



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

Estudio de la expresión de genes mitocondriales del complejo I de
Yarrowia lipolytica en cepas deficientes de complejo I.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:

MARTHA ALICIA MINOR VILLAR

TUTOR: DRA. XOCHITL PÉREZ MARTÍNEZ

MÉXICO, D. F.

JUNIO, 2012.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Xochitl Pérez por su apoyo y confianza para aventurarnos en este proyecto, por permitirme formar parte de su grupo de investigación y ayudarme a crecer profesionalmente.

Al Dr. Salvador Uribe Carvajal por su tutoría, por permitirme trabajar continuamente en su laboratorio y por el apoyo brindado.

A la Dra. Sobeida Sánchez Nieto por su ayuda, consejo y asesoría durante la realización de este proyecto.

Al cDr. Sergio Guerrero Castillo y Alfredo Cabrera por enseñarme algunas de las técnicas y enseñarme a trabajar con este modelo.

A la Dra. Yolanda Camacho Villasana por su asesoría técnica y por su valiosa participación en la realización de este proyecto.

Al CONACyT por la beca No. 240109 otorgada para la realización de estudios de maestría.

DEDICATORIAS

A mi madre y hermanos, en especial...

... A la memoria de **Elias Minor Villar†**, porque eres un hermano y un amigo excepcional, gracias por apoyar siempre mis decisiones, respaldarme cuando fue necesario, no olvidaré tus sabios consejos, sé que creías en mí. Y yo estoy orgullosa por un hermano como tú, que fuiste un hombre que se dirigió ante la vida con rectitud y honradez, ¡ah! y muy trabajador.

Fuiste como un árbol, lleno de vida, ante las adversidades te mantenías de pie y cualquiera podía apoyarse en ti.

Lo único que lamento es no haberte abrazado lo suficiente (10, 20 años más aún así; no serían suficientes). Te extraño y mi consuelo son los buenos recuerdos, desde aquellas madrugadas en las que te levantaba para que me acompañaras al baño (¡ups! pero me daba miedo), pasando por los días de trabajo en el restirador (para los muchach@s días de castigo), hasta los días en los que te convertiste en todo un “señor” (sé que no te gustaba que te lo dijera pero sí, ya eras un señor jajaja).

Sé que siempre estarás conmigo porque siempre te voy a tener en mi corazón.

A Erick Amador, eres una gran persona.

ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS.....	v
RESUMEN.....	vi
INTRODUCCIÓN.....	1
I. <i>Yarrowia lipolytica</i> como modelo de estudio.....	1
II. La mitocondria y la cadena transportadora de electrones.....	2
III. Biogénesis de la NADH: ubiquinona oxidorreductasa o complejo I.....	7
IV. Genoma mitocondrial.....	12
V. Estudios del complejo I en <i>Yarrowia lipolytica</i>	14
VI. Regulación de la expresión de genes mitocondriales.....	15
JUSTIFICACIÓN.....	18
HIPÓTESIS y OBJETIVOS.....	20
METODOLOGÍA.....	21
RESULTADOS.....	36
I. Caracterización fenotípica de las cepas mutantes.....	36
II. Las cepas mutantes presentan sensibilidad a flavona y no a rotenona...42	
III. Los niveles de los transcritos de las subunidades mitocondriales no se ven afectados en ausencia del complejo I.....	45
IV. Ensayos para determinar la expresión de subunidades mitocondriales del complejo I a nivel de proteína	52
DISCUSIÓN.....	63
CONCLUSIONES.....	74
PERSPECTIVAS.....	75
ANEXOS.....	76
REFERENCIAS.....	86

ABREVIATURAS

BN-PAGE Electroforesis nativa azul en gel de poliacrilamida
bp pares de bases
COB citocromo b
dATP deoxiadenosina trifosfato
dATP³² deoxiadenosina trifosfato marcada con Fosforo 32
dCTP deoxicitidina trifosfato
DEPC Dietil pirocarbonato
dGTP deoxiguanosina trifosfato
DNA ácido desoxiribonucleico
dTTP deoxitimidina trifosfato
EDTA ácido tetraetilendiaminacético
FMN Flavin mononucleótido
KLH Keyhole limpet hemocyanin
MIM membrana interna mitocondrial
MOPS ácido morfolino propanosulfónico
MPM marcador de peso molecular
mtDNA genoma mitocondrial
NBT Nitroazul de tetrazolium
NDH2e deshidrogenasa alterna externa
NDH2i deshidrogenasa alterna interna
nt nucleótidos
OD densidad óptica
PCR reacción en cadena de la polimerasa
PVDF polivinil difluoruro
RNA ácido ribonucleico
rRNA ácido ribonucleico ribosomal
SDS dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida
WT Cepa silvestre

RESUMEN

Yarrowia lipolytica es un hongo dimórfico aerobio obligado, que contiene una cadena respiratoria clásica (contiene los complejos I-IV), además de una NADH-deshidrogenasa alterna (NDH2) y una oxidasa alternativa no-hemo. El complejo I (CI) es el primer aceptor de electrones de la cadena respiratoria, está conformado por un gran número de subunidades (dependiendo de la especie pueden llegar a ser más de 40). *Sacharomyces cerevisiae* es un modelo ampliamente utilizado para el estudio de la biogénesis de los complejos respiratorios pero la falta de CI en esta levadura ha dificultado el estudio de esta enzima.

Y. lipolytica contiene una NADH deshidrogenasa alterna (NDH2), la cual realiza la misma reacción redox del complejo I, pero no contribuye al gradiente transmembranal de protones y se encuentra del lado externo de la membrana interna mitocondrial. La relocalización artificial por técnicas de biología molecular de la NADH-deshidrogenasa alterna al lado matricial de la membrana interna mitocondrial (NDH2i), permite a la célula reducir el NADH contenido en la matriz mitocondrial y con ello ser viable aún en mutantes del complejo I. La presencia de una NDH2i permite utilizar a *Y. lipolytica* como modelo de estudio para el complejo I.

El objetivo de este estudio fue analizar la expresión de las subunidades mitocondriales del complejo I en *Y. lipolytica*. Nos interesa explorar, sí como sucede en otros complejos respiratorios, la expresión de subunidades codificadas en el genoma mitocondrial podría regularse por el estado de ensamblaje del complejo respiratorio. Se llevó a cabo la caracterización fenotípica de las cepas mutantes (Δ PSST, Δ TYKY y Δ 51kDa), la medición de los niveles de transcritos mitocondriales y se generaron anticuerpos contra las subunidades ND1 y ND2, codificadas en el genoma mitocondrial (mtDNA).

Los genes eliminados (Δ *psst*, Δ *tyky* y Δ 51kDa) corresponden a subunidades del complejo I codificadas en el núcleo. Las subunidades PSST y TYKY se encuentran en el módulo Q (módulo de unión a la ubiquinona) y la subunidad de 51kDa está en el sitio de unión al NADH.

Se observó que el crecimiento de las cepas mutantes con respecto a la cepa silvestre es similar en medio YD con dextrosa. Se midió la respiración mitocondrial en presencia de rotenona, inhibidor de complejo I, y se observó que la cepa silvestre es sensible a este compuesto, mientras las mutantes son capaces de seguir respirando.

Nos interesó estudiar también si la expresión de los genes mitocondriales que codifican para las subunidades de CI se alteran en las mutantes que no ensamblan CI. A través de ensayos tipo Northern blot se observó que los niveles de RNA mensajero mitocondrial de *ND1*, *ND2*, *ND3*, *ND4* y *ND4L* no se alteraron. Se intentó montar la técnica para analizar los niveles de traducción de proteínas mitocondriales mediante incubación con ³⁵S metionina en presencia de inhibidores de los ribosomas citoplásmicos, sin embargo a la fecha ha resultado imposible establecer dicha técnica en *Y. lipolytica*. Por lo tanto, aún falta establecer si la expresión de genes mitocondriales se afecta por defectos en el ensamblaje del complejo I a nivel traduccional o postraduccional.

INTRODUCCIÓN

I. *Yarrowia lipolytica* como modelo de estudio

Yarrowia lipolytica es un hongo ascomiceto, dimórfico y aerobio obligado, que tiene la capacidad de utilizar como fuente de carbono glucosa, alcoholes, acetato y sustratos hidrofóbicos (ácidos grasos, aceites y alcanos). Este ascomiceto en un principio se ubicó dentro del género *Candida*, posteriormente se reclasificó como *Endomycopsis*, después como *Saccharomycopsis lipolytica* y finalmente como *Yarrowia*, siendo la única especie conocida dentro de este género (Wolf 1996).

Y. lipolytica secreta lipasas extracelulares, proteasas ácidas, proteasas alcalinas y RNAsa. Es capaz de crecer como levadura o hifa y pseudohifa dependiendo de las condiciones de crecimiento. Esta levadura es considerada como un organismo no patógeno debido a que es incapaz de crecer a temperaturas mayores a los 32 a 34°C (Wolf 1996).

Por otra parte atrajo el interés biotecnológico debido a su capacidad de producir grandes cantidades de ácidos orgánicos (ácido cítrico, ácido α -cetoglutarico) y bioconversión de compuestos alifáticos (Barth, et al. 1997).

Desde hace muchos años se iniciaron estudios genéticos, biológicos y bioquímicos en esta levadura. Algunos de los estudios en los que se ha utilizado a este organismo como modelo son: el metabolismo de ácidos grasos, la biogénesis de peroxisomas, el estudio de la transición del dimorfismo y la producción de proteínas heterólogas (Barth, et al. 1997).

También en los últimos años se ha utilizado a *Y. lipolytica* como modelo para estudiar la biogénesis del complejo I respiratorio, ya que a diferencia de la levadura *S. cerevisiae*, contiene una cadena de transporte de electrones clásica, es decir, posee los complejos respiratorios del I al IV, por lo que la cadena respiratoria es más parecida a la de mamíferos que a la de *S. cerevisiae* (Kerscher, et al. 2002).

II. La mitocondria y la cadena transportadora de electrones

Los organismos aerobios consumen oxígeno y es en la mitocondria donde se lleva a cabo el metabolismo oxidativo en eucariontes. La mitocondria participa en el metabolismo de lípidos y aminoácidos, contiene también proteínas oxidorreductoras involucradas en el transporte de electrones y fosforilación oxidativa y participa en la regulación de la apoptosis.

La mitocondria está limitada por la membrana exterior y contiene otra membrana interior extensamente invaginada. Las invaginaciones son llamadas crestas y las proteínas que intervienen en el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa están ligadas a la membrana interna de la mitocondria (MIM). La membrana interna divide a la mitocondria en dos compartimientos, el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial (Voet 2007).

La matriz es una solución parecida a un gel que contiene altas cantidades de enzimas solubles del metabolismo oxidativo, sustratos, cofactores e iones inorgánicos. La matriz también contiene la maquinaria genética mitocondrial (DNA, RNA, enzimas de expresión y ribosomas) (Voet 2007).

El sistema de transporte de electrones se encuentra embebido en la bicapa lipídica de la membrana interna mitocondrial y está compuesto de cuatro complejos enzimáticos multiproteicos. La principal función del sistema es el transporte coordinado de electrones y protones, lo cual conduce a la producción de ATP por la ATP sintasa o complejo V.

La cadena respiratoria clásica consiste de cuatro complejos (complejos I, II, III y IV) y dos acarreadores de electrones; la ubiquinona y el citocromo *c* (ver figura 1). La fosforilación oxidativa inicia con la entrada de electrones a la cadena respiratoria a través de los complejos I y II. Los electrones entran del NADH vía complejo I o del succinato vía complejo II y son transferidos a la ubiquinona. El complejo III lleva los electrones de la ubiquinona reducida al citocromo *c* y el complejo IV transfiere los electrones del citocromo *c* al oxígeno. El transporte de electrones está acoplado a la translocación de protones a través de la membrana interna de la mitocondria, del lado matricial al espacio intermembranal. La

formación de este gradiente transmembranal provee la fuerza para llevar a cabo la síntesis de ATP por el complejo V (Smeitink, et al. 2001).

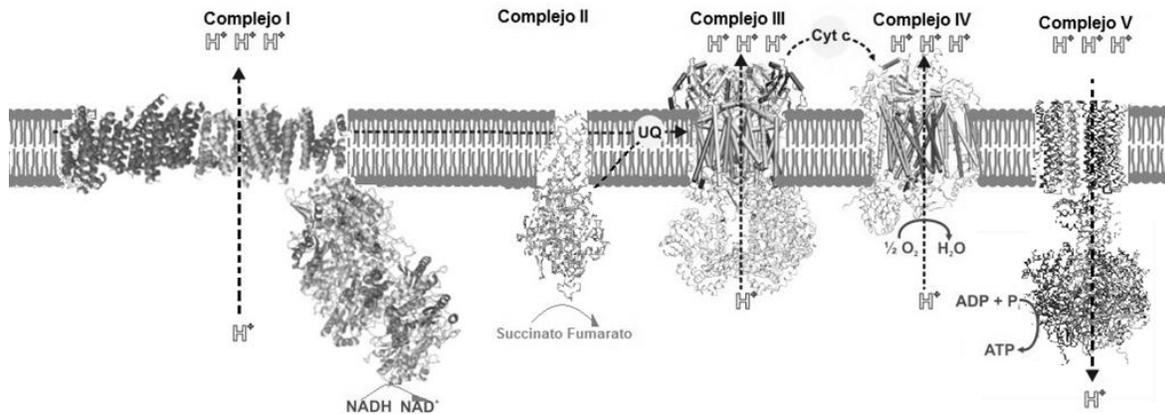


Figura 1. Cadena transportadora de electrones y ATP sintasa. En el esquema se muestra la estructura tridimensional de los complejos I-IV. El complejo I oxida al NADH y transfiere los electrones a la poza de quinonas. El complejo II oxida al succinato y transfiere los electrones a la ubiquinona. El complejo III lleva los electrones de la ubiquinona reducida al citocromo c y el complejo IV transfiere los electrones del citocromo c al O₂. El complejo V utiliza el gradiente de H⁺ para llevar a cabo la síntesis de ATP por el complejo V. Las imágenes de las estructuras cristalográficas fueron tomadas del banco de datos de proteínas (PDB www.rcsb.org).

➤ *Complejos enzimáticos de la cadena transportadora de electrones y la ATP sintasa*

El complejo I o NADH: ubiquinona oxidorreductasa se encuentra en la mayoría de los organismos eucariontes con algunas excepciones como *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Kluyveromyces lactis*. Este complejo cataliza la oxidación de NADH y la reducción de la ubiquinona acoplada a la translocación de cuatro protones a través de la membrana interna de la mitocondria. El núcleo del

complejo está integrado por catorce subunidades que se conservan en eucariotes y son equivalentes a las subunidades de bacterias. De estas, siete son subunidades unidas a la membrana codificadas por el genoma mitocondrial en eucariotes y siete son subunidades extrínsecas de membrana codificadas en el núcleo. Las subunidades hidrofílicas forman un dominio extendido en la matriz mitocondrial (Bridges, et al. 2009).

La succinato deshidrogenasa (SDH), también conocida como complejo II, participa en la transferencia de electrones a la ubiquinona mediante la oxidación de succinato a fumarato y no participa en la translocación de protones a través de la membrana. La SDH de *S. cerevisiae* es un heterotetrámero compuesto de 2 dominios distintos, un dímero periférico y un dominio monomérico o dimérico intrínseco a la membrana. El dominio periférico contiene los sitios activos para la oxidación de succinato, la subunidad Sdh1p está unida covalentemente al Dinucleótido de Flavina y Adenina (FAD) y la Sdh2p contiene 3 centros Fe-S, mientras que el dominio intrínseco está compuesto de 2 subunidades hidrofóbicas (Lemire, et al. 2002). Todas las subunidades que forman el complejo II son de origen nuclear.

El complejo III o citocromo bc_1 es un homodímero que en *S. cerevisiae* está compuesto de 10 subunidades proteicas por monómero. Tres de ellas; el citocromo b (COB), el citocromo c_1 y la proteína de Rieske contienen grupos prostéticos y participan en la transferencia de electrones (Zara, et al. 2009). COB es la única subunidad codificada en el DNA mitocondrial.

La citocromo c oxidasa (complejo IV) cataliza el paso final de la transferencia de electrones, en la cual los electrones son transferidos del citocromo c reducido al oxígeno molecular. En mamíferos el complejo IV está integrado por 13 diferentes subunidades. Las 3 subunidades más grandes y más hidrofóbicas son Cox1, Cox2 y Cox3, codificadas por genes mitocondriales (Lazarou, et al. 2009).

La actividad de los complejos I, II, y IV genera un gradiente transmembranal que proporciona la fuerza protón-motriz para que el complejo V o F_1F_0 -ATP sintasa pueda producir ATP a partir de ADP (Lefebvre-Legendre, et al. 2003). La F_1F_0 -ATP sintasa está compuesta de tres unidades estructurales distintas, cada una con una

función única. La F_1 es un complejo multiproteico globular con 5 subunidades distintas cuya estequiometría es $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ y es el sitio de unión del adenín nucleótido capaz de sintetizar o hidrolizar ATP. F_1 está unida a un conjunto de subunidades embebidas en la membrana interna mitocondrial que conforman la unidad F_0 de la ATP sintasa. En *S. cerevisiae* el núcleo del sector F_0 está integrado por 3 subunidades codificadas en el mtDNA (Atp6, Atp8 y Atp9). La interfase entre Atp6 y Atp9 forma el canal por el cual los protones se transfieren a través de la membrana interna. La tercera parte funcional es el estator compuesto por 4 subunidades Atp4, Atp7, Atp14 y OSCP (Stock, et al. 2000).

En los últimos años se ha observado que la ATP sintasa forma estructuras diméricas y oligoméricas en la membrana mitocondrial. Del mismo modo los complejos respiratorios I, III y IV están asociados a supercomplejos o respirosomas. En mamíferos, se ha observado la presencia de supercomplejos compuestos por I-III₂-IV₄ y III₂-IV₄, en plantas I₂-III₄, I-III₂-IV₁₋₄, V₂ y III₂-IV₁₋₂ y en *S. cerevisiae* III₂-IV₂. La presencia de estos supercomplejos permitiría la canalización de sustratos entre varios complejos aumentando su tasa y eficiencia de transferencia de electrones, el secuestro de intermediarios reactivos y la estabilización de los complejos individuales dentro del respirosoma (Eubel, et al. 2004; Guerrero-Castillo, et al. 2009).

➤ *Componentes alternos de la cadena de transporte de electrones*

En mamíferos el primer paso en la vía de oxidación del NADH comienza en el complejo I pero en bacterias, arqueas, levaduras, hongos y plantas se ha encontrado una NADH: ubiquinona oxidoreductasa alterna (también llamada NDH2) en adición o sustitución del complejo I. NDH2 lleva a cabo la misma reacción de oxidación del NADH que complejo I, pero no está acoplada a la translocación de protones a través de la membrana interna (Kerscher, et al. 1999).

La NDH2 es una enzima de 50-60 kDa y no bombea protones, es insensible a inhibidores clásicos del complejo I como la rotenona y la piericidina A y tal vez

compite con el complejo I por el NADH y la ubiquinona en la matriz mitocondrial, aunque también algunas deshidrogenasas son capaces de reaccionar con el NADPH (Kerscher, et al. 2008) (ver figura 2).

En eucariontes la enzima puede estar orientada al lado interno, externo o en ambos en la membrana interna mitocondrial. Estudios realizados en *Torulopsis utilis* (Katz, et al. 1971) y en *Neurospora crassa* (Schwitzguebel, et al. 1982) indican que la actividad de la NADH está bajo control metabólico, ya que la actividad es alta durante etapas tempranas de la fase media logarítmica, pero cuando las células entran a la fase estacionaria de crecimiento y disminuye la fuente de carbono la actividad es baja. La enzima consiste en una cadena polipeptídica y contiene una molécula de FAD como grupo prostético unido no covalentemente (Kerscher, et al. 2008).

Algunos eucariontes como los mamíferos no tienen una NDH2 pero la expresión heteróloga de la deshidrogenasa alterna de *S. cerevisiae* del lado matricial de la membrana interna puede rescatar la actividad NADH ubiquinona oxidorreductasa en defectos del complejo I, como se ha observado en *Drosophila melanogaster* y en líneas celulares de mamífero (Seo, et al. 1998) (Sanz, et al. 2010).

Otra enzima que funciona como parte de la cadena de transporte de electrones de plantas, algunos hongos y protistas es la oxidasa alterna no-hemo (AOX), la cual transfiere electrones del ubiquinol al oxígeno de manera directa pasando por alto a los complejos III y IV (Joseph-Horne, et al. 2001) (ver figura 2). AOX es una proteína de la membrana interna que no se afecta por inhibidores del complejo IV (cianuro, monóxido de carbono, entre otros) y se activa en condiciones de estrés, su actividad no está acoplada a la translocación de protones (McDonald 2009).

En plantas se ha observado que la AOX puede ayudar a disminuir la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Se ha propuesto que en general podría ayudar a mantener la homeostasis modulando la producción de ATP, manteniendo el flujo de electrones al oxígeno cuando otros componentes de la cadena están afectados o el ADP es limitante (McDonald 2009).

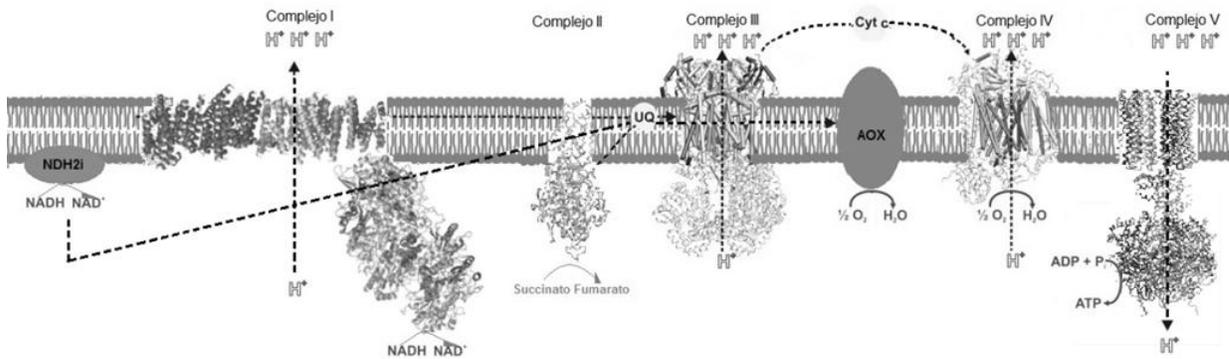


Figura 2. Componentes alternos de la cadena respiratoria. En el esquema se muestra la estructura tridimensional de los complejos I-IV. La NDH2 se encuentra del lado de la matriz mitocondrial y lleva a cabo la oxidación del NADH, transfiere los electrones a la poza de quinonas. La AOX transfiere los electrones de la ubiquinona al oxígeno.

La cadena respiratoria de *Y. lipolytica* contiene los complejos I-V, una NADH-deshidrogenasa alterna externa (NDH2e) y dos isoformas de la oxidasa alterna no-hemo (AOX). El flujo de electrones que sigue la vía NDH2e-quinona-AOX es conveniente quizá cuando hay un exceso de poder reductor, condición presente en la fase estacionaria de crecimiento (Kerscher, et al. 2002; Guerrero-Castillo, et al. 2009).

III. Biogénesis de la NADH: ubiquinona oxidorreductasa o complejo I

La NADH: ubiquinona oxidorreductasa es la enzima más grande de la cadena transportadora de electrones. La enzima tiene forma de “L”, la cual se forma por dos brazos, uno inmerso en la membrana interna de la mitocondria y el otro soluble en la matriz (Abdrakhmanova, et al. 2004). Las subunidades codificadas en la mitocondria forman parte del brazo inmerso en la membrana.

El complejo I de *Y. lipolytica* tiene una masa total de 963.7 kDa y se han identificado 42 subunidades. Se ha visto que de éstas, 21 subunidades están conservadas en mamíferos y hongos. Las 14 subunidades que forman el núcleo

funcional son: ND1, ND2, ND3, ND4, ND5, ND6, ND4L, 75kDa, 51kDa, 49kDa, 30kDa, 24kDa, TYKY y PSST. El resto son subunidades accesorias que probablemente tengan una función en el ensamble, la estabilización y regulación de la actividad del complejo I (Hunte, et al. 2010; Angerer, et al. 2011).

El complejo I está conformado por 3 módulos. El **módulo N** contiene el sitio de oxidación del NADH con una molécula de FMN (flavin mononucleótido) como aceptor primario de los electrones y que alimenta una red de centros Fe-S. El **módulo Q** contiene el sitio de reducción de la ubiquinona y acepta los electrones provenientes del modulo N y los transfiere a la ubiquinona vía centros Fe-S. El **módulo P** es la región donde se lleva a cabo la translocación de protones. En *Y. lipolytica* son 7 centros Fe-S que conducen a los electrones del FMN a la ubiquinona (ver figura 3) (Hunte, et al. 2010).

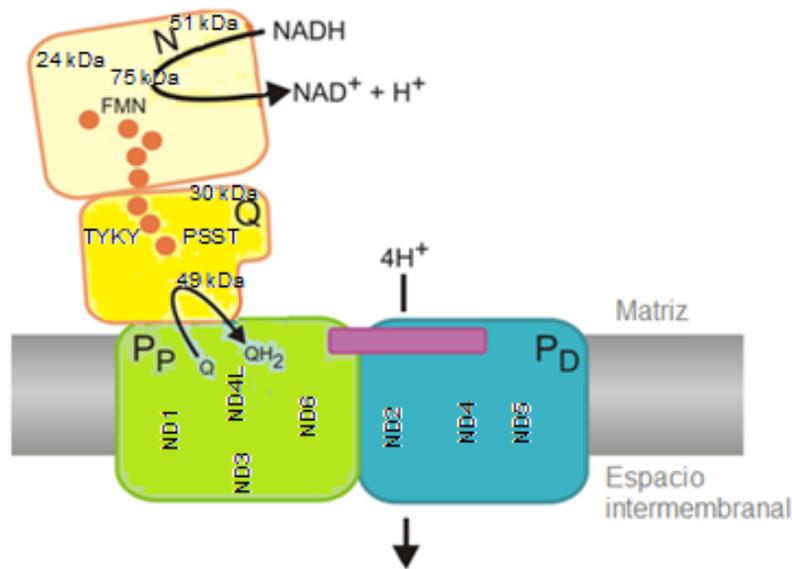


Figura 3. Modelo esquemático de los módulos del complejo I de *Yarrowia lipolytica*. El esquema muestra la ubicación de las 14 subunidades que forman el núcleo catalítico del complejo I. El modulo N es el sitio de unión del NADH. El modulo Q contiene el sitio de unión de la ubiquinona. El modulo P es la región donde se lleva a cabo la translocación de protones. El modulo P se divide a su vez en un modulo P proximal (P_P) y un P distal (P_D). Tomada y modificada de (Hunte, et al. 2010; Angerer, et al. 2011).

La primer estructura cristalina reportada de complejo I fue de *Thermus thermophilus* (ver figura 4A) con 15 subunidades. ND2, ND4 y ND5 muestran un patrón de 14 hélices repetidas, cada subunidad contiene dos hélices discontinuas (Efremov, et al. 2010).

La estructura cristalográfica de *Y. lipolytica* se obtuvo con menor resolución (figura 4B). El brazo membranal tiene una longitud de 180Å y la longitud del brazo periférico es de 190Å. Presumiblemente las subunidades más grandes e hidrofóbicas ND2, ND4 y ND5 están involucradas en el bombeo de protones y son homólogas a antiportadores Na⁺ o K⁺/H⁺ (Efremov, et al. 2010; Hunte, et al. 2010).

En ambas estructuras cristalográficas se observa la presencia de una hélice anfipática extendida (HL) a lo largo del dominio membranal cerca de la superficie de la bicapa lipídica. HL está en contacto directo con las hélices discontinuas en cada una de las subunidades parecidas a antiportadores. En la estructura cristalográfica de *Y. lipolytica* se observa la cadena de 7 centros Fe-S que conecta al FMN con el sitio de reducción de la quinona. En donde N2 es último centro Fe-S aceptor de electrones (Efremov, et al. 2010; Hunte, et al. 2010).

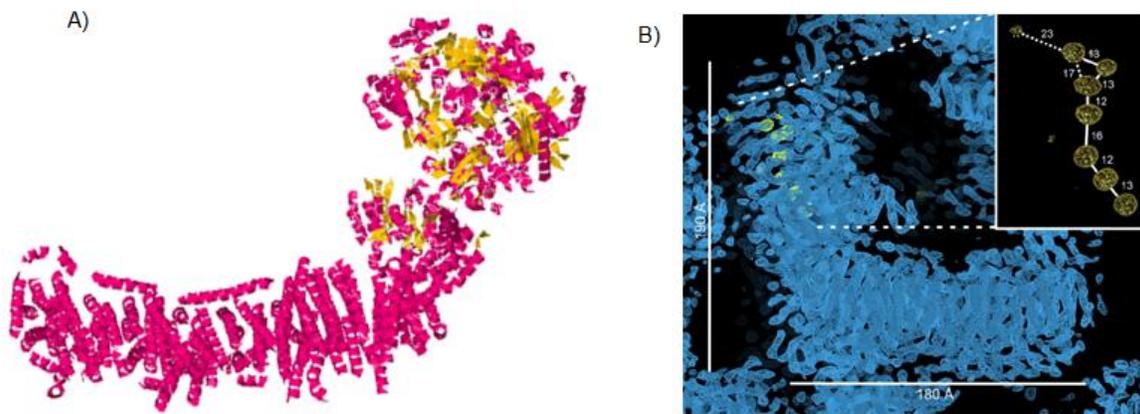


Figura 4. Estructura cristalográfica de complejo I. A) Estructura de *T. thermophilus* a 4.5Å de resolución. B) Estructura de *Y. lipolytica* a 6.3Å de resolución. Imágenes tomadas de (Efremov, et al. 2010; Hunte, et al. 2010).

La transferencia de dos electrones del NADH a la quinona está acoplada a la translocación de cuatro protones a través de la membrana. El mecanismo de bombeo de los protones es desconocido pero en el caso de *Y. lipolytica* se ha propuesto que sólo hay dos sitios de paso de protones uno en el módulo P_P y otro en el módulo P_D y que son los intermediarios oxidorreductores de la ubiquinona los que conducen cambios conformacionales (Brandt 2011).

Este modelo implica la consideración de dos estados conformacionales del complejo I, el estado E y el estado P. En el estado E, la transferencia de electrones de N₂ a la ubiquinona o semiquinona ocurre a una velocidad alta pero el sustrato (quinona) está protegido para prevenir su protonación. En este estado las especies aniónicas son desestabilizadas y los sitios de bombeo están en la conformación de entrada. En el estado P la protonación es posible, las especies aniónicas de la quinona son estabilizadas y los sitios de bombeo adquieren la conformación de salida. Se piensa que los dos sitios de bombeo están conformacionalmente ligados por el movimiento del elemento de transmisión HL (Brandt 2011).

➤ *Biogénesis del complejo I*

De todos los complejos respiratorios, la biogénesis del complejo I es la menos comprendida. El complejo I de eucariontes requiere de la integración de un gran número de subunidades (en mamíferos más de 40), la interacción de proteínas codificadas en dos diferentes genomas y la incorporación de diversos grupos prostéticos, todo esto hace sumamente complejo el ensamblaje de la enzima.

Por más de 30 años *S. cerevisiae* ha sido utilizada para estudiar la biogénesis de los complejos III, IV y V (Tzagoloff, et al. 1975) pero la ausencia de CI ha generado la necesidad de utilizar a otro organismo como modelo. En los años 90's se identificaron chaperonas del ensamblaje en *N. crassa* (CIA30 y CIA84) (Kuffner, et al. 1998) pero sólo en años recientes se han identificado chaperonas

específicamente involucradas en el ensamblaje de CI utilizando como modelo al humano.

El ensamble del complejo I es un proceso dinámico que para ser completado requiere de diversos factores de ensamblaje (al menos 11 son los que hasta la fecha se han descrito) (McKenzie, et al 2010).

Para determinar cómo las subunidades son ensambladas en el complejo I de humanos, Antonicka y colaboradores realizaron un estudio con células de pacientes deficientes de complejo I e identificaron un grupo de intermediarios de ensamblaje por electroforesis nativa. De sus hallazgos se propuso un modelo de ensamblaje donde tanto el brazo membranal como el matricial están juntos en etapas tempranas del ensamblaje (Antonicka, et al. 2003). Este modelo difiere del modelo de ensamble del complejo I de *N. crassa* en donde se ha observado que el brazo membranal y el brazo matricial son ensamblados por vías independientes con dos intermediarios separados formando el brazo membranal (Tuschen, et al. 1990; Ugalde, et al. 2004).

En la figura 5 se observa el modelo de ensamble del complejo I de mamífero en el que se pueden ver distintos intermediarios. Durante etapas tempranas del ensamble las subunidades 30kDa, 49kDa y PSST forman parte del intermediario 2. El intermediario 3 aparece con la adición de la subunidad de 39kDa y se ancla a la membrana mediante los factores de ensamblaje (Ndufaf3 y Ndufaf4). Se propone que el intermediario 3 se asocia con ND1 para formar un intermediario de 400kDa (Vogel, et al. 2007).

El intermediario "b" se ensambla a partir de las subunidades membranales ND2, ND3, ND6 y B17, las cuales se asocian con el factor de ensamblaje Ndufaf1 (o CIA30) y Ecsit. Los intermediarios 4 y "b" se ensamblan juntos, con la adición de ND4 y ND5 dando lugar al intermediario de 830 kDa (intermediario 6). Se ha postulado que los factores de ensamblaje Ndufaf3, Ndufaf4, Ndufaf1 y Ecsit permanecen asociados hasta la última etapa de ensamblaje, donde el intermediario "d" (módulo N), se incorpora a la forma madura del complejo I (Tuschen, et al. 1990; Antonicka, et al. 2003; Lazarou, et al. 2007; McKenzie, et al 2010).

Otras proteínas que participan en el ensamblaje del complejo I recientemente descritas son: C8orf38 y ACAD9. ACAD9 es la proteína Acil-CoA deshidrogenasa 9 y se une a NDUFAF1 y a Ecsit (Nouws, et al. 2010). C8orf38 se piensa participa en síntesis dentro de la mitocondria o integración de ND1 en la membrana interna (McKenzie, et al. 2011).

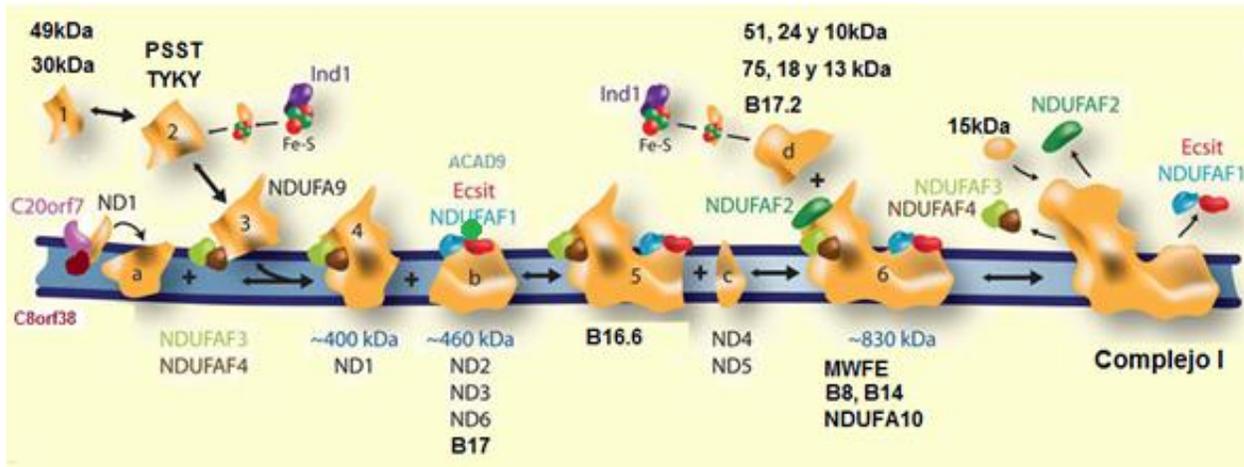


Figura 5. Modelo del ensamblaje del complejo I de humano. La nomenclatura utilizada para nombrar las subunidades es la de bovino. En color amarillo están las subunidades de CI y en colores diferentes se observan los factores de ensamblaje, en cada subcomplejo se indica las subunidades que van ensamblando para formar los diferentes intermediarios. Tomado y modificado de (McKenzie, et al. 2010).

IV. Genoma mitocondrial de *Y. lipolytica*

El genoma mitocondrial de diferentes linajes de eucariontes muestra una amplia diversidad en su tamaño, contenido genético y en su organización pero en general se caracterizan por su reducido contenido genético. A pesar de que son pocos los genes en este genoma, el mantenimiento del mtDNA, la transcripción, la síntesis de proteínas y su inserción en la membrana es controlada en mayor parte por factores codificados en el genoma nuclear, los cuales son importados a la mitocondria.

Los genes encontrados en el genoma mitocondrial codifican para subunidades hidrofóbicas de los complejos respiratorios, para el RNA ribosomal de la subunidad grande y chica y un importante conjunto de RNA's de transferencia.

El genoma mitocondrial de *Y. lipolytica* es circular y tiene un tamaño de 47.9kb. Codifica para siete subunidades de la NADH: ubiquinona oxidoreductasa (*ND1*, *ND2*, *ND3*, *ND4*, *ND5*, *ND6* y *ND4L*), una subunidad de complejo III (*COB*), tres subunidades de la citocromo oxidasa (*COX1*, 2 y 3), tres subunidades de la ATP sintasa (*ATP6*, *ATP8* y *ATP9*), RNAs ribosomales de la subunidad grande y chica y 27 RNAs de transferencia (ver figura 6). Únicamente los genes de *ND1*, *COX1*, *COX3*, *ND5* y *COB* son interrumpidos por un total de 17 intrones de los cuales, uno se encuentra en *ND1* y dos en *ND5* (Kerscher, et al. 2001).

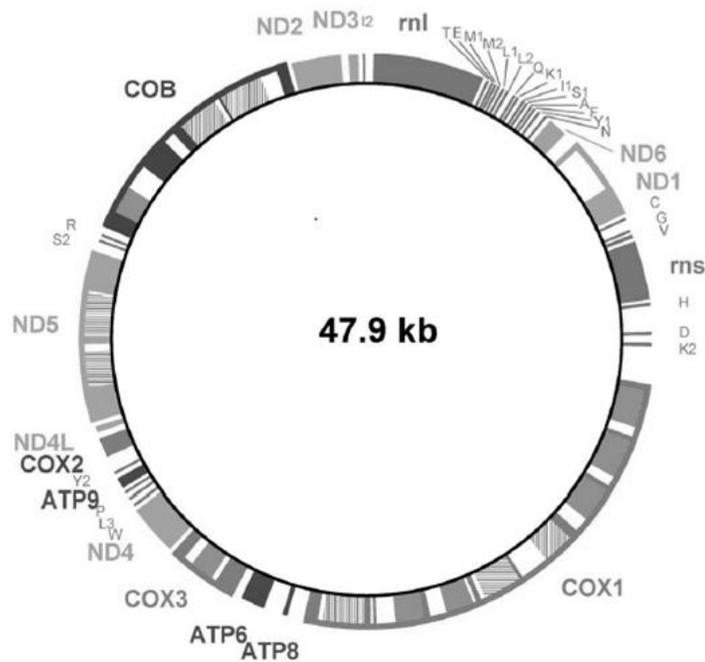


Figura 6. Genoma mitocondrial de *Y. lipolytica*. ND1, ND2, ND3, ND4, ND5, ND6 y ND4L son subunidades del complejo I. COB es una subunidad de complejo III, Cox1, 2 y 3 son parte de la citocromo c oxidasa, Atp6, Atp8 y Atp9 son subunidades de la ATP sintasa, rnl y rns codifican para el RNA ribosomal de la subunidad grande y chica del ribosoma respectivamente. Hay un total de 27 RNAs de transferencia. Las líneas diagonales son intrones. Imagen tomada de (Kerscher, et al. 2002).

Los siete genes codificados de la NADH ubiquinona oxidorreductasa están embebidos en la membrana interna y forman parte del brazo membranal. ND2, ND4 y ND5 contienen un mayor número de cruces transmembrales en *Y. lipolytica* se estima son 13 para ND2 y ND3 y 16 para ND5, ND3, ND6 y ND4L son de menor peso molecular y contienen menor cantidad de cruces transmembranales, siendo subunidades de menor tamaño 3, 5 y 2 respectivamente. Mientras que para ND1 son 10.

V. Estudios del complejo I en *Y. lipolytica*

Se sabe que interrupciones de genes nucleares que codifican para subunidades esenciales del complejo I no son viables en *Y. lipolytica*. Por ello Kerscher y colaboradores tomaron como base el modelo de *S. cerevisiae* (que es una levadura que no contiene complejo I pero si tiene deshidrogenasas alternas en ambos lados de la membrana interna de la mitocondria) y redirigieron una deshidrogenasa alterna al lado matricial de la mitocondria de *Y. lipolytica*, lo cual, ha permitido el estudio de mutaciones del complejo I (Kerscher, et al. 2001; Kerscher, et al. 2002). Esta NDH2i contiene la presecuencia de la subunidad de 75kDa que le permite internalizarse en la mitocondria (Kerscher, et al. 2001).

➤ Mutantes de las subunidades PSST, TYKY y 51kDa

El síndrome de Leigh o encefalopatía necrosante subcutánea es un desorden neurodegenerativo progresivo y severo que tiene una incidencia estimada de 1:40 000 en niños recién nacidos (Ahlers, et al. 2000) que resulta en la muerte a edad temprana. En los últimos años se identificaron mutaciones puntuales en genes para las subunidades del complejo I como la causa de defectos genéticos, cerca de una tercera parte de estos casos puede ser atribuido a mutaciones en genes que codifican para subunidades estructurales del complejo I, sugiriendo que los

casos restantes se deben a defectos en otras proteínas como chaperonas involucradas en la biogénesis del CI (Calvo, et al. 2010).

En el caso de un paciente con síndrome de Leigh se encontraron dos mutaciones, una en el gen *NDUFS7* (homólogo a PSST) que resulta en una sustitución V122M y otra en la sustitución R102H en el gen *NDUFS8* (homólogo de TYKY).

Las subunidades PSST y TYKY forman parte del módulo Q. Se ha propuesto que PSST y TYKY contienen al centro Fe-S N2. PSST forma parte del sitio de unión de la quinona. En *T. thermophilus* PSST está en contacto directo con la membrana (Ahlers, et al. 2000; Efremov, et al. 2010).

Ahlers y colaboradores reconstruyeron las mutaciones en *Y. lipolytica* y encontraron que estas mutantes puntuales afectan el transporte de electrones en aproximadamente un 50%, mostrando un comportamiento similar a los pacientes con estas mutaciones, lo que indica que *Y. lipolytica* puede ser utilizado como modelo de estudio para el complejo I (Ahlers, et al. 2000).

La subunidad 51kDa contiene el sitio de unión al NADH y al FMN y está asociada a la subunidad 24kDa, ambas junto con 75kDa forman el módulo N del complejo I. En cepas de *Y. lipolytica* en donde se ha eliminado la subunidad de 51kDa se pierde la actividad catalítica del complejo ya que los centros redox no pueden ser reducidos por el NADH. Sin embargo, no se ha descrito el ensamble del complejo en esta cepa Δ 51kDa (Zickermann, et al. 2007).

VI. Regulación de la expresión de genes mitocondriales

La biogénesis de enzimas de la fosforilación oxidativa en eucariontes es dependiente de dos sistemas genéticos, el mitocondrial y el nuclear. El rol principal del sistema mitocondrial es proveer proteínas altamente hidrofóbicas que forman parte de los complejos respiratorios.

La mitocondria ha mantenido su propio aparato de transcripción–traducción–inserción de proteínas en la membrana durante la evolución para llevar a cabo la

expresión de su genoma. Los componentes de esa maquinaria son principalmente codificados en el DNA nuclear; así como, la mayoría de las proteínas que forman parte de los complejos respiratorios. Estos componentes son importados a la mitocondria a través de maquinarias de exportación.

La regulación de la expresión de los genes mitocondriales por el estado de ensamblaje de los complejos respiratorios ha sido ampliamente demostrada principalmente en *S. cerevisiae*. Se ha observado que cuando un complejo respiratorio no se puede ensamblar por mutaciones en factores de ensamblaje o subunidades estructurales, entonces la síntesis de alguna (s) subunidad (es) codificada (s) en el genoma mitocondrial disminuye drásticamente. Esta forma de regulación negativa puede prevenir la agregación de proteínas hidrofóbicas no ensambladas (ver figura 6) (Barrientos, et al. 2004; Rak, et al. 2009; Mick, et al. 2011).

En el caso de mutantes de ensamblaje de complejo IV se sabe que la síntesis de Cox1 disminuye (Mick, et al. 2011) y esto depende de señales localizadas en el extremo carboxilo terminal de la misma proteína Cox1 (figura 7) (Shingu-Vazquez, et al. 2010).

Otro ejemplo de este proceso se encuentra en la ATP sintasa. En este caso la expresión de Atp6 y Atp8 depende de la presencia del sector F₁ ensamblado (Rak, et al. 2009). En la ATP sintasa las señales que regulan este proceso no se localizan en las mismas proteínas Atp6 y Atp8 como en la citocromo c oxidasa donde la señal de regulación está en Cox1.

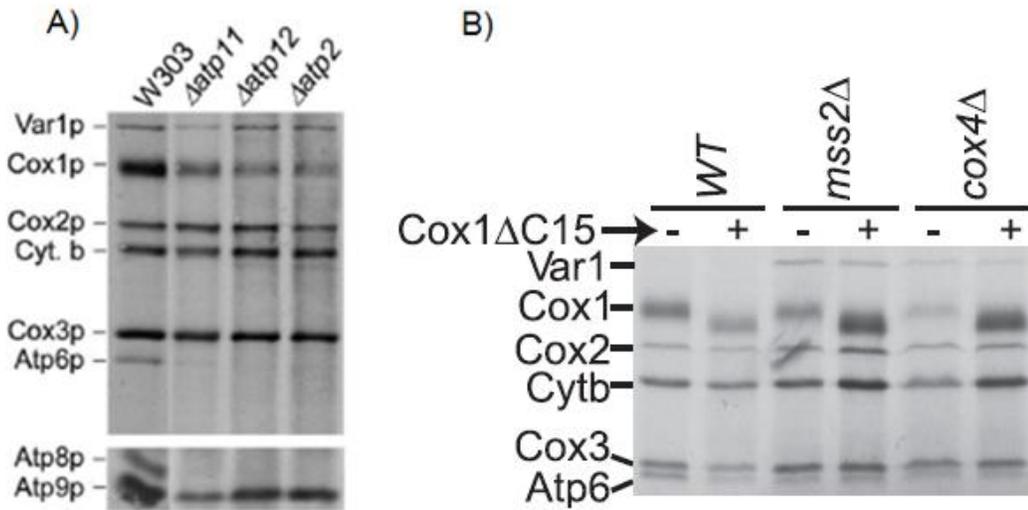


Figura 7. Regulación de la síntesis de proteínas mitocondriales. En mutantes de ensamblaje la síntesis de proteínas mitocondriales disminuye. A) Marcaje radioactivo de proteínas sintetizadas en la mitocondria. W303 es la cepa silvestre Atp11 y 12 son chaperonas de ensamblaje de la ATP sintasa, Atp2 es una subunidad del sector F_1 (Rak, et al. 2009). B) Marcaje radioactivo de proteínas sintetizadas en la mitocondria. Mutantes de ensamblaje de la COX ($\Delta mms2$, $\Delta cox4$). Mss2 es una chaperona del ensamblaje de Cox2 y Cox4 es una subunidad del complejo IV, en presencia o ausencia del carboxilo terminal de cox1 (Shingu-Vazquez, et al. 2010).

En el caso del complejo I, es poco lo que se conoce. Un estudio reciente con RNA de interferencia muestra que la falta de C8orf38 reduce la actividad del complejo I en un 80%. Pacientes con mutaciones en esta proteína tienen niveles reducidos de complejo I y defectos en la traducción de ND1. Por tanto la pérdida de ND1 resulta en un ensamble estancado, impidiendo la progresión a intermediarios tardíos de ensamblaje (McKenzie, et al. 2011).

JUSTIFICACIÓN

A la fecha el estudio de la biogénesis de complejo I ha sido muy difícil, debido a la complejidad de la enzima y también debido a que el modelo ampliamente utilizado para estudiar la biogénesis de los complejos respiratorios (*S. cerevisiae*), no posee complejo I. Por otra parte *Yarrowia lipolytica* aparece como una alternativa, ya que posee complejo I y a que se han desarrollado varias herramientas genéticas, similares a las de *S. cerevisiae*.

Es posible obtener mutantes viables de complejo I en *Y. lipolytica* si se redirige la deshidrogenasa alterna hacia el interior de la membrana (Kerscher, et al. 2001), supliendo así la función de oxidación de NADH en la matriz mitocondrial del complejo I.

U. Brandt y colaboradores usaron a *Y. lipolytica* como modelo eucariote para imitar mutaciones en subunidades de complejo I asociadas a miopatías y concluyen que este organismo puede ser un modelo útil para el estudio de consecuencias biológicas por deficiencias del complejo I de humanos (Ahlers, et al. 2000). Creemos que *Y. lipolytica* es un modelo que potencialmente permitirá estudiar la biogénesis de este complejo.

En nuestro grupo y en otros se ha observado que la síntesis de Cox1, COB, y Atp6 y Atp8 dentro de la mitocondria dependen de que cada una de los complejos, respectivos estén ensambladas, de lo contrario, su síntesis o estabilidad baja dramáticamente (Rak, et al. 2009; Gruschke, et al. 2011; Mick, et al. 2011). En este caso en particular, a nosotros nos interesa estudiar si podría existir un mecanismo que regulara la expresión de alguna de las subunidades mitocondriales de complejo I y si este control puede ser a nivel de acumulación de transcritos, de síntesis de proteínas dentro de la mitocondria o de su regulación proteolítica.

Actualmente es muy poco lo que se conoce acerca de la expresión del genoma mitocondrial de *Y. lipolytica*, por lo que inicialmente deberemos sentar las bases para que en un futuro se pueda iniciar (si es que existe), el estudio del

control de la expresión de genes mitocondriales de complejo I por estado de ensamblaje del mismo complejo.

Por lo tanto comenzaremos tratando de identificar a la mayor cantidad posible de transcritos maduros para los 7 genes mitocondriales de complejo I y analizaremos si su acumulación se afecta en las mutantes Δ PSST, Δ TYKY y Δ 51kDa. Posteriormente intentaremos establecer un sistema *in vivo* para analizar síntesis de proteínas mitocondriales en células completas en presencia de inhibidores de la síntesis citoplásmica y de ^{35}S -metionina. Finalmente intentaremos obtener anticuerpos contra algunas de las subunidades mitocondriales de complejo I para analizar su estabilidad en diversas mutaciones que afectan el ensamblaje de complejo I (Δ PSST, Δ TYKY y Δ 51kDa).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La ausencia de subunidades nucleares del complejo I modificará la expresión de los genes mitocondriales del mismo complejo.

OBJETIVO GENERAL

❖ Estudiar la expresión de genes mitocondriales del complejo I en cepas incapaces de ensamblar el complejo I en *Y. lipolytica*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Caracterización fenotípica de las cepas deficientes de complejo I.
2. Determinar los niveles de los RNA's mensajeros de las subunidades mitocondriales ND1, ND2, ND3, ND4 y ND4L en mutantes Δ PSST, Δ TYKY y Δ 51kDa.
3. Establecer la técnica de síntesis de proteínas mitocondriales.
4. Generar anticuerpos contra las subunidades ND1 y ND2 para determinar si los niveles estacionarios de estas proteínas se afectan en las mutantes Δ PSST, Δ TYKY y Δ 51kDa.

METODOLOGÍA

I. Cepas de *Yarrowia lipolytica*.

Las cepas utilizadas en el presente trabajo se muestran en la tabla 1. El nombre que se indica en la tabla está dado por la subunidad que se eliminó, utilizando la nomenclatura de las subunidades del complejo I de bovino.

Nombre	Genotipo	Donada por:
Cepa silvestre (E150)	Mat B, his-1, ura3-302, leu2-270, xpr2-322, X::NDH2i.	Dr. Salvador Uribe Carbajal.
ΔTYKY	Mat A, lis11,nuim::LEU2, X::NDH2i.	Dr. Ulrich Brandt
ΔPSST	Mat A, nukm::LEU2, X::NDH2i.	Dr. Ulrich Brandt
Δ51kDa	Mat A, his-1, ura3-302, leu2-270, xpr2-322, nubm::URA3, NUGM-HT2, X::NDH2i.	Dr. Salvador Uribe Carbajal.

Tabla1. Genotipos de las cepas de *Y. lipolytica*.

II. Diluciones seriadas 1:10.

Se inocularon 2 colonias de la cepa en 2 mL de medio YD a 30°C toda la noche. Al día siguiente se colectaron las células por centrifugación (1 minuto a 16,100 g), en un tubo eppendorf previamente pesado, se desechó el sobrenadante y se pesó de nuevo el tubo. Se calculó el peso de las células obtenidas y se adicionó la cantidad necesaria de H₂O estéril para tener una concentración de 0.01 g_{células}/mL.

Posteriormente se adicionaron al pozo 1 de una placa de ELISA, 150 μ L de la suspensión celular, se tomaron 15 μ L y se adicionaron de manera sucesiva a 5 pozos más que contenían previamente 135 μ L de agua estéril. Al momento de transferir los 15 μ L se homogenizó la mezcla por pipeteo.

Se esterilizó el replicador por flameo y se introdujo a los pozos de la placa de ELISA en los que se encuentran las diluciones de las células, finalmente se imprimió en una caja de medio YD. Se incubaron las cajas de medio a 25°C y 30°C durante tres días, tomando foto de cada una ellas a los días 1, 2 y 3.

III. Cultivo y aislamiento de mitocondrias de *Y. lipolytica* (Guerrero-Castillo, et al. 2009).

Se crecieron diez colonias de las cepas de *Y. lipolytica* en 50 mL de medio YD a 30°C durante 15 horas en agitación constante. Al día siguiente se vertió el precultivo en 1 L de medio YD y se incubó a 30°C en agitación constante. Las células se cosecharon en fase media logarítmica (OD ~1.2) por centrifugación a 4,400 x *g*, se lavaron con agua destilada y se resuspendieron en medio de aislamiento frío (ver anexos para conocer la composición del medio de aislamiento).

Las células se rompieron con perlas de vidrio usando un homogenizador “Bead beater” dando 3 pulsos de 20 segundos y períodos de 40 segundos de descanso a 4°C.

Posteriormente el amortiguador con las células rotas se centrifugó en tubos de 50 mL a 756 x *g* por 5 minutos, se colectó el sobrenadante y se descartaron las pastillas. Se centrifugó el sobrenadante a 17,400 x *g* durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se unieron las pastillas en un tubo y se llevó a 30 mL de volumen con medio de aislamiento. Se repitió el ciclo de centrifugación 5 minutos a 3,700 x *g*, se tomó el sobrenadante y se centrifugó a 18,900 x *g*. Se retiró el sobrenadante cuidadosamente y la pastilla de mitocondrias se resuspendió en el menor volumen posible de medio de aislamiento.

IV. Cuantificación de mitocondrias por el método de Lowry modificado (Markwell, et al. 1978).

- *Para la curva estándar*

En 10 tubos de ensayo se colocaron cantidades crecientes de una solución de albúmina sérica bovina (10 mg/mL) desde el tubo 1 hasta el tubo 10 (10-100 μ L de albúmina) y se llevó a 1 mL de volumen con agua. Se colocó también un tubo con 1 mL de agua sin albúmina, el cual se utilizó como blanco.

- *Para las muestras*

Se hizo una dilución 1:10 de la muestra a cuantificar. Se colocaron 5, 10 y 20 μ L de la muestra (por duplicado) en tubos diferentes y se llevó a 1 mL con agua.

Se adicionaron a los tubos de las muestras y de la curva 3mL de solución C, se mezclaron con vórtex y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 300 μ L de solución D, se mezcló en vórtex y se dejó incubando por 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se midió la absorbancia a una longitud de onda de 740 nm (en los anexos se encuentra la composición de las soluciones).

Se trazó la curva estándar y por interpolación se determinó la concentración de proteína de cada muestra.

V. Electroforesis en geles desnaturizantes, nativos azules, SDS-PAGE en segunda dimensión y transferencia de proteínas a membranas.

- *Gel SDS-PAGE (Laemmli 1970)*

Los geles desnaturizantes se realizaron al 16% de acrilamida para correr las muestras de los ensayos del marcaje radioactivo.

Las muestras se calentaron a 65°C durante 5 minutos y se cargaron con amortiguador de Laemmli (ver anexos para conocer la composición).

- *BN-PAGE. Gel nativo azul (Wittig, et al. 2006)*

Se realizaron geles nativos para separar al complejo I del resto de los complejos respiratorios. El gel nativo azul se hizo con un gradiente del 4 al 12% de acrilamida (Véase la sección de anexos).

Se tomó 1mg de mitocondrias frescas (aisladas el mismo día). Las mitocondrias se solubilizaron con n-dodecil- β -D-maltósido (concentración final del 1%, 2mg de detergente/mg de proteína) y amortiguador de muestra (volumen final 200 μ L) durante 15 minutos en hielo, agitando suavemente por inversión cada 5 minutos.

A continuación se centrifugaron las mitocondrias por 25 minutos a 100,000 x g utilizando el rotor A-300 en una microcentrífuga y así se eliminaron aquellas mitocondrias que no se hayan solubilizado. Se tomó el sobrenadante cuidadosamente y se colocó en un tubo nuevo, en donde se adicionaron 10 μ L de azul de Coomassie serva G 5% y se mezclaron suavemente por inversión. Las mitocondrias se mantuvieron a 4°C.

La muestra se cargó en el gel y se adicionó a la cámara el amortiguador del cátodo 1 en la parte superior y se corrió a 30 mA a 4°C hasta que el frente de corrida alcanzó un tercio del gel (aproximadamente 1 hora y 30 minutos), en ese momento se cambió el amortiguador del cátodo por el amortiguador del cátodo 2 y se continuó la electroforesis (4 horas aproximadamente). El amortiguador del ánodo es el mismo durante toda la corrida.

- *Gel 2D SDS-PAGE (Schagger 2006)*

Al terminar la electroforesis del gel nativo, se cortó un carril el cual se sumergió en solución desnaturizante durante 20 minutos. Posteriormente se colocó el carril del gel en posición horizontal arriba de un gel desnaturizante al 14%. Se

corrió el gel a 50 V hasta que el frente azul entró en el gel concentrador y después se aumentó el voltaje a 100 V. Finalmente se transfirió el gel a una membrana de nitrocelulosa.

- *Transferencia de proteínas a membrana*

Las proteínas separadas en gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (2D SDS-PAGE) o a membrana de PVDF (para el caso de los geles desnaturalizantes).

Cuando se transfirió en membrana de PVDF, la membrana se colocó en metanol aproximadamente por 30 segundos y posteriormente se sumergió en una solución de transferencia (80:20 de amortiguador de electroforesis y metanol).

Se colocaron en la base de la cámara de transferencia 3 papeles filtro previamente humedecidos con solución de transferencia, sobre la cama de papel se colocó el gel, encima del gel la membrana y sobre la membrana 3 papeles filtro. Se cerró la cámara y se transfirió a 1.5 mA/cm² de membrana durante 1 hora y 30 minutos.

Al término de la transferencia se dejó secar la membrana. Lo mismo se hizo con la membrana de nitrocelulosa a diferencia de que esta última no se sumergió en metanol sino directamente en la solución de transferencia.

VI. Medición de la actividad enzimática en gel

Se cortó un carril completo del gel nativo para cada ensayo de actividad.

La actividad NADH deshidrogenasa del complejo I se determinó por la incubación del gel nativo en 20 mL de solución amortiguadora (Tris 10 mM pH=7.0) en presencia de NBT y NADH. Cuando el complejo ha mostrado actividad se observa una banda de color púrpura (Juárez, et al. 2004).

Para observar sólo la banda que muestra actividad y eliminar la coloración del azul de Coomassie se sumergió el gel en una solución que contiene 50% de metanol y 50% de ácido acético durante toda la noche.

La actividad oxidasa del complejo IV se realizó mediante la incubación del gel nativo en 20 mL de amortiguador de fosfatos pH=7.4, diaminobencidina 5 mg y citocromo c 5 mM (Wittig, et al. 2007).

VII. Extracción de DNA (tomado y modificado de (Dan Burke., et al. 2000)).

Se inocularon 2 ó 3 colonias en 2 mL de medio YD e incubaron a 30°C toda la noche. Al día siguiente se colectaron las células por centrifugación durante 1 minuto a 16,100 x g en una centrifuga eppendorf de mesa.

Se lavaron las células con 1 mL de agua estéril. Posteriormente se resuspendió el botón de células en 500 µL de solución de lisis (ver anexos), se agregó 1 volumen de perlas de vidrio (perlas de 425-600 µm de Sigma) y 500 µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico 25:24:1 y se agitó en vórtex por 3 minutos.

Se centrifugó el lisado de células por 5 minutos a 16,100 x g a 4°C. Se tomó la fase acuosa cuidadosamente y se colocó en un tubo nuevo cuidando no tomar la interfase.

El DNA se precipitó con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M pH=5.2 y 3 volúmenes de etanol absoluto. Se incubó durante 10 minutos a -20°C. Transcurrido ese tiempo se centrifugó a 16,100 x g, 10 minutos a 4°C. Finalmente se lavó con 1 mL de etanol al 70% y resuspendió en 50 µL de agua.

VIII. Amplificación y clonación de las sondas de DNA

Se diseñaron oligonucleótidos para generar sondas de DNA (que van aproximadamente de los 150nt a 500nt) de las diferentes subunidades mitocondriales del complejo I. Los productos de PCR obtenidos se clonaron en el

plásmido pGEM (promega) y este plásmido se transformó en *E. coli*. El plásmido se secuenció para ver si nuestro inserto era idéntico al de la cepa de *Y. lipolytica* (en el anexo III se encuentran los oligonucleótidos utilizados para el PCR, así como la temperatura de alineamiento que se utilizó).

IX. Marcaje radioactivo de las sondas de prueba (Sambrook, et al. 2001).

El marcaje de las sondas se llevó a cabo con la adición de $[\alpha\text{-P}^{32}]$ -dATP a la reacción de PCR. La mezcla de reacción contenía: 5 μL del templado de DNA (utilizando como templado al plásmido que contiene nuestra región de DNA de interés), 0.2 mM de deoxirribonucleótidos (dCTP, dGTP y dTTP), 20 μM de iniciadores, 5U taq DNA polimerasa, amortiguador 1X y 1.4 mM de MgCl_2 en un volumen final de 50 μL .

Las mezclas de reacción se realizaron al doble de la cantidad necesaria y antes de adicionar la marca radiactiva se dividió en dos, a un tubo se adicionó el $[\alpha\text{-P}^{32}]$ -dATP y a otro dATP. El tubo de reacción con dATP se empleó como control y se cargó en un gel de agarosa para ver que el producto había amplificado.

Una vez obtenido el producto de PCR radioactivo se eliminó el exceso de deoxirribonucleótidos con columnas de BioRad siguiendo las indicaciones del fabricante.

X. Extracción de RNA (Wolf 1996).

Se crecieron 5 colonias de *Y. lipolytica* en 20 mL de medio YD, se incubó toda la noche a 30°C (densidad óptica de 1.2) y se cosecharon las células por centrifugación a 3,000 x g durante 5 minutos.

Se lavaron las células con 1 mL de solución AE (en la sección de anexos se encuentra la composición de las soluciones). Se centrifugaron a velocidad máxima por un minuto. Se tomó la cantidad necesaria para tener 0.25 g de células. Se

adicionó a las células 1 volumen de perlas de vidrio, 400 μL de solución AE, 500 μL de fenol saturado con AE y 100 μL de SDS al 10%. Se lisaron las células agitando en un vórtex a velocidad máxima la mezcla anterior, dando pulsos de 30 segundos y 30 segundos de descanso en hielo (este ciclo se repitió 3 veces).

Se colocaron los tubos a 65°C por 5 minutos y se enfriaron inmediatamente en hielo por 5 minutos. Posteriormente se centrifugó a $16,100 \times g$ durante 10 minutos a 4°C .

Se colocó la fase acuosa en un tubo eppendorf nuevo y se adicionaron 500 μL de amortiguador AE, se mezcló por inversión y se centrifugó nuevamente 10 minutos a 4°C a $16,100 \times g$.

Se recuperó la fase acuosa en un tubo limpio y se adicionó un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló por inversión y se centrifugó a $16,100 \times g$ por 10 minutos a 4°C . Se tomó la fase acuosa y se adicionó el volumen necesario de cloruro de litio 4M para tener una concentración de 0.4M de LiCl, y dos volúmenes de etanol al 100%.

Se incubó la mezcla anterior a -20°C durante 1 hora para precipitar el RNA, posteriormente se centrifugó a $16,100 \times g$ por 10 minutos a 4°C . Se retiró el sobrenadante y el precipitado se lavó con 500 μL de etanol al 75%, se centrifugó durante 5 minutos a $16,100 \times g$ a 4°C . Finalmente se dejó secar el RNA y se resuspendió en 40 μL de agua tratada con DEPC.

XI. Gel desnaturizante de RNA

Una vez que se obtuvo el RNA de las células, se cuantificó su concentración en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 Thermo Scientific. Se preparó un gel con una concentración final de agarosa 1%, MOPS 10X al 1% y 18% de formaldehído.

- *Preparación de las muestras*

Se colocó en un tubo Eppendorf el volumen de muestra equivalente a 10 μg de RNA.

Se añadió a cada muestra 2 μL de MOPS 10X, 6 μL de formaldehído y 20 μL de formamida.

Se calentó la muestra a 65°C por 15 minutos, después se enfrió de inmediato en hielo por 5 minutos y se adicionó a cada muestra 5 μL de amortiguador de carga y 5 μL de bromuro de etidio (1 mg/mL).

Cuando las muestras ya fueron desnaturalizadas, se cargaron en el gel y se corrió la electroforesis a 50V durante 75 minutos, transcurrido ese tiempo se aumentó el voltaje a 100 V y se corrió 2 horas más.

XII. Transferencia de RNA a membrana de nylon y Northern blot

Terminada la electroforesis, el RNA se transfirió a membrana de nylon, para lo cual se llevó a cabo lo siguiente:

- Se colocó en un recipiente amplio un soporte de acrílico, se colocó un papel filtro sobre el soporte, el papel filtro estaba en contacto con el amortiguador SSC20X por ambos extremos del soporte.
- Se colocó el gel sobre el papel (el gel se lavó previamente con H₂O-DEPC), se cubrió con papel los extremos del gel dejando descubierto los carriles en donde corrieron las muestras y se colocó sobre el gel la membrana de nylon.
- Se colocaron 3 papeles filtro encima del gel y después una torre de servilletas de 7 cm de altura. Al final de la torre de papel se colocó un acrílico y un objeto de aproximadamente 1.5 kg.
- Se añadió en el recipiente 500 mL de solución SSC 20X y se dejó transfiriendo toda la noche.
- Terminada la transferencia se retiró la membrana, se colocó en un entrecruzador (UV Stratalinker 2400) y se dieron 2 pulsos de radiación UV a 1199 μJoules .

➤ *Northern blot*

Una vez obtenida la sonda marcada con dATP³² limpia se guardó la mitad (25 µL de sonda) a -20°C y la otra mitad se desnaturalizó incubando 1/10 de volumen de solución de NaOH 1N, 1mM de EDTA y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. La sonda desnaturalizada se agregó a la solución de prehibridación precalentada a 65°C (ver anexos) en donde se encontraba la membrana.

Se hibridó toda la noche a 65°C en horno rotatorio.

Al día siguiente se retiró la solución de hibridación y se realizaron 4 lavados a la membrana, uno con solución 2XSSC-0.2% SDS por 5 minutos, dos lavados con solución 2XSSC-0.2% SDS por 15 minutos y el cuarto lavado con solución 0.2XSSC-0.2% SDS por 30 minutos, todos los lavados se hacen a 65°C en el horno rotatorio y con 50 mL de solución.

Finalmente se cubrió la membrana con plástico y se dejó exponiendo en una pantalla sensible a radioactividad toda la noche, al día siguiente se obtuvo la señal de las proteínas marcadas con el equipo Typhoon 9400, la imagen se digitalizó con Typhoon scanner control v5.0 y se analizó con el software Imagequant para análisis digital.

XIII. Traducción *in vivo* de proteínas mitocondriales.

Para llevar a cabo la síntesis *in vivo* de proteínas mitocondriales se siguió el protocolo descrito para *S. cerevisiae* cuando se utilizaron células completas y se modificaron algunas condiciones en el caso de los esferoplastos.

- *Células completas (Bonnefoy, et al. 2001)*
 - Se crecieron 2 colonias de células en 2 mL de medio YD a 30°C toda la noche. Se inoculó 0.1 mL de precultivo en 10 mL de medio YD. Las células se cosecharon en fase media logarítmica (OD~1.2, 15 horas de crecimiento) por

centrifugación a 3,000 x *g*, se lavaron con 1 mL de agua y se colocaron en un tubo con tapa de rosca.

- Se tomaron 0.12 g de células:
- Las células se resuspendieron en 1.5 mL de medio mínimo sin metionina (–met/glucosa) y se incubaron 10 minutos a 30°C con agitación constante.
- Se adicionaron 5 µL de cicloheximida (10 mg/mL disuelta en etanol) y se incubó 30 minutos a 30°C con agitación.
- Se añadieron a las células 5 µCi de ³⁵S-metionina y se incubaron a 30°C por 30 minutos en agitación. Transcurrido el tiempo se colocan los tubos inmediatamente en hielo-agua por 5 minutos.
- Los tubos se centrifugaron a 16,100 x *g* a 4°C por 1 minuto en centrifuga de mesa, al finalizar se eliminó el sobrenadante.
- Nuevamente se lavaron las células pero ahora con 200 µL de SHP frío (Sorbitol, HEPES e inhibidor de proteasas, ver anexos).
- La pastilla de células se resuspendió en 200 µL de SHP frío y se agregó un volumen de perlas de vidrio frías (perlas de 425-600 µm de Sigma).
- Se agitó en vórtex 30 segundos a velocidad máxima con descanso de 30 segundos en hielo (se repitió dos veces más este paso).
- Se centrifugó el lisado celular a 600 x *g* por 5 minutos a 4°C, se tomó el sobrenadante y se vertió en un tubo limpio.
- Se agregó a la pastilla 200 µL de SHP frío y repitió el ciclo vórtex-hielo. Se centrifugó 5 minutos a 600 x *g* a 4°C. Se tomó el sobrenadante y se unió a la fracción anterior.
- Se centrifugó el sobrenadante a 16,100 x *g* por 10 minutos a 4°C, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 40 µL de solución de Laemmli. Se calentaron las muestras a 65°C durante 5 minutos.
- Se cargaron en el gel 5 µL de las proteínas (gel de acrilamida-SDS al 16% de 17x14 cm) y se corrió a 27V durante hora y media.

Al finalizar la electroforesis se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF y se expuso la membrana a una placa sensible a radioactividad para el equipo Typhoon 9400 (Molecular dynamics, Amersham Pharmacia Biotech). Se

dejó la membrana en exposición toda la noche, al día siguiente se obtuvo la señal de las proteínas marcadas con el equipo typhoon 9400, la imagen se digitalizó con Typhoon scanner control v5.0 y se analizó la imagen con el software Imagequant para análisis digital.

➤ *Traducción in vivo con esferoplastos (Mihara, et al 1980; Daum, et al. 1982)*

Se crecieron 3 colonias de la cepa en 2 mL de medio YD toda la noche a 30°C. Al día siguiente se vertieron los 2 mL de precultivo en un matraz que contiene 20 mL de medio YD y se incubó a 30°C durante 3 horas.

Se cosecharon las células por centrifugación a 3,000 x g durante 10 minutos y se lavaron con agua estéril una vez y se centrifugaron de nuevo a la misma velocidad.

Las células se resuspendieron en 2 mL de amortiguador TD (2ml/g de peso húmedo). Se agitó 10 minutos a 30°C.

Se centrifugaron las células durante 5 minutos a 1,000 x g. Posteriormente se lavó el botón con amortiguador MP2 (7 ml/g de peso húmedo) y se centrifugaron las células a 1,000 x g por 5 minutos. Posteriormente el botón de células se resuspendió en amortiguador MP2, se adicionó zimoliasa 20T (3mg/g de peso húmedo) y se incubaron durante 40 minutos a 30°C (con agitación suave).

Se revisó la formación de esferoplastos. Para ello se comparó 1 mL de sorbitol 1.2 M contra 1 mL de agua adicionando a cada uno 25 µL de células. Cuando los esferoplastos ya fueron formados, el tubo con agua se vio claro comparado con el tubo de sorbitol.

Una vez que se formaron los esferoplastos se centrifugaron a 600 x g por 5 minutos y se recuperaron en 500 µL de medio –met, sorbitol 1.2 M y HEPES 20 mM pH=7.4 y se incubó a 30°C durante 20 minutos.

A continuación se adicionó la cantidad necesaria de antibiótico y se incubó 10 minutos a 30°C con agitación suave.

Se añadieron a las células 5 μCi de ^{35}S -metionina, se incubó a 30°C por 20 minutos con agitación suave. Transcurrido el tiempo se colocaron los tubos inmediatamente en hielo-agua durante 5 minutos.

Se centrifugaron las células a $600 \times g$ en centrífuga de mesa a 4°C por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se lavaron las células con 200 μL de SHP frío y se resuspendieron en 200 μL de SHP frío y se agregó un volumen de perlas de vidrio frías.

Se agitaron los tubos con las células en vórtex 30 segundos a velocidad máxima y se incubaron 30 segundos en hielo (se repitió dos veces más este paso). Se centrifugaron los tubos a $600 \times g$ por 5 minutos a 4°C y se tomó el sobrenadante de manera cuidadosa y se vertió en un tubo limpio.

Se centrifugó el sobrenadante a $16,100 \times g$ en centrífuga de mesa por 10 minutos a 4°C , se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 40 μL de solución de Laemmli. Para desnaturalizar las muestras se calentaron a 65°C durante 5 minutos.

Se cargaron 5 μL de la muestra desnaturalizada en un gel de acrilamida al 16% y se corrió a 27 V por hora y media.

XIV. Western blot

Una vez que las proteínas son transferidas a membrana se realiza el Western blot. La membrana se incubó toda la noche a 4°C con solución de bloqueo. Posteriormente se adicionó el anticuerpo de prueba en el amortiguador apropiado y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se hicieron 3 lavados (10 minutos cada uno) con solución de lavado. Después se incubó 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario en solución de blot. Se realizaron nuevamente 3 lavados de 10 minutos cada uno. Finalmente se realizó la detección con quimioluminiscencia (kit pierce ECL Western blotting) y el resultado se obtuvo por autorradiografía.

XV. Obtención de anticuerpos

➤ *Aplicación del antígeno*

Los péptidos para la generación de anticuerpos se sintetizaron por GenScript y se unieron a una molécula de KLH (Keyhole limpet hemocyanin) a través de una cisteína en el extremo carboxilo y se acetilaron en el extremo amino.

Una vez que se tuvieron los péptidos, estos se resuspendieron en solución de PBS de tal manera que la concentración del péptido fuera de 1 mg/mL y se guardó en alícuotas de 100 µL a -70°C.

El esquema de inmunización que se siguió es el siguiente:

Día 1	Día 28	Día 56	Día 84	Día 91	Antes del día 98
Obtención de sangre (suero preinmune)	Se inyectó 50 µg del péptido y se llevó a 1 mL con adyuvante incompleto de Freud.	Se inyectó 50 µg del péptido y se llevó a 1 mL con adyuvante incompleto de Freud.	Se inyectó 50 µg del péptido y se llevó a 1 mL con adyuvante incompleto de Freud.	2 ^a sangría. Se realizó la búsqueda de anticuerpos por Western blot.	Si el resultado del día 91 era positivo se sangró al conejo por punción cardiaca.

Tabla 2. Esquema de inmunización.

➤ *Colecta de anticuerpos*

Se sangró al conejo a blanco con punción cardiaca. Se colectaron aproximadamente 50 mL de sangre directamente en tubos de centrífuga.

Se dejó formar el coágulo a 4°C. Posteriormente se retira el coágulo con palillos de madera largos y delgados.

A 4°C se realizó lo siguiente:

- Se tomó el sobrenadante y se precipitó con sulfato de amonio al 40%, se midió el volumen de suero y se adicionó la cantidad de sulfato de amonio necesaria (243 g para un litro de suero).
- Se agregó el sulfato de amonio poco a poco, con agitación constante, en cuanto estuvo disuelto el sulfato de amonio se centrifugó a 12,000 x *g* en el rotor JA25-50 durante 10 min a 4°C.
- El botón de anticuerpos se resuspendió en el menor volumen posible de PBS, se prepararon alícuotas de 100 µL y se guardaron a -70°C.

RESULTADOS

I. Caracterización fenotípica de las cepas mutantes

Las cepas mutantes fueron donadas por el Dr. Ulrich Brandt (Medical school Johann Wolfgang Goethe-Universität) y por el Dr. Salvador Uribe Carvajal (Instituto de Fisiología Celular, UNAM).

Las cepas en estudio contienen la interrupción de los genes de *Y. lipolytica* *nuim*, *nukm* y *nubm* genes homólogos a *tyky*, *psst* y *51kDa* de bovino respectivamente, todos estos genes codifican para subunidades localizadas en el brazo soluble del complejo I y son de origen nuclear. Para entender mejor los resultados se utilizará solo la nomenclatura de bovino, por lo tanto las cepas son: Δ PSST, Δ TYKY y Δ 51kDa (Ahlers, et al. 2000; Kerscher, et al. 2002).

La construcción de las cepas mutantes se llevó a cabo por recombinación homóloga siguiendo prácticamente la misma estrategia. El gen *tyky* se eliminó por recombinación homóloga con *LEU2* para lo cual un fragmento de DNA genómico de 2.6kb y que contiene al gen de interés, se trató con enzimas de restricción (*Bam*HI y *Pst*I) para eliminar el marco de lectura abierto (ORF), excepto los primeros nucleótidos (correspondientes a los primeros 20 aminoácidos) y los últimos nucleótidos (correspondientes a los últimos 10 aminoácidos de la proteína). Y en el espacio el gen *LEU2* se insertó en orientación opuesta al ORF, se amplificó el fragmento y se aisló para transformar las células de *Y. lipolytica*. La recombinación homóloga se verificó por Southern blot y PCR (Ahlers, et al. 2000).

La eliminación de *psst* y *51kDa* se realizó por recombinación homóloga con el marcador de *LEU* y *URA* respectivamente. La estrategia fue la misma que en el caso de TYKY (Ahlers, et al. 2000; Kerscher, et al. 2002).

A continuación se muestra la estructura del complejo I de *T. thermophilus*, en ella se indica las subunidades homólogas de *Y. lipolytica* que fueron eliminadas (ver figura 8). Las subunidades que están ausentes en las cepas son: PSST, TYKY y la de 51kDa respectivamente, las cuales se encuentran en color rojo.

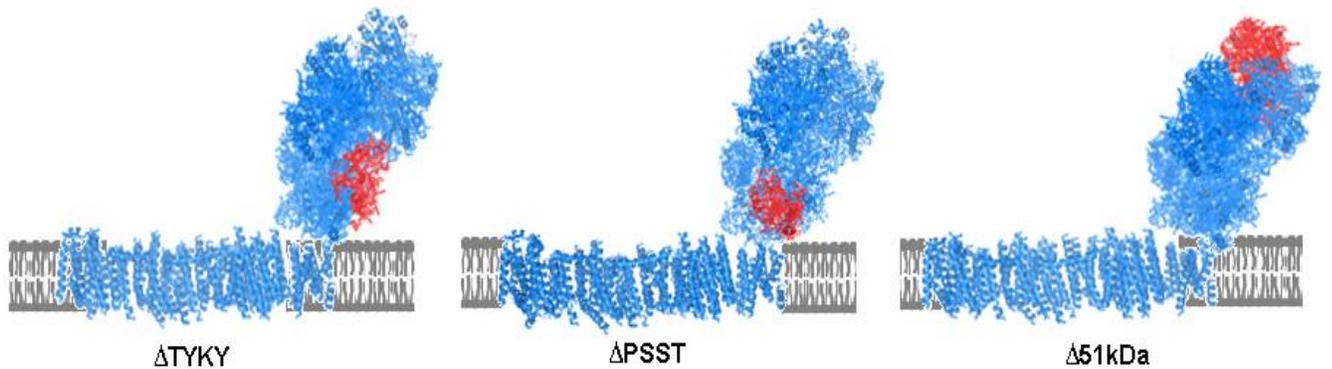


Figura 8. Subunidades ausentes del complejo I. Para visualizar mejor los resultados mostramos los sitios en los que se encuentran las subunidades que fueron eliminadas, tomando como base la estructura del complejo I de *T. thermophilus*. En color rojo se observa la subunidad que fue eliminada.

El redireccionamiento de la deshidrogenasa alterna al lado matricial de la membrana interna de la mitocondria en las cepas mutantes se hizo mediante el empleo de la secuencia de importe mitocondrial de *nuam*, una subunidad del complejo I que también es de origen nuclear (Kerscher, et al. 2001).

Para comenzar con el presente estudio, lo primero que se hizo fue caracterizar el fenotipo de las cepas mutantes, para determinar si la ausencia del complejo I se compensa por la presencia de la NDH2 alterna. Para ello se realizaron curvas de crecimiento, ensayos de crecimiento con dilución seriada en medio sólido YD y se observó al microscopio la morfología celular.

Las curvas de crecimiento se realizaron en medio líquido YD a 30°C. Estas curvas no muestran diferencias en cuanto al tiempo de crecimiento entre la cepa tipo y las cepas mutantes (ver figura 9).

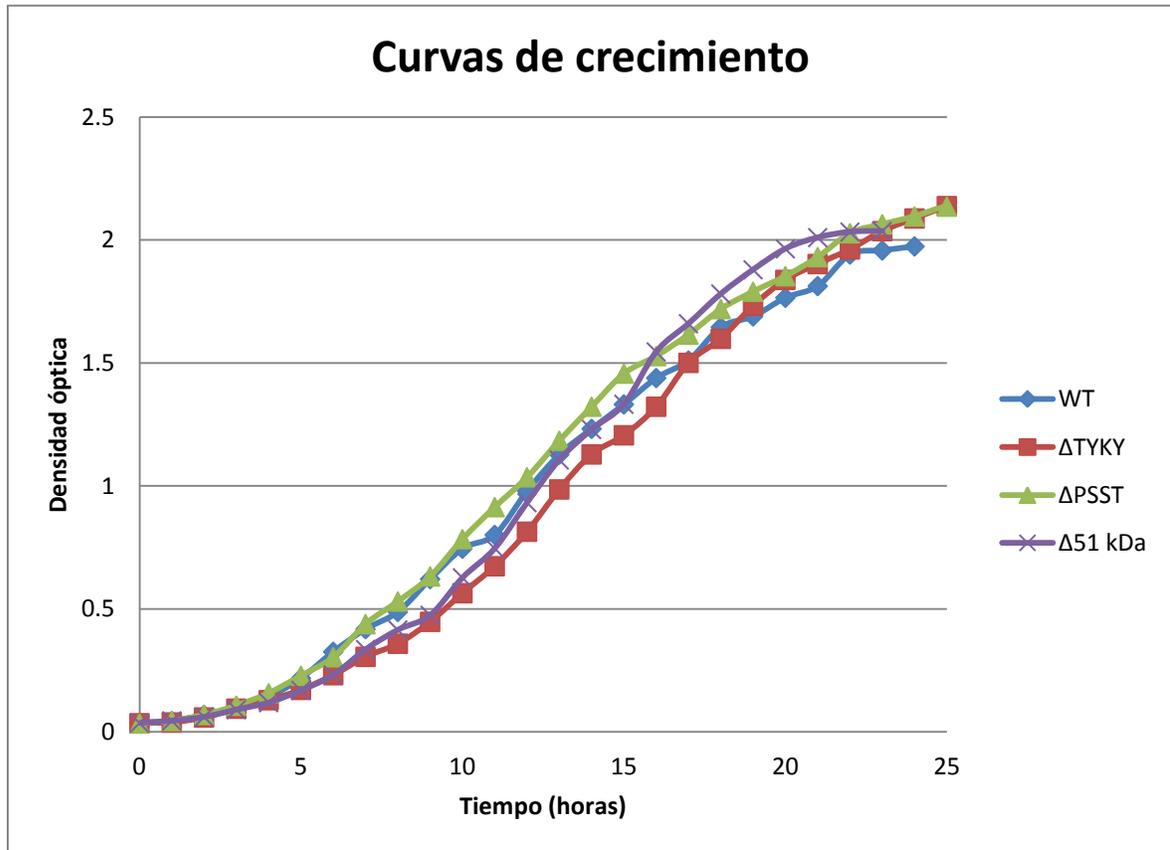


Figura 9. Curvas de crecimiento en medio líquido YD. Densidad óptica a 600_{nm}.

No encontramos diferencias en el tiempo de crecimiento entre las cepas que no ensamblan complejo I con aquella que si lo ensambla, con lo que corroboramos que la NDH2 interna compensa la ausencia del complejo I.

Posteriormente se realizaron ensayos de crecimiento en medio sólido YD en diluciones seriadas de todas las cepas. En los primeros carriles donde hay un mayor número de células podemos observar diferencias en la morfología de la colonia (ver figura 10). Como se puede observar la colonia de la cepa silvestre es más rugosa que las colonias de las cepas mutantes.

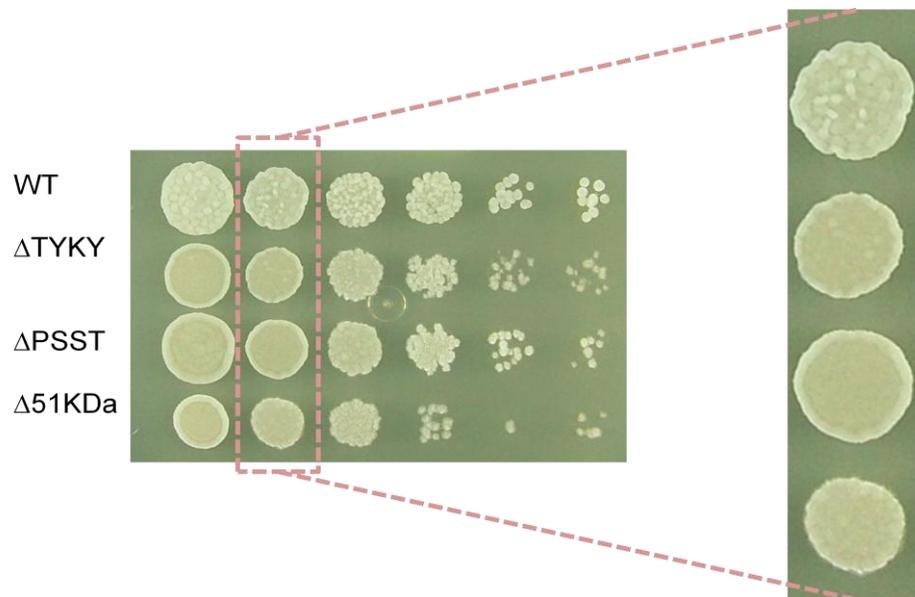


Figura 10. Crecimiento colonial de las cepas de *Y. lipolytica*. Medio sólido YD a 30°C durante 3 días.

Para determinar si el cambio en la colonia es debido a cambios en la forma de las células, se visualizaron al microscopio las diferentes cepas en fase media logarítmica y en fase media estacionaria. Las imágenes obtenidas del microscopio a una amplificación de 40X se observan en la figura 11. Sólo se muestran las imágenes en el inicio de la fase estacionaria ya que no hay diferencia considerable con las imágenes obtenidas en fase media logarítmica.

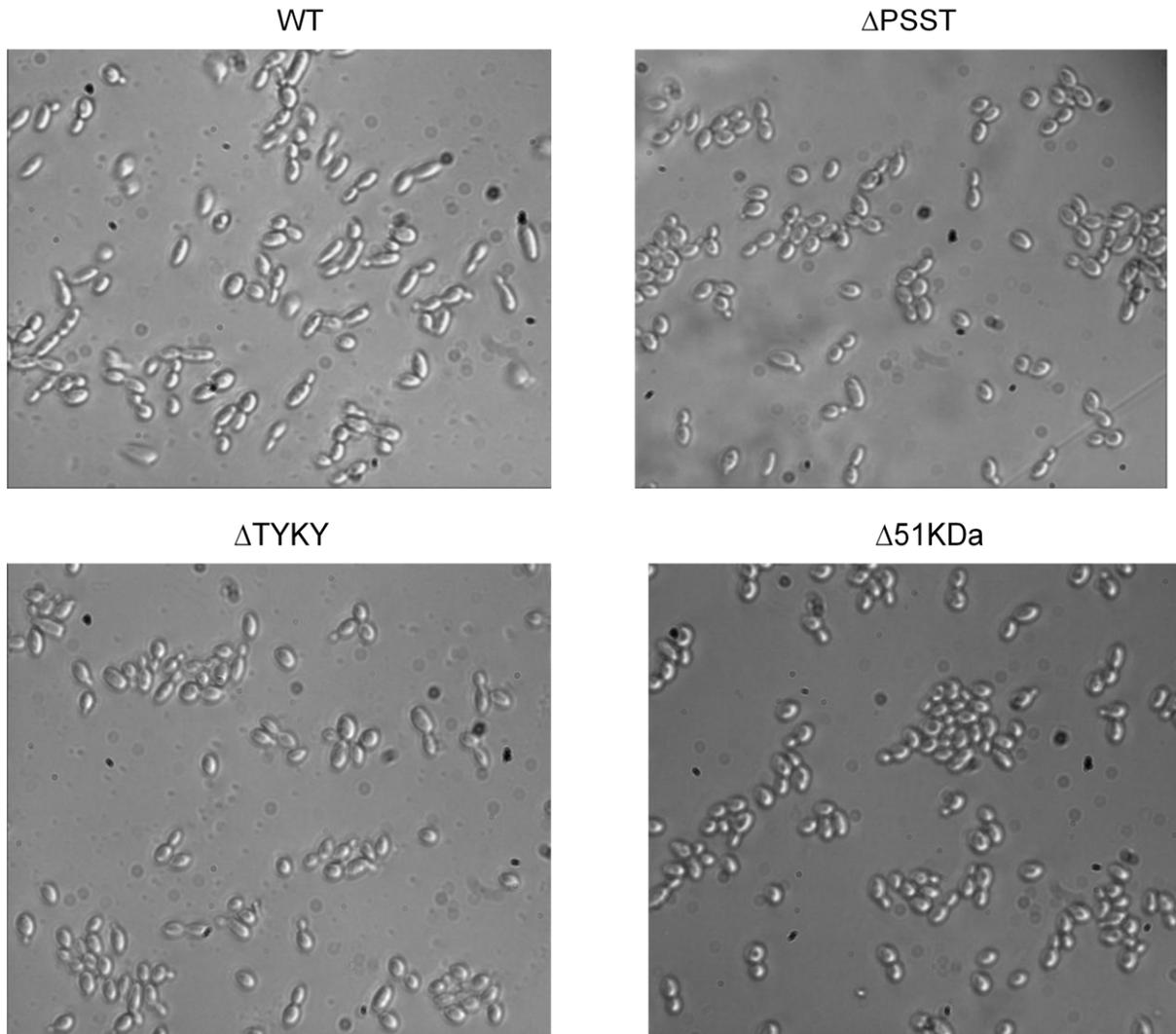


Figura 11. Morfología celular de las cepas de *Y. lipolytica*. Células crecidas en medio YD líquido a 30°C, vistas al microscopio (Nikon labophot microscopes) con un aumento de 40X en el inicio de la fase estacionaria. Las colonias se tomaron de medio líquido YD.

También observamos las células que crecieron en medio sólido (figura 12), sin encontrar diferencia en cuanto a la formación de hifas.

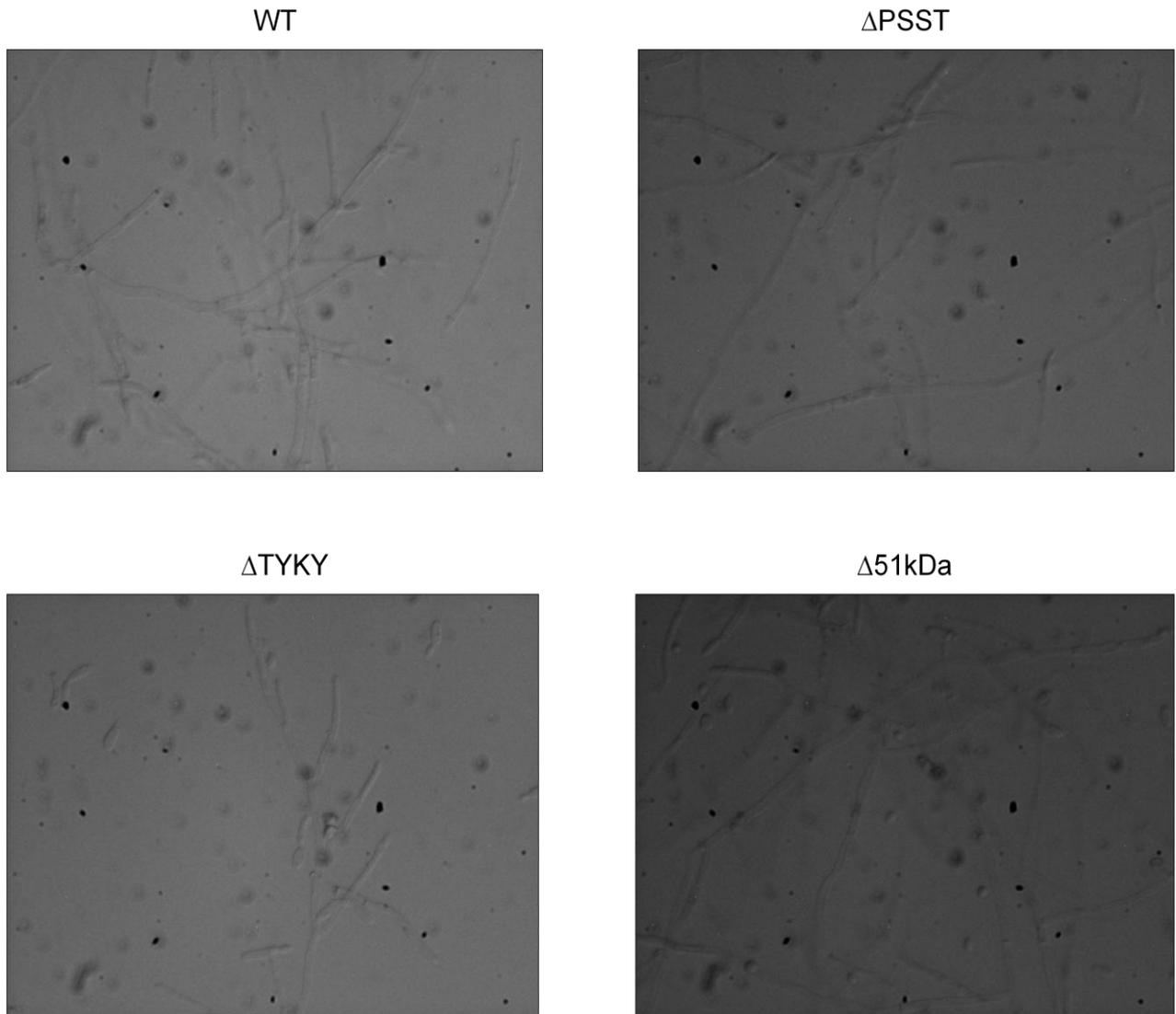


Figura 12. Morfología celular de las cepas de *Y. lipolytica*. Células crecidas en medio YD sólido a 30°C, a las 48hrs, vistas al microscopio (Nikon labophot microscopes) a un aumento de 40X.

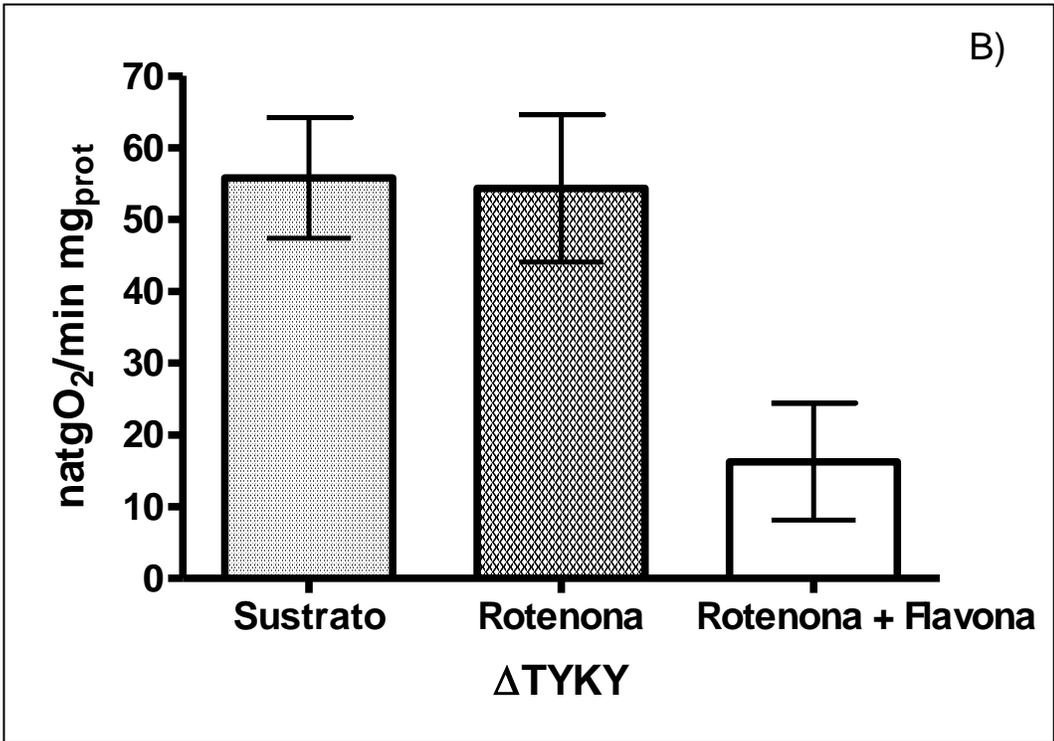
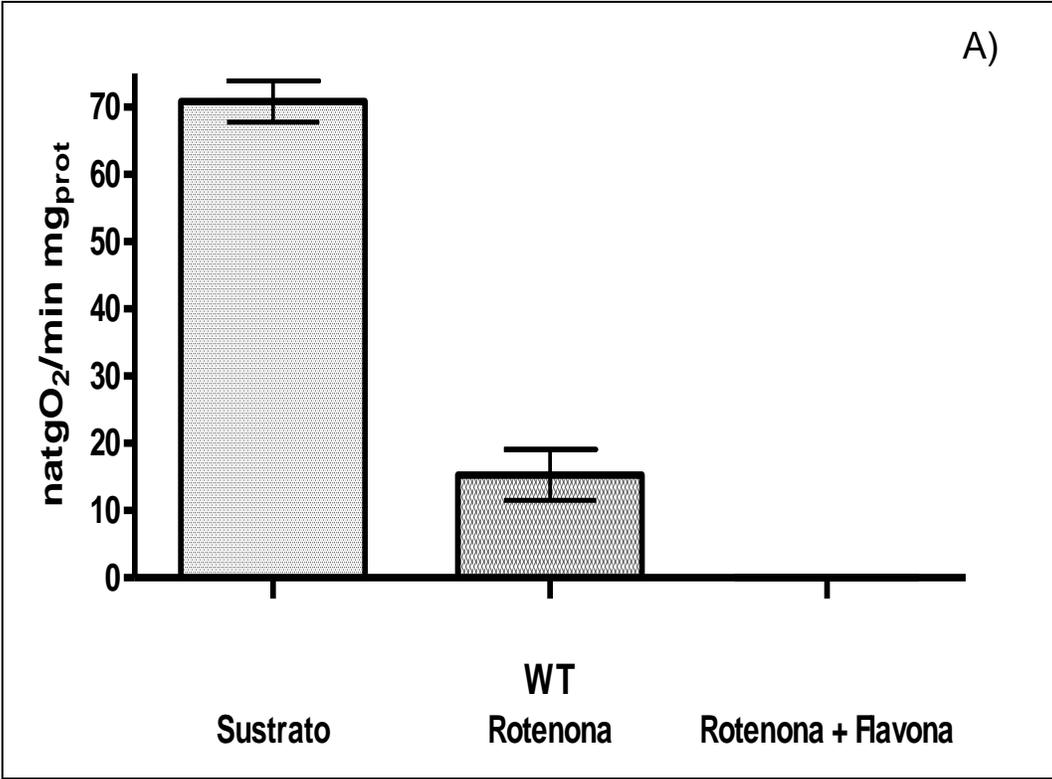
Con la evidencia obtenida podemos decir que no existen diferencias morfológicas notorias en las células pero que el crecimiento poblacional (arquitectura de la colonia), es diferente entre las cepas que no ensamblan complejo I con aquella que sí lo ensambla.

II. Las cepas mutantes presentan sensibilidad a flavona y no a rotenona

Una vez que hemos determinado que la ausencia de complejo I no afecta la viabilidad de las células el siguiente paso es estudiar si las cepas respiran y si las mutantes son sensibles a rotenona, inhibidor del complejo I. Para ello se purificaron mitocondrias de cada una de las cepas. Las células utilizadas para el aislamiento se cosechan en fase media logarítmica, las mitocondrias se aislaron por el método mecánico descrito en la sección de métodos y se cuantificaron con el método de Lowry modificado.

La respiración se midió con base en la cantidad de oxígeno consumido por miligramo de proteína por minuto. El consumo de oxígeno se midió en una celda de 1 ml, en presencia de medio respiratorio. En la figura 13A, 13B, 13C y 13D que se muestra a continuación; la primer barra corresponde al consumo de oxígeno en presencia de sustrato respiratorio, la segunda barra es el consumo de oxígeno en presencia de un inhibidor del complejo I (15 μ M de rotenona) y la tercer barra muestra el consumo de oxígeno en presencia de un inhibidor de la NDH2 (200 μ M de flavona).

La adición de los inhibidores fue secuencial y en la misma celda, es decir, se adicionó primero el sustrato, después la rotenona y finalmente la flavona. Cada una de las barras muestra el promedio de 3 lecturas y las líneas negras indican la desviación estándar.



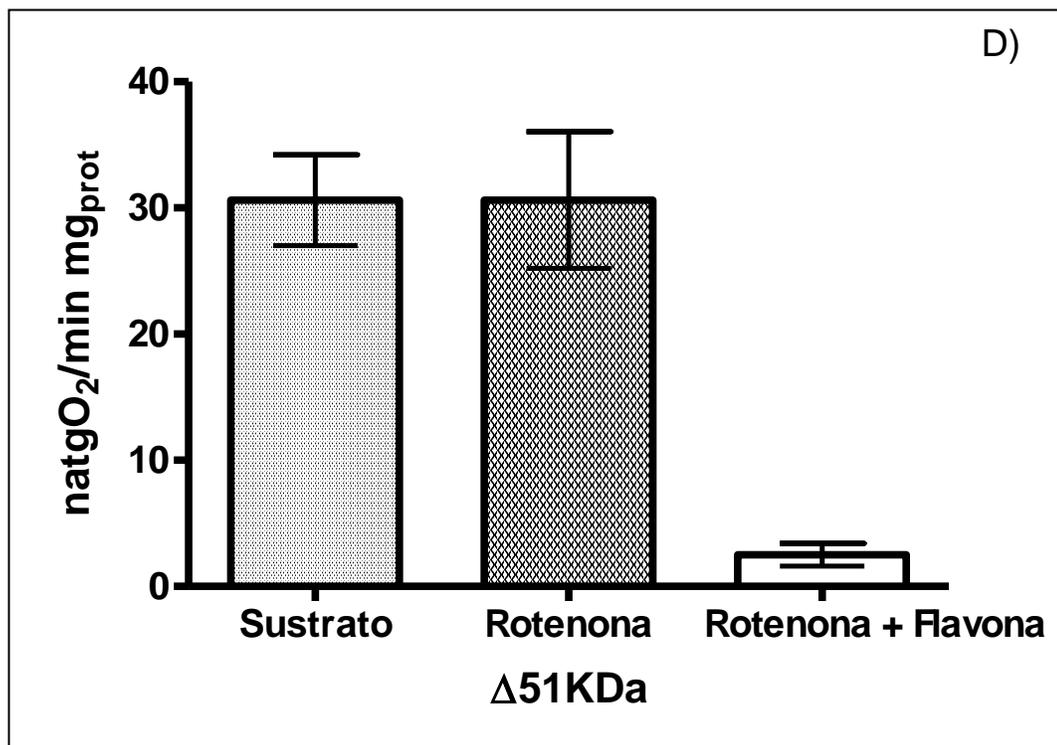
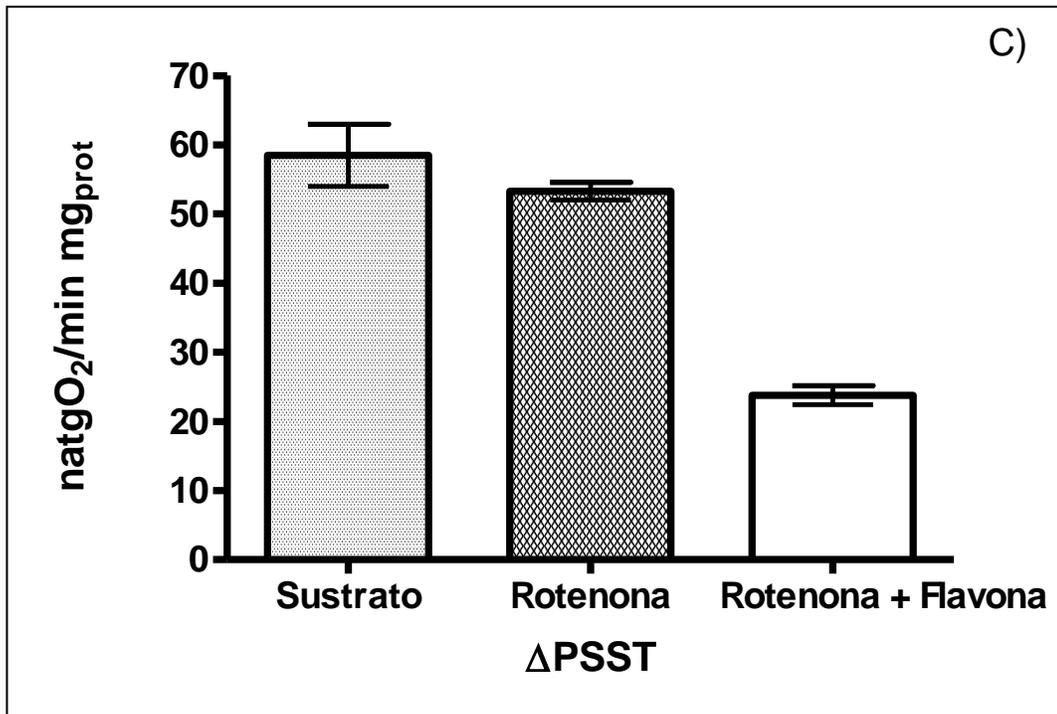


Figura 13. Medición del consumo de oxígeno. A) Cepa silvestre; B) Cepa Δ TYKY; C) Cepa Δ PSST; y D) Cepa Δ 51KDa. Para medir el consumo de oxígeno se utilizó como sustrato 10 mM de

piruvato, malato y citrato, 20 mM de KCl, 1 mM de $MgCl_2$ y 15 μM de rotenona y 200 μM de flavona.

En la cepa silvestre el consumo de oxígeno en presencia de rotenona disminuye en más de un 50% y al adicionar flavona (inhibidor de las deshidrogenasas alternas) se inhibe por completo la respiración (figura 13A).

Las mitocondrias de $\Delta TYKY$ y $\Delta PPST$ (figura 13B y 13C) respiran casi a los niveles de la cepa silvestre, al adicionar rotenona no se ve afectada su respiración significativamente y en presencia de flavona la respiración se inhibe en más de un 50%.

En la cepa $\Delta 51kDa$ la rotenona no inhibe la respiración mientras que la flavona la inhibe casi por completo. Los trazos se repitieron en tres ocasiones y el comportamiento fue similar. También es importante mencionar que la cepa $\Delta 51kDa$ en todos los ensayos mostró un menor consumo de oxígeno (ver figura 13D). También probamos adicionar el doble de la concentración de flavona en los ensayos pero veíamos solo un artefacto porque parecía aumentar la concentración de oxígeno.

Con lo anterior podemos decir que las cepas que no contienen complejo I son sensibles a flavona pero no a rotenona, lo que indica que su respiración no depende de la presencia de complejo I.

III. Los niveles de los transcritos de las subunidades mitocondriales no se ven afectados en ausencia del complejo I.

La siguiente pregunta por resolver es si en ausencia de un complejo I completamente ensamblado se modifican los niveles de RNA mensajero de las subunidades mitocondriales de complejo I. Para ello se aisló el RNA total de cada una de las cepas y a través de ensayos tipo Northern blot se obtuvieron los niveles de RNA mensajero.

Las sondas de prueba para cada una de las subunidades mitocondriales del complejo I se clonaron en el plásmido pGEM y se transformaron en *E. coli*. Una

vez transformadas las bacterias se aisló el plásmido y se mandó a secuenciar el inserto. La secuencia de las sondas de DNA de ND1, ND2, ND3, ND4 y ND4L son 100% idénticas comparadas con las secuencias depositadas en la base de datos.

A partir de la sonda clonada se realizó el PCR radioactivo de cada una de las sondas y con ello se obtuvo la sonda de prueba marcada con [α -P³²]-dATP. Todas las membranas se hibridaron con un fragmento del 16S rRNA, el cual forma parte de la subunidad pequeña del ribosoma mitocondrial, empleado como control de carga.

Las imágenes que a continuación se muestran (figuras 14-18), presentan la membrana teñida con azul de metileno o el gel de RNA teñido con bromuro de etidio (para ubicar el tamaño de los transcritos tomando como referencia el 26S rRNA y 18S rRNA), la membrana con cada una de las señales de los transcritos y un esquema del tamaño de los transcritos que esperamos.

Dado que no se ha reportado el tamaño de los mensajeros de las subunidades mitocondriales del complejo I de *Y. lipolytica*, hemos estimado el tamaño de los transcritos considerando para ello las regiones no codificantes entre los genes.

El primer transcrito que analizamos es el de ND1. En la figura 14 se observan dos bandas, una debajo del 26S rRNA y la otra por debajo de 18S rRNA, por lo se piensa que una de las bandas corresponde a un transcrito maduro y el de mayor tamaño a un transcrito que aún no ha sido procesado y contiene todavía un intrón. El ensayo se hizo por duplicado pero en ninguno de los casos se observa diferencia en los niveles del mensajero de ND1. Se compararon los niveles del transcrito entre las cepas mutantes Δ PSST, Δ TYKY y Δ 51kDa y la cepa silvestre y no se pudo encontrar una diferencia significativa entre los niveles de mRNA de ND1.

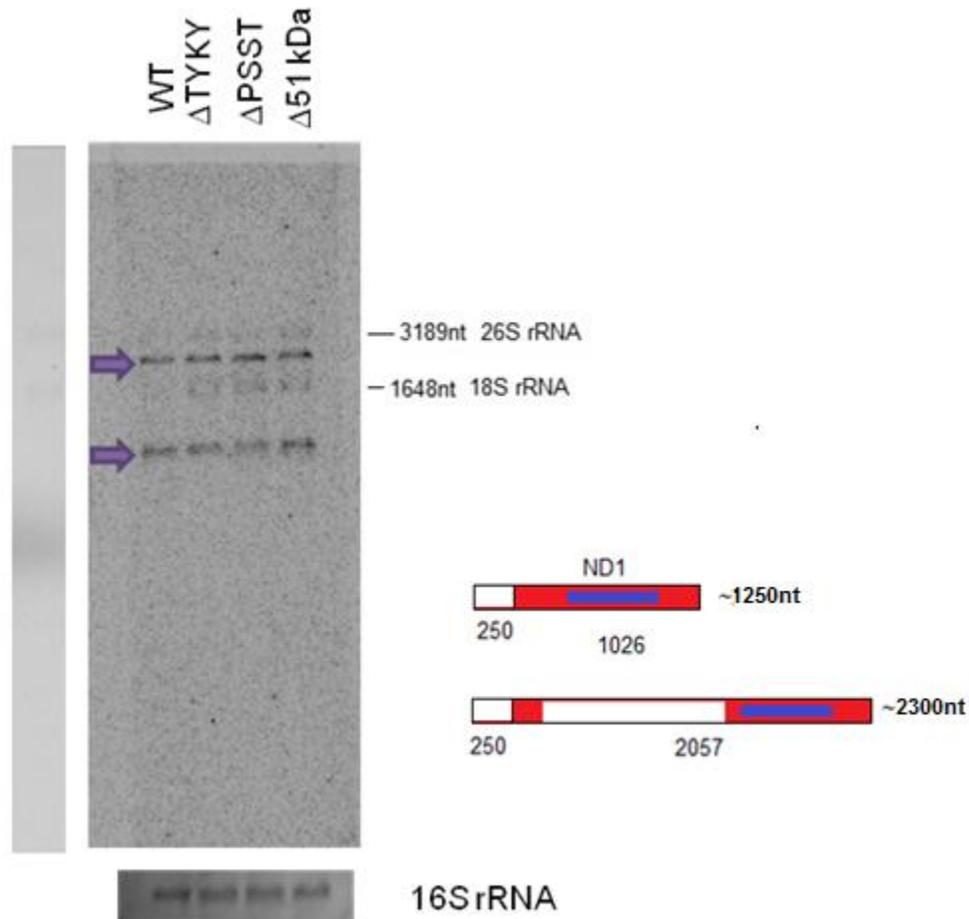


Figura 14. Northern Blot de la subunidad ND1. Se cargaron en el gel 10 μ g de RNA total. En color blanco esta la región no codificante, en color rojo la región codificante y en color azul es el sitio donde hibrida la sonda de prueba.

El siguiente transcrito analizado fue ND2. Al hibridar la sonda de ND2 obtenemos una banda con migración similar al 26S rRNA, la cual corresponde a un tamaño aproximado de 3100 bases (ver figura 15). Ya que dicha banda es muy intensa, creemos que podría ser un policistrón, ya que ND3 y COB están cerca de ND2 y las regiones intergénicas son muy pequeñas, y juntos nos darían un tamaño aproximado de 3100 bases.

Se comparó el nivel de dicho policistrón entre las cepas mutantes y la silvestre y no se encontraron diferencias. Aunque en la mutante Δ PSST se observa una

menor señal del transcrito también es menor la señal del 16S rRNA, indicando que se cargó menos RNA total.

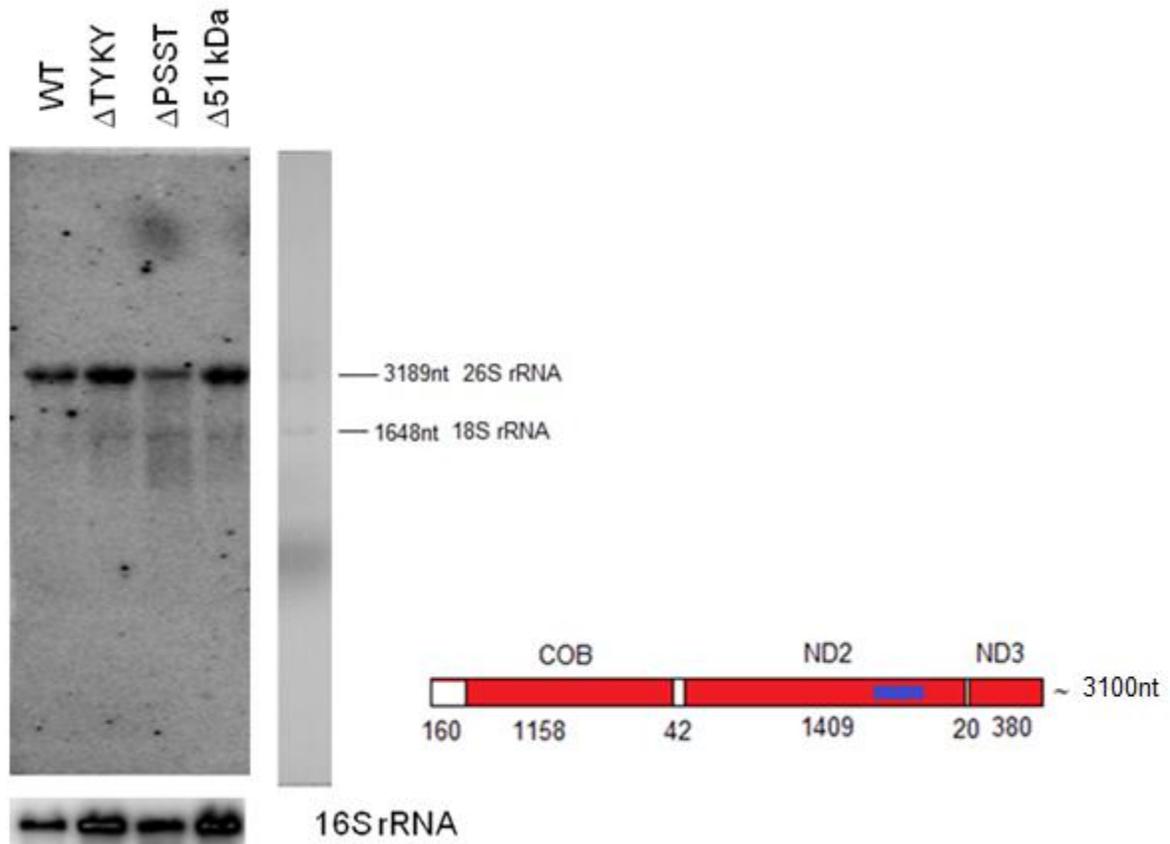


Figura 15. Northern Blot de la subunidad ND2. Se cargaron en el gel 10 μ g de RNA total. En color blanco esta la región no codificante, en color rojo la región codificante y en color azul es el sitio donde hibrida la sonda de prueba.

En el caso del RNA mensajero de ND4 encontramos que la sonda hibrida en 2 sitios, una banda de mayor tamaño que el 26S rRNA y otra banda cercana al 18S rRNA. En la literatura se ha reportado que ATP8, ATP6, COX3 y ND4 se transcriben en un policistrón (Matsuoka, Matsubara et al. 1994). El tamaño de este policistrón es de 3.8 kb, el cual corresponde a la banda que esta por arriba del 26S rRNA, pero la banda de aproximadamente 1.6 kb también es muy clara (ver figura 16) por lo que pensamos que esta puede corresponder únicamente al RNA

mensajero de ND2 ya que el gen es de casi 1.4 kb (sin considerar las regiones no traducidas).

Hasta el momento podemos decir que los niveles de los RNA's mensajeros de ND4 de las cepas mutantes no muestran cambios en su expresión en comparación con la cepa silvestre.

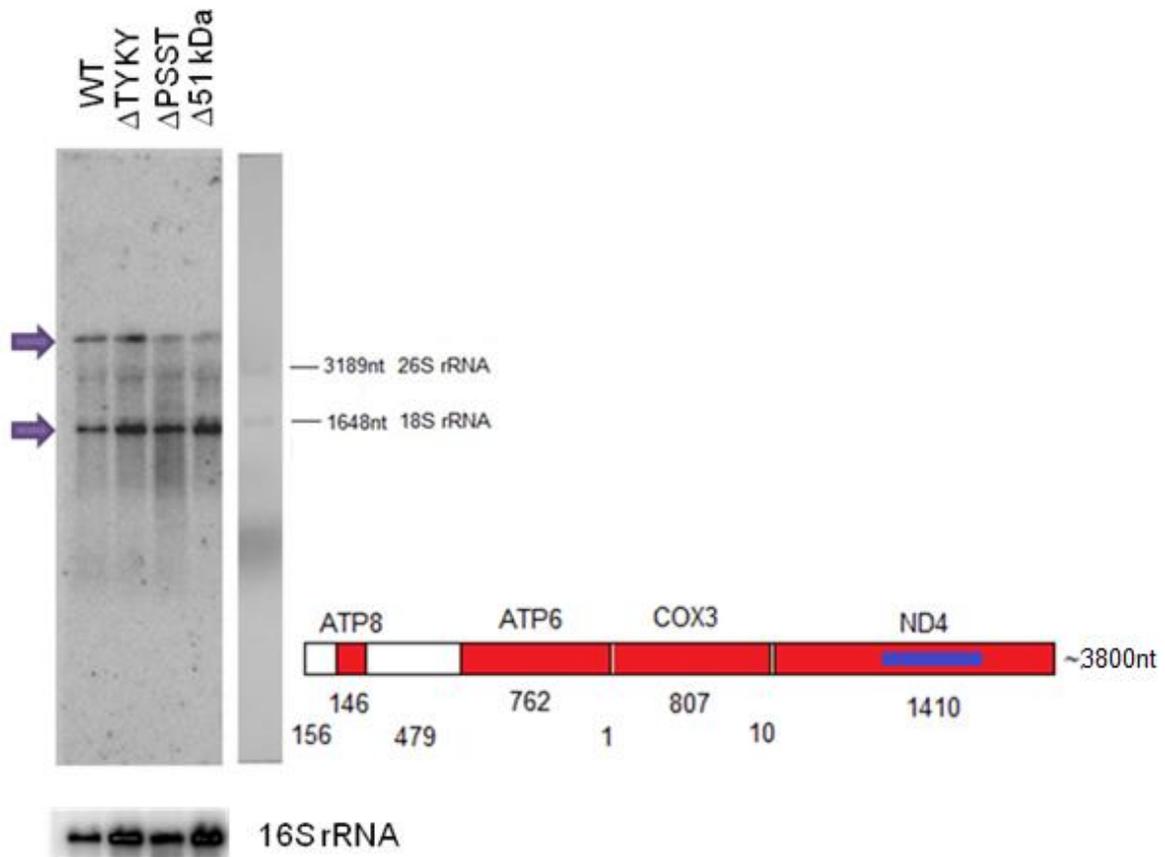


Figura 16. Northern Blot de la subunidad ND4. Se cargaron en el gel 10 μ g de RNA total. En color blanco esta la región no codificante, en color rojo la región codificante y en color azul es el sitio donde hibrida la sonda de prueba.

El RNA mensajero de ND4L se observa de mayor tamaño que el 26S rRNA (ver figura 17), mas de 3.1kb. Este ensayo se obtuvo por triplicado y se cuantificó densitométricamente la intensidad de la señal.

Creemos que ND4L puede estar transcribiéndose junto con ND5 y COX2, el tamaño de ese policistrón es de aproximadamente 3.6 kb.

Para llevar a cabo la cuantificación de la señal de las bandas se tomó como referencia la banda del 16S rRNA. El gráfico muestra el promedio del cociente ND4L/16S rRNA, así como la desviación estándar. Se analizó el resultado con una prueba de ANOVA al 95% y la prueba indicó que no hay diferencias estadísticamente significativas entre la señal de las cepas mutantes con respecto a la cepa silvestre.

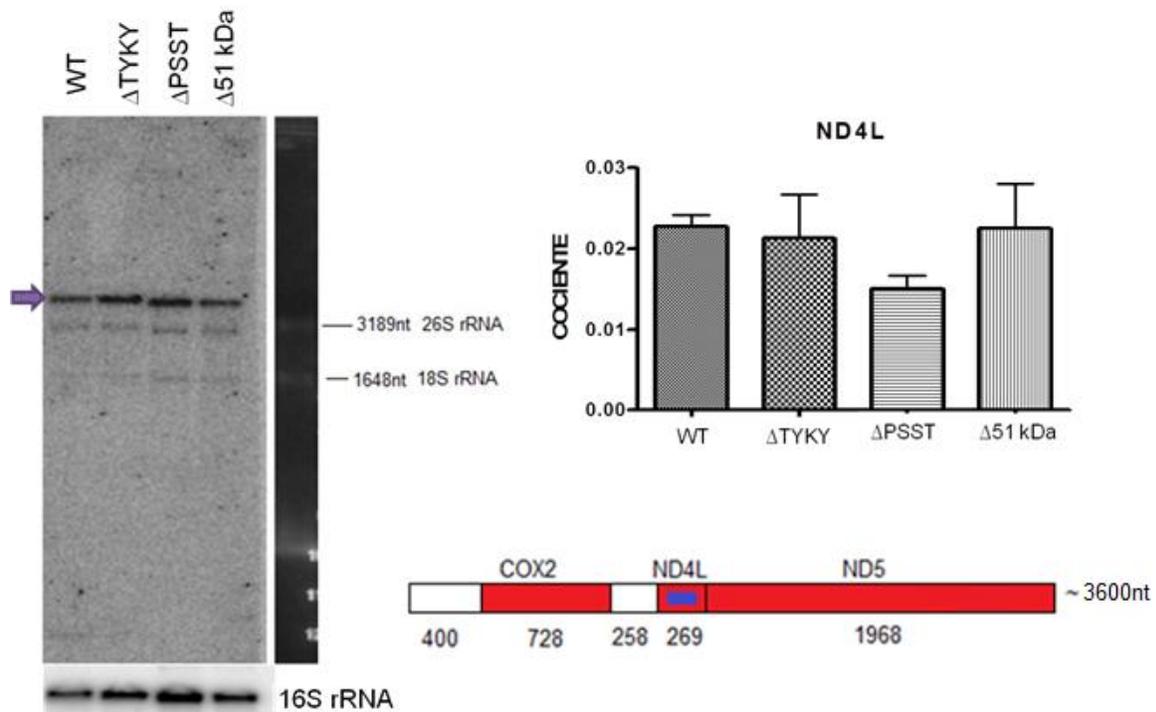


Figura 17. Northern Blot de la subunidad ND4L. Se cargaron en el gel 10 μ g de RNA total. En color blanco esta la región no codificante, en color rojo la región codificante y en color azul es el sitio donde hibrida la sonda de prueba.

Por último hibridamos la sonda de ND3. La membrana de ND4L es la misma que se empleó para hibridar ND3 de ahí que no consideramos la banda de mayor tamaño (~3600 nt), ya que corresponde a la señal de ND4L. Como lo habíamos indicado para el caso de ND2 pensamos que es un policistrón que lleva a COB,

ND2 y ND3, este policistrón estaría a la altura aproximada de 26S rRNA (3100 nt). En la figura 18 tampoco encontramos diferencias en el nivel de RNA mensajero de ND3 entre las cepas mutantes y la cepa silvestre.

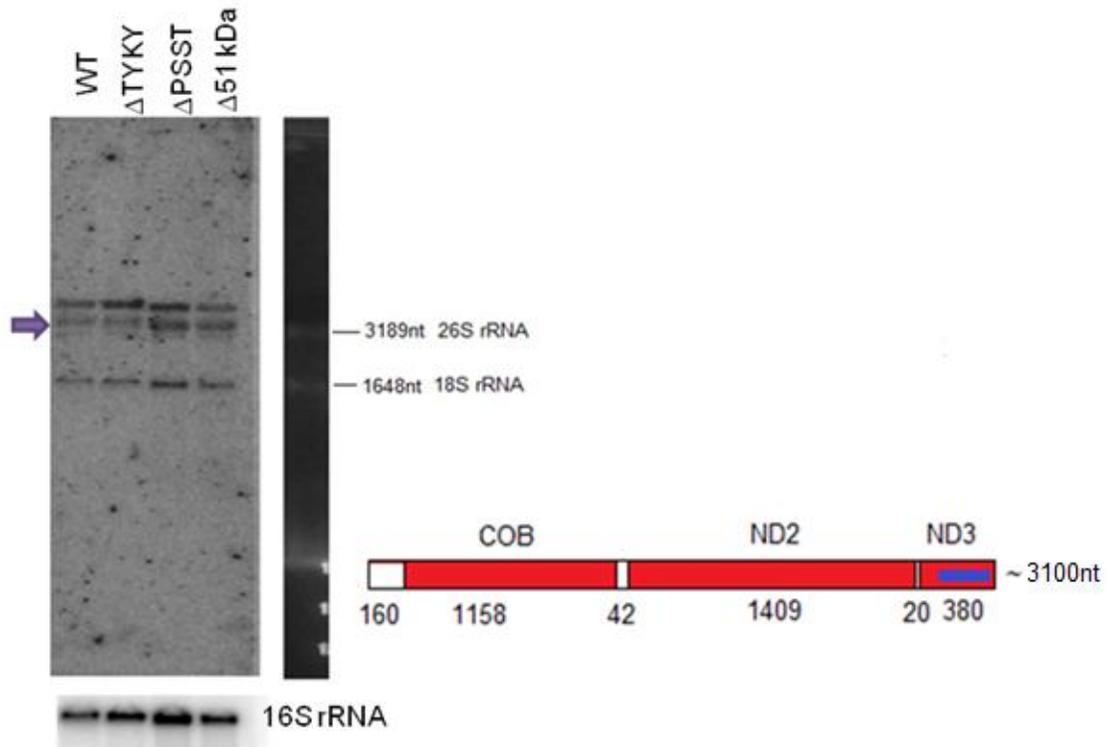


Figura 18. Northern Blot de la subunidad ND3. Se cargó en el gel 10 μ g de RNA total. En color blanco esta la región no codificante, en color rojo la región codificante y en color azul es el sitio donde hibrida la sonda de prueba.

De los experimentos anteriores podemos concluir que la eliminación de las subunidades PSST, TYKY y 51kDa de origen nuclear del complejo I no afecta la transcripción de las subunidades de origen mitocondrial del mismo complejo.

IV. Ensayos para determinar la expresión de subunidades mitocondriales de complejo I a nivel de proteína.

➤ *Ensayos de síntesis de proteínas en la mitocondria*

La siguiente pregunta que intentamos resolver es si la expresión de las subunidades mitocondriales a nivel de síntesis de proteínas se ve afectada por la ausencia de complejo I.

Para ello lo primero que hicimos fue intentar establecer el método para estudiar la traducción *in vivo* de los mRNAs codificados en el genoma mitocondrial de *Y. lipolytica*, ya que esta técnica nunca se ha implementado para este organismo.

En *S. cerevisiae* un método empleado que ayuda a estudiar la síntesis de proteínas codificadas en el genoma mitocondrial, es marcar *in vivo* las proteínas que se van sintetizando, empleando para ello metionina marcada con S³⁵ en presencia de cicloheximida (Bonney, et al. 2001). La cicloheximida es un inhibidor de la síntesis de proteínas citoplásmicas. Las proteínas sintetizadas en la mitocondria se separan en gel desnaturalizante de acrilamida y por autorradiografía se observan las bandas de las proteínas que fueron sintetizadas.

Basados en el protocolo de *S. cerevisiae*, realizamos un primer ensayo empleando cicloheximida. Para realizar este experimento se incubaron las células en medio sin metionina por 10 minutos, después se adicionó cicloheximida para inhibir a los ribosomas citoplásmicos. Posteriormente se adicionó la metionina radioactiva y se incubó, la síntesis con la marca radioactiva se detiene con frío.

Como control utilizamos a *S. cerevisiae* ya que esta técnica ha sido ampliamente utilizada en este organismo, en donde se obtienen 8 bandas, las cuales ya han sido identificadas (figura 19, segundo carril panel A).

El ensayo se hace en presencia y ausencia de antibiótico. En el caso de *S. cerevisiae* en presencia de cicloheximida se observan 8 bandas (figura 19, panel A, carril 2) que corresponden a las proteínas mitocondriales y cuando no hay antibiótico se observan muchas bandas en donde se observan las proteínas

citoplásmicas (figura 19, panel A, carril 1). En *Y. lipolytica* se sintetizan 13 proteínas en la mitocondria pero en el ensayo se observan más de 13 bandas y se presenta el mismo número de bandas en presencia y ausencia de cicloheximida, lo cual indica (figura 18, panel B, carriles 4 y 5) que la cicloheximida no inhibe a los ribosomas citoplásmicos siendo *Y. lipolytica* resistente a este antibiótico.

Emetina es también un antibiótico empleado para inhibir la síntesis de proteínas del citoplasma en células de animales, pero igual que la cicloheximida no mostró tener actividad ni en *S. cerevisiae* ni en *Y. lipolytica* (figura 19, panel A y B, carril 3 y 6).

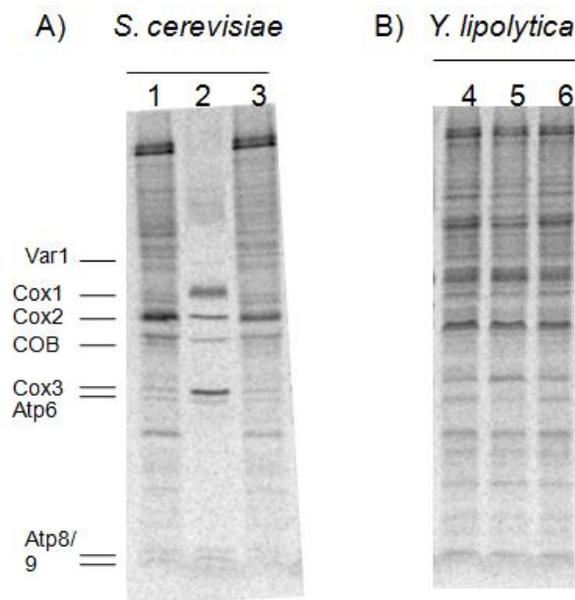


Figura 19. Traducción *in vivo* con células completas. Carril: 1) Sin antibiótico, 2) Con cicloheximida (50 µg/mL), 3) Con emetina (100 µg/mL).

Pensando en que quizá la falta de actividad de los antibióticos en *Y. lipolytica* se deba a la composición de su pared celular, decidimos hacer el ensayo con esferoplastos (células sin pared celular). El ensayo con esferoplastos es similar al de células completas (ver sección de métodos). Al igual que en la figura anterior, no hay inhibición de la síntesis de proteínas en el citosol de *Y. lipolytica* (Figura 20, panel B carriles 5 y 6).

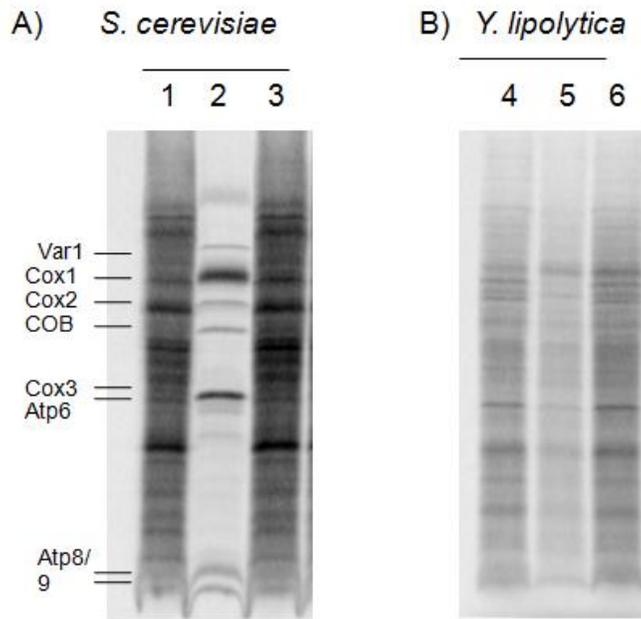


Figura 20. Traducción *in vivo* con esferoplastos. Carril: 1) Sin antibiótico, 2) Con cicloheximida (50 µg/mL), 3) Con emetina (100 µg/mL).

Se probaron diferentes condiciones para el experimento, como diferentes tiempos de incubación con el antibiótico, el doble de la cantidad de antibióticos pero en ningún caso se logró observar sólo la síntesis de proteínas mitocondriales (resultados no mostrados).

También probamos crecer las células en presencia de cicloheximida y emetina pero en cicloheximida no se inhibió el crecimiento a diferentes concentraciones y en emetina se inhibió un poco a 400 µg/mL pero aún a esta concentración tampoco se logró obtener la inhibición de los ribosomas del citoplasma (datos no mostrados).

Estos resultados sugieren que *Y. lipolytica* es resistente a los antibióticos probados, por lo que a la fecha esto impide el análisis de la síntesis de proteínas mitocondriales en este organismo.

Se ha reportado que la presencia de transportadores tipo ABC confieren a algunos microorganismos resistencia a antibióticos y en *Y. lipolytica* se han descrito genes que pueden ser análogos a estos transportadores, por ello

pensamos que tal vez en *Y. lipolytica* estén presentes estos transportadores. Por tal razón utilizamos un antibiótico que inhibe a dichos transportadores, la ciclosporina A (Tanabe, et al. 2007). En la figura 21 vemos el resultado de la traducción *in vivo* en presencia de ciclosporina A, la concentración utilizada fue el doble de la que se utiliza en *C. albicans* (0.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$), en ningún caso observamos algún efecto de la ciclosporina A.

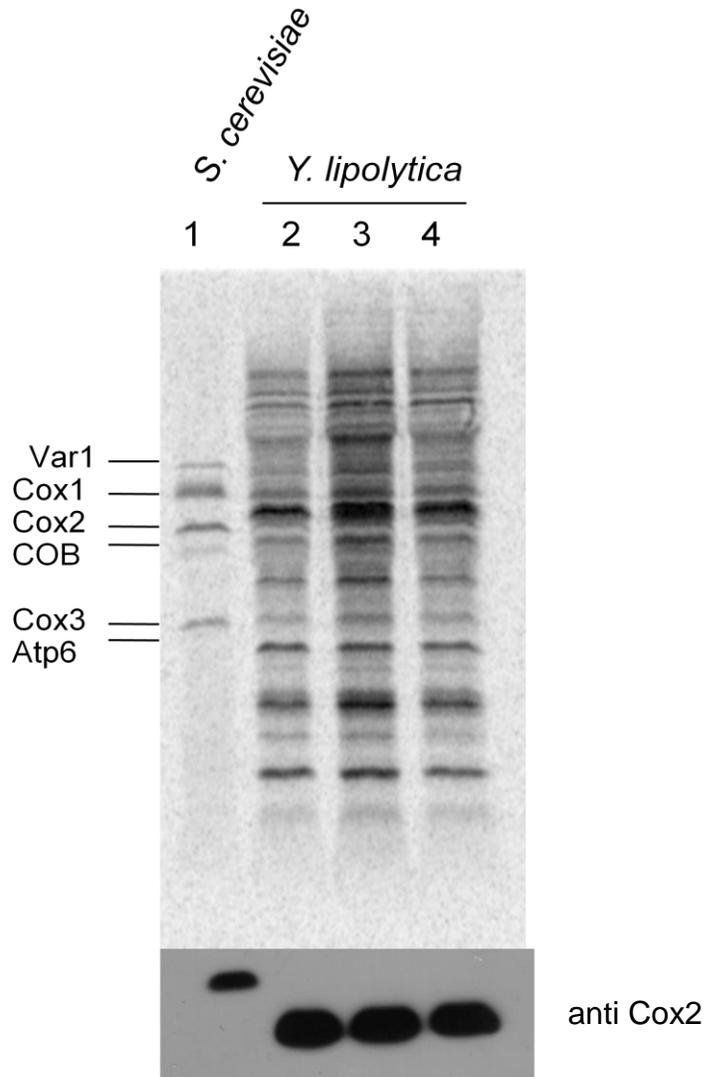


Figura 21. Traducción *in vivo* con células completas. Carril: 1) *S. cerevisiae* con cicloheximida; 2) *Y. lipolytica* sin antibiótico; 3) *Y. lipolytica* con cicloheximida (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)+ciclosporina A (1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$); 4) *Y. lipolytica* con emetina (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + Ciclosporina A (1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Western blot anti-Cox2.

Como control de carga (ver figura 21) realizamos el Western blot contra la subunidad Cox2. En el caso de *Y. lipolytica* observamos que no hay diferencia significativa entre los carriles que se trataron con antibiótico y el que no contiene ningún antibiótico.

Hasta el momento no hemos encontrado las condiciones para llevar a cabo el ensayo de síntesis de proteínas mitocondriales en *Y. lipolytica*. Lo único que podemos decir es que *Y. lipolytica* es un organismo multirresistente a inhibidores de la traducción.

➤ *Generación de anticuerpos contra la subunidad ND1 y ND2.*

A continuación nos interesó obtener anticuerpos contra dos proteínas mitocondriales de complejo I: ND1 y ND2, con la idea de poder monitorear cómo varían sus niveles en ausencia de ensamblaje del complejo I.

En principio se diseñaron 2 péptidos, uno para ND1 y otro para ND2. En ambos casos se buscó que la secuencia del péptido no formara parte de un cruce transmembranal; aún no se encuentran en la base de datos las estructuras tridimensionales de ND1 y ND2 pero analizando las secuencias con diferentes servidores en línea (TMpred <http://www.ch.embnet.org>, SOSUI) se obtuvieron 8 posibles cruces transmembranales para ND1 y 12 para ND2. Se buscaron regiones antigénicas en los dominios que se predicen son solubles, usando el servidor en línea “antigenic” (Antigenic <http://emboss.bioinformatics.nl>). De las regiones antigénicas predichas se buscó que no estuvieran presentes en la secuencia de ND1 y ND2 de conejo. En la figura 22A y 22B se muestran en color naranja el sitio donde se encuentra el péptido diseñado.

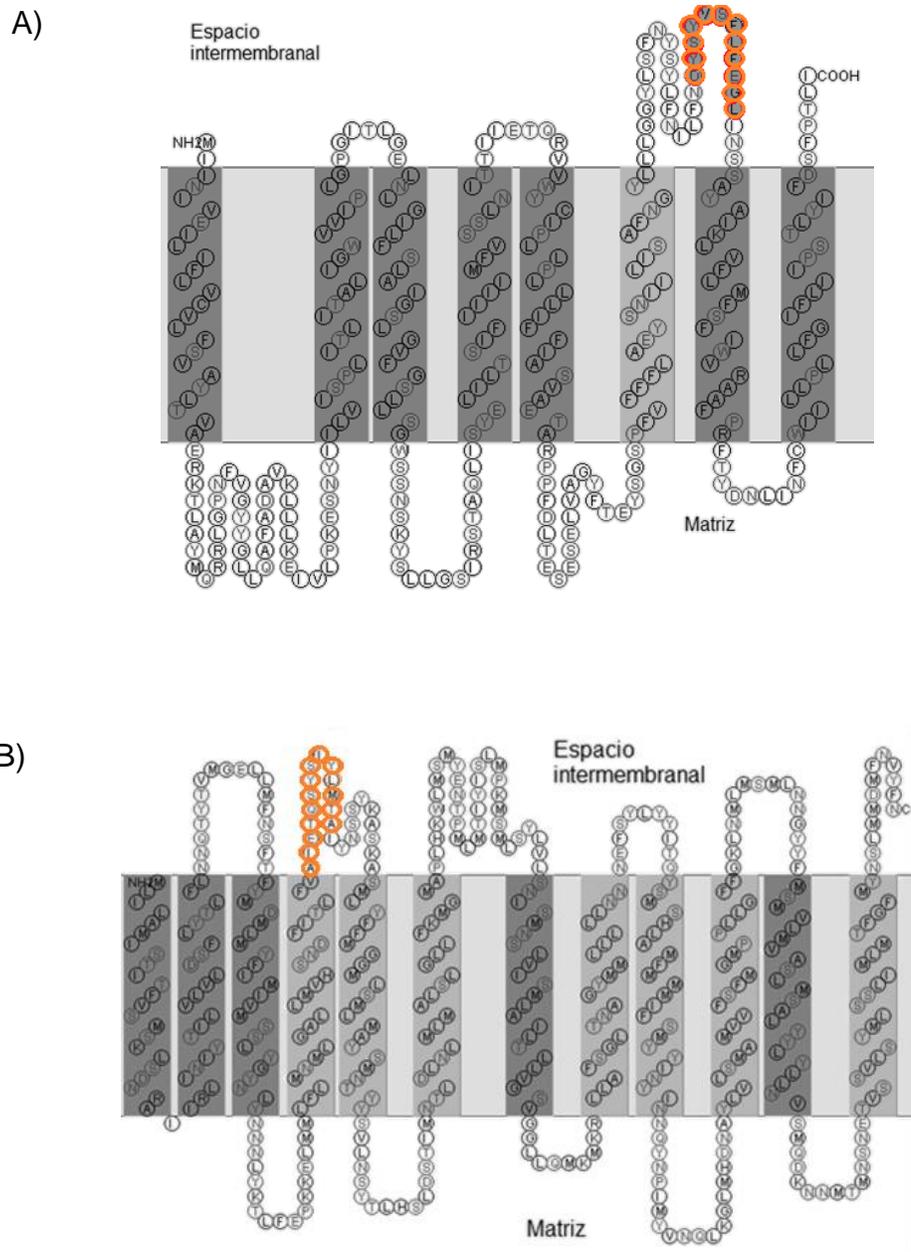


Figura 22. Predicción de cruces transmembranales. A) subunidad ND1 y B) ND2 de *Y. lipolytica*. Mapa topológico obtenido con el servidor SOSUI. En círculos de color naranja se encuentran los aminoácidos de cada péptido antigénico.

La secuencia del péptido de ND1 es: DYSYVSFLFEG L y la de ND2 es AIETQSYSIYLM TA.

Los péptidos se sintetizaron comercialmente (Genscript) y se acoplaron covalentemente a una molécula de KLH.

Se inmunizaron dos conejos de forma independiente con cada uno de los péptidos antigénicos ND1 o ND2. Al día siguiente del tercer refuerzo se tomó una muestra de sangre de la oreja de los conejos y se hizo un ensayo de Western blot con proteínas de *Y. lipolytica*. Para el caso de ND1 se obtuvo una banda por debajo de los 50KDa, indicativa de la presencia de anticuerpo contra dicha subunidad, por lo que se procedió a sangrar el conejo a blanco.

En el caso de ND2 no se obtuvo una señal que nos pudiera indicar la presencia de anticuerpos anti-ND2, por lo que se realizó una cuarta inmunización con el antígeno de ND2, al día siguiente del cuarto refuerzo tomamos una muestra de sangre de la oreja y realizamos nuevamente un Western blot pero tampoco observamos una banda por lo que decidimos sacrificar al conejo.

El suero del conejo inmunizado contra ND1 obtenido de oreja se guardó a -70°C y el suero del sangrado a blanco se trató con sulfato de amonio al 40 % para precipitar las inmunoglobulinas.

Se probaron diferentes diluciones de suero sin tratar y tratado con sulfato de amonio y así se determinó el título de anticuerpo, 1:500 para el suero de la oreja y 1:5,000 para el anticuerpo precipitado con sulfato de amonio. ND1 es una proteína cuya masa molecular es de 38.7 kDa, la cual creemos corresponde a la banda que está por debajo de los 50KDa (ver figura 23).

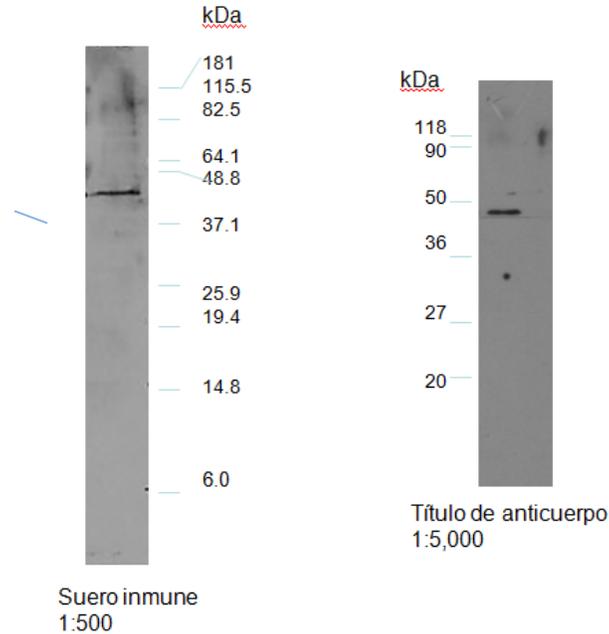


Figura 23. Título del anticuerpo. Se cargaron en el gel 50 μ g de proteínas mitocondriales. Se realizó el título de anticuerpos tanto del suero inmunizado como de los anticuerpos precipitados con sulfato de amonio al 40%.

Para ver si el anticuerpo reconoce una proteína del complejo I se purificaron mitocondrias de la cepa silvestre de *Y. lipolytica*, se solubilizaron con n-dodecil maltósido y el extracto se separó en un gel nativo para posteriormente realizar un gel desnaturante en segunda dimensión. En el mismo gel azul se cargaron 3 carriles con 1 mg de proteína solubilizada con lauril maltósido. A un carril se le midió la actividad de NADH deshidrogenasa, en un segundo carril se midió la actividad de citocromo c oxidasa y el tercer carril se corrió en un gel de segunda dimensión.

La segunda dimensión se transfirió a membrana de nitrocelulosa y se incubó con el anticuerpo contra ND1. Se observó que aparecen varias manchas, una por arriba de los 36 kDa y dos entre los 27 y 20 kDa. Todas estas bandas provienen de la región donde migra el complejo I de acuerdo a la actividad de NADH deshidrogenasa que presentó esta región. Creemos que las manchas por debajo de los 27 kDa podrían ser productos de degradación de ND1, aunque pensamos que la banda que se observa entre 36kDa y 50kDa corresponde a ND1 (ver figura 24).

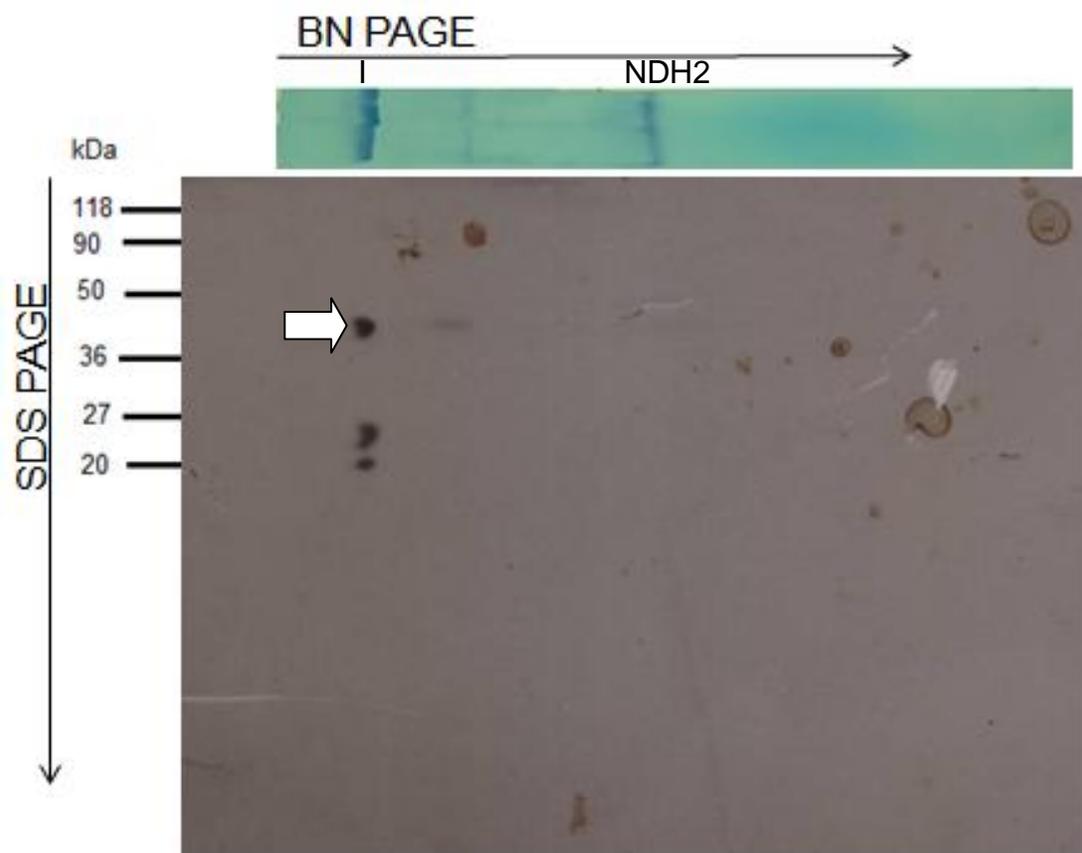


Figura 24. Gel azul nativo y Western blot con el anticuerpo de ND1. 1 mg de proteína mitocondrial solubilizada con lauril maltósido de la cepa tipo se corrió en un gel nativo en primera dimensión. La banda se cortó y se corrió en una segunda dimensión desnaturizante. En la parte superior se encuentra el gel nativo y las bandas que dieron actividad de deshidrogenasa. Se utilizó el anticuerpo precipitado con sulfato de amonio 1:5,000.

A continuación se muestra el gel nativo con la actividad de citocromo c oxidasa y el western blot con el anticuerpo anti Cox2 (ver figura 25) como control de que la actividad indica el complejo correspondiente y de que la subunidad (en este caso Cox2) se presenta en la misma región donde se presentó la actividad.

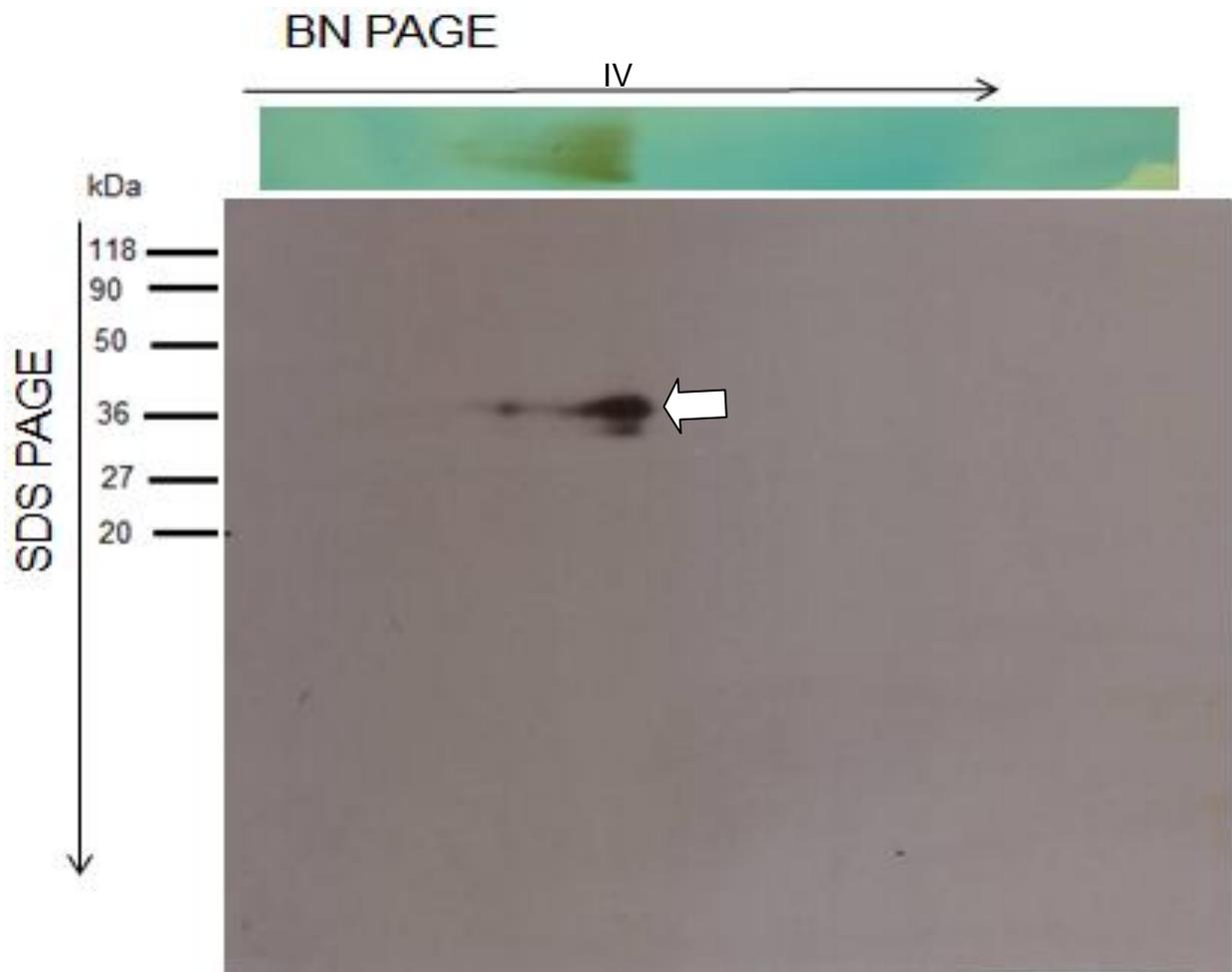


Figura 25. Gel azul nativo y Western blot con el anticuerpo contra Cox2p. 1 mg de proteína mitocondrial solubilizada con lauril maltósido de la cepa tipo se corrió en un gel nativo en primera dimensión. La banda se cortó y se corrió en una segunda dimensión desnaturante. En la parte superior se encuentra el gel nativo y las bandas que dieron actividad de citocromo c oxidasa. En la parte superior se encuentra el gel nativo y la banda de actividad de citocromo c oxidasa de complejo IV.

Lo anterior indica que los anticuerpos obtenidos de la inmunización del conejo reconocen a ND1.

Una vez que contamos con los anticuerpos, queríamos determinar si los niveles de proteína se modifican en el estado estacionario en deficiencia de subunidades de origen nuclear. Fueron muchos los intentos realizados para obtener este Western blot. Se variaron las condiciones (tiempo de incubación, se cambiaron las soluciones), se probaron diferentes tipos de membrana

(nitrocelulosa, PVDF), se probó dializar el anticuerpo, se emplearon diferentes preparaciones mitocondriales, se probó el suero y el anticuerpo precipitado con sulfato de amonio pero en todos ellos se observó que el anticuerpo se unía a un gran número de proteínas (datos no mostrados). El Western blot más limpio que logramos obtener se muestra en la figura 25. La citrato sintasa es nuestro control de carga (figura 26 A). Para ND1 obtuvimos dos bandas, ambas se encuentran por arriba de los 50kDa. Se repitió el western y fue reproducible, pero no podemos decir cuál es la banda que corresponde a ND1 ya que el peso molecular es mayor al esperado y no concuerda con los datos obtenidos anteriormente.

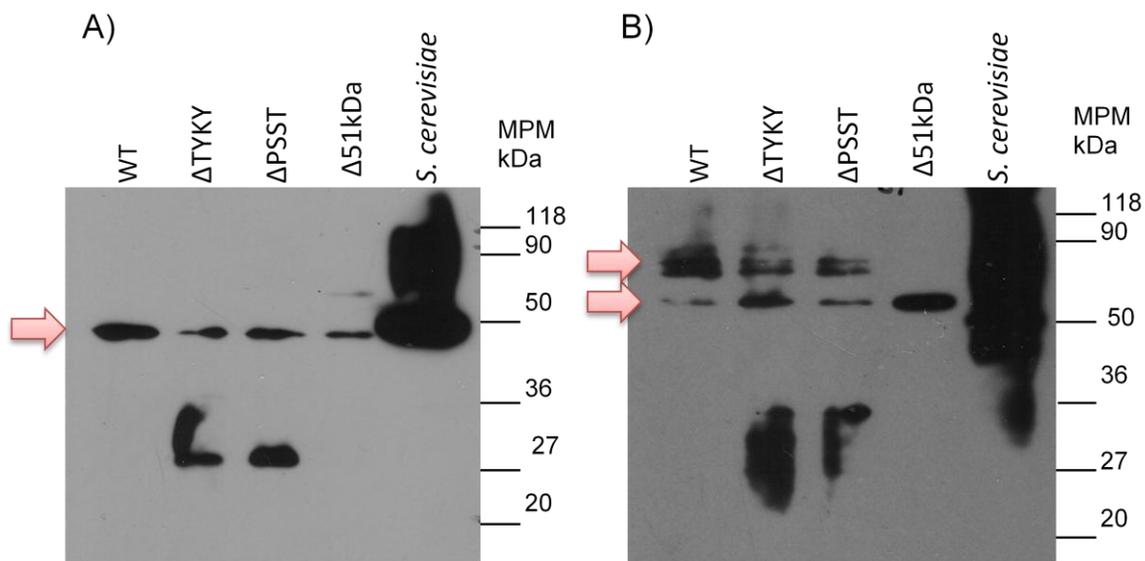


Figura 26. Niveles de ND1 en el estado estacionario. Se cargaron en el gel 20 μ g de proteína mitocondrial de cada una de las cepas. A) Western blot anti-citrato sintasa, B) Western blot con el anticuerpo ND1. *S. cerevisiae* es utilizado como control.

Con lo anterior podemos decir que el antígeno de ND1 sí generó un anticuerpo, pero este anticuerpo por razones desconocidas no es funcional por lo que es necesario inmunizar a un conejo para obtenerlo nuevamente.

DISCUSIÓN

Yarrowia lipolytica es un organismo que ha sido utilizado en los últimos años como modelo para estudiar al complejo I respiratorio, ya que igual que *S. cerevisiae*, se han desarrollado varias herramientas genéticas para el estudio de este organismo, Dichas herramientas pueden ser en el futuro de gran utilidad para realizar tamizajes genéticos y estudios que nos permitan identificar chaperonas de ensamblaje, cómo son los mecanismos de ensamblaje y conocer más sobre la biogénesis de complejo I.

El presente trabajo tiene como objetivo realizar un acercamiento metodológico al estudio de la expresión de genes mitocondriales de *Y. lipolytica*.

I. Caracterización fenotípica de las cepas mutantes.

En la sección de resultados observamos que las células deficientes en complejo I respiratorio presentan características muy similares de crecimiento a la cepa silvestre en medio rico YD.

El tiempo de crecimiento es casi el mismo en todas las cepas en medio líquido con glucosa, la fase media logarítmica de todas ellas es a las 15 horas a 30°C. El mismo comportamiento se observó en estudios de crecimiento en diluciones seriadas, donde la cepa silvestre crece a los mismo niveles que las cepas mutantes. En medio sólido observamos que la arquitectura de las colonias de la cepa silvestre difiere de las mutantes, siendo las primeras más rugosas, tienen ondulaciones en las orillas y tienen mayor volumen mientras que las colonias de Δ TYKY, Δ PSST y Δ 51KDa son lisas.

Se ha reportado que incluso las cepas silvestres de *Y. lipolytica* exhiben varios tipos morfología colonial, que van desde colonias lisas y brillosas hasta cepas rugosas, y enredadas (Wolf 1996). La razón por la cual las cepas silvestres pueden dar diferentes tipos coloniales se desconoce (Barth, et al. 1997).

Las observaciones anteriores también se encontraron en la cepa de *Y. lipolytica* $\Delta nuam$ (cepa carente de la subunidad de 75KDa del complejo I). La cepa silvestre que contiene al complejo I muestra una morfología colonial más compleja, típica de un crecimiento micelial, mientras que la mutante produce colonias más lisas (Kerscher, et al. 2001).

También se ha reportado que la formación de micelio solo se presenta en medio con glucosa (Ruiz-Herrera, et al. 2002), por lo que esperaríamos entonces que el crecimiento de tipo micelial fuera igual en todas las cepas. Dadas estas observaciones podríamos pensar que la forma de la colonia está relacionada con el dimorfismo del hongo.

El dimorfismo de *Y. lipolytica* es afectado por diferentes factores como: el pH del medio, la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno y el tiempo de crecimiento entre otros. Es importante hacer énfasis en que las condiciones que afectan el dimorfismo son diferentes en medio sólido que en líquido (Wolf 1996).

Nosotros no observamos diferencias en el dimorfismo celular en medio líquido ni sólido, aún cuando las células que se tomaron del medio sólido muestran a simple vista diferente tipo de colonia. La cepa tipo de *Y. lipolytica* puede formar levaduras e hifas, al parecer en las mismas proporciones que las cepas mutantes.

Palkova, Z., y colaboradores (2010) estudiaron cepas de laboratorio de *S. cerevisiae* y aislados silvestres. Ellos encontraron que las cepas silvestres presentan un tipo colonial denominado “fluffy” (colonias voluminosas con superficie ondulante), parecida a la arquitectura colonial de la cepa silvestre de *Y. lipolytica*. En cambio las cepas de laboratorio muestran colonias lisas. En su estudio demuestran que las colonias tipo “fluffy” contienen mayor cantidad de agua, la cual puede ser depositada en el espacio intercelular y dentro de su matriz extracelular (ECM). De la misma manera, poseen una mayor cantidad de glicoproteína (llamada Flo11p surface cell adhesin). Además que la arquitectura de la colonia no depende de la morfología de la célula (St'ovicek, et al. 2010), esta última observación coincide con lo que observamos en las colonias de *Y. lipolytica*.

Por tanto creemos que la diferencia en la morfología de las colonias puede estar dada por la ausencia del complejo I y como consecuencia puede ocasionar

que las células tengan un mayor contenido de agua y/o que componentes (glicoproteínas) de la superficie celular modifiquen su nivel de expresión. Se sabe que en la pared celular de *Y. lipolytica* están presentes glicoproteínas (Barth, et al. 1997) y tal vez su concentración cambió en las cepas mutantes.

II. Las cepas mutantes presentan sensibilidad a flavona y no a rotenona.

La rotenona ha sido clasificada como un inhibidor de la cadena respiratoria de clase II, es decir, es un inhibidor de tipo no competitivo del complejo I (Friedrich, et al. 1994) lo que implica que se une a un sitio diferente al sitio activo de la enzima. Diversos estudios sugieren que la cavidad donde se une la quinona es también el sitio de unión a inhibidores (Tocilescu, et al. 2010).

En las oximetrías realizadas la cepa silvestre tuvo un comportamiento esperado: la respiración fue sensible a rotenona y la respiración se inhibió por completo en presencia de rotenona y flavona. En la figura 13B, 13C y 13D se observa que la rotenona inhibe al complejo I pero el consumo de oxígeno continúa. En la WT en presencia de rotenona, el NADH endógeno puede ser reducido por la NDH2e y llevar los electrones a la poza de quinonas por lo que al adicionar la flavona el consumo de O₂ se detiene.

En las cepas mutantes se observa resistencia a rotenona y sensibilidad a flavona. Esto comprueba una vez más la ausencia de complejo I. Lo que llama nuestra atención es que en presencia de flavona el consumo de O₂ no llega a cero, esto es particularmente notorio en las mutantes Δ TYKY y Δ PSST.

La flavona es un inhibidor de las deshidrogenas alternas de *S. cerevisiae*, inhibe tanto a las que se encuentran en la parte externa como a la localizada en la parte interna (de Vries, et al. 1988). Para tratar de explicar este comportamiento proponemos dos posibilidades; la formación de radicales libres y cambios de la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial a la flavona.

Se sabe que en pacientes con deficiencias de complejo I se producen cantidades excesivas de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Luo, et al. 1997).

Por otra parte se sabe que la formación de superóxido depende de la relación NADH/NAD^+ (Hirst, et al. 2008). En nuestras cepas mutantes la relación NADH/NAD^+ podría desplazarse hacia una mayor concentración de NADH. El redireccionamiento de la deshidrogenasa alterna al lado interno de la membrana mitocondrial (NDH2i) en deficiencia del complejo I, ha mostrado ser capaz de disminuir en gran medida la cantidad de ROS pero no a los niveles de la silvestre (Seo, et al. 1998; Sanz, et al. 2010). Por lo tanto creemos que al menos una parte del consumo de O_2 en las cepas mutantes podríamos atribuirlo a la formación de especies reactivas de oxígeno.

La segunda explicación de que las cepas mutantes no sean 100% sensibles a flavona, es que la membrana interna mitocondrial pudiera tener una menor permeabilidad a la flavona y eso impide que la flavona alcance la matriz mitocondrial. Esto debido a que nuestra cepa silvestre sólo lleva a la NDH2 alterna del lado externo (NDH2e) de la matriz mitocondrial. Por lo cual en la cepa silvestre la flavona tal vez alcanza más fácilmente a esta deshidrogenasa, mientras que en las cepas mutantes la deshidrogenasa alterna esta redirigida al interior de la membrana interna y tal vez la afinidad de la flavona por esta deshidrogenasa es menor. Cabe mencionar que en nuestros ensayos adicionamos el doble de concentración de flavona que se utiliza en *S. cerevisiae* para tratar de asegurarnos que esto no dependiera de la concentración. Sin embargo aún con el doble de concentración observamos consumo de oxígeno.

Kitajima-Ihara y Yagi sobreexpresaron la deshidrogenasa alterna de *S. cerevisiae* en *E. coli*, como parte de sus hallazgos encontraron que al medir la actividad de la NDH2 en presencia de flavona, la actividad NADH deshidrogenasa se inhibe casi por completo, es decir la NDH2 es sensible a la flavona, pero no en su totalidad (Kitajima-Ihara, et al. 1998). Hacen mención a que la actividad residual, es decir, el consumo de oxígeno que aún observan en presencia de flavona puede deberse a la composición de la membrana. La membrana interna de la mitocondria de levadura tiene una composición significativamente diferente a la membrana citoplásmica de *E. coli* en términos de composición lipídica (Kitajima-Ihara, et al. 1998). Lo anterior puede estar sucediendo también en nuestros

resultados, apoyando que en *Y. lipolytica* la falta de inhibición total de la flavona sea porque no cruce por completo la membrana interna mitocondrial como en *S. cerevisiae* debido a la composición de dicha membrana.

De igual manera, en células de mamífero deficientes del complejo I, que contienen una versión de la NDH2i de *S. cerevisiae*, se observa una pequeña cantidad de O₂ consumido en presencia de flavona (Seo, et al. 1998).

Conocer la composición exacta de la membrana interna mitocondrial de *Y. lipolytica* nos ayudaría a ver si hay diferencias con la composición de la MIM de *S. cerevisiae* pero hasta el momento nosotros no hemos encontrado en la literatura cuál es la composición exacta de la MIM de *Y. lipolytica*. Pero especulamos que la flavona no puede ingresar por completo a la matriz mitocondrial.

III. Expresión de genes mitocondriales que codifican para el complejo I respiratorio.

➤ *Transcripción de genes mitocondriales.*

Las subunidades PSST y TYKY contienen centros Fe-S mientras que la subunidad de 51kDa contiene el sitio de unión al FMN (Angerer, et al. 2011), por lo tanto la ausencia de dichas subunidades afecta el paso de los electrones del NADH a la quinona. Tomando en consideración el modelo de ensamblaje descrito en mamíferos PSST y TYKY formarían parte de intermediarios de ensamblaje en etapas tempranas y 51kDa entraría en etapas tardías. Se ha visto en otros complejos respiratorios (complejo II, IV y V), que defectos en su ensamblaje afectan la expresión de genes mitocondriales sobre todo a nivel traduccional y postraduccional, especialmente bien documentado para *S. cerevisiae* (Rak, et al. 2009; Gruschke, et al. 2011; Mick, et al. 2011).

Parte de los objetivos de este trabajo fueron estudiar si podía existir alguna regulación similar para complejo I de *Y. lipolytica*. Para ello comenzamos analizando la expresión de subunidades mitocondriales a nivel transcripcional.

Primero fue necesario identificar el nivel de los transcritos mitocondriales de complejo I. Este tipo de estudios no se había realizado con anterioridad. Encontramos que algunos genes, como ND5 y ND4L, se encuentran como policistrones con otros genes mitocondriales y que no se observan transcritos procesados que incluyan sólo al ORF (marco de lectura abierto) de interés. Todos los genes mitocondriales de *Y. lipolytica* son transcritos de la misma cadena de DNA, sugiriendo que algunos o muchos de ellos son policistrónicos (Matsuoka, et al. 1994). La transcripción de genes mitocondriales en unidades policistrónicas es común en levadura y en humano. Los genes mitocondriales humanos son procesados como transcritos policistrónicos (que cubren casi la longitud total de cada cadena) (Sánchez, et al.) y en *S. cerevisiae* también algunos genes son transcritos primarios policistrónicos como es el caso de Atp6-Atp8-Cox1.

También llama nuestra atención que las distancias entre los ORF's de un policistrón son muy pequeñas como por ejemplo entre Cox3 y ND4, donde hay sólo 10 nucleótidos de distancia o no hay nucleótidos que los separen como es el caso de ND4L y ND5. Al igual que como ocurre con el mtDNA de humano es difícil saber cómo los ribosomas encuentran su sitio de entrada. Otros genes se transcriben y procesan en RNA's mensajeros aislados, tal como es el caso de ND1.

Los genes mitocondriales están organizados en forma compacta y generalmente son co-transcritos como largos precursores de RNA's, los cuales son después procesados en mRNA's y tRNA's individuales. En *Y. lipolytica* se sabe que los genes de subunidades de la Atp6, Atp8, Cox3 y ND4 están organizados en una unidad transcripcional teniendo un arreglo similar al genoma mitocondrial de humano (Matsuoka, et al. 1994). Esto es en parte confirmado en la figura 16 ya que hay una banda a los ~3.8 kb pero también observamos una banda casi a la altura de 1.6 kb. En los 2 últimos carriles de la figura 16 observamos que, cuando la banda de ~3.8 kb disminuye la de ~1.6 se enriquece.

Si la intensidad de la señal fuera aditiva, esto no reflejaría diferencia de ND4 entre las cepas comparando con el 16S rRNA y consideramos que la banda de los ~1.6 kb pertenece a un RNA mensajero maduro de ND4.

No encontramos reportes de ninguna otra unidad transcripcional descrita de *Y. lipolytica*, pero sí encontramos reportado el sitio de inicio de la transcripción para el gen *atp8*, el cual, comienza en la última A del nonanucleótido 5'-ATATAAATA-3', el cual se asemeja al sitio consenso de inicio de la transcripción mitocondrial en *S. cerevisiae* y *K. lactis* (Christianson, et al 1983).

Buscamos este nonanucleótido en todo el genoma de *Y. lipolytica* para ver si podríamos inferir sitios de inicio de la transcripción y si fuese así esperamos encontrarlos antes de las unidades policistrónicas propuestas (COB, ND2 y ND3; Cox2, ND4L y ND5) pero no lo encontramos. Sólo encontramos dicho nonanucleótido antes de los tRNA's de: tRNA_{leu}, tRNA_{gly}, tRNA_{asp}, rRNA de la subunidad pequeña, de Cox1 y de Cox2 (datos no mostrados).

El mensajero de ND1 es monocistrónico igual que su contraparte en humano. La disposición de los genes mitocondriales en *Hansenula wingei* es muy similar a la disposición en *Y. lipolytica*. En *H. wingei* se encontró que ND4L y ND5 están en la misma unidad transcripción, pero no determinaron si es dicistrón o policistrón (Okamoto, et al. 1994). Lo anterior apoya nuestra propuesta de un policistrón con Cox2, ND4L y ND5.

En mitocondrias de levaduras las secuencias intergénicas de tRNA's sirven como sitios de procesamiento primario por la acción de ribonucleasa procesadoras de tRNA que editan los sitios 5' y 3' de los precursores de tRNA (Chen, et al. 1988). Los dos policistrones que proponemos estarían flanqueados por tRNA's.

En *S. cerevisiae* no se afecta la acumulación de los RNA's mensajeros mitocondriales de la ATP sintasa en defectos de su propio ensamblaje (Rak, et al. 2009). Este mismo comportamiento está presente en *Y. lipolytica*, donde la falta de ensamblaje de complejo I no afecta la acumulación de los RNA's mensajeros estudiados en este trabajo.

➤ *Ensayos in vivo de síntesis de proteínas mitocondriales.*

La técnica de estudio de la traducción *in vivo* de proteínas mitocondriales con S³⁵-metionina ha sido ampliamente utilizada en algunos organismos. En *Y. lipolytica* no existen reportes de dicho ensayo. Nosotros en principio empleamos el mismo protocolo que ha sido descrito para *S. cerevisiae*, en el que se usa la cicloheximida para inhibir la síntesis de proteínas en el citoplasma pero no en la mitocondria (Bonney, et al. 2001). La cicloheximida ha sido aplicada en el laboratorio por décadas para inhibir la traducción eucarionte, a nivel de la elongación, pero su mecanismo de acción aún no es claro (Schneider-Poetsch, et al. 2010).

Como se observa en la figuras 19-21 *Y. lipolytica* es resistente a este antibiótico.

Intentamos probar con otro antibiótico, la emetina que se ha utilizado en ensayos de traducción *in vivo* en células de mamífero (Chomyn 1996). La emetina también se ha descrito como un inhibidor de la síntesis de proteínas en eucariontes pero en *Y. lipolytica* no mostró tener efecto.

Transportadores pleiotrópicos resistentes a fármacos (PDR por sus siglas en inglés Pleiotropic Drug Resistant transporters) son miembros de la subfamilia de transportadores ATP-Binding Cassette (ABC), los cuales exportan antifúngicos y xenobióticos en hongos y plantas, lo que confiere resistencia a los organismos (Seret, et al. 2009). En el genoma de *Y. lipolytica* se han identificado genes que podrían codificar para este tipo de acarreadores (Seret, et al. 2009). Es posible que la resistencia a estos antibióticos sea conferida por este tipo de transportadores.

La ciclosporina A es un inhibidor de los transportadores ABC (Tanabe, et al. 2007), y aún a una concentración elevada (el doble de la concentración utilizada en *Candida albicans*) (Marchetti, et al. 2000), no se observó inhibición de la traducción citoplásmica.

Existe la posibilidad de que los antibióticos no entren a la célula. Para eliminar la pared celular hicimos los ensayos en esferoplastos y sin embargo tampoco obtuvimos resultados positivos.

Cabe mencionar que también intentamos hacer el ensayo con mitocondrias aisladas (traducción *in organello*), para ello empleamos el mismo protocolo de levadura (Westermann, et al. 2001). Sin embargo, no observamos la síntesis de las proteínas mitocondriales. Quizá sea porque las condiciones para llevar a cabo la traducción no sean las mismas para los dos organismos (datos no mostrados).

Por lo tanto será necesario continuar la búsqueda de condiciones para realizar el experimento de síntesis de proteínas en mitocondrias en *Y. lipolytica*.

➤ *Generación de anticuerpos.*

Consideramos que una herramienta muy útil es la obtención de anticuerpos. Recientemente se reportó que la disminución de la síntesis de ND1 provoca estancamiento en el ensamblaje del complejo (McKenzie, et al. 2011). Apoyados por este reporte consideramos muy importante la obtención de anticuerpos contra ND1. De acuerdo al modelo propuesto en mamífero, ND1 entraría en etapas tempranas del ensamblaje del complejo y se encuentra inmerso en la membrana interna de la mitocondria.

El conejo es uno de los animales más empleados para la producción de anticuerpos policlonales en el laboratorio, ya que ofrece múltiples ventajas, una de ellas es la excelente sensibilidad de los conejos a una amplia variedad de antígenos, otra es la presencia de un único isotipo de inmunoglobulinas G. (Suckow 2012).

Logramos obtener anticuerpos contra ND1, lo cual indica que el péptido utilizado resultó ser antigénica para el conejo. La forma en la que pudimos corroborar que el anticuerpo reconociera a una subunidad de la NADH deshidrogenasa fue mediante geles nativos en primera dimensión y geles desnaturalizantes en segunda dimensión.

En el gel azul nativo (primera dimensión) las proteínas mitocondriales se solubilizaron con lauril maltósido que es un detergente que nos permite mantener a los complejos respiratorios ensamblados (Nubel, et al. 2009). Para determinar qué banda corresponde al complejo I se midió la actividad de NADH deshidrogenasa, en donde los electrones del NADH oxidado pasan al NBT y el NBT reducido forma un precipitado de color marrón. De las dos bandas que se observan, la de mayor tamaño corresponde al complejo I y la de menor tamaño a la deshidrogenasa alterna. Así corroboramos que el anticuerpo reconoce a una subunidad del complejo I.

Pensamos que las manchas que están por debajo del marcador de 36kDa, en el Western blot del gel 2D, son productos de degradación de la propia ND1.

A continuación intentamos hacer el Western blot con todas las cepas en estudio. En los ensayos realizados posteriores a los de la 2D, las autorradiografías mostraban más de 5 bandas a diferentes pesos moleculares y no podíamos decir cuál de ellas era ND1.

Probamos varias condiciones pero no logramos obtener una sola banda como en el título de anticuerpos, ni de un peso similar.

El ensayo más limpio que obtuvimos fue el que se muestra en la figura 26 pero las bandas que se observan están por arriba de lo esperado; así que consideramos que ninguna de las dos bandas de este Western blot pertenece a ND1.

No tenemos claro que pudo haber pasado con el anticuerpo. Consideramos que es necesario volver a inmunizar a un conejo y obtener nuevamente los anticuerpos.

En el caso de ND2 volvimos a revisar la base de datos y encontramos que en fechas posteriores al diseño del péptido fue corregida la base de datos. Algunos aminoácidos de la secuencia cambiaron, entre ellos dos aminoácidos de nuestro péptido por lo que consideramos que no es necesario volver a inmunizar al conejo con este péptido porque no tiene una secuencia idéntica a ND2.

Todavía es poco lo que se conoce acerca de *Y. lipolytica* por lo que resulta complicado tratar de explicar nuestros resultados. Sin embargo, aunque el

presente proyecto no muestra resultados contundentes acerca de la expresión de los genes mitocondriales, creemos que abre un campo muy amplio de estudio en este organismo.

CONCLUSIONES

❖ La ausencia de complejo I modifica la arquitectura de las colonias de *Yarrowia lipolytica* de manera visible, sin embargo las colonias al microscopio presentan las mismas morfologías.

❖ La flavona podría no inhibir por completo a la NHD2 interna en *Y. lipolytica*.

❖ *Y. lipolytica* es un organismo resistente a diversos inhibidores de la traducción de proteínas citosólicas, como la cicloheximida y la emetina, por lo que se dificultó montar la técnica de síntesis de proteínas mitocondriales *in vivo*.

❖ La ausencia de subunidades de la NADH ubiquinona oxidoreductasa de origen nuclear no modifica la acumulación de los RNA's mensajeros mitocondriales de *ND1*, *ND2*, *ND3*, *ND4* y *ND4L*.

❖ El péptido de ND1 generó anticuerpos que reconocen a una subunidad de origen mitocondrial del complejo I de *Y. lipolytica*.

❖ El péptido de ND2 no produjo anticuerpos en conejo.

PERSPECTIVAS

❖ Mediante un ensayo de microarreglos de las cepas mutantes y la cepa silvestre podemos determinar los genes que modifican su expresión, con ello tal vez podríamos encontrar nuevos genes que estén participando en la biogénesis de complejo I.

❖ Buscar si existe diferente cantidad de glicoproteínas en la superficie celular de las colonias lisas (mutantes de complejo I) y rugosas (cepa silvestre).

❖ Construir la cepa que contenga al complejo I y una deshidrogenasa alterna interna y no a la externa, para utilizar a esta cepa como control y con ello observar si la flavona puede inhibir la actividad de las deshidrogenasas alternas por completo.

❖ Medir la cantidad de especies reactivas de oxígeno que se producen en la mitocondria para determinar qué mutante está más afectada por la ausencia de complejo I.

❖ Hacer ensayos tipo Northern blot contra los RNA's de las subunidades mitocondriales de complejo IV y con ello comprobar si la transcripción policistrónica propuesta es correcta.

❖ Inmunizar a un conejo con el péptido de ND1 y obtener nuevamente los anticuerpos para hacer un Western blot con el nuevo anticuerpo de ND1 contra todas las cepas de *Y. lipolytica*.

ANEXOS

Medios de cultivo

➤ Medio YD

Extracto de levadura 1%

Dextrosa 2%

➤ Medio –met

Base nitrogenada sin aminoácidos 0.67%

Galactosa o dextrosa 2%

Aminoácidos sin metionina 0.075%

➤ Medio YPGal

Extracto de levadura 1%

Peptona

Galactosa 2%

➤ Medio LB

Extracto de levadura 0.5%

Bacto triptona 1%

NaCl 1%

Soluciones

Aislamiento de mitocondrias

➤ Amortiguador de maleato 100 mL

Ácido maleico 0.5M 5.8 g

Ajustar pH=6.8 con Tris

➤ Solución de aislamiento		1 L
Manitol	0.6M	109.62 g
Amortiguador de maleato pH=6.8	0.5M	20 mL
Albúmina sérica bovina	0.1%	1 g*

*Adicionar al momento de usar.

Lowry modificado

➤ Solución A		1 L
Na ₂ CO ₃	2%	20 g
NaOH	0.4%	4 g
Tartrato de sodio	0.16%	1.6 g
SDS	1%	10 g

➤ Solución B		100 mL
Cu ₂ SO ₄ ·5H ₂ O	4%	4 g

➤ Solución C

Mezclar 100 volúmenes de A + 1 volumen de B. Preparar al momento de usar.

➤ Solución D

Mezclar 1 volumen de reactivo de Folin+1volumen de agua. Preparar al momento de usar.

Extracción de DNA y RNA

➤ Amortiguador de lisis		20 mL
Triton X-100	100%	400 µL
SDS	10%	1 mL

NaCl	5M	400 μ L
Tris pH=8.0	2M	100 μ L
EDTA	500mM	40 μ L

➤ Solución AE 100mL

Acetato de sodio	1M	5mL	pH=5.3
EDTA	0.5M	2mL	

Northern blot

➤ SSC 20x 1 L

Cloruro de sodio 175.3 g

Citrato de sodio 88.2 g

Ajustar pH=7.0 con HCl.

Adicionar 1 mL de DEPC, mezclar y dejar toda la noche en reposo, al día siguiente esterilizar en autoclave.

➤ Denhardt's 50x 100 mL

Albúmina sérica bovina 1% 1 g

Ficoll 1% 1 g

Polivinilpirrolidona 1% 1g

Filtrar con membrana de 0.45 μ m.

➤ Solución de hibridación 100 mL

SSC 20x 25 mL

Denhardt's 50x 10 mL

SDS 10% 5 mL

ssDNA 10 mg/mL

Western blot

➤ Solución de bloqueo		50 mL
Leche en polvo	10%	5 g
Tris pH=7.6	1M	2.5 mL
NaCl	5M	1.5 mL

➤ Solución de blot		10 mL
Leche en polvo	1%	0.1 g
Tris pH=7.6	1M	100 μ L
NaCl	5M	200 μ L
EDTA	500mM	20 μ L
Tween-20	5%	200 μ L

➤ Solución de lavado		1L
Tris pH=7.6	1M	10 mL
NaCl	5M	20 mL
EDTA	500mM	2 mL
Tween-20	100%	1 mL

Traducción *in vivo* de proteínas mitocondriales

➤ Amortiguador SHP		10 mL
Sorbitol	2.4M	2.5 mL
HEPES pH=7.4	1M	200 μ L
Inhibidor de proteasas		3.3 μ L

➤ Amortiguador TD		10 mL
Ditrioteitol	4M	25 μ L
Tris-SO ₄ pH=9.4	1M	100 μ L

➤ Amortiguador MP2

Sorbitol	1.2M
Amortiguador de fosfatos pH=7.4	20mM
Zimoliasa 20-T	3 mg/g de células

Geles de acrilamida

SDS-PAGE para ensayos de traducción *in vivo*

Reactivo	Gel separador 16%	Gel concentrador 5%
30% acrilamida-0.3% bis-acrilamida	9 mL	0.83 mL
Tris pH=8.8	3.28 mL	--
Tris pH=6.8	--	150 μ L
Agua destilada	4.5 mL	4 mL
SDS 10%	167 μ L	50
Persulfato de amonio 10%	100 μ L	25 μ L
TEMED	10 μ L	5 μ L

Preparación de la muestra

✓ Amortiguador de muestra 2x		5 mL
Tris pH=6.8	2M	0.25 mL
SDS	10%	2 mL
Glicerol	50%	2 mL
Azul de bromofenol		10 mg
β -mercaptoetanol*		100 μ L

*Adicionar al momento de usar

✓ Amortiguador de electroforesis 5x		1 L
Tris	0.125M	15.1 g
Glicina	1.25M	94 g
SDS	0.5%	5 g

Gel azul nativo

Para preparar el gel se utiliza un formador de gradientes, en un cilindro se coloca la acrilamida al 12% y en otro la acrilamida a 4%. La velocidad a la que cae la acrilamida debe ser lenta pero no lo suficiente como para que polimerice la acrilamida antes de terminar de salir del gradiente. La velocidad a la que bajan las soluciones debe ser la misma.

Reactivo	Gel separador 4 %	Gel separador 12%	Gel concentrador 4%
48.5% acrilamida-1.5% bis-acrilamida	1.5 mL	4.6 mL	0.5 mL
Amortiguador para el gel 3x	6.2 mL	6.2 mL	2 mL
Glicerol 80%	1.2 mL	4.73 mL	--
Agua destilada	9.6 mL	3.04 mL	3.4 mL
Digitonina 5%	92.5 μ L	92.5 μ L	--
Persulfato de amonio 10%	50 μ L	50 μ L	32 μ L
TEMED	18 μ L	18 μ L	9 μ L

✓ Amortiguador 3x 100 mL
 Ácido aminocaproico 1.5M 19.68 g
 Imidazol 75mM 0.51 g
 Ajustar pH=7.0 con HCl

✓ Amortiguador del cátodo 1 1 L
 Tricina 50mM 8.96 g
 Imidazol 7.5mM 0.51 g
 Azul de Coomassie Serva G 0.02% 200 mg

✓ Amortiguador del cátodo 2 1 L
 Tricina 50 mM 8.96 g

Imidazol	7.5mM	0.51 g
Azul de Coomassie Serva G	0.002%	20 mg

✓ Amortiguador del ánodo 1 L

Imidazol	25mM	1.7 g
----------	------	-------

Ajustar pH=7.0 con HCl

Preparación de muestra

✓ Amortiguador de muestra 50 mL

Ácido aminocaproico	750mM	4.92 g
---------------------	-------	--------

Imidazol	25mM	0.09g
----------	------	-------

Ajustar pH=7.0 con HCl.

✓ Solución de dodecil maltósido 1 mL

Dodecil maltósido	10%	100 mg
-------------------	-----	--------

✓ Solución de Coomassie Serva blue G 1 mL

Azul de Coomassie Serva G	5%	50 mg
---------------------------	----	-------

Gel desnaturalizante (2ª dimensión)

Reactivo	Gel separador 14%	Gel concentrador 4%
30% acrilamida-0.98% bis-acrilamida	14 mL	1.6 mL
Amortiguador para el gel 3x	12mL	3 mL
Glicerol 80%	4 mL	--
Agua destilada	--	7.4 mL
Persulfato de amonio 10%	100 µL	25 µL
TEMED	10 µL	5 µL

✓ Solución desnaturalizante		100 mL
β-mercaptoetanol	1 %	1mL
Amortiguador del cátodo	1x	c.p.b 100 mL
SDS	1%	1g
✓ Amortiguador para el gel 3x		100 mL
Tris	3M	36.33 g
SDS	0.3%	0.3 g
Ajustar el pH=8.45 con HCl.		
✓ Amortiguador del cátodo 10x		500 mL
Tris	1M	60.57 g
Tricina	1M	89.6 g
SDS	1%	5 g
✓ Amortiguador del ánodo 10x		500 mL
Tris	1M	60.57 g
Ajustar el pH=8.9 con HCl.		

Iniciadores y condiciones de PCR. Clonados en el plásmido pGEM.

C

Gen	Iniciador	Temperatura de alineamiento
ND1	Fw5' CGCAGACGCGGTAAAACCTATTATT3' Rv5' GTCTAGCTGTTTCTGCAACTGAAGC3'	52°C
ND2	Fw5' GTTGGATCAGTTGGTGGATTAT3' Rv5' CCA AAGAATCCTAATAATGGTGGT3'	52°C
ND3	Fw5' GGAGCATTTGAATGTGGTTTAACT3' Rv5' TGAATCTGTGTTTGGTTTATTATG3'	52°C
ND4	Fw5' CTCTTAGTGGTTCTTTATTCATGCT3' Rv5' GGA CTTACAAAACCGTGTGCTA3'	50°C
ND4L	Fw5' TGTTTAGAGACAATGTTGCTAGGT3' Rv5' CCTATAGCTGACTCTACACCTGCT3'	52°C
16S RNA	Fw5' ATGTCGCCATAGTAGTACGTTCC3' Rv5' GCCCTATCTATTTGGGTCATCTT3'	52°C

REFERENCIAS

- Abdrakhmanova, A., V. Zickermann, et al. (2004). "Subunit composition of mitochondrial complex I from the yeast *Yarrowia lipolytica*." Biochim Biophys Acta **1658**(1-2): 148-56.
- Ahlers, P. M., A. Garofano, et al. (2000). "Application of the obligate aerobic yeast *Yarrowia lipolytica* as a eucaryotic model to analyse Leigh syndrome mutations in the complex I core subunits PSST and TYKY." Biochim Biophys Acta **1459**(2-3): 258-65.
- Angerer, H., K. Zwicker, et al. (2011). "A scaffold of accessory subunits links the peripheral arm and the distal proton-pumping module of mitochondrial complex I." Biochem J **437**(2): 279-88.
- Antonicka, H., I. Ogilvie, et al. (2003). "Identification and characterization of a common set of complex I assembly intermediates in mitochondria from patients with complex I deficiency." J Biol Chem **278**(44): 43081-8.
- Barrientos, A., A. Zambrano, et al. (2004). "Mss51p and Cox14p jointly regulate mitochondrial Cox1p expression in *Saccharomyces cerevisiae*." EMBO J **23**(17): 3472-82.
- Barth, G. and C. Gaillardin (1997). "Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*." FEMS Microbiol Rev **19**(4): 219-37.
- Bonnefoy, N., N. Bsat, et al. (2001). "Mitochondrial translation of *Saccharomyces cerevisiae* COX2 mRNA is controlled by the nucleotide sequence specifying the pre-Cox2p leader peptide." Mol Cell Biol **21**(7): 2359-72.
- Brandt, U. (2011). "A two-state stabilization-change mechanism for proton-pumping complex I." Biochim Biophys Acta **1807**(10): 1364-9.
- Bridges, H. R., L. Grgic, et al. (2009). "The respiratory complexes I from the mitochondria of two *Pichia* species." Biochem J **422**(1): 151-9.
- Calvo, S. E., E. J. Tucker, et al. (2010). "High-throughput, pooled sequencing identifies mutations in NUBPL and FOXRED1 in human complex I deficiency. ." Nature Genetics **42**: 851–858.

- Chen, J. Y. and N. C. Martin (1988). "Biosynthesis of tRNA in yeast mitochondria. An endonuclease is responsible for the 3'-processing of tRNA precursors." J Biol Chem **263**(27): 13677-82.
- Chomyn, A. (1996). "In vivo labeling and analysis of human mitochondrial translation products." Methods Enzymol **264**: 197-211.
- Christianson, T. and M. Rabinowitz (1983). "Identification of multiple transcriptional initiation sites on the yeast mitochondrial genome by in vitro capping with guanylyltransferase." J Biol Chem **258**(22): 14025-33.
- Dan Burke., D. Dean, et al., Eds. (2000). Methods in yeast genetics, cold spring harbor laboratory press.
- Daum, G., S. M. Gasser, et al. (1982). "Import of proteins into mitochondria. Energy-dependent, two-step processing of the intermembrane space enzyme cytochrome b2 by isolated yeast mitochondria." J Biol Chem **257**(21): 13075-80.
- de Vries, S. and L. A. Grivell (1988). "Purification and characterization of a rotenone-insensitive NADH:Q6 oxidoreductase from mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*." Eur J Biochem **176**(2): 377-84.
- Efremov, R. G., R. Baradaran, et al. (2010). "The architecture of respiratory complex I." Nature **465**(7297): 441-5.
- Eubel, H., J. Heinemeyer, et al. (2004). "Respiratory chain supercomplexes in plant mitochondria." Plant Physiol Biochem **42**(12): 937-42.
- Friedrich, T., P. van Heek, et al. (1994). "Two binding sites of inhibitors in NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I). Relationship of one site with the ubiquinone-binding site of bacterial glucose:ubiquinone oxidoreductase." Eur J Biochem **219**(1-2): 691-8.
- Gruschke, S., K. Kehrein, et al. (2011). "Cbp3-Cbp6 interacts with the yeast mitochondrial ribosomal tunnel exit and promotes cytochrome b synthesis and assembly." J Cell Biol **193**(6): 1101-14.
- Guerrero-Castillo, S., M. Vazquez-Acevedo, et al. (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.
- Hirst, J., M. S. King, et al. (2008). "The production of reactive oxygen species by complex I." Biochem Soc Trans **36**(Pt 5): 976-80.
- Hunte, C., V. Zickermann, et al. (2010). "Functional modules and structural basis of conformational coupling in mitochondrial complex I." Science **329**(5990): 448-51.
- Joseph-Horne, T., D. W. Hollomon, et al. (2001). "Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components." Biochim Biophys Acta **1504**(2-3): 179-95.
- Juarez, O., G. Guerra, et al. (2004). "The mitochondrial respiratory chain of *Ustilago maydis*." Biochim Biophys Acta **1658**(3): 244-51.
- Katz, R., L. Kilpatrick, et al. (1971). "Acquisition and loss of rotenone sensitivity in *Torulopsis utilis*." Eur J Biochem **21**(3): 301-7.
- Kerscher, S., S. Drose, et al. (2008). "The three families of respiratory NADH dehydrogenases." Results Probl Cell Differ **45**: 185-222.
- Kerscher, S., S. Drose, et al. (2002). "Yarrowia lipolytica, a yeast genetic system to study mitochondrial complex I." Biochim Biophys Acta **1555**(1-3): 83-91.
- Kerscher, S., G. Durstewitz, et al. (2001). "The complete mitochondrial genome of *Yarrowia lipolytica*." Comp Funct Genomics **2**(2): 80-90.
- Kerscher, S. J., A. Eschemann, et al. (2001). "External alternative NADH:ubiquinone oxidoreductase redirected to the internal face of the mitochondrial inner membrane rescues complex I deficiency in *Yarrowia lipolytica*." J Cell Sci **114**(Pt 21): 3915-21.
- Kerscher, S. J., J. G. Okun, et al. (1999). "A single external enzyme confers alternative NADH:ubiquinone oxidoreductase activity in *Yarrowia lipolytica*." J Cell Sci **112** (Pt 14): 2347-54.
- Kitajima-Ihara, T. and T. Yagi (1998). "Rotenone-insensitive internal NADH-quinone oxidoreductase of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria: the enzyme expressed in *Escherichia coli* acts as a member of the respiratory chain in the host cells." FEBS Lett **421**(1): 37-40.

- Kuffner, R., A. Rohr, et al. (1998). "Involvement of two novel chaperones in the assembly of mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I)." Journal Molecular Biology **283**: 409-417.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Lazarou, M., M. McKenzie, et al. (2007). "Analysis of the assembly profiles for mitochondrial- and nuclear-DNA-encoded subunits into complex I." Mol Cell Biol **27**(12): 4228-37.
- Lazarou, M., S. M. Smith, et al. (2009). "Assembly of nuclear DNA-encoded subunits into mitochondrial complex IV, and their preferential integration into supercomplex forms in patient mitochondria." FEBS J **276**(22): 6701-13.
- Lefebvre-Legendre, L., A. Balguerie, et al. (2003). "F1-catalysed ATP hydrolysis is required for mitochondrial biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae* growing under conditions where it cannot respire." Mol Microbiol **47**(5): 1329-39.
- Lemire, B. D. and K. S. Oyedotun (2002). "The *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial succinate:ubiquinone oxidoreductase." Biochim Biophys Acta **1553**(1-2): 102-16.
- Luo, X., S. Pitkanen, et al. (1997). "Excessive formation of hydroxyl radicals and aldehydic lipid peroxidation products in cultured skin fibroblasts from patients with complex I deficiency." J Clin Invest **99**(12): 2877-82.
- Marchetti, O., J. M. Entenza, et al. (2000). "Fluconazole plus cyclosporine: a fungicidal combination effective against experimental endocarditis due to *Candida albicans*." Antimicrob Agents Chemother **44**(11): 2932-8.
- Markwell, M. A., S. M. Haas, et al. (1978). "A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples." Anal Biochem **87**(1): 206-10.
- Matsuoka, M., M. Matsubara, et al. (1994). "Organization and transcription of the mitochondrial ATP synthase genes in the yeast *Yarrowia lipolytica*." Curr Genet **26**(5-6): 382-9.
- McDonald, A. E. (2009). "Alternative oxidase: what information can protein sequence comparisons give us?" Physiol Plant **137**(4): 328-41.

- McKenzie, M. and M. T. Ryan (2010). "Assembly factors of human mitochondrial complex I and their defects in disease." IUBMB Life **62**(7): 497-502.
- McKenzie, M., E. J. Tucker, et al. (2011). "Mutations in the gene encoding C8orf38 block complex I assembly by inhibiting production of the mitochondria-encoded subunit ND1." J Mol Biol **414**(3): 413-26.
- Mick, U. D., T. D. Fox, et al. (2011). "Inventory control: cytochrome c oxidase assembly regulates mitochondrial translation." nature reviews **12**: 14-20.
- Mihara, K. and G. Blobel (1980). "The four cytoplasmically made subunits of yeast mitochondrial cytochrome c oxidase are synthesized individually and not as a polyprotein." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(7): 4160-4.
- Nouws, J., L. Nijtmans, et al. (2010). "Acyl-CoA dehydrogenase 9 is required for the biogenesis of oxidative phosphorylation complex I." Cell Metab **12**(3): 283-94.
- Nubel, E., I. Wittig, et al. (2009). "Two-dimensional native electrophoretic analysis of respiratory supercomplexes from *Yarrowia lipolytica*." Proteomics **9**(9): 2408-18.
- Okamoto, K., T. Sekito, et al. (1994). "The mitochondrial genome of yeast *Hansenula wingei* encodes NADH dehydrogenase subunit genes ND4L and ND5." Mol Gen Genet **243**(4): 473-6.
- Rak, M. and A. Tzagoloff (2009). "F1-dependent translation of mitochondrially encoded Atp6p and Atp8p subunits of yeast ATP synthase." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(44): 18509-14.
- Ruiz-Herrera, J. and R. Sentandreu (2002). "Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*." Arch Microbiol **178**(6): 477-83.
- Sambrook J. and D. W. Russell. 3a Ed. (2001). Molecular cloning, cold spring harbor laboratory press.
- Sanchez, M. I., T. R. Mercer, et al. "RNA processing in human mitochondria." Cell Cycle **10**(17): 2904-16.
- Sanz, A., M. Soikkeli, et al. (2010). "Expression of the yeast NADH dehydrogenase Ndi1 in *Drosophila* confers increased lifespan independently of dietary restriction." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(20): 9105-10.

- Schagger, H. (2006). "Tricine-SDS-PAGE." Nat Protoc **1**(1): 16-22.
- Schneider-Poetsch, T., T. Usui, et al. (2010). "Garbled messages and corrupted translations." Nat Chem Biol **6**(3): 189-198.
- Schwitzguebel, J. P. and J. M. Palmer (1982). "Properties of mitochondria as a function of the growth stages of *Neurospora crassa*." J Bacteriol **149**(2): 612-9.
- Seo, B. B., T. Kitajima-Ihara, et al. (1998). "Molecular remedy of complex I defects: rotenone-insensitive internal NADH-quinone oxidoreductase of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria restores the NADH oxidase activity of complex I-deficient mammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(16): 9167-71.
- Seret, M. L., J. F. Diffels, et al. (2009). "Combined phylogeny and neighborhood analysis of the evolution of the ABC transporters conferring multiple drug resistance in hemiascomycete yeasts." BMC Genomics **10**: 459.
- Shingu-Vazquez, M., Y. Camacho-Villasana, et al. (2010). "The carboxyl-terminal end of Cox1 is required for feedback assembly regulation of Cox1 synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria." J Biol Chem **285**(45): 34382-9.
- Smeitink, J., L. van den Heuvel, et al. (2001). "The genetics and pathology of oxidative phosphorylation." Nat Rev Genet **2**(5): 342-52.
- St'ovicek, V., L. Vachova, et al. (2010). "General factors important for the formation of structured biofilm-like yeast colonies." Fungal Genet Biol **47**(12): 1012-22.
- Stock, D., C. Gibbons, et al. (2000). "The rotary mechanism of ATP synthase." Curr Opin Struct Biol **10**(6): 672-9.
- Suckow, M., Stevens, K., Wilson, R. (2012). *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*.
- Tanabe, K., E. Lamping, et al. (2007). "Inhibition of fungal ABC transporters by unnarmicin A and unnarmicin C, novel cyclic peptides from marine bacterium." Biochem Biophys Res Commun **364**(4): 990-5.
- Tocilescu, M. A., V. Zickermann, et al. (2010). "Quinone binding and reduction by respiratory complex I." Biochim Biophys Acta **1797**(12): 1883-90.

- Tuschen, G., U. Sackmann, et al. (1990). "Assembly of NADH: ubiquinone reductase (complex I) in Neurospora mitochondria. Independent pathways of nuclear-encoded and mitochondrially encoded subunits." J Mol Biol **213**(4): 845-57.
- Tzagoloff, A., A. Akai, et al. (1975). "Assembly of the mitochondrial membrane system. Characterization of nuclear mutants of Saccharomyces cerevisiae with defects in mitochondrial ATPase and respiratory enzymes." J Biol Chem **250**(20): 8228-35.
- Ugalde, C., R. Vogel, et al. (2004). "Human mitochondrial complex I assembles through the combination of evolutionary conserved modules: a framework to interpret complex I deficiencies." Hum Mol Genet **13**(20): 2461-72.
- Voet, D., Judith Voet, 3^a Ed. (2007). Fundamentos de Bioquímica, Wiley.
- Vogel, R., C. Dieteren, et al. (2007). "Identification of mitochondrial complex I assembly intermediates by tracing tagged NDUFS3 demonstrates the entry point of mitochondrial subunits." Journal Biological Chemistry **282**: 7582-7590.
- Westermann, B., J. M. Herrmann, et al. (2001). "Analysis of mitochondrial translation products in vivo and in organello in yeast." Methods Cell Biol **65**: 429-38.
- Wittig, I., H. P. Braun, et al. (2006). "Blue native PAGE." Nat Protoc **1**(1): 418-28.
- Wittig, I., M. Karas, et al. (2007). "High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes." Mol Cell Proteomics **6**(7): 1215-25.
- Wolf, K., Ed. (1996). Nonconventional Yeast in Biotechnology, Springer.
- Zara, V., L. Conte, et al. (2009). "Evidence that the assembly of the yeast cytochrome bc1 complex involves the formation of a large core structure in the inner mitochondrial membrane." FEBS J **276**(7): 1900-14.
- Zickermann, V., K. Zwicker, et al. (2007). "Characterization of a subcomplex of mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) lacking the flavoprotein part of the N-module." Biochim Biophys Acta **1767**(5): 393-400.