción fue de 0.72 ± 0.01 kDa.

Los resultados utilizando PEGs de diferente masa molecular sugirieron que existe una diferencia entre el canal detectado en mitocondrias de la cepa silvestre y la mutante Δ Pic. Por ello se decidió evaluar la velocidad de contracción de las mitocondrias silvestres y mutantes con un PEG que ya no entrara en las mitocondrias de la cepa Δ Pic. Bajo la suposición de que si el s_c MUC en ausencia del acarreador de fosfato tiene menores dimensiones, entonces un PEG de una masa crítica ocasionaría una mayor velocidad de contracción al ser comparada con la velocidad de contracción de una suspensión de mitocondrias con un s_c MUC de mayores dimensiones (Fig. 21).

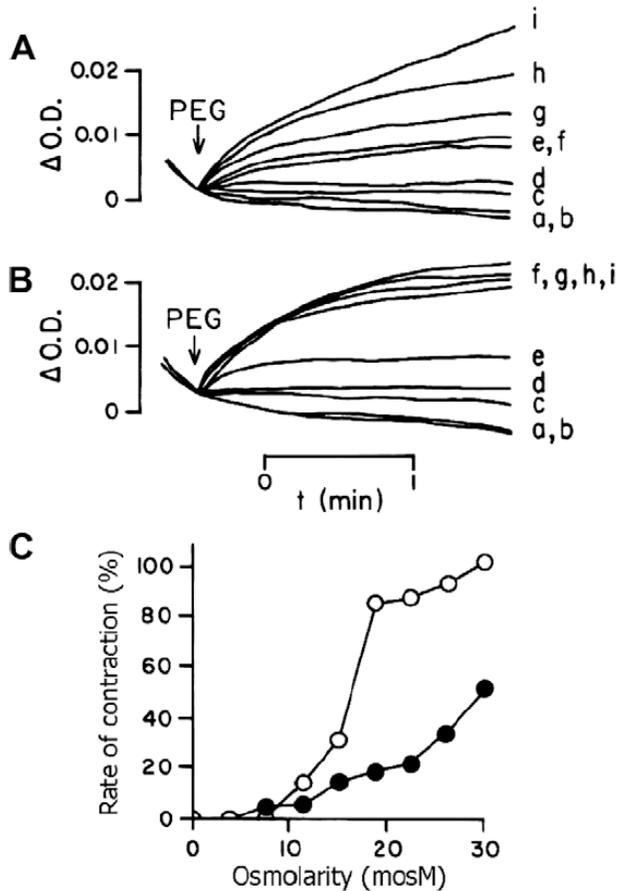


Figura 21. Propiedades de exclusión molecular de las mitocondrias de las cepas silvestre y Δ Pic a diferentes osmolaridades. Condiciones experimentales: Manitol 0.3 M, MES 5 mM, pH 6.8 ajustado con TEA, 0.5mM CN⁻, 2mM ATP. En donde se indica, se añadió PEG de 1.1 kDa.

(A) Cepa silvestre, (B) Cepa Δ Pic, (C) Velocidades porcentuales de contracción tomando como máximo la contracción obtenida en presencia de PEG 1.45 kDa. a: Sin PEG, b: 3.75 mosM, c: 7.5 mosM, d: 11.25 mosM, e: 15 mosM, f: 18.75 mosM, g: 22.5 mosM, h: 26.25 mosM, i: 30 mosM de PEG 1.45 kDa. Círculos opácos: WT; Círculos vacíos: Δ Pic.

En ausencia de PEG, no se observó contracción ni en las mitocondrias de la cepa silvestre, ni en la Δ Pic (Fig. 21, trazos a). Posteriormente se observó que al añadir concentraciones crecientes de PEG de 1.1 kDa, la contracción mitocondrial se incrementaba proporcionalmente en la cepa silvestre (Fig. 21A). Cuando la misma titulación se llevó a cabo en las mitocondrias de la cepa mutante, se observó que la contracción se incrementó de 3.75 a 15 mosM de PEG de 1.1 kDa (Fig. 21B, trazos b-d). Al incrementar la concentración de PEG, las mitocondrias de la cepa Δ Pic presentaron un salto en el porcentaje de contracción a niveles mayores al 80% (Fig. 21C, círculos vacíos). A concentraciones de 18.5 a 30 mosM de PEG, la contracción aumentó marginalmente hasta llegar al 100% en presencia de PEG 30 mosM (Fig. 21C, círculos

vacíos). Éstos resultados sugieren que el canal detectado en las mitocondria de la cepa Δ Pic presenta menores dimensiones.

Discusión

La levadura *S. cerevisiae* es un microorganismo anaerobio facultativo. Por lo tanto es capaz de crecer por la vía fermentativa con un contenido de mitocondrias parcial o completamente disfuncionales [Sherman, 2002]. Lo anterior hace posible que proteínas de suma importancia como VDAC o Pic puedan ser eliminados genéticamente sin que sean letales. En principio, esta característica sitúa a *S. cerevisiae* como el mejor modelo para la comprensión y caracterización de varios fenómenos mitocondriales incluyendo el de la transición de la permeabilidad. Sin embargo, es importante conocer las diferencias que presentan las mitocondrias de *S. cerevisiae* al ser comparadas con mitocondrias de otras especies [Azzolin y cols., 2010a; Azzolin y cols., 2010b]. Por una parte, las mitocondrias de *S. cerevisiae* carecen de un uniportador de Ca^{2+} sensible a rojo de rutenio [Jung y cols., 1997]. Por otra parte, el s_c MUC es insensible a ciclosporina A (aunque se ha demostrado que la ciclofilina de *S. cerevisiae* sí es inhibida por el inmunosupresor) [Jung y cols., 1997; Matouschek y cols., 1995]. Estas características ocasionan que la levadura sea muy resistente a la presencia de Ca^{2+} en el medio de reacción y por consiguiente ha llevado a expertos en el campo a proponer que el s_c MUC y el PTP son entidades sin ninguna relación entre sí [Halestrap, 2009b; Halestrap, 2010]. Por otra parte, otro grupo de expertos ha sugerido recientemente que la transición de la permeabilidad podría estar ampliamente conservada en el dominio eucarionte [Azzolin y cols., 2010]. Esta hipótesis fue postulada con base en el descubrimiento de que el Ca^{2+}

induce la transición de la permeabilidad en *S. cerevisiae* siempre y cuando las mitocondrias sean incubadas con Ca^{2+} , bajos niveles de fosfato y en presencia del ionóforo de Ca^{2+} ETH129 [Yamada y cols., 2009]. Esto significa que el transporte de Ca^{2+} a la matriz mitocondrial puede desencadenar la apertura del $s_c\text{MUC}$ y por lo tanto estos estudios y los presentados en esta tesis sugieren que las mitocondrias de *S. cerevisiae* presentan los dos sitios de interacción con Ca^{2+} presentes en el $s_c\text{MUC}$: Un sitio externo en donde el Ca^{2+} puede inhibir la apertura del $s_c\text{MUC}$ y del PTP con IC_{50} de 0.3 y 0.25 mM respectivamente y un sitio interno en donde el Ca^{2+} induce la transición de la permeabilidad [Al-Nasser y Crompton, 1986; Bernardi y cols., 1993; Perez-Vazquez y cols., 2003; Yamada y cols., 2009]. Los resultados presentados en estos trabajos sugieren que la transición de la permeabilidad está puede ser un fenómeno ampliamente distribuido tanto en mamíferos como levaduras. Adicionalmente, los resultados presentados en esta tesis aportan evidencia que sugiere que el sitio externo en donde el Ca^{2+} inhibe la transición de la permeabilidad puede tener una IC_{100} cercana a 50 μM siempre y cuando exista Mg^{2+} y Pi en el medio de incubación de las mitocondrias. En forma análoga, el PTP podría ser inhibido con Ca^{2+} siempre y cuando exista RR y Mg^{2+} en el medio de reacción.

A pesar de que *S. cerevisiae* representa la posibilidad de obtener mitocondrias carentes de la gran mayoría de proteínas mitocondriales, es importante mencionar que fue necesario hacer adaptaciones a los ensayos comúnmente efectuados en el laboratorio con la finalidad de evitar resultados falsos positivos. En el caso de las mitocondrias de la cepa ΔPor1 , las mitocondrias aisladas no transportan eficientemente dinucleótidos como el NADH y adenín nucleótidos [Antos y cols., 2001a; Antos y cols., 2001b; Averet y cols.,

2002; Sanchez y cols., 2001]. Esto origina que las mitocondrias aisladas de esta cepa presenten velocidades respiratorias muy inferiores a las reportadas para aquellas mitocondrias que expresan VDAC (Resultados no mostrados). En el caso del NADH, la molécula es transportada a través de la membrana externa por VDAC para poder ser oxidada por las NADH deshidrogenasas externas [Kmita y Budzinska, 2000; Kmita y cols., 1999]. En ausencia de VDAC, moléculas como el NADH pueden ser internalizadas a la mitocondria por el complejo TOM, sin embargo el transporte de estas moléculas a través de la translocasa TOM no sustituye totalmente la ausencia de VDAC. Por lo anterior, en los experimentos presentados para la cepa Δ Por1, este problema fue resuelto al utilizar etanol como sustrato respiratorio. Al añadir etanol a la mitocondria, este es oxidado por la alcohol deshidrogenasa mitocondrial generando así NADH dentro de la matriz mitocondrial y obteniendo velocidades de respiración similares a las de las mitocondrias de la cepa silvestre. Por otra parte, la inducción del s_c MUC en estas cepas se llevó a cabo por restricción de Pi en vez de por adición de ATP al medio de reacción. En el caso de las mitocondrias de la cepa Δ Pic, el potencial de membrana $\Delta\Psi$ en condiciones respiratorias tiende a ser muy bajo, ya que el transporte de Pi se encuentra acoplado a la respiración mitocondrial [Zara y cols., 1996]. Sin embargo, el problema de la baja capacidad para establecer un $\Delta\Psi$ similar a las mitocondrias de la cepa silvestre pudo ser resuelto al inhibir a la cadena respiratoria con cianuro y generar un potencial utilizando a la ATP sintasa como ATPasa al hidrolizar el ATP exógeno [Roucou y cols., 1995]. En estas condiciones, se pudo evaluar la sensibilidad de las cepas silvestre y mutante Δ Pic al organomercurial mersalil. Estudios previos del grupo de Wohlrab con el Pic aislado y reconstituido sugieren que las cisteínas implicadas en la transición del modo de acarreo

acoplado con protones y no acoplado (inespecífico) dependen exclusivamente de dos C28 en un dímero del Pic [Schroers y cols., 1997]. Sin embargo, experimentos recientes del grupo de Kunji sugieren que en realidad estas moléculas operan como monómeros [Kunji y Crichton, 2010]. Este mismo debate se ha suscitado en torno a VDAC. El grupo de Rostovsteva propone que este canal opera como monómero [Rostovtseva com pers.], mientras que datos recientes a partir de análisis cristalográficos y funcionales sugieren que este canal puede operar como monómero pero también como dímero y hexámero [Mader y cols., 2010; Ujwal y cols., 2009]. La diferencia entre el funcionamiento como monómero y oligómero radica en que como monómero, VDAC transporta moléculas a través del barril β . Al funcionar como hexámero, y bajo un estímulo apoptótico, se favorece la translocación de moléculas de mayor masa molecular como el factor de inducción de la apoptosis (AIF) y el citocromo *c*. Esto se da a través de un mecanismo desconocido el cual constituye un tema de amplio debate [Mader y cols., 2010]. En cuanto a la sensibilidad de VDAC a cationes, estudios en mitocondrias de líneas celulares sugieren que la isoforma 1 presenta dos residuos ácidos implicados en la unión a Ca^{2+} y a rojo de rutenio [Israelson y cols., 2007]. En una colaboración con este grupo, se logró identificar los residuos de interacción en Por1. En mitocondrias de una cepa con la mutación en la porina Q72E se determinó un mayor efecto protector del rojo de rutenio sobre la oxidación de NADH probablemente debido a que en esa mutante (y en menor proporción en la silvestre) el Rojo de Rutenio también se une a VDAC de levadura impidiendo el tráfico de solutos [Resultados no publicados].

En trabajos recientes del grupo de Halestrap, se ha propuesto que el acarreador de Pi es un componente del PTP de mamíferos [Leung y Halestrap, 2008; Leung y cols.,

2008]. Los resultados presentados en esta tesis sugieren que este acarreador también forma parte del s_c MUC y por ende se aporta evidencia que refuerza la noción de que la transición de la permeabilidad mitocondrial es un fenómeno conservado en el dominio eucarionte. Sin embargo, es importante recalcar que el s_c MUC (o una estructura similar) sigue siendo detectada en las mutantes Δ Pic. La estructura detectada tiene dimensiones cercanas a la mitad del límite medio de exclusión molecular del s_c MUC y sugiere que otra proteína probablemente de dimensiones similares al Pic (otro acarreador mitocondrial) contribuye a la estructura del poro en las mitocondrias de la cepa Δ Pic [Zoratti y cols., 2010; Zoratti y cols., 2005]. Otras hipótesis sugieren que el canal en el núcleo del poro de transición está formado por componentes del complejo TIM23 algunos de los cuales interactúan con el translocador de nucleótidos de adenina (y probablemente con Pic) [Claypool y cols., 2008].

La posibilidad de que el s_c MUC es la manifestación bioenergética del agregado de proteínas constituido por VDAC, Pic, ANT y probablemente componentes de la maquinaria de importación de proteínas parece tener cada día mayor validez. Al eliminar genéticamente la mayoría de estas proteínas, se sigue detectando permeabilidad inespecífica. Sin embargo, ciertas propiedades del canal detectado en estas mutantes cambian, lo cual lleva a considerar que estas proteínas pueden asociarse para dar como resultado MUCs con diferentes niveles de regulación.

Conclusiones Parciales

- El s_c MUC es inhibido reversiblemente por Ca^{2+} .
- La inhibición por Ca^{2+} se da en concentraciones micromolares siempre y cuando exista Mg^{2+} y Pi en el medio de reacción.
- En ausencia de VDAC se pierde la modulación por Ca^{2+} , OG y dVO_4 .
- VDAC es un probable componente del s_c MUC.
- El mersalil induce la apertura del s_c MUC.
- El efecto del mersalil y el fosfato es considerablemente menor en la cepa ΔPic .
- Un s_c MUC de menores dimensiones es detectado en las mitocondrias de la cepa ΔPic .
- El acarreador de fosfato es un probable componente del s_c MUC.
- La transición de la permeabilidad mitocondrial en *S. cerevisiae* presenta una estructura y regulación con ciertas similitudes a la detectada en mamíferos.

Conclusion General

- El s_c MUC de *S. cerevisiae* puede ser considerado como un modelo para la comprensión de ciertos aspectos del poro de transición de la permeabilidad de otras especies.

Perspectivas

- Evaluar el efecto de derivados de ubiquinonas (moduladores del PTP de mamíferos) sobre el s_c MUC.
- Determinar el sitio de interacción de los derivados de ubiquinonas utilizados.

Referencias

- Abrahams, J. P. , Leslie, A. G. , Lutter, R. y Walker, J. E. (1994). "Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria." *Nature* 370(6491): 621-8.
- Åkerman, K. E. y Wikström, M. K. (1976). "Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential." *FEBS Lett* 68(2): 191-7.
- Al-Nasser, I. y Crompton, M. (1986). "The reversible Ca²⁺-induced permeabilization of rat liver mitochondria." *Biochem J* 239(1): 19-29.
- Antos, N. , Budzinska, M. y Kmita, H. (2001a). "An interplay between the TOM complex and porin isoforms in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria." *FEBS Lett* 500(1-2): 12-6.
- Antos, N. , Stobienia, O. , Budzinska, M. y Kmita, H. (2001b). "Under conditions of insufficient permeability of VDAC1, external NADH may use the TOM complex channel to cross the outer membrane of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria." *J Bioenerg Biomembr* 33(2): 119-26.
- Averet, N. , Aguilaniu, H. , Bunoust, O. , Gustafsson, L. y Rigoulet, M. (2002). "NADH is specifically channeled through the mitochondrial porin channel in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Bioenerg Biomembr* 34(6): 499-506.
- Azzolin, L. , Basso, E. , Argenton, F. y Bernardi, P. (2010a). "Mitochondrial Ca²⁺ transport and permeability transition in zebrafish (*Danio rerio*)." *Biochim Biophys Acta*.
- Azzolin, L. , von Stockum, S. , Basso, E. , Petronilli, V. , Forte, M. A. y Bernardi, P. (2010b). "The mitochondrial permeability transition from yeast to mammals." *FEBS Lett* 584(12): 2504-9.
- Babcock, G. T. (1999). "How oxygen is activated and reduced in respiration." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(23): 12971-3.
- Baines, C. P. , Kaiser, R. A. , Purcell, N. H. , Blair, N. S. , Osinska, H. , Hambleton, M. A. , Brunskill, E. W. , Sayen, M. R. , Gottlieb, R. A. , Dorn, G. W. , Robbins, J. y Molkentin, J. D. (2005). "Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death." *Nature* 434(7033): 658-62.
- Baines, C.P. (2010) "The cardiac mitochondrion: nexus of stress." *Annu Rev Physiol*.72:61-80.
- Barros, M. H. , Cunha, F. M. , Oliveira, G. A. , Tahara, E. B. y Kowaltowski, A. J. "Yeast as a model to study mitochondrial mechanisms in ageing." *Mech Ageing Dev*.
- Bathori, G. , Csordas, G. , Garcia-Perez, C. , Davies, E. y Hajnoczky, G. (2006). "Ca²⁺-dependent control of the permeability properties of the mitochondrial outer membrane and voltage-dependent anion-selective channel (VDAC)." *J Biol Chem* 281(25): 17347-58.
- Bayrhuber, M. , Meins, T. , Habeck, M. , Becker, S. , Giller, K. , Villinger, S. , Vonrhein, C. , Griesinger, C. , Zweckstetter, M. y Zeth, K. (2008). "Structure of the human voltage-dependent anion channel." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(40): 15370-5.

- Beavis, A. D. y Garlid, K. D. (1990). "Evidence for the allosteric regulation of the mitochondrial K^+/H^+ antiporter by matrix protons." *J Biol Chem* 265(5): 2538-45.
- Beavis, A. D. , Lu, Y. y Garlid, K. D. (1993). "On the regulation of K^+ uniport in intact mitochondria by adenine nucleotides and nucleotide analogs." *J Biol Chem* 268(2): 997-1004.
- Bernardi, P. (1999). "Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition." *Physiol Rev* 79(4): 1127-55.
- Bernardi, P. , Colonna, R. , Costantini, P. , Eriksson, O. , Fontaine, E. , Ichas, F. , Massari, S. , Nicolli, A. , Petronilli, V. y Scorrano, L. (1998). "The mitochondrial permeability transition." *Biofactors* 8(3-4): 273-81.
- Bernardi, P. y Forte, M. (2007). "The mitochondrial permeability transition pore." *Novartis Found Symp* 287: 157-64; discussion 164-9.
- Bernardi, P. y Rasola, A. (2007). "Calcium and cell death: the mitochondrial connection." *Subcell Biochem* 45: 481-506.
- Bernardi, P. , Veronese, P. y Petronilli, V. (1993). "Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore. I. Evidence for two separate Me^{2+} binding sites with opposing effects on the pore open probability." *J Biol Chem* 268(2): 1005-10.
- Beutner, G. , Sharma, V. K. , Giovannucci, D. R. , Yule, D. I. y Sheu, S. S. (2001). "Identification of a ryanodine receptor in rat heart mitochondria." *J Biol Chem* 276(24): 21482-8.
- Boyer, P. D. (2002). "A research journey with ATP synthase." *J Biol Chem* 277(42): 39045-61.
- Bradshaw, P. C. y Pfeiffer, D. R. (2006a). "Loss of NAD(H) from swollen yeast mitochondria." *BMC Biochem* 7: 1-3.
- Bradshaw, P. C. y Pfeiffer, D. R. (2006b). "Release of Ca^{2+} and Mg^{2+} from yeast mitochondria is stimulated by increased ionic strength." *BMC Biochem* 7: 1-4.
- Brandina, I. , Graham, J. , Lemaitre-Guillier, C. , Entelis, N. , Krasheninnikov, I. , Sweetlove, L. , Tarassov, I. y Martin, R. P. (2006). "Enolase takes part in a macromolecular complex associated to mitochondria in yeast." *Biochim Biophys Acta* 1757(9-10): 1217-28.
- Bunoust, O. , Devin, A. , Averet, N. , Camougrand, N. y Rigoulet, M. (2005). "Competition of electrons to enter the respiratory chain: a new regulatory mechanism of oxidative metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* 280(5): 3407-13.
- Cabrera-Orefice, A. , Guerrero-Castillo, S. , Luevano-Martinez, L. A. , Pena, A. y Uribe-Carvajal, S. (2010). "Mitochondria from the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* (halophilic organelles?)." *J Bioenerg Biomembr* 42(1): 11-9.
- Carafoli, E. (2010). "The fateful encounter of mitochondria with calcium: How did it happen?" *Biochim Biophys Acta* 1797(6-7): 595-606.
- Carafoli, E. , Balcavage, W. X. , Lehninger, A. L. y Mattoon, J. R. (1970). " Ca^{2+} metabolism in yeast cells and mitochondria." *Biochim Biophys Acta* 205(1): 18-26.

- Casadio, R. , Jacoboni, I. , Messina, A. y De Pinto, V. (2002a). "A 3D model of the voltage-dependent anion channel (VDAC)." *FEBS Lett* 520(1-3): 1-7.
- Casadio, R. , Martelli, P. L. , Giordano, A. , Rossi, M. y Raia, C. A. (2002b). "A low-resolution 3D model of the tetrameric alcohol dehydrogenase from *Sulfolobus solfataricus*." *Protein Eng* 15(3): 215-23.
- Castrejon, V. , Parra, C. , Moreno, R. , Pena, A. y Uribe, S. (1997). "Potassium collapses the deltaP in yeast mitochondria while the rate of ATP synthesis is inhibited only partially: modulation by phosphate." *Arch Biochem Biophys* 346(1): 37-44.
- Castrejon, V. , Pena, A. y Uribe, S. (2002). "Closure of the yeast mitochondria unspecific channel (YMUC) unmasks a Mg²⁺ and quinine sensitive K⁺ uptake pathway in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Bioenerg Biomembr* 34(4): 299-306.
- Cavalier-Smith, T. (2010) "Deep phylogeny, ancestral groups and the four ages of life." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*.365:111-32.
- Claypool, S. M. , Oktay, Y. , Boontheung, P. , Loo, J. A. y Koehler, C. M. (2008). "Cardiolipin defines the interactome of the major ADP/ATP carrier protein of the mitochondrial inner membrane." *J Cell Biol* 182(5): 937-50.
- Colombini, M. (2004). "VDAC: the channel at the interface between mitochondria and the cytosol." *Mol Cell Biochem* 256-257(1-2): 107-15.
- Colombini, M. (2009). "The published 3D structure of the VDAC channel: native or not?" *Trends Biochem Sci* 34(8): 382-9.
- Correa, F. , Soto, V. y Zazueta, C. (2007). "Mitochondrial permeability transition relevance for apoptotic triggering in the post-ischemic heart." *Int J Biochem Cell Biol* 39(4): 787-98.
- Cortes, P. , Castrejon, V. , Sampedro, J. G. y Uribe, S. (2000). "Interactions of arsenate, sulfate and phosphate with yeast mitochondria." *Biochim Biophys Acta* 1456(2-3): 67-76.
- Crompton, M. , Costi, A. y Hayat, L. (1987). "Evidence for the presence of a reversible Ca²⁺-dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria." *Biochem J* 245(3): 915-8.
- Crompton, M. , Virji, S. y Ward, J. M. (1998). "Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore." *Eur J Biochem* 258(2): 729-35.
- Choudhary, O. P. , Ujwal, R. , Kowallis, W. , Coalson, R. , Abramson, J. y Grabe, M. (2009). "The electrostatics of VDAC: implications for selectivity and gating." *J Mol Biol* 396(3): 580-92.
- Daum, G. , Bohni, P. C. y Schatz, G. (1982). "Import of proteins into mitochondria. Cytochrome b2 and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria." *J Biol Chem* 257(21): 13028-33.
- de Chateaubodeau, G. , Guerin, M. y Guerin, B. (1974). "Studies on anionic transport in yeast mitochondria and promitochondria. Swelling in ammonium phosphate, glutamate, succinate and fumarate solutions." *FEBS Lett* 46(1): 184-7.

- de Chateaubodeau, G. A. , Guerin, M. y Guerin, B. (1976). "Permeability of yeast mitochondrial internal membrane: structure-activity relationship." *Biochimie* 58(5): 601-10.
- de la Fuente, S. , Montenegro, P. , Fonteriz, R. I. , Moreno, A. , Lobaton, C. D. , Montero, M. y Alvarez, J. (2010). "The dynamics of mitochondrial Ca^{2+} fluxes." *Biochim Biophys Acta* 1797(10): 1727-1735.
- De Pinto, V. , Messina, A. , Accardi, R. , Aiello, R. , Guarino, F. , Tomasello, M. F. , Tommasino, M. , Tasco, G. , Casadio, R. , Benz, R. , De Giorgi, F. , Ichas, F. , Baker, M. y Lawen, A. (2003). "New functions of an old protein: the eukaryotic porin or voltage dependent anion selective channel (VDAC)." *Ital J Biochem* 52(1): 17-24.
- Dejean, L. , Beauvoit, B. , Guerin, B. y Rigoulet, M. (2000). "Growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* on a non-fermentable substrate: control of energetic yield by the amount of mitochondria." *Biochim Biophys Acta* 1457(1-2): 45-56.
- Diwan, J. J. y Lehrer, P. H. (1977). "Inhibition of mitochondrial potassium ion flux by thallos ions." *Biochem Soc Trans* 5(1): 203-5.
- Drgon, T. , Sabova, L. , Nelson, N. y Kolarov, J. (1991). "ADP/ATP translocator is essential only for anaerobic growth of yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *FEBS Lett* 289(2): 159-62.
- Dyall, S. D. , Brown, M. T. y Johnson, P. J. (2004). "Ancient invasions: from endosymbionts to organelles." *Science* 304(5668): 253-7.
- Estabrook, R. W. (1967). "Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement ADP:O ratios." *Methods Enzymol* 10: 41-47.
- Forte, M. , Adelsberger-Mangan, D. y Colombini, M. (1987a). "Purification and characterization of the voltage-dependent anion channel from the outer mitochondrial membrane of yeast." *J Membr Biol* 99(1): 65-72.
- Forte, M. , Guy, H. R. y Mannella, C. A. (1987b). "Molecular genetics of the VDAC ion channel: structural model and sequence analysis." *J Bioenerg Biomembr* 19(4): 341-50.
- Frey, T. G. y Mannella, C. A. (2000). "The internal structure of mitochondria." *Trends Biochem Sci* 25(7): 319-24.
- Fujimoto, K. , Chen, Y. , Polonsky, K. S. y Dorn, G. W., 2nd (2010). "Targeting cyclophilin D and the mitochondrial permeability transition enhances β -cell survival and prevents diabetes in Pdx1 deficiency." *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Garlid, K. D. , DiResta, D. J. , Beavis, A. D. y Martin, W. H. (1986). "On the mechanism by which dicyclohexylcarbodiimide and quinine inhibit K^+ transport in rat liver mitochondria." *J Biol Chem* 261(4): 1529-35.
- Garlid, K. D. , Dos Santos, P. , Xie, Z. J. , Costa, A. D. y Paucek, P. (2003). "Mitochondrial potassium transport: the role of the mitochondrial ATP-sensitive K^+ channel in cardiac function and cardioprotection." *Biochim Biophys Acta* 1606(1-3): 1-21.
- Garlid, K. D. y Paucek, P. (2003). "Mitochondrial potassium transport: the K^+ cycle." *Biochim Biophys Acta* 1606(1-3): 23-41.

- Gomes, D. S. , Pereira, M. D. , Panek, A. D. , Andrade, L. R. y Eleutherio, E. C. (2008). "Apoptosis as a mechanism for removal of mutated cells of *Saccharomyces cerevisiae*: the role of Grx2 under cadmium exposure." *Biochim Biophys Acta* 1780(2): 160-6.
- Gornal, A. G., Bardavill, C.J. , David, M.M. (1949). "Determination of serum proteins by means of the biuret reaction." *J. Biol. Chem.* 177: 751-760.
- Gosling, J. P. y Duggan, P. F. (1971). "Activities of tricarboxylic acid cycle enzymes, glyoxylate cycle enzymes, and fructose diphosphatase in bakers' yeast during adaptation to acetate oxidation." *J Bacteriol* 106(3): 908-14.
- Grandier-Vazeille, X. , Bathany, K. , Chaignepain, S. , Camougrand, N. , Manon, S. y Schmitter, J. M. (2001). "Yeast mitochondrial dehydrogenases are associated in a supramolecular complex." *Biochemistry* 40(33): 9758-69.
- Gray, M.W., Burger, G. y Lang, B.F. (1999) "Mitochondrial evolution." *Science* 283:1476-81.
- Guerin, B. , Bukusoglu, C. , Rakotomanana, F. y Wohlrab, H. (1990). "Mitochondrial phosphate transport. N-ethylmaleimide insensitivity correlates with absence of beef heart-like Cys42 from the *Saccharomyces cerevisiae* phosphate transport protein." *J Biol Chem* 265(32): 19736-41.
- Guerin, B. , Bunoust, O. , Rouqueys, V. y Rigoulet, M. (1994). "ATP-induced unspecific channel in yeast mitochondria." *J Biol Chem* 269(41): 25406-10.
- Guerrero-Castillo, S. , Vazquez-Acevedo, M. , Gonzalez-Halphen, D. y Uribe-Carvajal, S. (2009). "In *Yarrowia lipolytica* mitochondria, the alternative NADH dehydrogenase interacts specifically with the cytochrome complexes of the classic respiratory pathway." *Biochim Biophys Acta* 1787(2): 75-85.
- Gutierrez-Aguilar, M. , Perez-Martinez, X. , Chavez, E. y Uribe-Carvajal, S. (2010). "In *Saccharomyces cerevisiae*, the phosphate carrier is a component of the mitochondrial unselective channel." *Arch Biochem Biophys* 494(2): 184-91.
- Hagerhall, C. (1997). "Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme." *Biochim Biophys Acta* 1320(2): 107-41.
- Hajnoczky, G. y Hoek, J. B. (2007). "Cell signaling. Mitochondrial longevity pathways." *Science* 315(5812): 607-9.
- Hajnoczky, G. , Saotome, M. , Csordas, G. , Weaver, D. y Yi, M. (2007). "Calcium signalling and mitochondrial motility." *Novartis Found Symp* 287: 105-17; discussion 117-21.
- Halestrap, A. P. (1991). "Calcium-dependent opening of a non-specific pore in the mitochondrial inner membrane is inhibited at pH values below 7. Implications for the protective effect of low pH against chemical and hypoxic cell damage." *Biochem J* 278 (Pt 3): 715-9.
- Halestrap, A. P. (1994). "Regulation of mitochondrial metabolism through changes in matrix volume." *Biochem Soc Trans* 22(2): 522-9.
- Halestrap, A. P. (2009a). "Mitochondria and reperfusion injury of the heart-A holey death but not beyond salvation." *J Bioenerg Biomembr.*
- Halestrap, A. P. (2009b). "What is the mitochondrial permeability transition pore?" *J Mol Cell Cardiol* 46(6): 821-31.

- Halestrap, A. P. (2010). "A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection." *Biochem Soc Trans* 38(4): 841-60.
- Halestrap, A. P. y Brenner, C. (2003). "The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death." *Curr Med Chem* 10(16): 1507-25.
- Halestrap, A. P. y Pasdois, P. (2009). "The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease." *Biochim Biophys Acta* 1787(11): 1402-15.
- Hall, P. M. (2009). "Nephrolithiasis: treatment, causes, and prevention." *Cleve Clin J Med* 76(10): 583-91.
- Hamel, P. , Saint-Georges, Y. , de Pinto, B. , Lachacinski, N. , Altamura, N. y Dujardin, G. (2004). "Redundancy in the function of mitochondrial phosphate transport in *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana*." *Mol Microbiol* 51(2): 307-17.
- Haworth, R. A. y Hunter, D. R. (1979). "The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site." *Arch Biochem Biophys* 195(2): 460-7.
- Haworth, R. A. y Hunter, D. R. (1980). "Allosteric inhibition of the Ca²⁺-activated hydrophilic channel of the mitochondrial inner membrane by nucleotides." *J Membr Biol* 54(3): 231-6.
- He, L. y Lemasters, J. J. (2002). "Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: a new paradigm of pore structure and function?" *FEBS Lett* 512(1-3): 1-7.
- Heberle, J. , Riesle, J. , Thiedemann, G. , Oesterhelt, D. y Dencher, N. A. (1994). "Proton migration along the membrane surface and retarded surface to bulk transfer." *Nature* 370(6488): 379-82.
- Hogeboom, G. H. , Schneider, W. C. y Pallade, G. E. (1947). "The isolation of morphologically intact mitochondria from rat liver." *Proc Soc Exp Biol Med* 65(2): 320.
- Hogeboom, G. H. , Schneider, W. C. y Pallade, G. E. (1948). "Cytochemical studies of mammalian tissues; isolation of intact mitochondria from rat liver; some biochemical properties of mitochondria and submicroscopic particulate material." *J Biol Chem* 172(2): 619-35.
- Hunter, D. R. y Haworth, R. A. (1979a). "The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms." *Arch Biochem Biophys* 195(2): 453-9.
- Hunter, D. R. y Haworth, R. A. (1979b). "The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca²⁺ release." *Arch Biochem Biophys* 195(2): 468-77.
- Israelson, A. , Abu-Hamad, S. , Zaid, H. , Nahon, E. y Shoshan-Barmatz, V. (2007). "Localization of the voltage-dependent anion channel-1 Ca²⁺-binding sites." *Cell Calcium* 41(3): 235-44.
- Jacotot, E. , Ravagnan, L. , Loeffler, M. , Ferri, K. F. , Vieira, H. L. , Zamzami, N. , Costantini, P. , Druillennec, S. , Hoebeke, J. , Briand, J. P. , Irinopoulou, T. , Daugas, E. , Susin, S. A. , Cointe, D. , Xie, Z. H. , Reed, J. C. , Roques, B. P. y Kroemer, G. (2000). "The HIV-1 viral protein R

- induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore." *J Exp Med* 191(1): 33-46.
- Jung, D. W. , Bradshaw, P. C. y Pfeiffer, D. R. (1997). "Properties of a cyclosporin-insensitive permeability transition pore in yeast mitochondria." *J Biol Chem* 272(34): 21104-12.
 - Kennedy, E. P. y Lehninger, A. L. (1950). "The products of oxidation of fatty acids by isolated rat liver mitochondria." *J Biol Chem* 185(1): 275-85.
 - Klingenberg, M. , Mayer, I. y Appel, M. (1985). "Interaction of fluorescent 3'-[1,5-(dimethylamino)naphthoyl]adenine nucleotides with the solubilized ADP/ATP carrier." *Biochemistry* 24(14): 3650-9.
 - Kmita, H. y Budzinska, M. (2000). "Involvement of the TOM complex in external NADH transport into yeast mitochondria depleted of mitochondrial porin1." *Biochim Biophys Acta* 1509(1-2): 86-94.
 - Kmita, H. , Stobienia, O. y Michejda, J. (1999). "The access of metabolites into yeast mitochondria in the presence and absence of the voltage dependent anion selective channel (YVDAC1)." *Acta Biochim Pol* 46(4): 991-1000.
 - Kolisek, M. , Zsurka, G. , Samaj, J. , Weghuber, J. , Schweyen, R. J. y Schweigel, M. (2003). "Mrs2p is an essential component of the major electrophoretic Mg²⁺ influx system in mitochondria." *EMBO J* 22(6): 1235-44.
 - Korshunov, S. S. , Skulachev, V. P. y Starkov, A. A. (1997). "High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria." *FEBS Lett* 416(1): 15-8.
 - Kramer, R. y Klingenberg, M. (1982). "Electrophoretic control of reconstituted adenine nucleotide translocation." *Biochemistry* 21(5): 1082-9.
 - Kramer, R. y Klingenberg, M. (1985). "Structural and functional asymmetry of the ADP/ATP carrier from mitochondria." *Ann N Y Acad Sci* 456: 289-90.
 - Kroemer, G. , Petit, P. , Zamzami, N. , Vayssiere, J. L. y Mignotte, B. (1995). "The biochemistry of programmed cell death." *FASEB J* 9(13): 1277-87.
 - Kunji, E. R. y Crichton, P. G. (2010). "Mitochondrial carriers function as monomers." *Biochim Biophys Acta* 1797(6-7): 817-831.
 - Lamarca, V. y Scorrano, L. (2009). "When separation means death: killing through the mitochondria, but starting from the endoplasmic reticulum." *EMBO J* 28(12): 1681-3.
 - Lang, B.F., Gray, M.W. y Burger, G. (1999) "Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes." *Annu Rev Genet* 33:351-97.
 - Lee, A. C. , Xu, X. , Blachly-Dyson, E. , Forte, M. y Colombini, M. (1998). "The role of yeast VDAC genes on the permeability of the mitochondrial outer membrane." *J Membr Biol* 161(2): 173-81.
 - Lemasters, J. J. (2007). "Modulation of mitochondrial membrane permeability in pathogenesis, autophagy and control of metabolism." *J Gastroenterol Hepatol* 22 Suppl 1: S31-7.
 - Lemasters, J. J. y Holmuhamedov, E. (2006). "Voltage-dependent anion channel (VDAC) as mitochondrial governor--thinking outside the box." *Biochim Biophys Acta* 1762(2): 181-90.

- Leung, A. W. y Halestrap, A. P. (2008). "Recent progress in elucidating the molecular mechanism of the mitochondrial permeability transition pore." *Biochim Biophys Acta*.
- Leung, A. W. , Varanyuwatana, P. y Halestrap, A. P. (2008). "The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition." *J Biol Chem* 283(39): 26312-23.
- Li, Y. , Johnson, N. , Capano, M. , Edwards, M. y Crompton, M. (2004). "Cyclophilin-D promotes the mitochondrial permeability transition but has opposite effects on apoptosis and necrosis." *Biochem J* 383(Pt 1): 101-9.
- Liu, X. , Kim, C. N. , Yang, J. , Jemmerson, R. y Wang, X. (1996). "Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c." *Cell* 86(1): 147-57.
- Lutter, R. , Abrahams, J. P. , van Raaij, M. J. , Todd, R. J. , Lundqvist, T. , Buchanan, S. K. , Leslie, A. G. y Walker, J. E. (1993a). "Crystallization of F1-ATPase from bovine heart mitochondria." *J Mol Biol* 229(3): 787-90.
- Lutter, R. , Saraste, M. , van Walraven, H. S. , Runswick, M. J. , Finel, M. , Deatherage, J. F. y Walker, J. E. (1993b). "F₁F₀-ATP synthase from bovine heart mitochondria: development of the purification of a monodisperse oligomycin-sensitive ATPase." *Biochem J* 295 (Pt 3): 799-806.
- Luttkik, M. A. , Overkamp, K. M. , Kotter, P. , de Vries, S. , van Dijken, J. P. y Pronk, J. T. (1998). "The *Saccharomyces cerevisiae* NDE1 and NDE2 genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH." *J Biol Chem* 273(38): 24529-34.
- Mader, A. , Abu-Hamad, S. , Arbel, N. , Gutierrez-Aguilar, M. y Shoshan-Barmatz, V. (2010). "Dominant-negative VDAC1 mutants reveal oligomeric VDAC1 to be active unit in mitochondria-mediated apoptosis." *Biochem J*.
- Malhi, H. , Gores, G. J. y Lemasters, J. J. (2006). "Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths?" *Hepatology* 43(2 Suppl 1): S31-44.
- Mannella, C. A. y Kinnally, K. W. (2008). "Reflections on VDAC as a voltage-gated channel and a mitochondrial regulator." *J Bioenerg Biomembr* 40(3): 149-55.
- Mannella, C. A. , Pfeiffer, D. R. , Bradshaw, P. C. , Moraru, II , Slepchenko, B. , Loew, L. M. , Hsieh, C. E. , Buttle, K. y Marko, M. (2001). "Topology of the mitochondrial inner membrane: dynamics and bioenergetic implications." *IUBMB Life* 52(3-5): 93-100.
- Manon, S. y Guerin, M. (1992). "K⁺/H⁺ exchange in yeast mitochondria: sensitivity to inhibitors, solubilization and reconstitution of the activity in proteoliposomes." *Biochim Biophys Acta* 1108(2): 169-76.
- Manon, S. y Guerin, M. (1993). "Evidence for three different electrophoretic pathways in yeast mitochondria: ion specificity and inhibitor sensitivity." *J Bioenerg Biomembr* 25(6): 671-8.
- Manon, S. y Guerin, M. (1995). "Investigation of the effects of Zn²⁺ and Cu²⁺ on the K⁺ transport in yeast mitochondria. Evidences for the involvement of a Zn²⁺-binding protein in the K⁺/H⁺ exchange." *Biochem Mol Biol Int* 35(3): 585-93.

- Manon, S. y Guerin, M. (1997). "The ATP-induced K⁺-transport pathway of yeast mitochondria may function as an uncoupling pathway." *Biochim Biophys Acta* 1318(3): 317-21.
- Manon, S. y Guerin, M. (1998). "Investigation of the yeast mitochondrial unselective channel in intact and permeabilized spheroplasts." *Biochem Mol Biol Int* 44(3): 565-75.
- Manon, S. , Roucou, X. , Guerin, M. , Rigoulet, M. y Guerin, B. (1998). "Characterization of the yeast mitochondria unselective channel: a counterpart to the mammalian permeability transition pore?" *J Bioenerg Biomembr* 30(5): 419-29.
- Manon, S. , Roucou, X. , Rigoulet, M. y Guerin, M. (1995). "Stimulation of oxidative phosphorylation by electrophoretic K⁺ entry associated to electroneutral K⁺/H⁺ exchange in yeast mitochondria." *Biochim Biophys Acta* 1231(3): 282-8.
- Matouschek, A. , Rospert, S. , Schmid, K. , Glick, B. S. y Schatz, G. (1995). "Cyclophilin catalyzes protein folding in yeast mitochondria." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(14): 6319-23.
- Mironova, G. D. , Baumann, M. , Kolomytkin, O. , Krasichkova, Z. , Berdimuratov, A. , Sirota, T. , Virtanen, I. y Saris, N. E. (1994). "Purification of the channel component of the mitochondrial calcium uniporter and its reconstitution into planar lipid bilayers." *J Bioenerg Biomembr* 26(2): 231-8.
- Mitchell, P. y Moyle, J. (1967). "Respiration-driven proton translocation in rat liver mitochondria." *Biochem J* 105(3): 1147-1162.
- Mitchell, P. y Moyle, J. (1969). "Estimation of membrane potential and pH difference across the cristae membrane of rat liver mitochondria." *Eur J Biochem* 7(4): 471-84.
- Nakashima, R. A. , Dordick, R. S. y Garlid, K. D. (1982). "On the relative roles of Ca²⁺ and Mg²⁺ in regulating the endogenous K⁺/H⁺ exchanger of rat liver mitochondria." *J Biol Chem* 257(21): 12540-5.
- Nakashima, R. A. y Garlid, K. D. (1982). "Quinine inhibition of Na⁺ and K⁺ transport provides evidence for two cation/H⁺ exchangers in rat liver mitochondria." *J Biol Chem* 257(16): 9252-4.
- Nury, H. , Dahout-Gonzalez, C. , Trezeguet, V. , Lauquin, G. J. , Brandolin, G. y Pebay-Peyroula, E. (2006). "Relations between structure and function of the mitochondrial ADP/ATP carrier." *Annu Rev Biochem* 75: 713-41.
- Palmieri, F. , Bisaccia, F. , Capobianco, L. , Dolce, V. , Fiermonte, G. , Iacobazzi, V. y Zara, V. (1993a). "Transmembrane topology, genes, and biogenesis of the mitochondrial phosphate and oxoglutarate carriers." *J Bioenerg Biomembr* 25(5): 493-501.
- Palmieri, F. , Indiveri, C. , Bisaccia, F. y Kramer, R. (1993b). "Functional properties of purified and reconstituted mitochondrial metabolite carriers." *J Bioenerg Biomembr* 25(5): 525-35.
- Pavon, N. , Aranda, A. , Garcia, N. , Hernandez-Esquivel, L. y Chavez, E. (2009). "In hyperthyroid rats octylguanidine protects the heart from reperfusion damage." *Endocrine* 35(2): 158-65.

- Pebay-Peyroula, E. , Dahout-Gonzalez, C. , Kahn, R. , Trezeguet, V. , Lauquin, G. J. y Brandolin, G. (2003). "Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside." *Nature* 426(6962): 39-44.
- Pedersen, P. L. (2008). "Voltage dependent anion channels (VDACs): a brief introduction with a focus on the outer mitochondrial compartment's roles together with hexokinase-2 in the "Warburg effect" in cancer." *J Bioenerg Biomembr* 40(3): 123-6.
- Pena, A. , Pina, M. Z. , Escamilla, E. y Pina, E. (1977). "A novel method for the rapid preparation of coupled yeast mitochondria." *FEBS Lett* 80(1): 209-13.
- Pereira, C. , Silva, R. D. , Saraiva, L. , Johansson, B. , Sousa, M. J. y Corte-Real, M. (2008). "Mitochondria-dependent apoptosis in yeast." *Biochim Biophys Acta* 1783(7): 1286-302.
- Perez-Vazquez, V. , Saavedra-Molina, A. y Uribe, S. (2003). "In *Saccharomyces cerevisiae*, cations control the fate of the energy derived from oxidative metabolism through the opening and closing of the yeast mitochondrial unselective channel." *J Bioenerg Biomembr* 35(3): 231-41.
- Petronilli, V. , Miotto, G. , Canton, M. , Brini, M. , Colonna, R. , Bernardi, P. y Di Lisa, F. (1999). "Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence." *Biophys J* 76(2): 725-34.
- Pfaff, E. , Klingenberg, M. y Heldt, H. W. (1965). "Unspecific permeation and specific exchange of adenine nucleotides in liver mitochondria." *Biochim Biophys Acta* 104(1): 312-5.
- Pfanner, N. , Craig, E. A. y Honlinger, A. (1997). "Mitochondrial preprotein translocase." *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 25-51.
- Pfanner, N. y Meijer, M. (1997). "The Tom and Tim machine." *Curr Biol* 7(2): R100-3.
- Phelps, A. , Schobert, C. T. y Wohlrab, H. (1991). "Cloning and characterization of the mitochondrial phosphate transport protein gene from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Biochemistry* 30(1): 248-52.
- Phelps, A. y Wohlrab, H. (1991). "Mitochondrial phosphate transport. The *Saccharomyces cerevisiae* (threonine 43 to cysteine) mutant protein explicitly identifies transport with genomic sequence." *J Biol Chem* 266(30): 19882-5.
- Prieto, S. , Bouillaud, F. y Rial, E. (1995). "The mechanism for the ATP-induced uncoupling of respiration in mitochondria of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Biochem J* 307 (Pt 3): 657-61.
- Prieto, S. , Bouillaud, F. y Rial, E. (1996). "The nature and regulation of the ATP-induced anion permeability in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria." *Arch Biochem Biophys* 334(1): 43-9.
- Prieto, S. , Bouillaud, F. , Ricquier, D. y Rial, E. (1992). "Activation by ATP of a proton-conducting pathway in yeast mitochondria." *Eur J Biochem* 208(2): 487-91.
- Rasheed, B. K. , Diwan, J. J. y Sanadi, D. R. (1984). "Activation of potassium ion transport in mitochondria by cadmium ion." *Eur J Biochem* 144(3): 643-7.
- Rehling, P. , Model, K. , Brandner, K. , Kovermann, P. , Sickmann, A. , Meyer, H. E. , Kuhlbrandt, W. , Wagner, R. , Truscott, K. N. y Pfanner, N.

- (2003). "Protein insertion into the mitochondrial inner membrane by a twin-pore translocase." *Science* 299(5613): 1747-51.
- Reinders, J. , Zahedi, R. P. , Pfanner, N. , Meisinger, C. y Sickmann, A. (2006). "Toward the complete yeast mitochondrial proteome: multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics." *J Proteome Res* 5(7): 1543-54.
 - Rigoni, M. , Paoli, M. , Milanese, E. , Caccin, P. , Rasola, A. , Bernardi, P. y Montecucco, C. (2008). "Snake phospholipase A2 neurotoxins enter neurons, bind specifically to mitochondria, and open their transition pores." *J Biol Chem* 283(49): 34013-20.
 - Rizzuto, R. , Duchen, M. R. y Pozzan, T. (2004). "Flirting in little space: the ER/mitochondria Ca²⁺ liaison." *Sci STKE* 2004(215): re1.
 - Robinson, A. J. , Overy, C. y Kunji, E. R. (2008). "The mechanism of transport by mitochondrial carriers based on analysis of symmetry." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(46): 17766-71.
 - Rostovtseva, T. K. y Bezrukov, S. M. (2008). "VDAC regulation: role of cytosolic proteins and mitochondrial lipids." *J Bioenerg Biomembr* 40(3): 163-70.
 - Rostovtseva, T. K. , Sheldon, K. L. , Hassanzadeh, E. , Monge, C. , Saks, V. , Bezrukov, S. M. y Sackett, D. L. (2008). "Tubulin binding blocks mitochondrial voltage-dependent anion channel and regulates respiration." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(48): 18746-51.
 - Rostovtseva, T. K. , Tan, W. y Colombini, M. (2005). "On the role of VDAC in apoptosis: fact and fiction." *J Bioenerg Biomembr* 37(3): 129-42.
 - Roucou, X. , Manon, S. y Guerin, M. (1995). "ATP opens an electrophoretic potassium transport pathway in respiring yeast mitochondria." *FEBS Lett* 364(2): 161-4.
 - Roucou, X. , Manon, S. y Guerin, M. (1997). "Conditions allowing different states of ATP- and GDP-induced permeability in mitochondria from different strains of *Saccharomyces cerevisiae*." *Biochim Biophys Acta* 1324(1): 120-32.
 - Sanchez, N. S. , Pearce, D. A. , Cardillo, T. S. , Uribe, S. y Sherman, F. (2001). "Requirements of Cyc2p and the porin, *POR1*, for ionic stability and mitochondrial integrity in *Saccharomyces cerevisiae*." *Arch Biochem Biophys* 392(2): 326-32.
 - Saraste, M. (1999). "Oxidative phosphorylation at the fin de siecle." *Science* 283(5407): 1488-93.
 - Schatz, G. y Dobberstein, B. (1996). "Common principles of protein translocation across membranes." *Science* 271(5255): 1519-26.
 - Schmitt, S. , Prokisch, H. , Schlunck, T. , Camp, D. G., 2nd , Ahting, U. , Waizenegger, T. , Scharfe, C. , Meitinger, T. , Imhof, A. , Neupert, W. , Oefner, P. J. y Rapaport, D. (2006). "Proteome analysis of mitochondrial outer membrane from *Neurospora crassa*." *Proteomics* 6(1): 72-80.
 - Schneider, A. J. y Mosley, J. W. (1959). "Studies of variations of glutamic-oxalacetic transaminase in serum in infectious hepatitis." *Pediatrics* 24: 367-77.
 - Schroers, A. , Burkovski, A. , Wohlrab, H. y Kramer, R. (1998). "The phosphate carrier from yeast mitochondria. Dimerization is a prerequisite for function." *J Biol Chem* 273(23): 14269-76.

- Schroers, A. , Kramer, R. y Wohlrab, H. (1997). "The reversible antiport-uniport conversion of the phosphate carrier from yeast mitochondria depends on the presence of a single cysteine." *J Biol Chem* 272(16): 10558-64.
- Selivanov, V. A. , Ichas, F. , Holmuhamedov, E. L. , Jouaville, L. S. , Evtodienko, Y. V. y Mazat, J. P. (1998). "A model of mitochondrial Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release simulating the Ca^{2+} oscillations and spikes generated by mitochondria." *Biophys Chem* 72(1-2): 111-21.
- Severin, F. F. , Meer, M. V. , Smirnova, E. A. , Knorre, D. A. y Skulachev, V. P. (2008). "Natural causes of programmed death of yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Biochim Biophys Acta* 1783(7): 1350-3.
- Sherman, F. (2002). "Getting started with yeast." *Methods Enzymol* 350: 3-41.
- Shoshan-Barmatz, V. , De Pinto, V. , Zweckstetter, M. , Raviv, Z. , Keinan, N. y Arbel, N. (2010). "VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death." *Mol Aspects Med* 31(3): 227-85.
- Shoshan-Barmatz, V. , Israelson, A. , Brdiczka, D. y Sheu, S. S. (2006). "The voltage-dependent anion channel (VDAC): function in intracellular signalling, cell life and cell death." *Curr Pharm Des* 12(18): 2249-70.
- Shprung, T. y Gozes, I. (2009). "A novel method for analyzing mitochondrial movement: inhibition by paclitaxel in a pheochromocytoma cell model." *J Mol Neurosci* 37(3): 254-62.
- Sickmann, A. , Reinders, J. , Wagner, Y. , Joppich, C. , Zahedi, R. , Meyer, H. E. , Schonfisch, B. , Perschil, I. , Chacinska, A. , Guiard, B. , Rehling, P. , Pfanner, N. y Meisinger, C. (2003). "The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(23): 13207-12.
- Sjostrand, F. S. (1978). "The structure of mitochondrial membranes: a new concept." *J Ultrastruct Res* 64(3): 217-45.
- Skulachev, V. P. (2001). "Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables." *Trends Biochem Sci* 26(1): 23-9.
- Tan, W. y Colombini, M. (2007). "VDAC closure increases calcium ion flux." *Biochim Biophys Acta* 1768(10): 2510-5.
- Theruvath, T. P. , Zhong, Z. , Currin, R. T. , Ramshesh, V. K. y Lemasters, J. J. (2006). "Endothelial nitric oxide synthase protects transplanted mouse livers against storage/reperfusion injury: Role of vasodilatory and innate immunity pathways." *Transplant Proc* 38(10): 3351-7.
- Tikunov, A. , Johnson, C. B. , Pediaditakis, P. , Markevich, N. , Macdonald, J. M. , Lemasters, J. J. y Holmuhamedov, E. (2010). "Closure of VDAC causes oxidative stress and accelerates the Ca^{2+} -induced mitochondrial permeability transition in rat liver mitochondria." *Arch Biochem Biophys* 495(2): 174-81.
- Traba, J. , Froschauer, E. M. , Wiesenberger, G. , Satrustegui, J. y Del Arco, A. (2008). "Yeast mitochondria import ATP through the calcium-dependent ATP-Mg/Pi carrier Sal1p, and are ATP consumers during aerobic growth in glucose." *Mol Microbiol* 69(3): 570-85.

- Trumpower, B. L. (1990). "The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc1 complex." *J Biol Chem* 265(20): 11409-12.
- Ujwal, R. , Cascio, D. , Colletier, J. P. , Faham, S. , Zhang, J. , Toro, L. , Ping, P. y Abramson, J. (2008). "The crystal structure of mouse VDAC1 at 2.3 Å resolution reveals mechanistic insights into metabolite gating." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(46): 17742-7.
- Ujwal, R. , Cascio, D. , Chaptal, V. , Ping, P. y Abramson, J. (2009). "Crystal packing analysis of murine VDAC1 crystals in a lipidic environment reveals novel insights on oligomerization and orientation." *Channels (Austin)* 3(3): 167-70.
- Uribe, S. , Rangel, P. y Pardo, J. P. (1992). "Interactions of calcium with yeast mitochondria." *Cell Calcium* 13(4): 211-7.
- Uribe, S. , Sanchez, N. y Peña, A. (1991). "Effects of K⁺ and other monovalent cations on yeast mitochondria." *Biochem Int* 24(4): 615-23.
- van der Laan, M. , Hutu, D. P. y Rehling, P. (2010). "On the mechanism of preprotein import by the mitochondrial presequence translocase." *Biochim Biophys Acta* 1803(6): 732-739.
- Vignais, P. V. , Vignais, P. M. y Defaye, G. (1973). "Adenosine diphosphate translocation in mitochondria. Nature of the receptor site for carboxyatractyloside (gummiferin)." *Biochemistry* 12(8): 1508-19.
- Vogtle, F. N. , Wortelkamp, S. , Zahedi, R. P. , Becker, D. , Leidhold, C. , Gevaert, K. , Kellermann, J. , Voos, W. , Sickmann, A. , Pfanner, N. y Meisinger, C. (2009). "Global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability." *Cell* 139(2): 428-39.
- Wallace, P. G. , Pedler, S. M. , Wallace, J. C. y Berry, M. N. (1994). "A method for the determination of the cellular phosphorylation potential and glycolytic intermediates in yeast." *Anal Biochem* 222(2): 404-8.
- Welihinda, A. A. , Trumbly, R. J. , Garlid, K. D. y Beavis, A. D. (1993). "On the regulation of Na⁺/H⁺ and K⁺/H⁺ antiport in yeast mitochondria: evidence for the absence of an Na⁺-selective Na⁺/H⁺ antiporter." *Biochim Biophys Acta* 1144(3): 367-73.
- Wickner, W. y Schekman, R. (2005). "Protein translocation across biological membranes." *Science* 310(5753): 1452-6.
- Yamada, A. , Yamamoto, T. , Yoshimura, Y. , Gouda, S. , Kawashima, S. , Yamazaki, N. , Yamashita, K. , Kataoka, M. , Nagata, T. , Terada, H. , Pfeiffer, D. R. y Shinohara, Y. (2009). "Ca²⁺-induced permeability transition can be observed even in yeast mitochondria under optimized experimental conditions." *Biochim Biophys Acta* 1787(12): 1486-91.
- Zara, V. , Dietmeier, K. , Palmisano, A. , Voza, A. , Rassow, J. , Palmieri, F. y Pfanner, N. (1996). "Yeast mitochondria lacking the phosphate carrier/p32 are blocked in phosphate transport but can import preproteins after regeneration of a membrane potential." *Mol Cell Biol* 16(11): 6524-31.
- Zazueta, C. , Franco, M. , Correa, F. , Garcia, N. , Santamaria, J. , Martinez-Abundis, E. y Chavez, E. (2007). "Hypothyroidism provides resistance

- to kidney mitochondria against the injury induced by renal ischemia-reperfusion." *Life Sci* 80(14): 1252-8.
- Zhen, Y. , Hoganson, C. W. , Babcock, G. T. y Ferguson-Miller, S. (1999). "Definition of the interaction domain for cytochrome c on cytochrome c oxidase. I. Biochemical, spectral, and kinetic characterization of surface mutants in subunit ii of *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome aa(3)." *J Biol Chem* 274(53): 38032-41.
 - Zoratti, M. , De Marchi, U. , Biasutto, L. y Szabo, I. (2010). "Electrophysiology clarifies the megariddles of the mitochondrial permeability transition pore." *FEBS Lett* 584(10): 1997-2004.
 - Zoratti, M. , Szabo, I. y De Marchi, U. (2005). "Mitochondrial permeability transitions: how many doors to the house?" *Biochim Biophys Acta* 1706(1-2): 40-52.