



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**Facultad de Medicina de la UNAM**

“Caracterización cinética y estructural de la Ndi1 de *Saccharomyces cerevisiae* y aspectos evolutivos de la enzima”

**T E S I S**  
**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE:**  
**DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**P R E S E N T A**  
Matus Ortega Macario Genaro

TUTOR: Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez  
Facultad de Medicina de la UNAM

Comité tutorial: Dra. Rosario Muñoz Clares  
Facultad de Química de la UNAM

Dr. Juan Luis Rendón Gómez  
Facultad de Medicina de la UNAM

MÉXICO, D. F

Junio de 2014



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.

**ÍNDICE:**

**Página 3.....Resumen**  
**Página 4.....Abstract**  
**Página 5 ..... Abreviaturas**  
**Página 6.....Introducción**  
**Página 25.....Objetivos del proyecto**  
**Página 26.....Materiales y Métodos**  
**Página 32.....Resultados**  
**Página 57.....Discusión y conclusiones**  
**Página 69.....Bibliografía**

## RESUMEN

Las deshidrogenasas alternas están presentes en los tres grandes superdominios de la vida. Ellas catalizan una reacción semejante al complejo I de la cadena respiratoria clásica de las mitocondrias, pero no contribuyen a la generación de gradientes electroquímicos de protones.

Estos elementos alternos se encuentran localizados en la membrana mitocondrial interna orientados hacia la matriz (NDI1) o hacia el citoplasma (NDE1 y NDE2). Las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae* son un buen modelo para estudiar este tipo de elementos alternos pues carecen del complejo I, pero posee los tres elementos arriba descritos.

En este trabajo se abarcaron tres líneas de investigación centrados en describir la estructura, la cinética y algunos aspectos evolutivos de la NDI1 de *S. cerevisiae*.

En la primera parte del trabajo se hizo un análisis filogenético de la distribución de las NDH2 y se encontró que están presentes en animales inferiores, lo que implica que muy posiblemente sea un elemento ancestral que perdieron solamente los animales superiores, pero que está conservado en los demás taxa biológicos.

Para describir la distribución de la NDI1 dentro de la mitocondria, se realizaron zimogramas que revelaron que la enzima funciona como dímero, y que éste forma parte de supercomplejos implicados en la canalización de sustratos con elementos del complejo III y IV, pero no con el complejo II.

También se realizaron ensayos cinéticos en condiciones de estado estacionario y se encontró, entre varios aspectos relevantes, que la enzima sigue un mecanismo cinético dependiente del sustrato aceptor de electrones. Es decir, si el sustrato aceptor es hidrofílico, como es el caso del dicloro fenol indo fenol (DCPIP), la enzima sigue un mecanismo del tipo Ping Pong, pero si el sustrato oxidante es hidrofóbico, como las quinonas, el mecanismo cinético es al azar con la presencia de un complejo ternario entre la enzima y sus sustratos.

## ABSTRACT

The alternative NADH dehydrogenase are present in the three great tree super domains of life. They catalyze a similar reaction to the classical complex I of the respiratory chain of mitochondria, but do not contribute to the generation of an electrochemical proton gradient.

These alternative elements are located on the inner mitochondrial membrane, facing the mitochondrial matrix (ND11) or to the cytoplasm (NDE1 and NDE2). Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* are a good model to study this type of alternative elements, because they lack complex I, but contain the tree elements described above.

In this work, three research lines focused on describing the structure, kinetics, and some evolutionary aspects were covered ND11 *S. cerevisiae*.

In the first part of the this work a phylogenetic analysis of the distribution of NDH2 was made, and we found that they are present in some animals, implying that quite possibly an ancestral element that lost only the higher animals, but is preserved in the other biological taxa.

To describe the distribution of ND11 within yeast mitochondria ND11, zymograms were performed which revealed that the enzyme functions as a dimer, and this enzyme is part of supercomplexes involved in the channeling of substrates with elements of complex III and IV, but not with complex II.

Steady state kinetic assays were also performed and we found, among several relevant aspects, that the enzyme follows a kinetic mechanism depending on the electron acceptor substrate. That is, if the acceptor substrate is hydrophilic, as in the case of DCPIP, the enzyme follows a Ping Pong mechanism, but if the oxidant substrate is hydrophobic, as the quinones, the kinetic mechanism is random with the presence of a ternary complex between the enzyme and its substrates

## **ABREVIATURAS**

DAB Diamino benzidina

DCPIP Di cloro fenol indofenol

DDM Dodecil maltósido

EDTA ácido etilendiaminotetraacético

NDI1 NADH deshidrogenasa interna 1

NADH Nicotinamin adenin dinucleotido reducido

NOPDG N-octil-glucopiranósido

MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenyl tetrazolio bromuro

Tris 2-amino-2-(hidroximeil)-1,3-propanediol

PMS fenazina metsulfato

## **INTRODUCCIÓN**

---

### La levadura del ascomiceto *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudio

Las levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* se han tomado desde el siglo pasado como uno de los modelos predilectos para realizar investigación en diferentes campos de las biociencias, como son la genética, la biología molecular, la bioquímica, el control y la regulación metabólica, la cinética enzimática, así como para caracterizar los componentes de las vías de transducción de señales, entre otros [1].

Dado su amplio uso industrial para la obtención de etanol para la elaboración del vino, la cerveza, o bien para la generación de glicerol (otro metabolito altamente deseado en la industria cosmetológica, farmacéutica y automotriz), o para conseguir células que realicen fermentaciones que incrementen la calidad de los productos de la industria panadera, o incluso para la generación de biomasa útil como complemento alimenticio del ganado ovino y caprino, estas levaduras han sido objeto de una gran cantidad de estudios.

Algunas de las muchas ventajas que las células de *S. cerevisiae* muestran para realizar investigación científica son las siguientes:

A) Un tiempo de duplicación celular corto (cerca a las 2 horas en medios de cultivo completos), lo que permite generar grandes cantidades de biomasa en pocas horas de cultivo,

B) Una disgregación rápida de sus células en medios líquidos y sólidos, lo que facilita aislar y caracterizar mutantes de manera rápida y sencilla,

C) Crecen en medios de carbono y nitrógeno de bajo costo. Por lo que es sencillo utilizar medios alimenticios sencillos determinados (con todos sus componentes conocidos) o medios complejos (utilizando extractos de levadura), y evaluar en ellos la cinética de crecimiento y el camino que toman las rutas metabólicas bajo cada condición de estudio.

D) Se han caracterizado muchas de sus enzimas y se conocen las principales rutas metabólicas, lo cual permite establecer análisis de flujo y, evaluar la flexibilidad de las rutas metabólicas clarificando las entradas, los metabolitos encrucijada, las enzimas que controlan en cada condición de cultivo, así como también determinar y cuantificar las “fugas” de la biomasa.

E) Está completamente secuenciado su genoma y se han mapeado cerca de 6,000 genes codificantes para proteínas y diversos RNAs funcionales.

Este punto es importante porque permite una amplia “ventana de oportunidades” para realizar investigación en las biociencias. Entre ellas sólo considero conveniente mencionar la aplicación de herramientas de bioinformática para predecir genes que codifiquen proteínas, y a su vez con esta información inferir la presencia de diversas vías metabólicas. Lo que es de gran interés para el estudio de la biología de sistemas por sus aplicaciones a la industria [2, 3].

F) Es una célula eucariota, lo cual permite extrapolar a organismos complejos el funcionamiento y validez de los factores de transcripción, la identificación de regiones promotoras [4], o bien la elucidación de los componentes de diversas vías de transducción de señales [5] y el control de la duplicación genética [6].

En este mismo sentido, dado que las levaduras de *S. cerevisiae* cuentan con la maquinaria necesaria para llevar a cabo la gran mayoría de las modificaciones postraduccionales que requieren las proteínas eucariotas, también se utilizan como sistemas para la expresión de proteínas heterólogas [7], así como para evaluar la estabilidad de regiones cromosómicas o bien de fragmentos genómicos xenólogos de diferentes dimensiones [8, 9].



**Figura 1.** La levadura de *S. cerevisiae*. A) Contraste en campo claro tomada por el C. a Dr. Christian Adrián Cárdenas Monroy de B) Imagen de barrido obtenida a partir de <http://rodadabreja.wordpress.com/> y del libro Molecular Biology of the cell de Alberts, B. 4ª edición (1994).

G) Existen ceparios con mutantes individuales para cada uno de los genes de esta levadura. Esto es muy importante pues permite la evaluación particular de la interrupción individual de cada gen y su impacto en el metabolismo, ante diferentes condiciones de cultivo. Es decir, se permite establecer si existen funciones metabólicas “redundantes” en las enzimas de *S. cerevisiae*, o bien, si existen alternativas metabólicas que salven la deficiencia de una enzima que participa en una ruta particular.

### Las mitocondrias como centros del metabolismo celular

El funcionamiento correcto de la mitocondria es fundamental para cualquier célula eucarionte pues representa el principal sitio de generación del ATP que consume la célula de manera cotidiana [10-12].

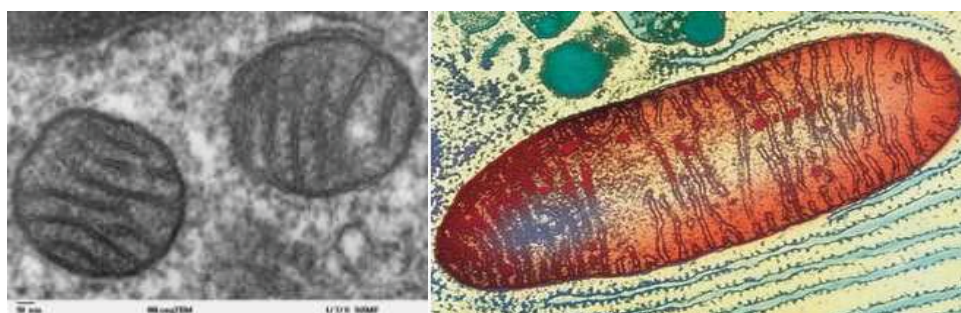
La mitocondria es un organelo celular cuya arquitectura muestra dos membranas de diferente composición (ver figura 2). La membrana externa tiene una composición aproximada de 50% de lípidos y 50% de proteína. Tiene un aspecto liso, es permeable a iones, al igual que a moléculas pequeñas y tiene un alto contenido de porinas, por lo que se propone que existe libre difusión de moléculas menores a 10 kDa (Voet y Voet, 2011).



En alto contraste, la membrana mitocondrial interna está compuesta en más de un 70 % de proteínas y el 30 % restante está constituido por lípidos membranales, de los cuales el colesterol está ausente. La membrana interna es impermeable al paso la mayoría de los metabolitos y moléculas pequeñas con excepción de el dióxido de carbono y el oxígeno molecular.

Por ello, la membrana mitocondrial interna además de ser un límite físico de la matriz mitocondrial, también desempeña un papel fundamental como una barrera selectivamente permeable, con lo cual es posible la generación del gradiente electroquímico de protones necesario para la fosforilación oxidativa.

La membrana mitocondrial interna presenta un alto número de crestas en las que se distribuyen los complejos respiratorios, descritos por Hateffi en la década de los años setenta del siglo XX, y es el escenario del transporte de electrones y la translocación de protones (Nelson y Cox, 2008).



**Figura 2.** Las mitocondrias. A. Microscopía electrónica de mitocondrias de pulmones humanos. B. Microscopía electrónica ilustrada de la mitocondria de hígado humano. Imágenes obtenidas en la página <http://remf.dartmouth.edu/images/mammalianLung>

También es en la mitocondria donde ocurren reacciones anapleróticas centrales para la biosíntesis de lípidos (cuerpos cetónicos, ácidos grasos, prostaglandinas, así como derivados isoprenoides como las quinonas, el dolicol fosfato, además del colesterol y sus estructuras derivadas), el ensamblaje de los grupos de porfirina y los centros de Fe-S (a partir de succinil CoA), así como la generación del oxaloacetato y el 2-oxoglutarato (que representan los dos principales sitios metapleróticos del ciclo de Krebs) [13]. Dentro de la mitocondria también ocurren reacciones fundamentales para el correcto metabolismo de los distintos compuestos derivados de oxígeno (como las especies reactivas de oxígeno) y de nitrógeno (ejemplo de ello son las poliaminas y el óxido nítrico), y aún para la regulación de los niveles calcio citosólico [14].

Las mitocondrias se han caracterizado por su relevante participación en el ciclo celular, pues están implicadas en fenómenos celulares como el envejecimiento, la longevidad, la apoptosis, el cáncer y la aparición de diversas enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson [15, 16], entre muchas otras.

Generalmente las mitocondrias contienen cuatro complejos respiratorios clásicos. Estos complejos realizan dos funciones esenciales para la síntesis de ATP, que son el transporte de electrones y el bombeo de protones [17-19], para así formar la fuerza protón motriz que utiliza la ATP sintasa mitocondrial (Devlin 2004 y Atkinson, D. E. 1977).

### **La generación del gradiente electroquímico de protones en las mitocondrias y su relación con las rutas metabólicas**

La fuerza protón motriz que permite la formación del ATP mitocondrial se produce en los complejos multienzimáticos que conforman el sistema oxidativo de la fosforilación oxidativa (OXPHOS, [20]) utilizando moléculas como el succinato y el NADH que actúan como donadores de electrones para las reacciones que catalizan los complejos I y II. Estos metabolitos (succinato y NADH) se generan en rutas oxidativas que ocurren dentro de la matriz mitocondrial o bien en el citoplasma (NADH que ingresa a las mitocondrias a través de sistemas “de lanzadera”). Ejemplo de estas rutas generadoras de poder reductor que ocurren dentro de la mitocondria son el ciclo de Krebs y la  $\beta$ -oxidación (que aportan NADH y FADH<sub>2</sub>), pero también hay reacciones individuales que generan NADH, como son la oxidación del  $\beta$ -hidroxibutirato para generar acetoacetato y la descarboxilación oxidativa del piruvato.

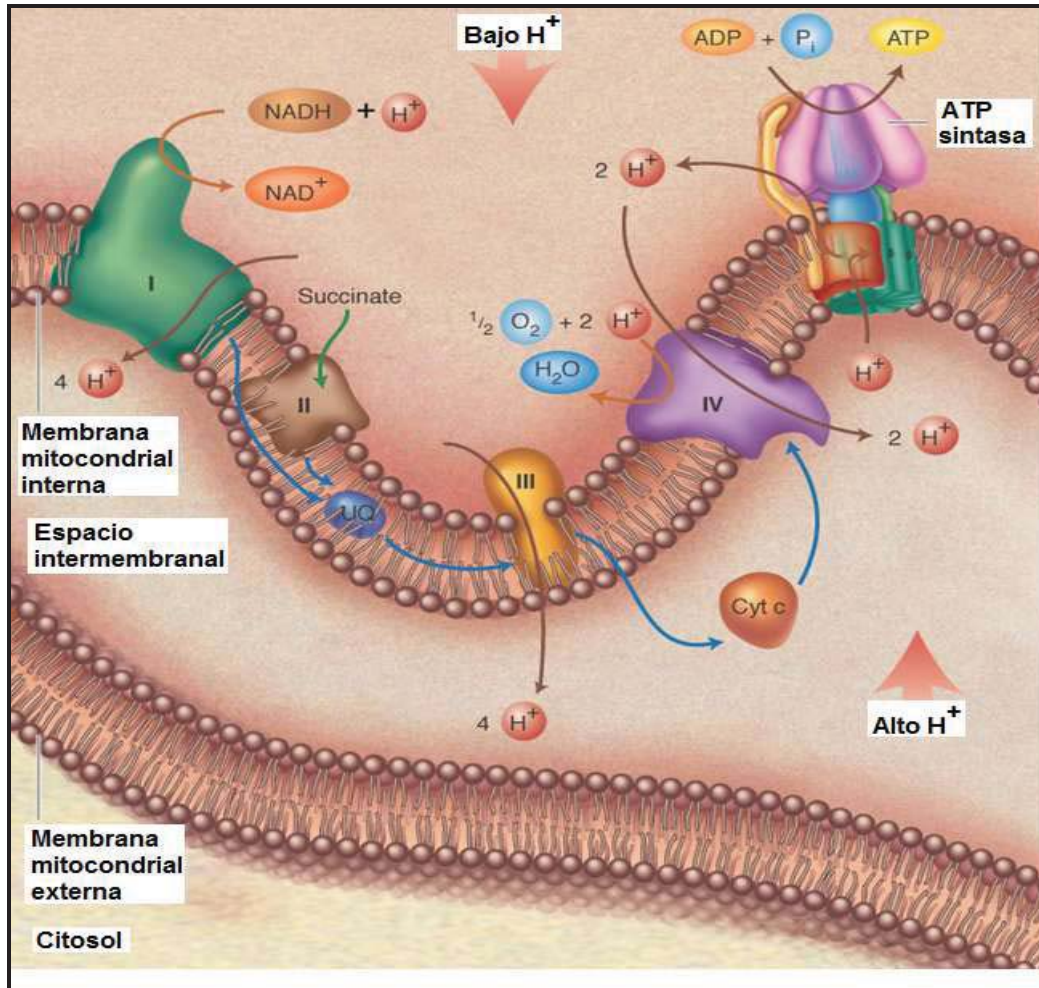
También existen otras reacciones que ocurren en el catabolismo de los aminoácidos que pueden aportar NADH o NADPH. Ejemplo de estas reacciones son la desaminación de la glutamina y la desaminación oxidativa del glutamato, así como reacciones de transdesaminación oxidativa implicadas en el catabolismo de los aminoácidos [21].

Fuera de la mitocondria el NADH se genera en su gran mayoría por la reacción catalizada por la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa de la glucólisis, mientras que el NADPH se genera por la glucosa-6 fosfato deshidrogenasa y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa, localizadas en el citosol y que forman parte de la fase oxidativa de la vía de las pentosas de fosfato (Voet y Voet, 2011). Además, las reacciones reversibles de etanol a acetaldehído y lactato a piruvato también pueden aportar NADH, mientras que la descarboxilación oxidativa del malato para generar piruvato realizada por la enzima málica citosólica puede generar poder reductor en forma de NADPH (Nelson y Cox, 2008).

Los complejos I y II de la cadena respiratoria oxidan a los dinucleótidos reducidos (NADH y succinato) generados en la mitocondria y transfieren los electrones a la quinona para que esos finalmente lleguen al complejo IV y permiten la formación del gradiente electroquímico de protones (Stryer, 6ª edición 2011). Sin embargo, para poder canalizar el poder reductor del NADH citosólico se deben utilizar sistemas de “lanzadera”, como la de malato-aspartato o la de glicerol fosfato deshidrogenasa, entre otras (Nelson y Cox 2008), o bien los dinucleótidos reducidos pueden ser oxidados directamente por deshidrogenasas no canónicas dependientes de quinona. Empero la presencia de

deshidrogenasas no convencionales se creía que estaba limitado a organismos como bacterias, plantas y hongos [22].

De esta manera, en las mitocondrias de mamífero, las dos principales entradas que alimentan con electrones a la cadena respiratoria son los complejos I y II (ver figura 3). El primero recibe el NADH formado en la matriz mitocondrial, conduce los electrones río abajo según los potenciales de óxido-reducción de cada uno de los centros FeS y hemo, al mismo tiempo que regenera el NAD<sup>+</sup>, lo que permite que haya más co-sustrato para realizar más oxidaciones dentro de las vías catabólicas.

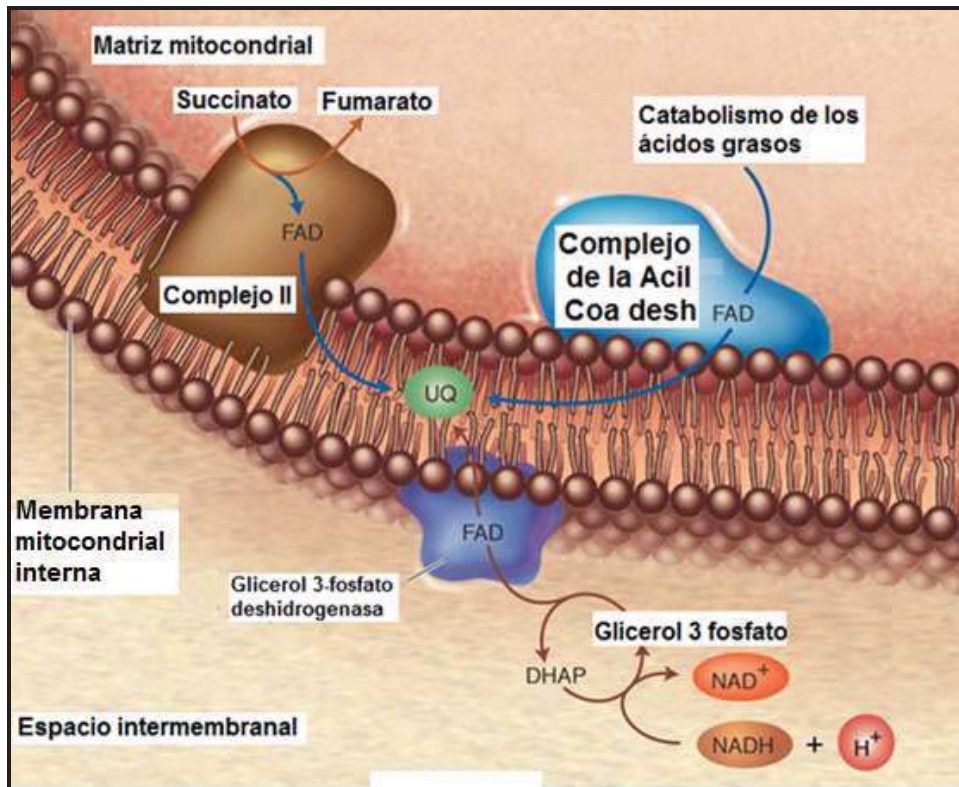


**Figura 3.** La cadena de transporte de electrones. En esta imagen se señalan las puertas de entrada de los electrones que alimentan a la cadena respiratoria. El papel de los complejos I y II es equivalente en pues ambos realizan reacciones de oxido-reducción y ceden sus electrones a la quinona, pero solo el complejo I es capaz de translocar protones a través de la membrana mitocondrial interna. Una vez que la quinona ha quedado reducida como quinol, este transportador de electrones internos dona posteriormente sus electrones al complejo III, en donde si hay translocación de protones. Ilustración del libro Principios de Bioquímica de Mckee.

De igual manera resulta muy importante el correcto funcionamiento del complejo II de la cadena respiratoria, pues a pesar de que no es un “centro conservador de energía” (pues no transloca protones hacia el espacio intermembranal [23]), en esta flavoproteína ocurre una función metabólica dual. La primera de ellas consiste en canalizar los electrones provenientes del succinato las quinonas, y de aquí hacia el complejo III y IV

(sitios en los que sí hay bombeo de protones). El segundo papel, es permitir función del ciclo de Krebs.

En este punto solo se necesita resaltar que existen varias FAD<sub>2</sub>-deshidrogenasas que cumplen un papel equivalente al complejo II en términos energéticos. Una de ellas es el complejo de la acil-CoA deshidrogenasa que realiza la primera oxidación del carbono β de los ácidos grasos activados como CoA; otra de ellas es la lanzadera de glicerol 3 fosfato deshidrogenasa (ver figura 4).



**Figura 4.** Otras entradas canónicas que alimentan a la cadena de transporte de electrones. En esta imagen se señalan las puertas de entrada de los electrones que permiten la reducción de las quinonas. Ilustración del libro Principios de Bioquímica de McKee.

Estas FAD-deshidrogenasas se consideran “lanzaderas de poder reductor” y cumplen una función muy importante, pues no solo re-oxidan a los dinucleótidos reducidos, sino también alimentan con electrones a la cadena respiratoria, y aunque no participan en la generación del gradiente electroquímico de protones, si permiten que río abajo en la cadena respiratoria ocurra un bombeo de protones impulsado por las reacciones redox de los complejos III y IV (McKee, 2008).

Un papel semejante a las lanzaderas convencionales es desempeñado por los elementos accesorios redox tipo NDH-2 que se encuentran en las mitocondrias de muchos protistas, hongos, plantas y animales primitivos [24]. Estos elementos que pueden participar en la oxidación del NADH y reducción de unas quinonas, o bien en ceder los electrones directamente al oxígeno, generalmente funcionan como proteínas

monoméricas que muestran un nivel de complejidad mínima en comparación con los elementos clásicos [25]. Esta característica los ha convertido en buenos candidatos para restaurar el funcionamiento de diversas mitocondriopatías relacionadas con la generación de radicales libres y el daño oxidativo asociado, o bien participar en la restauración del potencial electroquímico de protones y así combatir diversas enfermedades como las mitocondriopatías tipo Leder, tipo Leigh y diversos tipos de patologías Parkinsonianas desarrolladas en células modelo [26-30]. Este enfoque que ha abierto ventanas de oportunidades para la terapia génica en células humanas [23, 28, 30-32].

Es necesario recalcar que estos elementos alternativos tipo NDH-2 que alimentan a la cadena respiratoria de las bacterias, protistas, hongos y plantas no son indispensables, pero pueden ayudar a rescatar a las células cuando los elementos clásicos fallan en la cadena respiratoria [25, 33, 34], o bien pueden incrementar el tiempo de vida media de diversos tipos celulares eucariotes sin necesidad de someter a las células a una restricción alimentaria [35, 36].

### **Los complejos redox pueden formar supercomplejos oxidativos fosforilantes en las cadenas respiratorias**

Los complejos respiratorios fueron descritos originalmente en un contexto de un modelo de “estado líquido” (derivado del concepto de membrana fluida propuesto por Singer y Nicholson en la década de los 70s). En este modelo cada una de los complejos redox funciona como entidades multiproteicas cohesionadas que se comportan como monómeros independientes entre sí, que pueden difundir azarosamente en la bicapa lipídica de la membrana mitocondrial interna. En este modelo, el flujo de electrones ocurre por eventos de difusión acoplada y colisiones, en donde los acarreadores de electrones (la ubiquinona y el citocromo c) son móviles entre los complejos embebidos en la membrana mitocondrial interna (este es el modelo de difusión azarosa de Hackenbrock) [37].

Sin embargo, a finales de la última década del siglo XX y principios de este siglo comenzó a emerger un modelo de estado “sólido” en el que los complejos respiratorios se encuentran unidos físicamente y forman supercomplejos con alto grado de organización que permiten la canalización de los electrones e incrementan la velocidad de transporte de los electrones, disminuye la probabilidad de formación de radicales libres de oxígeno, y que pueden participar en incrementar la estabilidad de los complejos respiratorios [38]. A estas unidades formadas por los complejos respiratorios se les ha llamado sistema de supercomplejos oxidativos fosforilantes [38, 39] o “respirasomas” o “sintasomas”, según su composición [40].

La presencia de estos supercomplejos respiratorios ha sido descrita para bacterias y para todos los grupos de eucariotas (hongos, plantas y mamíferos [17, 41]). Aún cuando diversos tipos de supercomplejos han sido descritos, los respirasomas mejor representados en todos los phyla siguen una estequiometría III<sub>2</sub>-IV, I-III<sub>2</sub>-IV, I- III<sub>2</sub>-IV<sub>2</sub>. En

relación a la ATP sintasa la estequiometría que frecuentemente se obtiene corresponde a dímeros y tetrámeros ( $V_2$  y  $V_2-V_2$ ).

Se ha propuesto que la formación del dímero del complejo V, mediado por el extremo amino de las subunidades e y g (o sus proteínas homólogas equivalentes), forman un ángulo mayor a 90 grados que puede ser relevante para la curvatura de las crestas mitocondriales [42] y de los collares respiratorios (respiratory strings)[43].

### **La participación fisiológica de los elementos alternos en la cadena de transporte de electrones**

El mantenimiento de la homeostasis del potencial redox dado por los cocientes  $NADH/NAD^+$  y  $NADPH/NADP$  es muy importante en todas las células [44]. En las levaduras de *S. cerevisiae* al menos doscientas reacciones metabólicas están relacionadas con estos dinucleótidos, por lo que cualquier cambio en el balance redox de estos dinucleótidos puede generar grandes impactos en el metabolismo [45]. En diversos hongos y plantas se ha descrito que el correcto funcionamiento de las NAD(P)H deshidrogenasas alternas es importante para el mantenimiento del balance redox [46].

En las cadenas de transporte de electrones de diversos protistas, hongos y plantas se ha realizado una gran cantidad de trabajos experimentales, así como múltiples revisiones que están enfocados en describir la participación de los elementos alternos que oxidan al NADH. Los enfoques han sido muy variados, pues unos tratan de obtener fármacos que inhiban a estos elementos alternos que están ausentes en células de mamífero, pero que su funcionamiento es fundamental en los parásitos, y por ende representan blancos farmacológicos idóneos [24]. O bien, buscan dilucidar los mecanismos cinéticos de estas enzimas pues son elementos que pueden suplir parcialmente las funciones de los complejos respiratorios de células de mamífero [47, 48].

### **La prevención de la formación de radicales libres de oxígeno en la cadena de transporte de electrones a través de elementos alternos (NDH-2 y AOX)**

Desde la primera descripción de las NADH deshidrogenasas alternas (NDH-2) en las mitocondrias de plantas en 1961 por Bonner [49], se ha propuesto que la participación de las NADH deshidrogenasas alternas como alimentadores de la cadena de transporte de electrones puede ser muy importante, pues además de alimentar a la cadena de transporte de electrones, también pueden ayudar a mantener un balance redox que permita el desarrollo de ciclos catabólicos “sanos” dentro de las mitocondrias [50].

Este balance redox lo consiguen al realizar la rápida oxidación del NADH a  $NAD^+$ , lo que es fundamental para mantener activo al principal ciclo anfibólico celular (el ciclo de Krebs) [51], y permitir así una dinámica celular “sana” al mismo tiempo que se elimina el exceso de equivalentes reductores y se previene la formación de radicales libres de

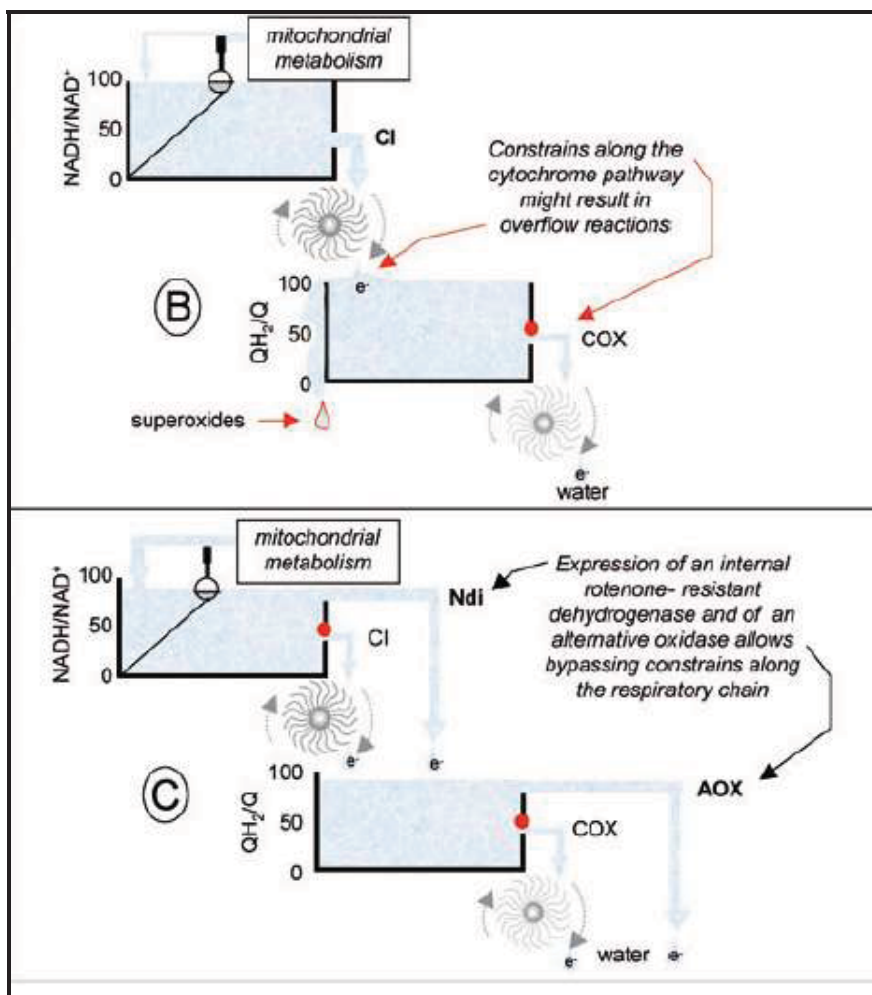
oxígeno [52]. Es decir, a mayor disponibilidad de  $\text{NAD}^+$  habrá mayor velocidad en las vías catabólicas, y de manera semejante, a mayor velocidad de consumo de NADH y su canalización en la cadena respiratoria, se producirá mayor energía en forma de ATP en las células para realizar la biosíntesis.

Sin embargo, como las NDH-2 no traslocan protones, gran parte de la energía proveniente del NADH se disipa sin generar un gradiente electroquímico de protones, al mismo tiempo que los electrones fluyen rápidamente hacia la quinona eliminándose así un sitio productor de radicales libres de oxígeno (como es el complejo I en las mitocondrias que sí lo presentan) [53].

De manera semejante se ha descrito el papel de las oxidasas alternas (AOX) en la cadena respiratoria. Estos elementos cumplen con una función auxiliar a la cadena de transporte de electrones que consiste en oxidar a la poza de quinonas y con esto pueden participar en la disminución de la generación de radicales libres de oxígeno. Esto es debido a que las AOX toman a la quinona reducida ( $\text{QH}_2$ ) y ceden sus electrones directamente al oxígeno para formar agua, evitando así que se acumulen radicales de semiquinona o bien, evitar que todos los electrones fluyan hacia el complejo III y posteriormente hacia el *citocromo c*, en donde también puede haber producción del anión superóxido. También, se ha propuesto la participación de las oxidasas alternas en la producción de calor, lo cual puede ser importante no solo para regular la homeostasis térmica celular, sino también puede ser importante para promover la polinización en las plantas con flores [54-56].

Aún cuando ambos elementos alternos realizan catálisis semejantes a las realizadas por el complejo I, los complejos III<sub>2</sub>-IV y IV, no bombean protones a través de la membrana mitocondrial interna, y por ende no participan directamente en la generación de potencial electroquímico, por lo que se les ha descrito como enzimas “no conservadoras de la energía metabólica”. Sin embargo se ha propuesto que esta característica pueda ser vista como una ventaja metabólica, pues ambos elementos alternos pueden proporcionar “flexibilidad metabólica” permitiendo el flujo de metabolitos en la vía oxidativa, pero eliminando los riesgos que representa el sobre flujo de electrones en la cadena respiratoria [57].

Más aún, Pierre Rustin y otros investigadores han propuesto la participación de estos elementos alternativos “poco eficientes” como “fugas” preventivas para aminorar el alto riesgo que representa la sobrecarga del flujo de electrones en las mitocondrias [23].



**Figura 5.** Modelo propuesto por Rustin en 2009 para explicar la ventaja que puede tener la participación de los elementos alternativos no conservadores de energía en las mitocondrias de mamíferos. En la analogía Pierre Rustin considera a la cantidad de NADH como el motor que permite la entrada de agua (electrones) en el complejo I (primer recipiente) con lo que se reduce la Quinona (medido como el cociente  $QH_2/Q$ ) hacia el complejo III y IV (segundo recipiente), y permite el bombeo de protones hacia el espacio intermembranal (turbina) como forma de generación de energía. Imagen modificada de la referencia [23].

Dada la variedad de las funciones de los elementos alternativos, en este trabajo nos enfocaremos en la caracterización de las deshidrogenasas de NADH, por lo que dejaremos en segundo plano el estudio de las oxidasas alternas.

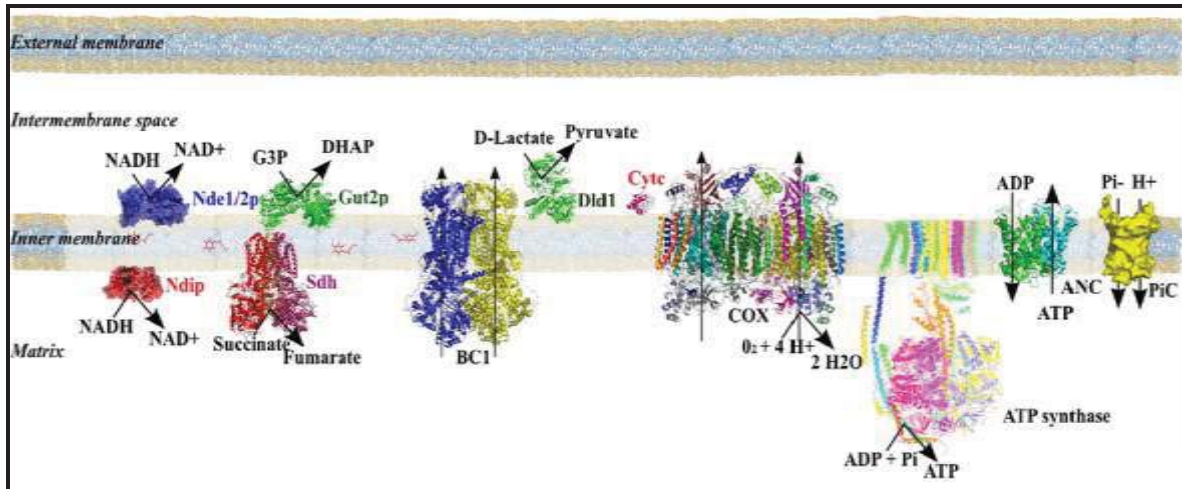
### Las tres NADH deshidrogenasas de *Saccharomyces cerevisiae*

En la mitocondrias de diversos hongos y plantas, o en las cadenas respiratorias de las bacterias, se pueden encontrar diversas combinaciones de los elementos alternativos que oxidan el NADH y el complejo I. Por ejemplo, *N. crassa* posee, además del complejo I tradicional, una NADH deshidrogenasa alterna interna y otra externa, *Y. lipolítica* posee al complejo I y sólo una NADH deshidrogenasa externa. La papa, *Solanum*



*tuberosum*, también posee el complejo I sensible a rotenona y dos deshidrogenasas de NADH (una interna y otra externa) sensibles a flavona. En el caso de *E. coli*, está presente el complejo I y una deshidrogenasa que mira hacia el citoplasma.

Sin embargo, las mitocondrias de ciertos hongos, como *S. cerevisiae* y *K. lactis*, no cuentan con el complejo I, pero en su lugar se encuentran tres deshidrogenasas alternas, una con orientación hacia el mitosol, y dos que miran hacia el espacio intermembranal [58]. Ambas levaduras muestran un metabolismo “respiro-fermentativo”.



**Figura 6.** Cadena respiratoria de *S. cerevisiae* que muestra las tres deshidrogenasas alternas presentes en la membrana mitocondrial interna de la mitocondria del hongo. También se señalan otras entradas de electrones importantes como son la lanzadera de glicerol 3- fosfato (Gut2p) y la lactato deshidrogenasa no canónica (Dld 1), además del complejo de la succinato deshidrogenasa (complejo II clásico). La imagen fue tomada de la referencia [51].

### Las rutas metabólicas dependen de la fuente de carbono y de las condiciones en que las células sean cultivadas

Cuando las levaduras de *S. cerevisiae* se cultivan en medios cerrados muestran un metabolismo respiro-fermentativo (efecto Crabtree); sin embargo, cuando son colocadas dentro de sistemas cerrados, como son los quimiostatos, siguen un metabolismo respiratorio con nula generación de productos fermentativos (etanol, glicerol y acetato) [59].

Christensen y colaboradores cuantificaron el flujo de los metabolitos cuando las levaduras de *S. cerevisiae* se cultivan en ambas condiciones [60], generando el siguiente esquema que representa de forma cuantitativa, mol por mol, la producción de cada intermediario obtenido.

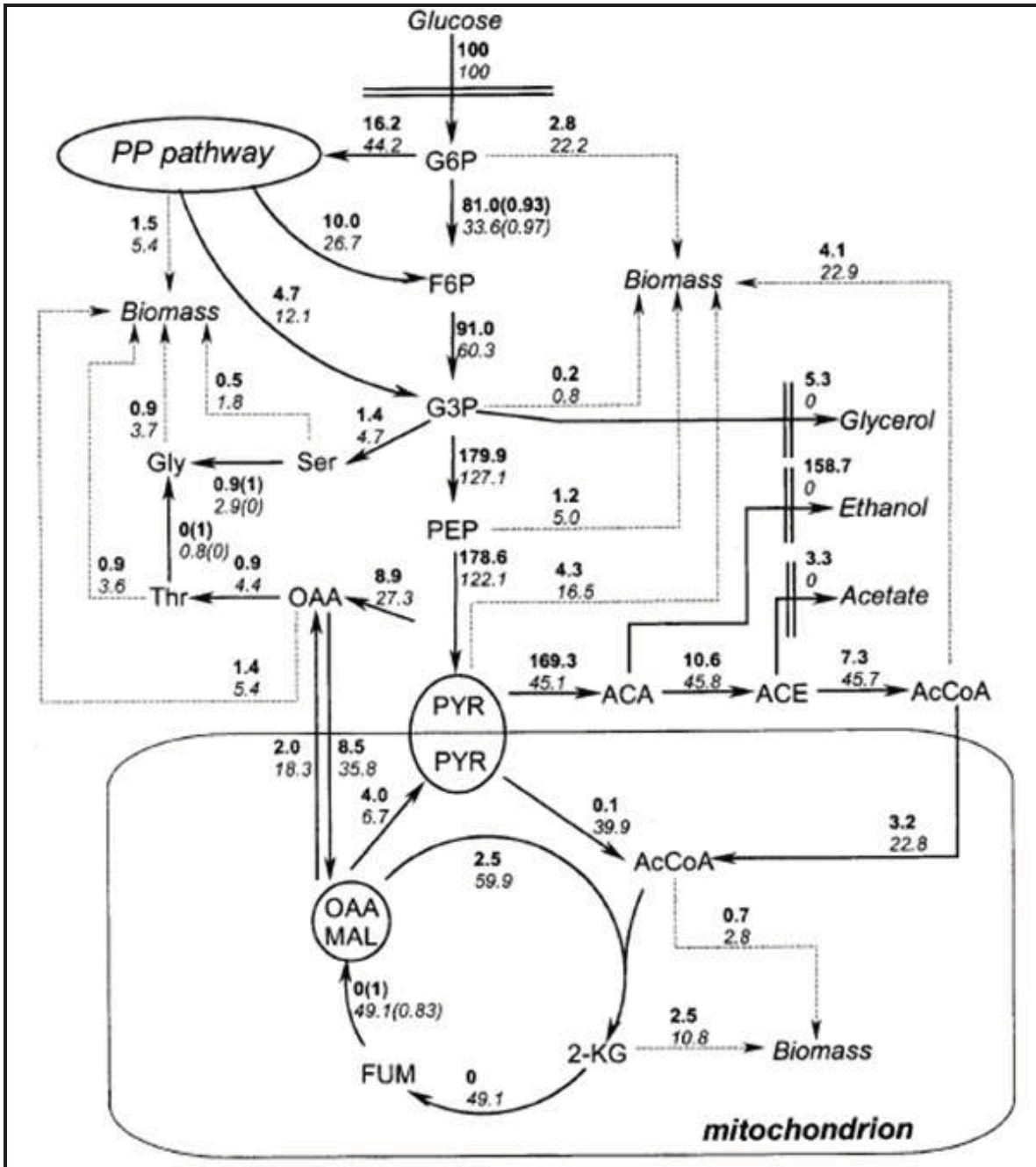


Figura 7. Esquema que marca los flujos de carbono y su distribución en la vía glucolítica y el ciclo de Krebs. Se toma como un valor absoluto de 100 la glucosa colocada en condiciones de respiración fermentativa (negritas), en itálicas se marcan los valores cuando las condiciones son solo respiratorias. La imagen fue tomada de la referencia [90].

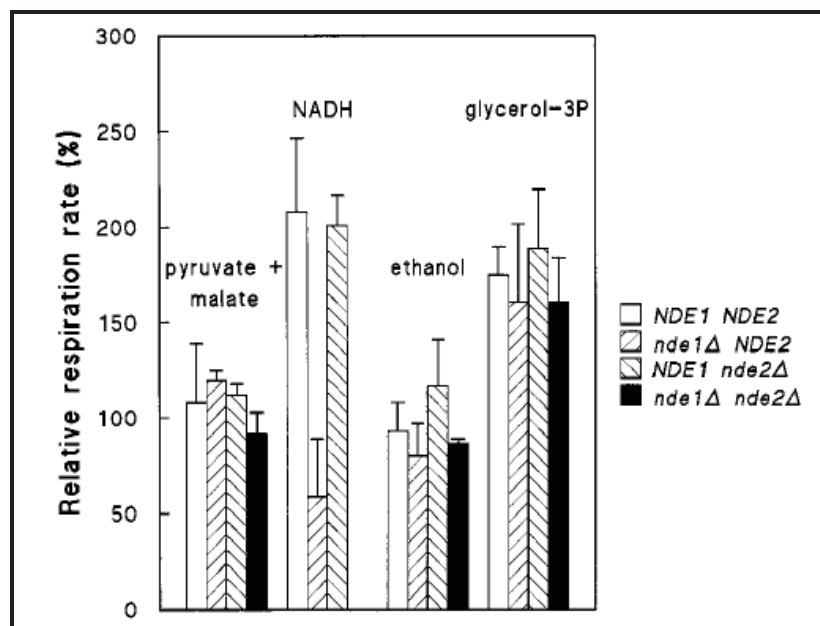
**Las mitocondrias de *S. cerevisiae* pueden ser alimentadas con diferentes sustratos fermentativos y respiratorios y las tasas respiratorias son distintas**

Cuando las mitocondrias de *S. cerevisiae* se alimentan con sustratos respiratorios que promueven la formación de NADH endógeno (como el par piruvato-malato, o  $\alpha$ -

cetoglutarato-malato), la NADH deshidrogenasa interna (Ndi1) es la principal puerta de entrada para los electrones a la cadena respiratoria. Sin embargo, si se coloca NADH exógeno directamente a las mitocondrias de *S. cerevisiae*, son las NADH deshidrogenasas externas (NDEs) quienes proveen de electrones a la poza de quinonas [25, 61].

Otros sustratos oxidables que alimentan a la cadena respiratorio de esta levadura son el glicerol 3-P, que alimenta a la lanzadera de glicerol 3 fosfato (Gut2p); el etanol que ingresa al mitosol y dentro es oxidado a acetaldehído generando NADH por la alcohol deshidrogenasa. O bien, pueden ser alimentadas con succinato para energizar así a la cadena a través del complejo II.

A este respecto, es muy interesante que la tasa de consumo de oxígeno de las mitocondrias sea dependiente del sustrato alimentador. Por ejemplo, en las mitocondrias acopladas de *S. cerevisiae*, se alcanzan mayores velocidades de respiración y mejores cocientes respiratorios cuando se añade NADH exógeno y es la NDE1 quien canaliza los electrones hacia las quinonas. En la misma forma, también resulta muy interesante el hecho de que la NDE2 sea una enzima “dispensable” y la interrupción de su gene, no arroje un fenotipo característico (ver figura 7).



**Figura 8.** Caracterización de las NDEs de la mitocondria de *S. cerevisiae*. Este diagrama de barras muestra las tasas de respiración relativas en cuatro mutantes de las NADH deshidrogenasas externas (NDEs) de *S. cerevisiae*. La nomenclatura utilizada por estos autores es la siguiente: CEN PK 113-7D (Wild Type o cepa silvestre), CEN PK 152 ( $\Delta$ NDE1), CEN PK 162 ( $\Delta$ NDE2) y CEN PK 167-2B ( $\Delta$ NDE1,  $\Delta$ NDE2) Figura tomada de la referencia [61]

En este mismo sentido, Pahlman y colaboradores en 2002 mostraron que la eliminación de una u otra de las dos deshidrogenasas externas de *S. cerevisiae* puede conducir a un incremento en la actividad de la enzima restante [62], mientras las mutantes

ΔNDEI sí disminuyen las tasas de crecimiento en medios que tienen como fuente de carbono al etanol o la galactosa, pero no en medios con glucosa [61].

TABLE III  
Substrate-dependent rates of oxygen consumption by mitochondria from wild-type *S. cerevisiae* CEN.PK113-7D and null mutants in open reading frames YMR145c (NDE1) and YDL085w (NDE2)

Cells were pregrown in aerobic, glucose-limited chemostat cultures at a dilution rate of 0.10 h<sup>-1</sup>. The oxygen uptake rates given were measured in the presence of 0.25 mM ADP; respiratory control (RC) values represent the ratio of respiration rates in the presence and absence of ADP. Experimental results are the average ± S.D. (σ<sub>n</sub>) of measurements with at least two independent mitochondrial isolations for each strain.

Substrate	<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK113-7D (NDE1 NDE2)		<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK152 (nde1ΔNDE2)		<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK162 (NDE1 nde2Δ)		<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK167-2B (nde1Δnde2Δ)	
	O <sub>2</sub> uptake rate	RC	O <sub>2</sub> uptake rate	RC	O <sub>2</sub> uptake rate	RC	O <sub>2</sub> uptake rate	RC
	$\mu\text{mol} \cdot (\text{mg protein})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$							
NADH	0.22 ± 0.06	3.0 ± 0.3	0.08 ± 0.04	1.8 ± 0.2	0.28 ± 0.01	2.6 ± 0.1	0.0 ± 0.0	
Malate + pyruvate	0.11 ± 0.01	1.7 ± 0.1	0.16 ± 0.01	2.0 ± 0.3	0.15 ± 0.01	2.0 ± 0.2	0.15 ± 0.02	2.0 ± 0.1
Ethanol	0.10 ± 0.02	1.4 ± 0.1	0.11 ± 0.02	1.4 ± 0.1	0.16 ± 0.03	1.7 ± 0.1	0.15 ± 0.03	1.6 ± 0.1
L-glycerol-3-phosphate	0.18 ± 0.04	2.3 ± 0.1	0.22 ± 0.06	2.5 ± 0.3	0.25 ± 0.04	2.2 ± 0.3	0.26 ± 0.03	2.6 ± 0.3
Succinate	0.10 ± 0.02	1.6 ± 0.1	0.13 ± 0.01	2.4 ± 0.4	0.13 ± 0.02	1.9 ± 0.2	0.17 ± 0.04	3.0 ± 0.3

**Figura 9.** Tabla que muestra las tasas de consumo de oxígeno y los coeficientes respiratorios de las cepas CEN PK 113-7D (Wild Type), CEN PK 152 (ΔNDE1), CEN PK 162 (ΔNDE2) y CEN PK 167-2B (ΔNDE1, ΔNDE2). Figura tomada de la referencia [61]

El funcionamiento de estos tres elementos alternos puede ser suplementado por otras NADH deshidrogenasas heterólogas. Vemuri y colaboradores en 2006 [46], construyeron una cepa de *S. cerevisiae* que corresponde a una triple mutante que carece de los tres genes codificantes para las NDs alternas, pero colocó una NADH oxidasa (NOX) (de *S. pneumoniae*) que pasa directamente los electrones al oxígeno para formar agua, y con ello restituyó la generación de la biomasa en fuentes de carbono como glucosa, etanol y glicerol. Otro punto importante es que el consumo de NADH citosólico por las dos NDEs externas, conduce a una inhibición de la lanzadera de glicerol 3 fosfato deshidrogenasa, y únicamente después que el NADH se consume, comienza a trabajar esta lanzadera [62] y sorprendentemente la ausencia de la lanzadera disminuye también el funcionamiento de las NDEs. Es decir, aún cuando físicamente no se propone que exista un contacto físico que permita esta regulación cruzada, estos autores plantean que hay una regulación cinética entre ambos sitios redox.

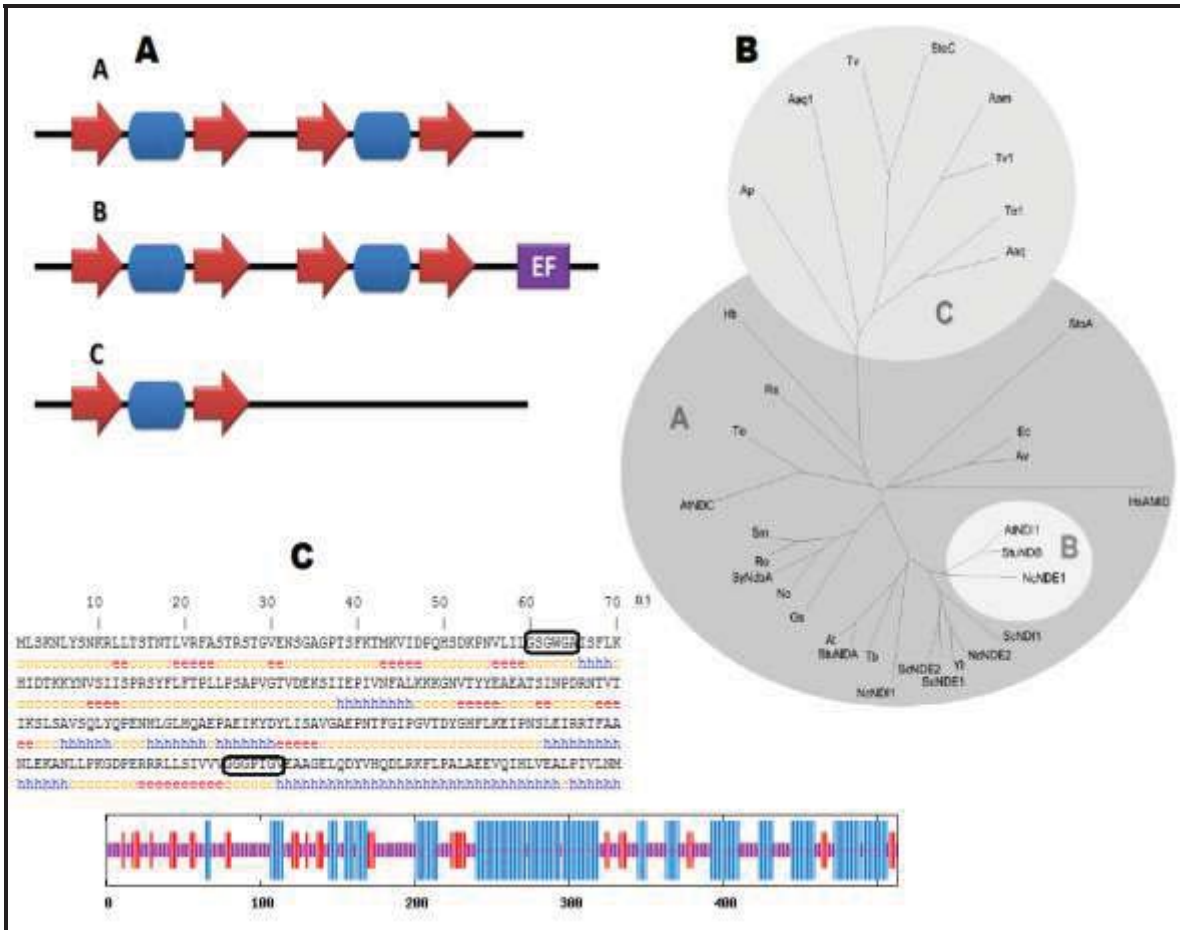
### Las NDH-2 de arqueas, bacterias y eucariotas son homólogos y conservan motivos estructurales y de unión de ligando característicos

Las NDH-2 son proteínas insensibles a los inhibidores clásicos del complejo I como la rotenona, el amital, la piericidina A y la capsaicina, pero en cambio son fuertemente inhibidas por derivados de flavona como la platanetina (6-dimetil-3,5,7,8-tetrahidroxiflavona) [63]. El rango de inhibición de estos compuestos es muy variado pues está reportado una I<sub>50</sub> de 200 nM para la NDH2 externa de *Y. lipolytica* con la HDQ (1-hydroxy-2-dodecil-4 (1H)-quinolona), o una I<sub>50</sub> de 2 μM para la NDH2 interna de la papa *Solanum tuberosum* [64].

El peso molecular de la mayoría de estas proteínas oscila alrededor de los 50 o 60 mil daltones (kDa) con un FAD unido de forma no covalente a la enzima. En todos los casos reportados, las NDH-2 no representan un sitio redox “conservador de la energía”, sino solo sitios de transferencia de electrones hacia la cadena respiratoria [52].

Las estructuras primarias de estas proteínas contienen las secuencias GXGXXG y GGGXGX necesarias para la unión del NADH, FAD o FMN. Estas secuencias generalmente se encuentran dentro de la primera unión entre la lámina  $\beta$ 1 y la hélice  $\alpha$  de las estructuras secundarias  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$  que están repetidas dos veces dentro de la estructura secundaria predicha para las NDH-2 [65] (ver paneles A y C de la figura 7).

Generalmente en el extremo de la segunda lámina  $\beta$  de este dominio existe un residuo de aminoácido con un grupo hidroxilo que realiza un puente de hidrógeno con los grupos OH 2' y 3' de la ribosa del NADH [66]. Aún cuando se ha reportado que varias deshidrogenasas alternas pueden tomar al NADPH como sustrato, es incierto cuál es la diferencia que correlacione su estructura primaria con la especificidad de los sustratos. Kerscher *et al*, proponen que el primer dominio  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$  es el sitio de unión para el NADH, mientras el segundo es el sitio de anclaje del anillo de isoaloxacina (FAD); sin embargo, en estas mitocondrias faltó la información estructural respaldada por estructuras tridimensionales resueltas por la técnica de cristalografía de rayos X.



**Figura 10.** Estructura secundaria de las NDH-2. En el panel A se esquematizan los tres grandes grupos de la NDH-2. El primer grupo A presenta un repetido del pliegue  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$  (estructuras  $\beta$  en flechas rojas y hélices  $\alpha$  en cilindros azules) en el que se encuentran las secuencias GXGXXG y GGGXXG de unión a los dinucleótidos. El segundo grupo B, además presenta un dominio de unión a calcio EF. En alto contraste el tercer grupo C, solo presenta un dominio de unión a dinucleótido. En el panel B se observa el dendograma de las NDH-2 realizado por Melo *et al.* en 2004 en donde esquematiza la división de los tres grupos de las proteínas NDH-2. En el panel C se coloca la predicción de estructura secundaria (realizado con el programa GOR 4 del portal de programas bioinformáticos EXPASY tools) de la NADH deshidrogenasa interna (NDI1) de *S. cerevisiae* y se encierra en óvalos negros las secuencias de unión de los dinucleótidos.

Dentro de las NDH-2 existen tres grupos bien definidos, que además de los dos dominios de unión a los dinucleótidos, pueden tener un dominio EF de unión a calcio (NDH-2 tipo B), o bien tener un solo dominio de unión a dinucleótido con la flavina unida de forma covalente (NDH-2 tipo C; ver en la figura 7 los paneles A y B).

Las NDH-2 se encuentran ampliamente distribuidas en todos los dominios biológicos (ver el panel B de la figura 7). Existen organismos que tienen genes para la NDH-2 en el dominio de las Arqueas, las Eubacterias, y en diversos Eucariotas como plantas, hongos, varios protistas y, más interesante aún en animales “inferiores” de vida marina (ésta es una de las aportaciones que hacemos en este trabajo doctoral). En todos ellos, la identidad y la similitud de las secuencias es alta [52], lo que implica que estos genes están sometidos a presiones evolutivas altas en las que resulta fundamental el

mantenimiento de los dominios funcionales de estas proteínas para la supervivencia de los organismos.

### La topología de las NDH-2 y su localización en las membranas para 2010

Poco o nada se conocía acerca de la estructura terciaria de las NDH-2. Salvo modelos *in silico* [67], el único reporte experimental sobre la topología de estas enzimas fue realizado por Ana P. Melo en 1999 trabajando con la NDH-2 interna de *Neurospora Crassa* [68]. En este artículo, la proteína de 64 kDa, obtenida en mitocondrias acopladas y en mitoplastos obtenidos por hinchamiento, fue insensible a la degradación por la proteinasa K, excepto cuando las mitocondrias solubilizadas con concentraciones mayores al 1% de digitonina y son sonicadas.

Cuando se utilizan programas para determinar la hidrofobicidad de proteínas no resulta clara la presencia de algún un cruce transmembranal en las NDH-2 (ver figura 11).

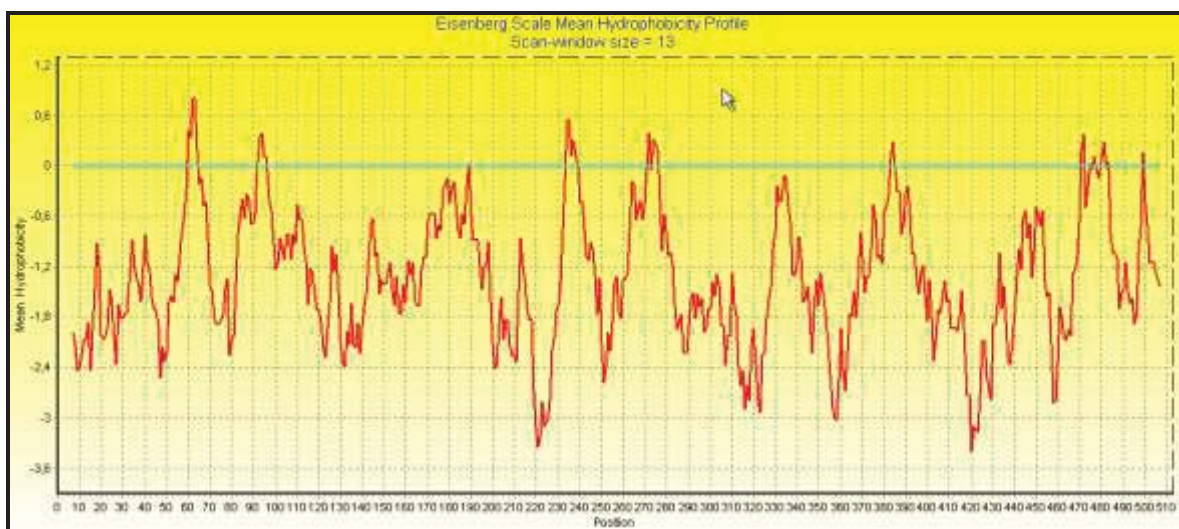
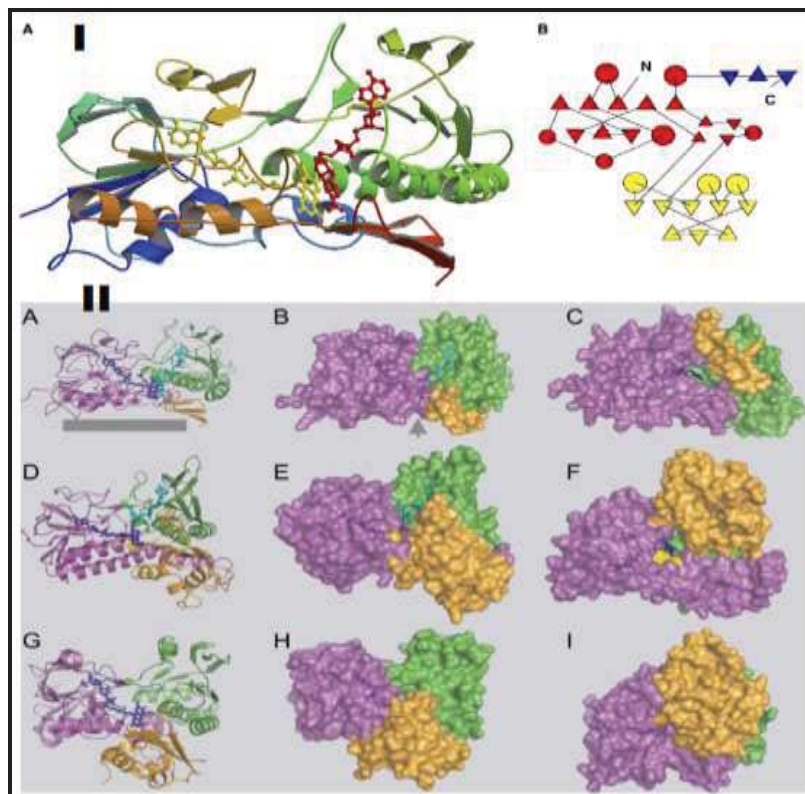


Figura 11. Perfil hidrofóbico de la NDI1 de *S. cerevisiae*. Entre mayor es el valor de hidrofobicidad mayor es la probabilidad de que las regiones se localicen dentro de las membranas mitocondriales. Este perfil fue realizado utilizando el algoritmo de Eisenberg en las utilerías de la suite de software Bioedit Sequence Alignment Editor 2009.

### Los modelos tridimensionales propuestos para las NDH-2

A falta de evidencia experimental obtenida por difracción de cristales de alguna NDH-2, los modelos teóricos predicen que este tipo de proteínas está caracterizado por un dominio N y otro C terminal en los que cada uno contiene 5 pares de láminas  $\beta$  paralelas flanqueadas por una tapa de 3 pares de láminas  $\beta$  antiparalelas (ver paneles I, IIA, IID y IIG de la figura 9). En todos los modelos realizados por homología, el tramo menos conservado está localizado en el C terminal, en donde la predicción de la estructura de los últimos 48 residuos de aminoácidos no fue posible [67].

Con base en estos modelos se propone que existe una orientación planar entre el anillo de isoaloxacina del FAD y el anillo de nicotinamida del NADH, por lo que durante la catálisis se forma una estructura de “triple sándwich” para realizar la transferencia de los electrones hacia la quinona dentro de la enzima [67].



**Figura 12.** Modelos estructurales de diferentes enzimas relacionadas con la NDH-2. Los modelos fueron hechos con el método de homología. Las figuras A, B y C fueron realizadas tomando como templado la estructura cristalográfica del PDB 1OZK correspondiente a una enzima NDH-2 tipo de *E. coli*. Las figuras D, E y F tienen como molde a la lipoamida deshidrogenasa de *P. putida* (PDB: 1LVL), finalmente las últimas 3 figuras (G, H e I) tienen como base la AIF de *H. sapiens* (PDB: 1M6I). La barra gris debajo de la figura A señala la posible posición de la membrana mitocondrial interna. La flecha gris abajo del modelo B señala el eje vertical sobre el cual son girados 90 grados todos los modelos. En todos los modelos el dominio de unión al anillo de FAD se observa en color morado, el dominio de unión al NADH en verde y en naranja el extremo carboxilo. Los ligandos FAD y NADH están coloreados en azul claro y azul oscuro, respectivamente. Las visualizaciones de los modelos fueron generadas con PYMOL v 0.9. Figura tomada del capítulo 1 de la bibliografía (Kerscher S. *et al* 2007).

Esta propuesta de la formación de un complejo ternario entre los dos ligandos con las NDH-2 fue desechada inicialmente, pues la evidencia experimental obtenida por ensayos de cinética indicaban que la cinética de la enzima sigue un mecanismo no secuencial de tipo “Ping-Pong” [48, 64, 69] ante ligandos como el dicloro fenol indofenol (DCPIP) y la dodecil benzoquinona (DBQ).

Fue hasta marzo de 2011 cuando, a través de ensayos espectrofotométricos y cinéticos, Yagi *et al* [47] propone que la NDI1 une los dos ligandos de manera simultánea durante su catálisis. En este punto conviene aclarar que demostrar que el mecanismo cinético de la NDI1 implicaba la formación de un complejo ternario era el objetivo central de esta tesis de doctorado. Sin embargo, este resultado fue publicado durante el



transcurso del periodo de redacción del artículo, por lo que esta tesis tuvo que cambiar su dirección y enfoque.

**Las propiedades cinéticas de las NADH deshidrogenasas.** Antes del año 2011, el consenso entre los diferentes grupos de investigación en el mundo era que las NDH-2 trabajaban siguiendo un modelo cinético de tipo “Ping-Pong”, y los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{max}$  de 10 NADH deshidrogenasas de diferentes organismos se resume en la tabla 1.

Organism	Group	$E_m$	$K_m$ ( $\mu$ M)	Mm (kDa)	Flavin	QBS
<i>E. coli</i>	A	ND <sup>d</sup>	50	45	FAD	IB
<i>A. vinelandii</i>	A	ND	13	ND	FAD	IB
<i>Synechocystis</i>	A	ND	ND	49 <sup>c</sup>	FAD	IB
<i>A. ambivalens</i>	C	+70	6	47	FMN	IA
<i>S. metallicus</i>	C	+160	2	49	FMN	ND
<i>T. brucei</i>	A	ND	120	2 × 33	FMN	IC
<i>Y. lipolytica</i>	A	ND	15	66 <sup>c</sup>	FAD	IB
<i>S. cerevisiae</i>						
NDH1	A	-370	31, 9 <sup>a</sup>	53	FAD	IA
NDE1	A	ND	ND	62 <sup>c</sup>	FAD	IB
NDE2	A	ND	ND	65 <sup>c</sup>	FAD	IB
<i>N. crassa</i>						
NDH1	A	ND		57	FAD	IB
NDE1	B	ND	11 <sup>b</sup>	64	FAD	IB
NDE2	A	ND	12	65 <sup>c</sup>	FAD	IB
<i>S. tuberosum</i>						
NDA	A	ND	14 <sup>b</sup>	55 <sup>c</sup>	FAD	IA
NDin	ND	ND	14 <sup>b</sup>	ND	FAD	ND
NDB	B	ND	ND	65	FAD	IC
NDex	ND	ND	ND	ND	FAD	ND

<sup>a</sup> Values obtained using  $Q_6$  or DCPIP, respectively.  
<sup>b</sup> The experiments were carried out with intact mitochondria (*N. crassa*) or inside-out submitochondrial particles (*S. tuberosum*); thus, the  $K_m$  values stand for external or internal NAD(P)H dehydrogenases, respectively.  
<sup>c</sup> Estimated from the sequence of the precursor protein.  
<sup>d</sup> ND, not determined. Fingerprints of type 1 Quinone-Binding Sites (QBS): type IA L(X)<sub>3</sub>H(X)<sub>2</sub>T, type IB (A/L/I)(X)<sub>3</sub>H(X)<sub>2</sub>L, and type IC L(X)<sub>3</sub>H(X)<sub>3</sub>S.

Tabla 1. Resumen de los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  y de las NDH-2 de 10 diferentes organismos. La tabla fue tomada de la referencia [52].

## OBJETIVOS DEL PROYECTO DOCTORAL:

Los **objetivos generales** de este proyecto fueron los siguientes:

- 1) Plantear un modelo que explique el mecanismo cinético de la NADH deshidrogenasa interna (Ndi1) de *S. cerevisiae* ante distintos aceptores de electrones.
- 2) Aportar información, bioinformática y experimental, sobre la estructura tridimensional de la enzima.
- 3) Ahondar en la línea evolutiva de las NDH2 a través del árbol de la vida, haciendo un análisis profundo en las secuencias publicadas en los diferentes bancos de información biológica.
- 4) Realizar zimogramas para caracterizar y analizar la distribución de la ND11 en los los supercomplejos respiratorios.

Los **objetivos particulares** que se cumplieron son:

- A. Sobre-expresar la proteína recombinante de *S. cerevisiae* en *E. coli*.
- B. Purificar la enzima a través de cromatografía de afinidad (Ni-NTA).
- C. Evaluar el mecanismo cinético en presencia de quinonas y con inhibidores.
- D. Obtener valores de unión ( $K_d$ ) por sus ligandos.
- E. Conocer la estructura cuaternaria de la enzima e identificar a las proteínas con las que interactúa en su entorno natural dentro de la mitocondria.
- F. Construir árboles filogenéticos de las NDH2 que reflejen la distribución e historia evolutiva de este tipo de proteínas en los tres grandes superdominios de la vida.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La estrategia seguida durante este proyecto se muestra en el siguiente diagrama:



### Bioinformática

Las secuencias de residuos de aminoácidos se obtuvieron del portal de genes de la National Center of Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) y del portal expasy (<http://www.expasy.org>).

Los alineamientos múltiples locales en bloque (BLAST Basic Local Alignment Search Tool) se realizaron en los mismos sitios utilizando las herramientas gratuitas que ahí están disponibles. Los programas de bioinformática que se utilizaron para realizar los alineamientos totales son los siguientes: Clustall W y BIOEDIT. Todos alineamientos fueron realizados utilizando una matriz de sustitución por bloques “BLOSUM 62” (Blocks of Amino Acid Substitution Matrix), en la opción de alineamiento múltiple total generando siempre 1,000 “arranques” en la opción “bootstrap- NJ”.

También se hicieron alineamientos múltiples incrementando las restricciones de la matriz, o bien utilizando las matrices tipo PAM (Point Accepted Mutation), DAYHOF y GONET en ambos programas. Los alineamientos en “matriz comparativa punto por punto” de las secuencias de aminoácidos (Dot blots), así como la obtención de los porcentajes de similitud e identidad de las NADH deshidrogenasas, se realizaron con la utilería de

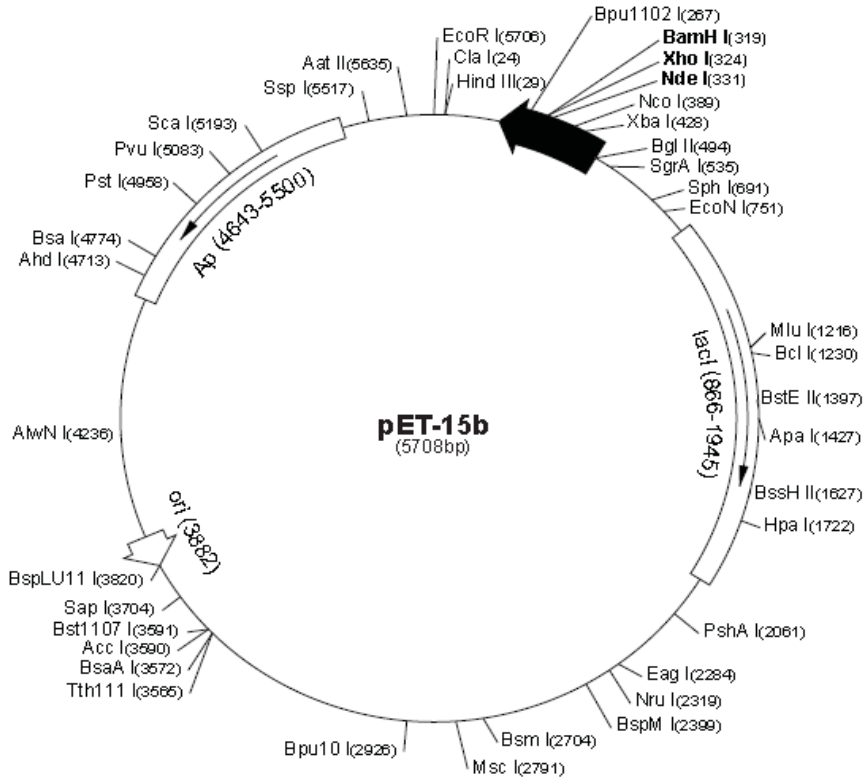
BIOEDIT, utilizando diferentes algoritmos de comparación para obtener la “comparación pareada”. Para construir los árboles filogenéticos se utilizó el programa MEGA (molecular evolutionary genetics analysis) en el cual se escogieron diversos algoritmos para generar los cladogramas. Los algoritmos seleccionados fueron máxima parsimonia y mínima evolución, que construyeron árboles con topología y distancias congruentes entre sí.

Para realizar la predicción de la estructura secundaria se usaron diversos programas como GOR4, JUFO y SOPMA, entre otros. Estos programas fueron seleccionados por que combinan índices de hidropatía y análisis de similitud basada en proteínas bien conocidas de forma simultánea. Para generar modelos en 3D se utilizaron los programas localizados en el portal <http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali/start> del programa de biotecnología “Dali protein” de EMBL (European Molecular Biology Laboratory). En este punto utilicé estrategias de homología y entrelazado (threading building blocks).

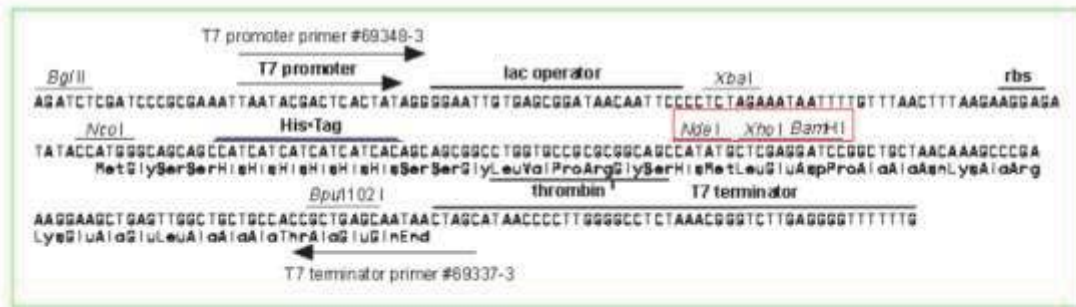
Asimismo, para generar modelos tridimensionales de la NDI1 utilicé los programas ESY Pred 3D <http://www.fundp.ac.be/sciences/biologie/urbm/bioinfo/esypred/>), I TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). La validación de los modelos generados se hicieron utilizando los programas de PROCHECK del RSCB-PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) en el que se utilizaron los criterios de RMS, z-score, y los gráficos de Ramachandran. La visualización y superimposición de los modelos tridimensionales generados se realizó con los programas UCSF CHIMERA 1.6.1 ([www.cgl.ucsf.edu/chimera](http://www.cgl.ucsf.edu/chimera)) y PyMOL ([www.pymol.org](http://www.pymol.org)).

### Biología molecular

Se hizo el diseño de primers F (*Nde1*) y R (*Xho1*) para amplificar el gen de la Ndi1 de *S. cerevisiae* quitando el péptido señal del gen completo que se había clonado en el plásmido pBSK+. Posteriormente se realizó la amplificación del gen por PCR y la clonación en el plásmido pGEM para transformar “Top Ten cels” de *E. coli*. Más adelante se realizó la subclonación del gen al vector de sobreexpresión pET15b con una cola de 6 histidinas en el extremo amino de la proteína. Finalmente se realizó la sobre-expresión de la proteína siguiendo los protocolos clásicos de inducción con IPTG.



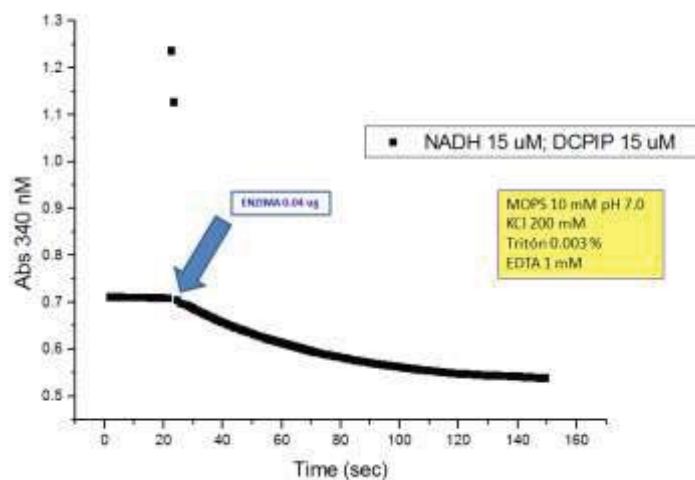
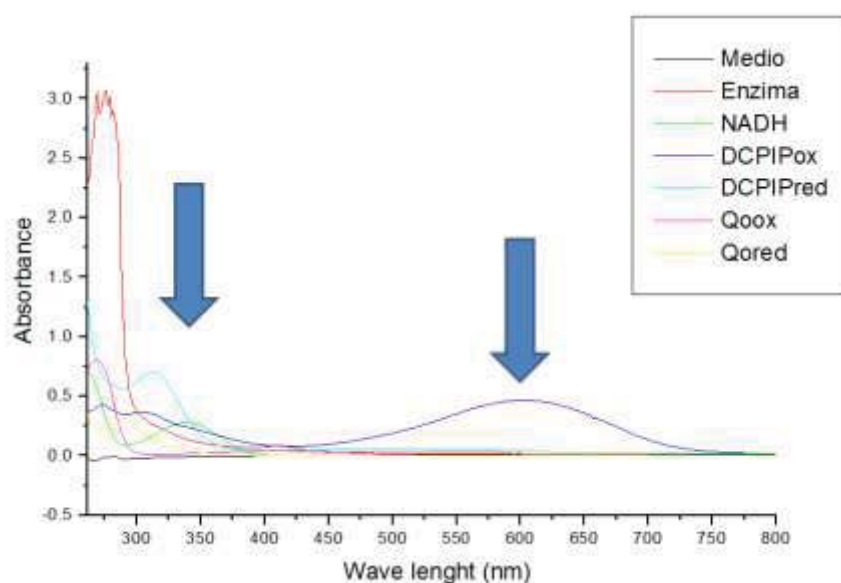
Mapa del plásmido pET15b en el que se realizó la subclonación de la NDI1 de *S. cerevisiae*.



En la parte superior se muestra la estructura de la construcción realizada en la subclonación de la NDI1. En la parte inferior de la figura se muestra un acercamiento del sitio de clonación múltiple del plásmido pET15b en el que se realizó la subclonación de la NDI1 de *S. cerevisiae*.

Las muestras de la NDI1 semipurificadas, obtenidas por elución con imidazol en pulsos de 0.5 a 1.5 M se pasaron a través de columnas de intercambio iónico y se confirmó que más del 90% de la proteína correspondía a la NDI1 (ver la figura 9 de la sección de resultados).

Al realizar el barrido del espectro de la enzima se obtuvieron gráficos como el que se encuentra abajo, en el que se verificaron los cambios en los estados de oxidación del DCPIP (600 nm) y del NADH (340 nm) para seguir a ambas longitudes de onda la velocidad instantánea de la reacción. Las condiciones de la mayor parte de los ensayos cinéticos ser realizó en un medio con MOPS 10 mM pH 7.0, KCl 200 mM, Tritón 0.003 %, EDTA 1 mM.



### Obtención de las mitocondrias de *S. cerevisiae*

Para aislar las mitocondrias inicialmente se probaron varios métodos, de los cuales el que mejores resultados generó es el siguiente protocolo:

Se inoculó un litro de YPD (1% glucosa, 0.5% bactopectona y 0.5% extracto de levadura) con 20 unidades de absorbancia de un precultivo de levaduras que crecieron en el mismo medio de YPD.

Se cultivaron las células en condiciones aeróbicas hasta que llegaron al inicio de la fase estacionaria (24 h) y se cosecharon por medio de centrifugación (3500 rpm, 5 min). Se lavaron 1-2 veces con agua destilada, repitiendo el paso de centrifugación.

Se resuspendieron los paquetes de células con el amortiguador de manitol (400 mM manitol, 50 mM tris, 1 mM EDTA pH 7.4). Por cada 1 g de células se añadieron 2.5 ml del amortiguador de manitol. Se añadió el mismo volumen de perlas de vidrio, 1 mM PMSF y se rompieron las células por un total de 5 minutos en la licuadora (bead beater), con descansos de 1 min por pulso de 1 minuto. Se lavaron las perlas de vidrio con el homogenizado celular con el amortiguador de manitol y los lavados se juntaron hasta que el volumen final fue de 270-280 mL. Se centrifugaron las muestras a 3500 rpm por 10 min. Como paso opcional se centrifugó el sobrenadante una vez más a 3500 rpm. Finalmente las mitocondrias se obtuvieron del sobrenadante al centrifugar a 12000 rpm por 20 minutos.

Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el paquete de mitocondrias en el amortiguador de manitol buscando una concentración de proteína entre 20 y 40 mg/mL.

### Zimogramas para evaluar la actividad de los complejos respiratorios

Para revelar la actividad de los diferentes complejos respiratorios, de los geles nativos seguí las siguientes tablas en las concentraciones señaladas:

#### Actividad de NADH deshidrogenasa (complejo I):

	1 gel (20 mL)	2 geles (20 mL)
MTT (1mg/mL)	10 mg (0.010 g)	20 mg
NADH (0.14mM)	7.5 mg (0.0075g)	15 mg
Tris-HCl 0.1M	2 mL	4 mL
ddH <sub>2</sub> O	18 mL.	36 mL

#### Actividad de Succinato deshidrogenasa (complejo II):

	1 gel (20 mL)	2 geles (20 mL)
Succinato (1M)	1.68 mL	3.36 mL
PMS (0.2mM)	1.2 mg (0.0012g)	2.4 mg
MTT 2mg/mL	40 mg (0.04g)	80 mg

EDTA 100 mM	0.9 mL	1.8 mL
ddH <sub>2</sub> O	14.42 mL	28.8 mL
Fosfatos 1M	1 mL	2 mL

### Actividad de citocromo c oxidasa Complejo IV:

	1 gel (20 mL)	2 geles (20 mL)
DAB (1mg/mL)	20 mg (0.02g)	40 mg
Catalasa (24U/mL)	2 uL	4 uL
Cytc 0.2mg/mL	4 mg (0.004g)	8 mg
Sacarosa	1.5 g	3 g
ddH <sub>2</sub> O	19 mL	38 mL
Fosfatos 1M	1 mL	2 mL

### Actividad de ATPasa (complejo V):

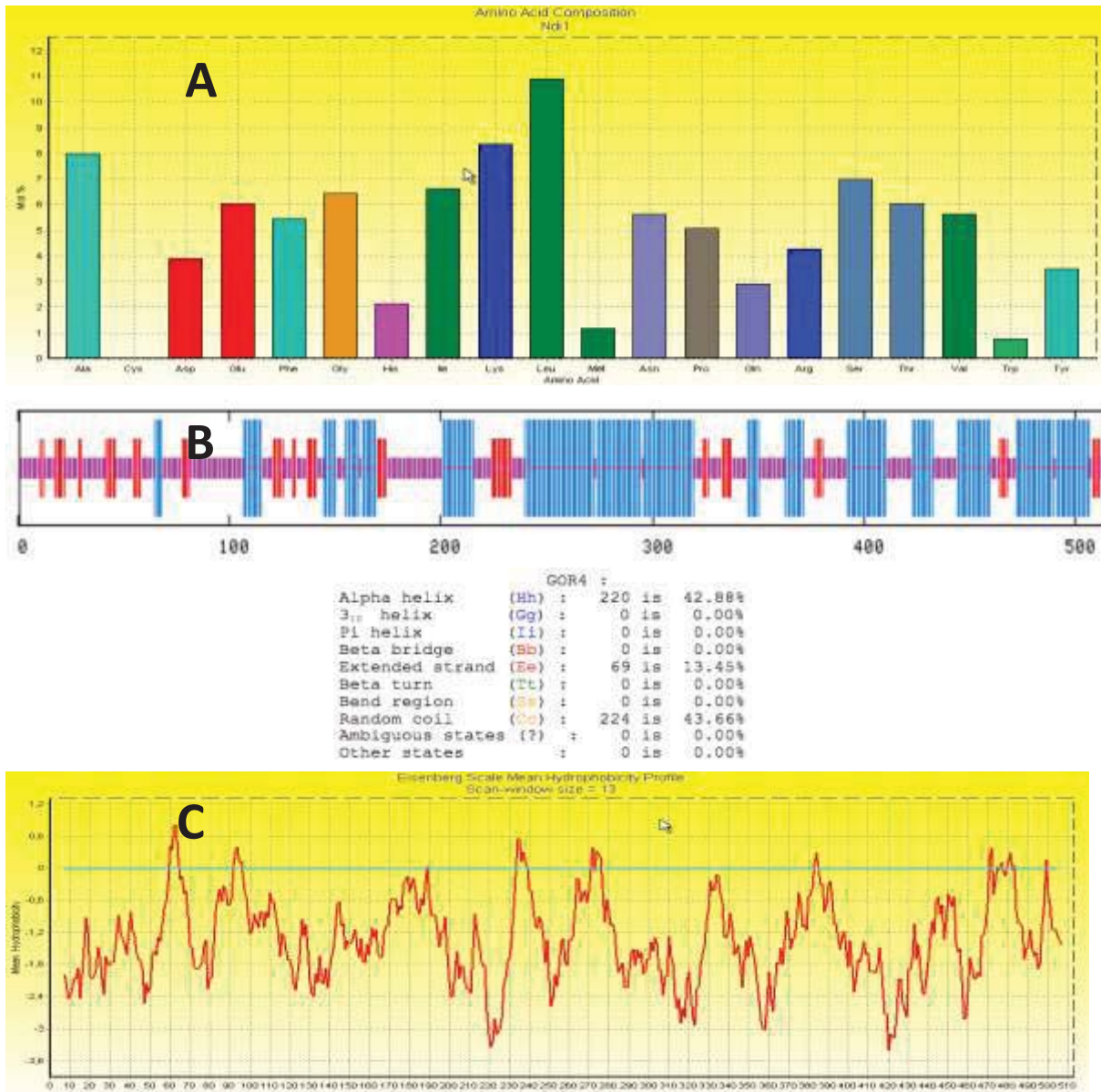
	1 gel (20 mL)	2 geles (20 mL)
Tris-glicerol (30 mM)	18.4 mL	36.8 mL
ATP (100 mM)	1 mL	2 mL
CaCl <sub>2</sub> (500 mM)	600 uL	1.2 mL



# RESULTADOS:

## Composición de aminoácidos, análisis de hidropatía y predicción de estructuras primaria y secundaria

El primer paso que se realizó para comenzar el estudio de la NDI1 fue analizar la composición y la secuencia de los 513 residuos de aminoácidos de la proteína. El resultado se muestra en el panel A de la figura 1.



**Figura 1. Panel A.** Histograma de barras que marca la cantidad de aminoácidos que componen a la NDI1 de *S. cerevisiae*. El programa utilizado está contenido dentro de la suite de software de Bioedit Sequence Alignment Editor 2009. **Panel B.** Predicción de la estructura secundaria de la NDI1 generado con algoritmos de topología y consenso. **Panel C.** Perfil de hidropatía de la NDI1 utilizando los algoritmos de Eisenberg colocando una amplitud de ventana de 13.

En el panel B de la misma figura 1 se muestra la predicción de la estructura secundaria realizada utilizando algoritmos de predicción rotacional de ángulo (HTMSRAP). Resultados semejantes se consiguieron utilizando algoritmos basados en consenso de estructuras conocidas, basadas en topología.

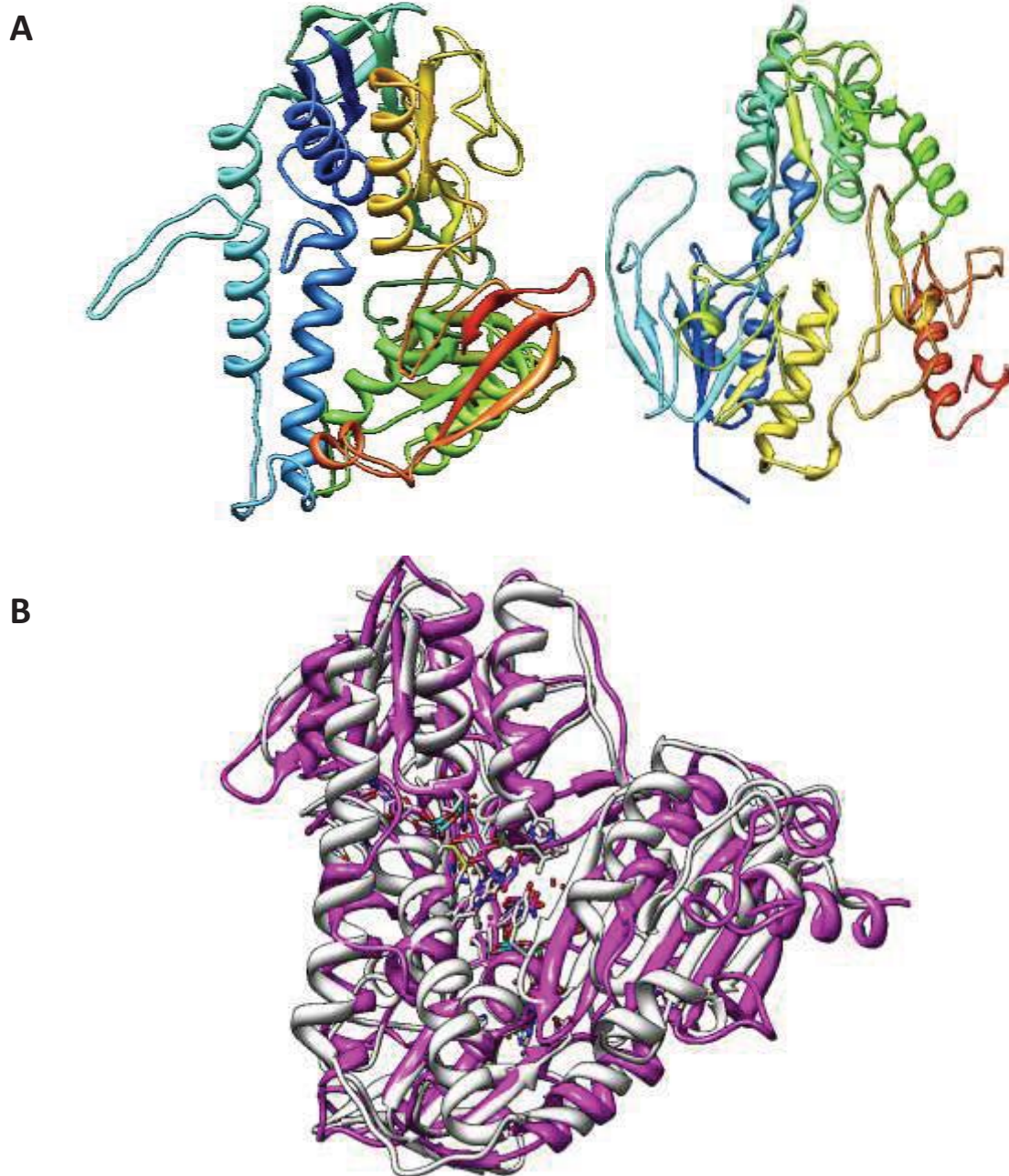
De estos resultados teóricos sólo hay que resaltar que no hay cisteínas en la estructura primaria de la NDI1, lo que descartó la presencia de puentes disulfuro dentro de la proteína o con cualquier otra. El punto isoeléctrico (pI) teórico fue de 9.43 y el peso molecular estimado es de 53 kDa, datos que fueron importantes pues se utilizaron como puntos de referencia cuando la proteína logró sobre expresarse y purificarse. Respecto al análisis de hidropatía (panel C), hay que resaltar que no se observa una zona preferentemente hidrofóbica que permita el anclaje a la proteína a las membranas. Tampoco, a partir de la estructura primaria se predijeron sitios de acilación para la proteína, lo que generaba la pregunta ¿Cómo se ancla esta a las membranas? La NDI1 se clasifica experimentalmente como una proteína membranal, pues sólo con alta fuerza iónica y detergentes es posible su separación de las membranas [89].

### Predicción de la estructura terciaria

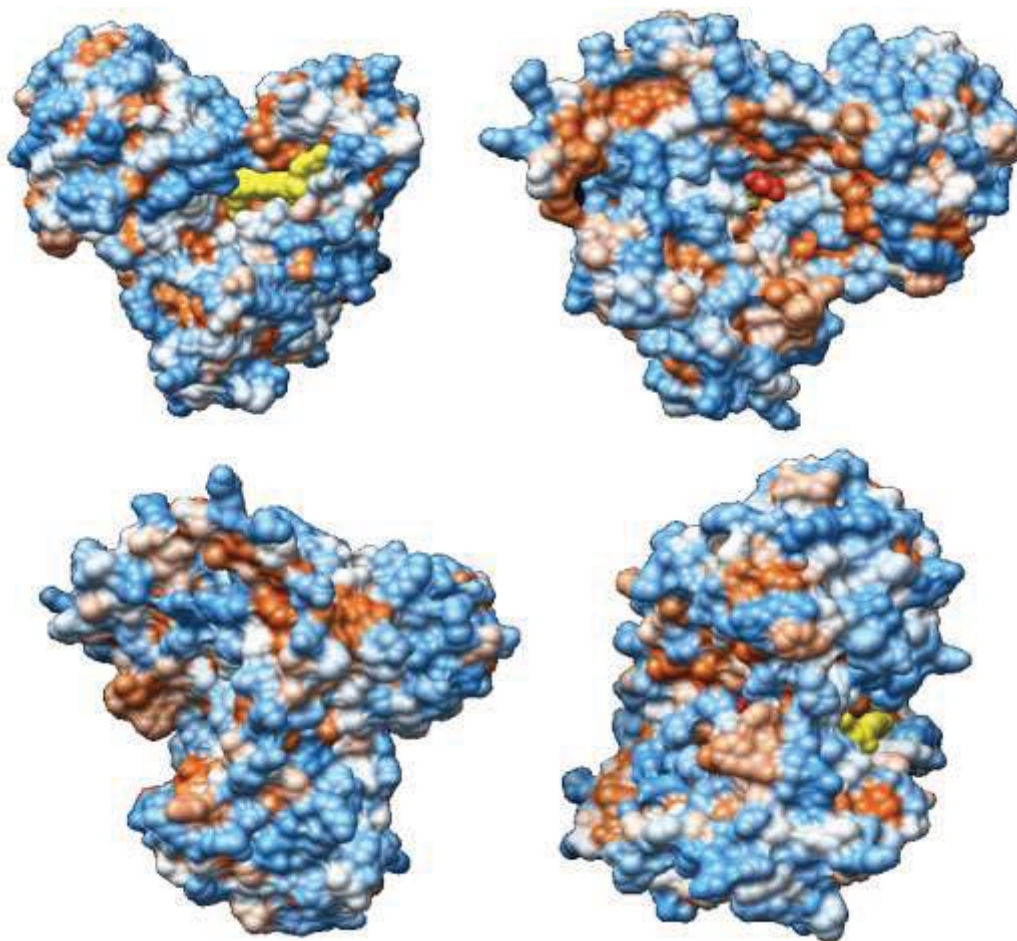
Después de seleccionar diversas estructuras y métodos para predecir la estructura terciaria de la NDI1, se seleccionó a la lipoamida deshidrogenasa de *T. thermophilus* como molde principal por compartir una identidad cercana al límite permitido para realizar el modelado por homología. Al existir secciones en las que no había similitud entre ambas estructuras, se permitió al programa utilizar estrategias de threading (entretrejado) para construir otros modelos. Uno de los modelos se muestra en el panel A de la figura 2. En el panel B de esta figura se coloca una vista frontal de la superposición de dos de los modelos construidos.

Este análisis *in silico* de las estructuras primaria a terciaria era muy importante realizarlo, pues una de las preguntas a resolver en el inicio de este proyecto era averiguar la manera como la NDI1 se adosaba periféricamente a la membrana mitocondrial interna de *S. cerevisiae*. Hasta el año 2012 solo se conocía la estructura primaria de las NDH2 y se habían modelado *in silico* diversas estructuras [86, 87], por lo que era relevante en el proyecto realizar este análisis. El siguiente paso fue hacer un análisis de la posible estructura terciaria de la proteína para confirmar o descubrir en el modelo zonas hidrofóbicas que sirvieran para el anclaje a las membranas.

El resultado de este análisis se muestra en las figuras 2 y 3. La estructura de la proteína muestra accesible el anillo de isoaloxacina del FAD para los sustratos reductores (NADH + H<sup>+</sup>) y oxidantes (quinonas y derivados como el DCPIP), lo cual era muy interesante, dado los reportes de cinética enzimática que en ese momento eran inciertos (secuencial o al azar) [69].



**Figura 2.** **A** Dos modelos teóricos de la estructura tridimensional de a NDI1, hecha con herramientas de ESyPred3D Bioinformatics technologies en el modelo de la izquierda se usó como templado la estructura 2EQ7 (correspondiente a la lipoamida deshidrogenasa de *Thermus thermophilus*) que tiene una identidad de 18.9 con la secuencia de la NDI1. A la izquierda está el modelo de la NDI1 hecho con I-Tasser este modelo de hilvanado o *threading* tomó como planteados las estructuras de 1LVL: Lipoamida deshidrogenasa, 1XHC: NADH oxidasa nitrato reductasa, 2CDU: NADPH oxidasa. **B** Superimposición de dos los modelos de la NDI1 de *S. cerevisiae*. El modelo A (blanco) fue realizado en el portal bio informático "ESyPred3D Bioinformatics technologies" considerando únicamente a la cadena A de la estructura tridimensional del cristal 2EQ7 (lipoamida deshidrogenasa de *Thermus thermophilus*) como templado pues tiene una identidad de 18.9 con la secuencia de la NDI1. El segundo modelo (en color morado) fue realizado con el programa "I-Tasser" tomando como templado un promedio de estructuras resueltas: 1FCD: flavocitocromo C sulfuro deshidrogenasa, 1LVL: Lipoamida deshidrogenasa, 1XHC: NADH oxidasa nitrato reductasa y la 2CDU: NADPH oxidasa. La superimposición de ambos modelos fue realizado con las herramientas del programa "USCF Chimera 1.6.1 2011".



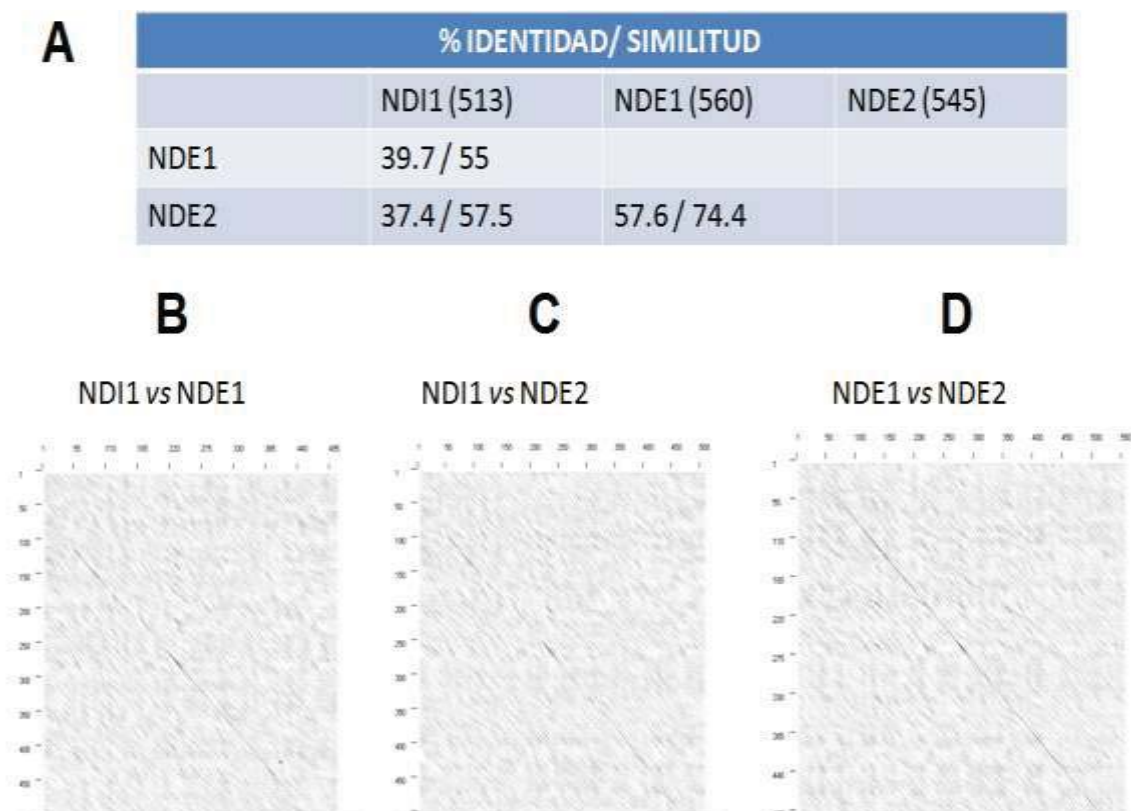
**Figura 3.** Visualización del área superficial de la ND11 de *S. cerevisiae*. El modelo considerado para realizar el análisis fue realizado en el portal bio informático “ESyPred3D Bioinformatics technologies” considerando únicamente a la cadena A de la estructura tridimensional del cristal 2EQ7 (lipoamida deshidrogenasa de *Thermus thermophilus*). Las cuatro imágenes señalan diferentes perspectivas del mismo modelo. En azul, café y blanco se señala la superficie hidrofílica con carga positiva, hidrofílica con carga negativa e hidrofóbica de la proteína, respectivamente. En color rojo se observa el anillo de flavina (FAD), finalmente en color amarillo se sobre salta el NADH.

Realizar este análisis y la predicción de las estructuras secundarias y terciarias era importante en el inicio del proyecto, pues una de las vertientes de este trabajo era clonar, sobre expresar y purificar a la proteína recombinante de *S. cerevisiae* en *E. coli*, para resolver su estructura tridimensional, pues al inicio del proyecto sólo se habían reportado modelos teóricos de su estructura tridimensional. Finalmente la primera parte este objetivo experimental se concluyó y se llevó a buen término, salvo que no se pudo concentrar la proteína por arriba de 1mg/ml, y por no fue posible resolver su estructura terciaria en nuestro equipo de trabajo. Este punto se discutirá más adelante.

La validez de los modelos teóricos realizados se analizará en la discusión de la tesis, pues al resolverse la estructura tridimensional de la proteína en el año 2012 por el equipo de Yagi [70, 71] se tuvo que replantear la factibilidad de los objetivos a conseguir en el proyecto doctoral.

### Comparación de secuencias parálogas de las NDH2 en *S. cerevisiae*

Al tener el genoma de *S. cerevisiae* otras dos proteínas homólogas parálogas (<http://www.yeastgenome.org/>), se decidió cuantificar la identidad y la similitud que había entre ellas (ver figura 4 panel A) y detectar con la herramienta de dot plot las zonas de mayor conservación (figura 4 paneles B, C y D), así como modelar también su estructura tridimensional (datos no mostrados). Esto se realizó con el fin de poder extrapolar la información que se generara con la NDI1 tanto en términos cinéticos como estructurales.



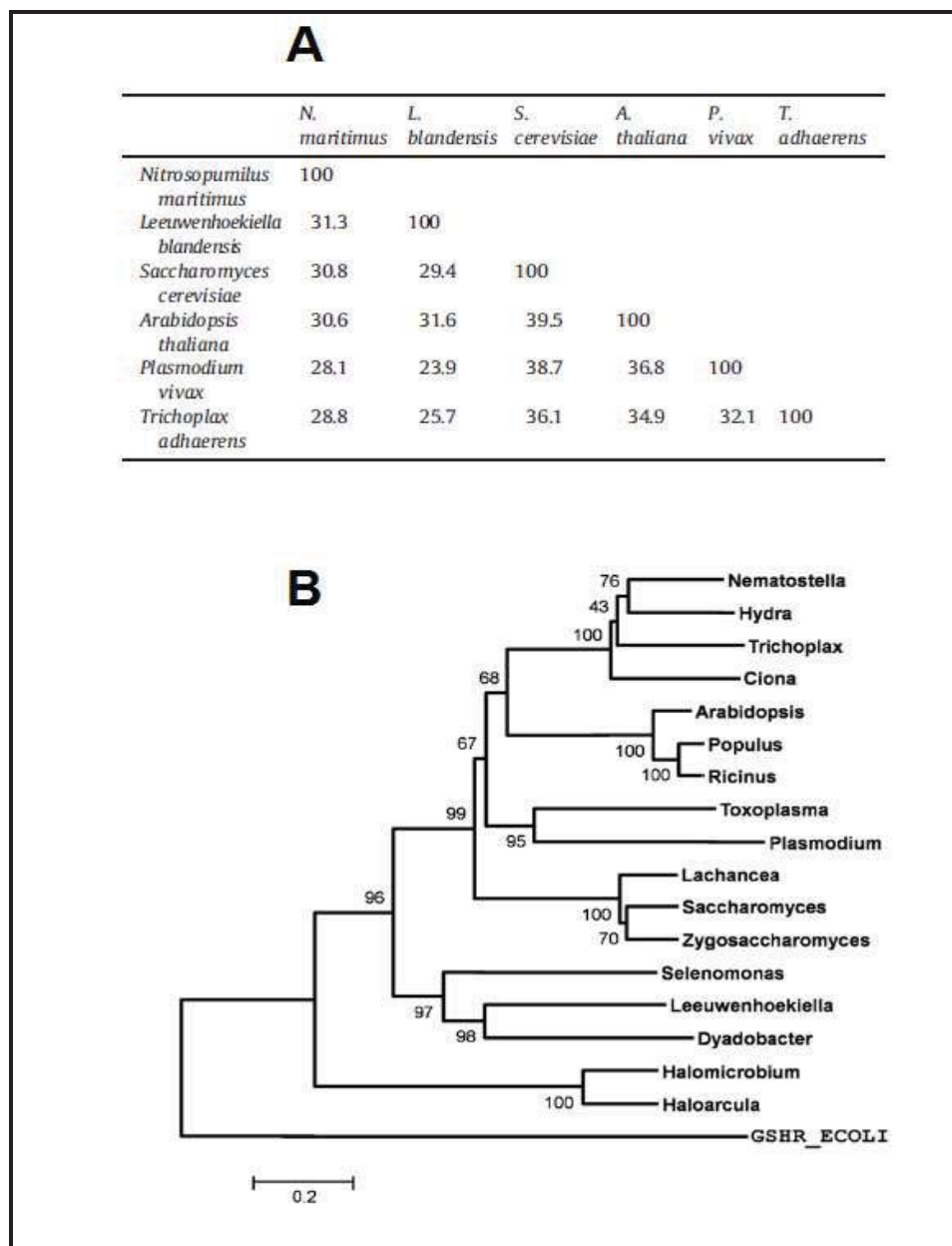
**Figura 4.** A. Tabla de identidad y similitud entre la estructura primaria de las tres NADH deshidrogenasas de *S. cerevisiae*. El porcentaje de identidad lo colocho en la parte superior del cociente, mientras la identidad en la parte inferior. La plataforma informática utilizada para este análisis fue BIOEDIT 6.0 ocupando diversas matrices de comparación (BLOSUM y PAM). En la figura solo muestro el resultado de una matriz 62.

### Distribución de las NDH2 en el árbol de la vida

Tomando la secuencia de aminoácidos de la NDI1 de *S. cerevisiae* y hacer un alineamiento local básico (BLAST) en las bases de datos de NCBI y Uniprot, se encontró que habían secuencias de aminoácidos con alta similitud en los tres grandes dominios del árbol de la vida. Salvo las proteobacterias  $\epsilon$ , se encontraron secuencias homólogas en todas las eubacterias. Estos resultados ya habían sido reportados antes [72-74]. Las NDH2 se pueden presentar en más de una copia dentro de un mismo genoma y todas las deshidrogenasas son funcionales [84-87]. Sin embargo, el hallazgo más notable más notable fue encontrar genes homólogos en el reino animal. Las secuencias se

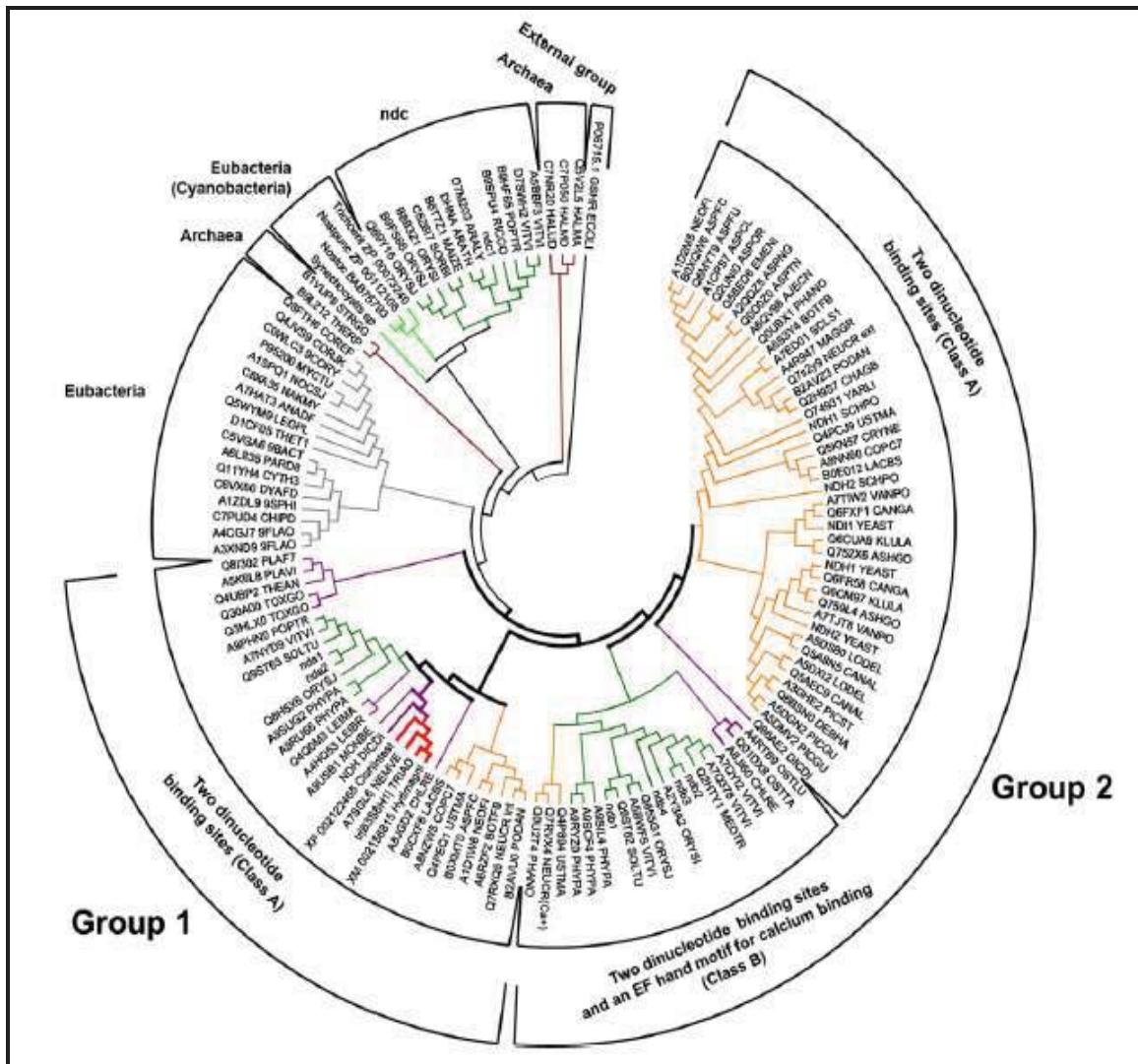
encontraron en una anémona: *N. vectensis*, en un placozoo: *T. adhaerens*, en un representante de los cnidarios *H. magnipapillata*, e incluso en equinodermos *S. purpuratus* y aún cordados *C. intestinalis*.

Un ejemplo representativo del porcentaje de identidad y de similitud entre estas secuencias encontradas en los genomas animales y las deshidrogenasas de otros grupos se muestra en el panel A de la figura 5. El árbol filogenético representativo construido con 17 secuencias de NDI1 se muestra en el panel B de la figura.



**Figura 5.** A. **Panel A** Tabla de identidad y similitud resultante de la alineación pareada **Panel B** árbol filogenético 17 secuencias representativas de las NDI1. El árbol fue construido utilizando el método de neighbour-joining, en el programa MEGA 4 (Tamura et al., 2007). Los vaores de Bootstrap se basaron en 1000 iteraciones. Para enraizar el árbol se utilizó la secuencia de la glutatión reductasa de *E. coli* (GSHR\_ECOLI, P06715).

Al considerar un mayor número de secuencias para construir un árbol representativo que refleje la distribución de las secuencias de aminoácidos de las deshidrogenasas se obtuvo el árbol filogenético de la figura 6. Cuando se ocuparon otros métodos, como máxima parsimonia, se obtuvieron árboles con topología semejante. De esta figura solo queremos destacar que tanto los protistas, los hongos y las plantas forman grupos parafiléticos, en uno de los cuales los taxa animales están más relacionados.



**Figura 6.** Árbol filogenético de las NADH deshidrogenasas en los tres grandes dominios de la vida. El árbol fue construido con el programa MEGA 4.0 utilizando el método de mínima evolución, realizando 1,000 iteraciones. Para enraizar el árbol, se colocó como grupo externo la secuencia de la glutatión reductasa de *E. coli* (GSHR\_EC01, P06715). En color rojo se destacan las secuencias halladas en los animales descritos, en naranja se colorean las secuencias correspondientes a hongos, en verde oscuro las plantas, en púrpura a los protistas, en gris las bacterias, en café las arqueas, y en verde brillante las cianobacterias.

Parte de estos resultados, combinados con un análisis semejante para la oxidasa alterna realizado por McDonald y colaboradores [74-78], fue publicado como un artículo original en la revista *Comparative Biochemistry and Physiology*.

## La clonación, sobre-expresión y purificación de la NDI1 de *S. cerevisiae*

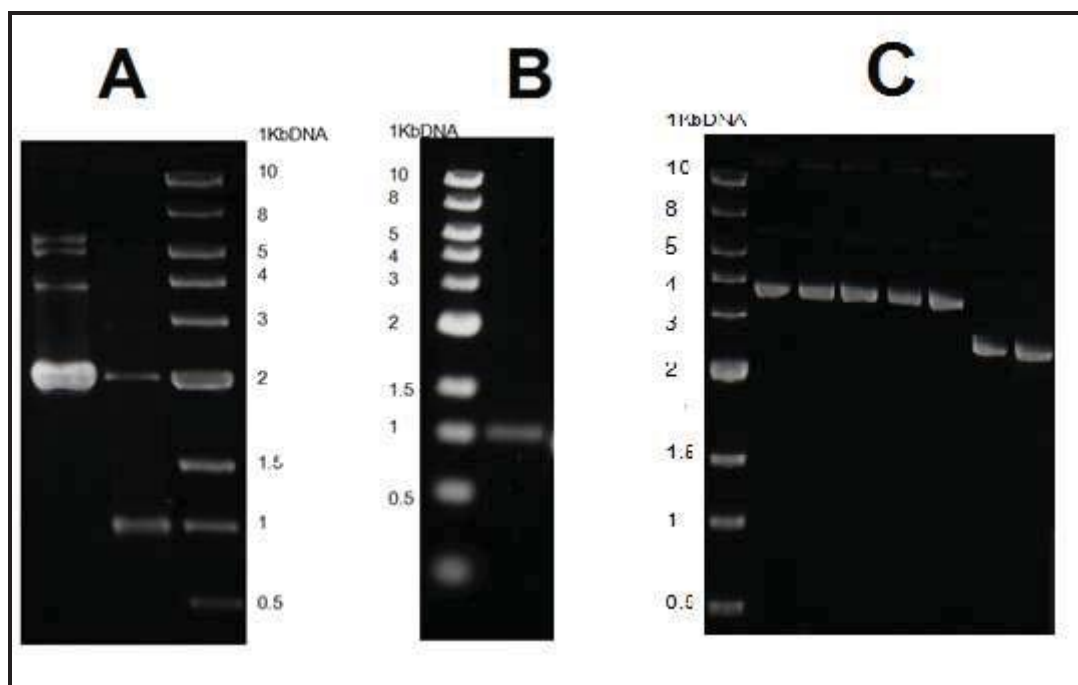
Para clonar el gen de la NDI1 se ocuparon los siguientes oligonucleótidos:

Forward: 5'-TAGTCAGATTCTGAATTCCATATGTCCACAGGGGTGG-3'

Reverse: 5'-TTCCAGAAAAGGGCATGCTCGAGTCATCTATAATCC -3'

3'-AAGGTCTTTTCCCGTACGAGCTCAGTAGATATTAGG -5'

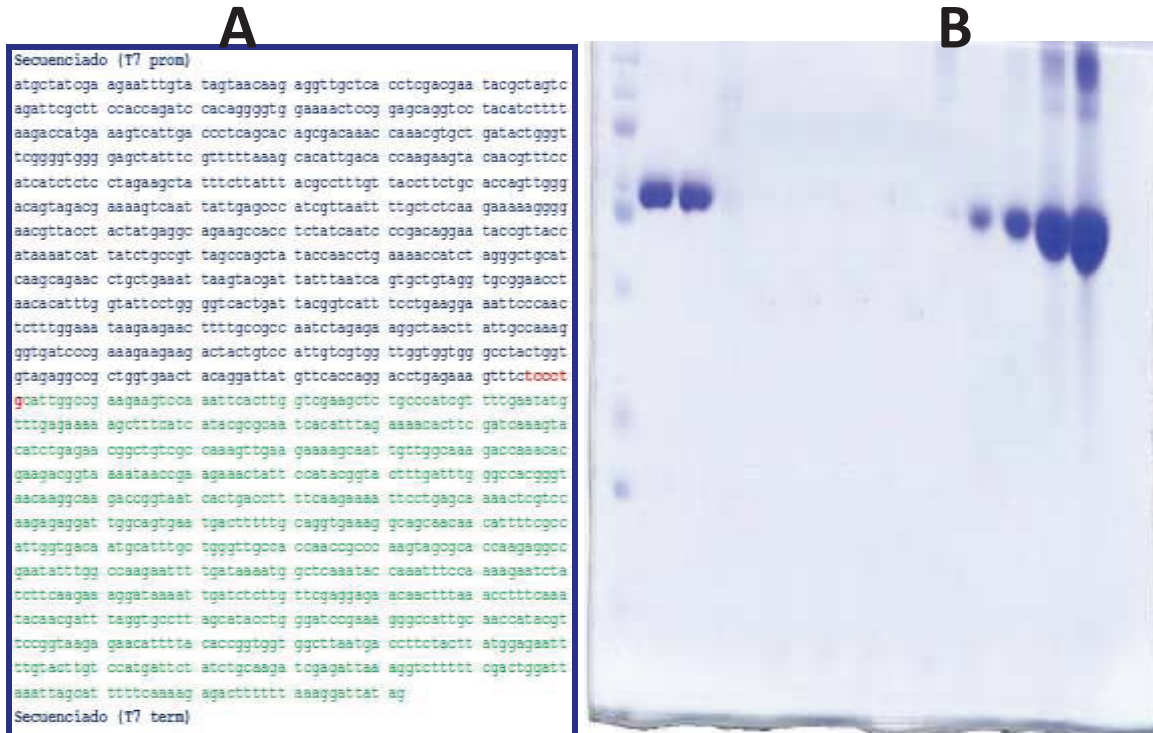
El resultado de la amplificación por PCR y la limpieza del producto del amplificado se observa en la figura 7 en los paneles A y B; la clonación del producto en el plásmido pET15b (que incluye la secuencia para una etiqueta de 6 residuos de histidina en el extremo amino) se observa en el panel C de la misma figura.



**Figura 7.** Amplificación y clonación del gen de la NDI1 de *S. cerevisiae*. En el panel A se muestra el producto del amplificado. Como una amplificación inespecífica, se cortó la banda, se extrajo el gen, se digirió con las enzimas Nde1 y Xho 1 y posteriormente se corrió en una electroforesis para verificar la longitud y la pureza del inserto (panel B). El plásmido pET15b fue digerido con las mismas enzimas para posteriormente ser insertado el gen del NDI1 (panel C).

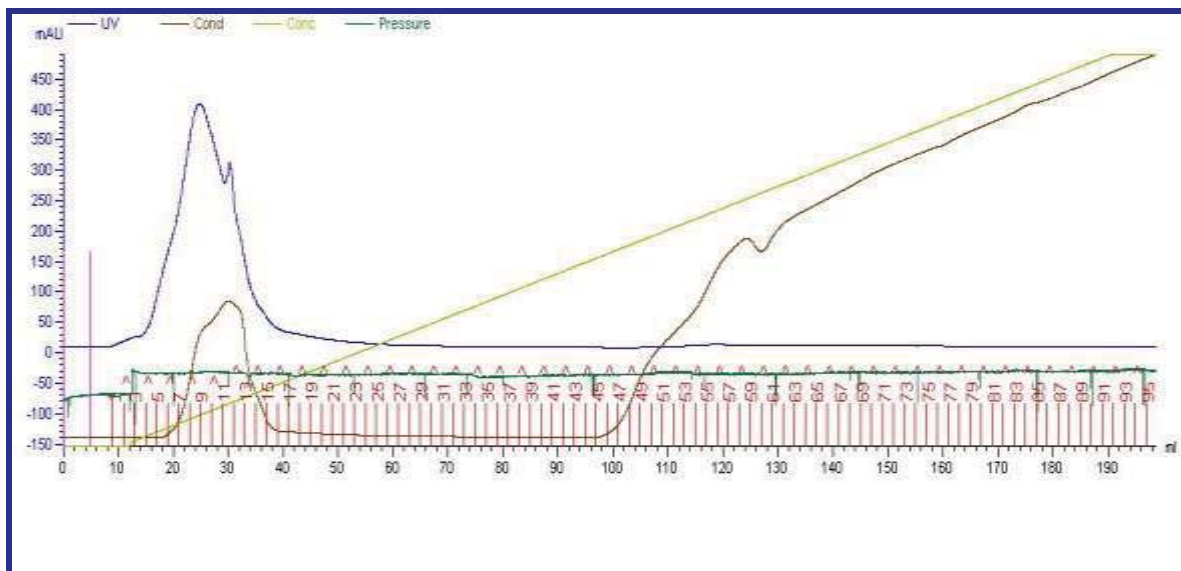
Para verificar que no hubiera mutaciones se mandó a secuenciar el inserto utilizando los primers forward y reverse del fago T7. En el panel A de la figura 8 se muestra el resultado de la secuenciación, y en el panel B se coloca un gel de poliacrilamida al 10%, representativo del resultado del proceso de purificación utilizando únicamente la resina Ni NTA.





**Figura 8.** Secuenciación del gen y purificación de la NDI1 recombinante de *S. cerevisiae*. En el panel A se coloca el resultado de la secuenciación con los promotores prom y term del fago T7. Se coloca en rojo los únicos 6 nucleótidos resueltos con una incertidumbre menor a 70%. En el panel B se coloca un gel representativo del resultado de la purificación de la NDI1 en un gel de poliacrilamida SDS al 10%.

Con el fin de verificar la pureza de la muestra obtenida, se realizaron gels de poliacrilamida teñidos con plata (datos no mostrados), así como también se realizaron cromatografías de intercambio iónico en matrices de Q y CM sefarosa que buscaban, además de purificar la proteína, concentrarla. El resultado de estos experimentos se observa en la figura 9.



**Figura 9.** Perfil de una cromatografía de la NDI1 recombinante de *S. cerevisiae* en una columna de intercambio iónico en Glutamina sefarosa (Q sepharose). La muestra cargada en la columna proviene de un proceso de extracción y purificación con la resina NiNTA. El pico que se observa entre los 10 y los 30 minutos corresponde a la NDI1.

### Cristalización de la proteína

En el proyecto se quería concentrar la proteína a un mínimo de 10 miligramos por mililitro para posteriormente comenzar con ensayos de cristalización utilizando la técnica de gota sedente en diversas cajas limbro para la cristalización de proteínas membranales.

Sin embargo, al momento de incrementar la concentración por arriba de 1 mg/ml, la proteína se precipitó (datos no mostrados). Se variaron los detergentes utilizados para la extracción de la proteína, las condiciones de temperatura y la fuerza iónica, entre otras, pero no se obtuvieron los resultados buscados.

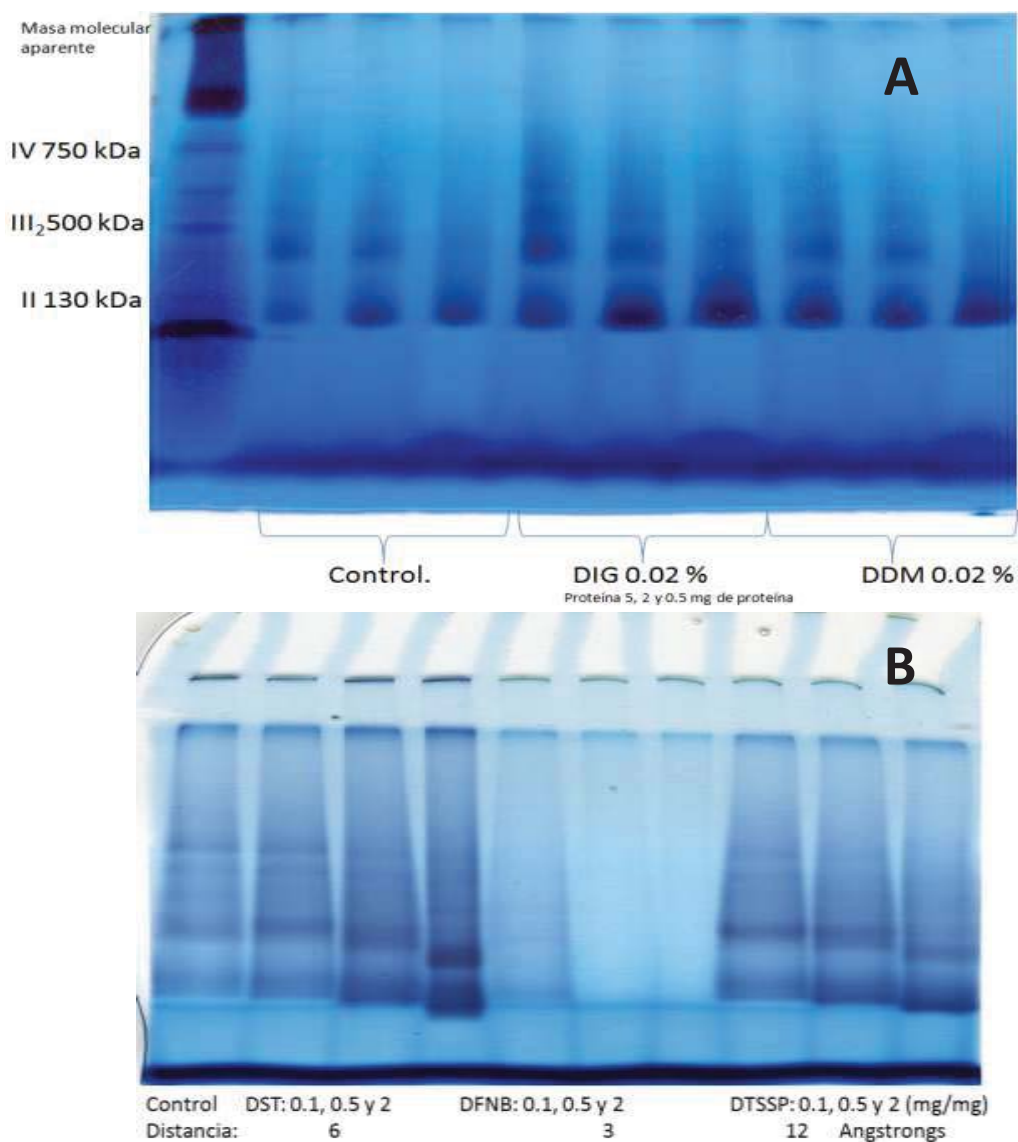
En la tabla 1 se muestran las concentraciones máximas alcanzadas antes de que las proteínas comience a precipitarse.

	Máxima concentración alcanzada:	Estabilidad a 4 °C:	Actividad específica:
Tritón	0.8 mg /mL	Total. La proteína mantiene completamente su actividad a 4 °C.	100 %
NOPDG	0.5 mg /mL	Muy poca. Hay una agregación constante a partir de 0.2 mg /mL	35 %
DDM	0.46 mg /mL	Se observa una agregación muy lenta cuando se superaron los 0.2 mg /mL	60 %

### Formas oligoméricas de la NDI1

Cuando la proteína recombinante purificada utilizando diferentes detergentes fue colocada en geles nativos azules, obtuvimos resultados que indicaban que la proteína funcionaba en forma de dímeros y multímeros de mayor peso molecular (figura 10 panel A carriles señalados como control). En el gel nativo fue muy interesante constatar que no se detectó actividad enzimática alguna como monómeros.

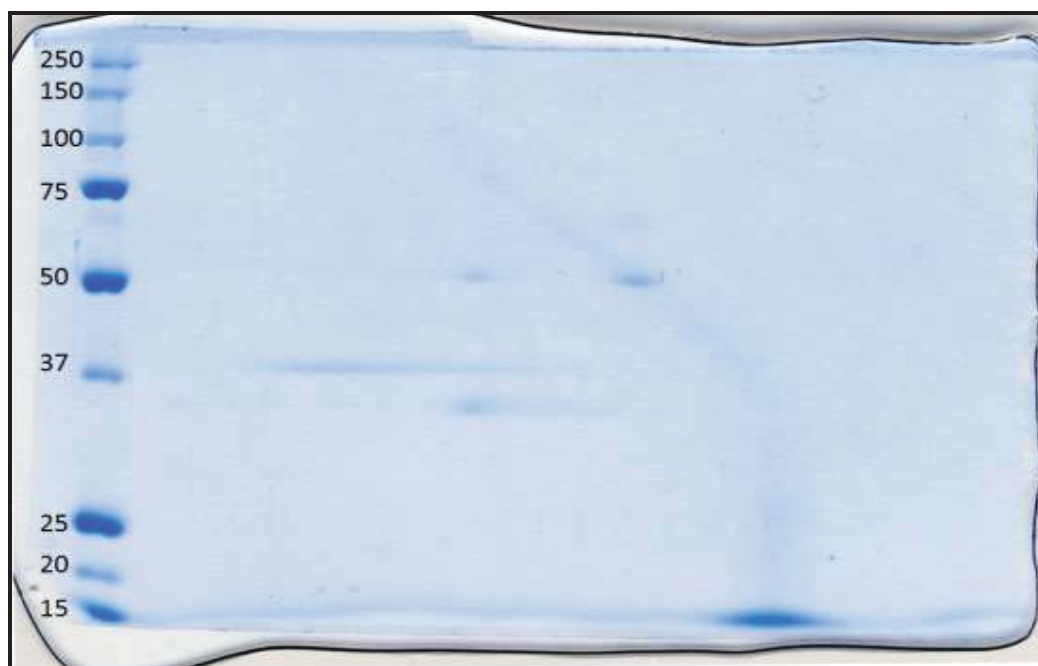
El peso molecular de la enzima monomérica es de 53 KDa, y las manchas de actividad enzimática de menor peso fueron de 130 KDa. Finalmente, al resolverse la estructura cristalográfica de la proteína recombinante por diversos grupos de investigación de Japón y Estados Unidos, se confirmó que la NDI1 se encuentra en su forma nativa formando dímeros [70].



**Figura 10.** Panel A. Zimograma para evaluar la actividad de NADH deshidrogenasa con la técnica de BN-PAGE. El carril de control corresponde a mitocondrias de *U. maydis*. Panel B. Zimograma de la actividad de NADH deshidrogenasa con la técnica de BN-PAGE.

Un experimento que arrojaría resultados interesantes era pre-incubar las muestras de proteína recombinante purificada con entrecruzadores específicos de grupos amino, e hidroxilo que están localizados a una distancia de 3 (DFNB), 6 (DST) y 12 (DTSSP) Å. Esto tenía el fin de encontrar los residuos de aminoácidos que forman la interfase entre los homo-oligómeros de la enzima. Estos entrecruzadores específicos de grupo y de distancia de enlace no alteraron el patrón del perfil electroforético de los zimogramas pero sí incrementaron la intensidad de las bandas con actividad, así como incrementaron la distancia de migración en el gel en gradiente (Figura 10 panel B).

Con la intención de aislar a los oligómeros entrecruzados y verificar la presencia de dímeros estables corrimos un gel desnaturalizante en una doble dimensión. Se realizó la tinción con la técnica de coomasie coloidal que detecta micro y aún nanogramos de proteína; sin embargo, la cantidad de proteína detectable como dímero u oligómeros de mayor peso apenas fue perceptible (Fig 12). Finalmente este resultado, en el que se detectó la presencia de dímeros cinéticamente activos de la NDI1 fue confirmado con las publicaciones de los años de 2012 y 2013 de diferentes cristales de la enzima realizados por los equipos de Takao Yagi y Maojun Yang [71, 83].



**Fig 12.** Segunda dimensión desnaturalizante y reductora del carril 4 (DST 2mg/mg) del zimograma presentado en la figura 7B. El gel fue teñido con coomasie coloidal para detectar aún cantidades cercanas a 50 ng de proteína. <http://www.piercenet.com/product/dst>

## Cinética enzimática

Con el fin de conocer la cinética de la NDI1 se realizaron ensayos en condiciones de estado estacionario, utilizando el NADH como agente reductor y diversos sustratos como aceptores de electrones. En la figura 13 se muestra un ensayo preliminar realizado con fracciones semi purificadas de la proteína recombinante. Una vez validado el sistema se seleccionó la región lineal para determinar las velocidades iniciales de la reacción.

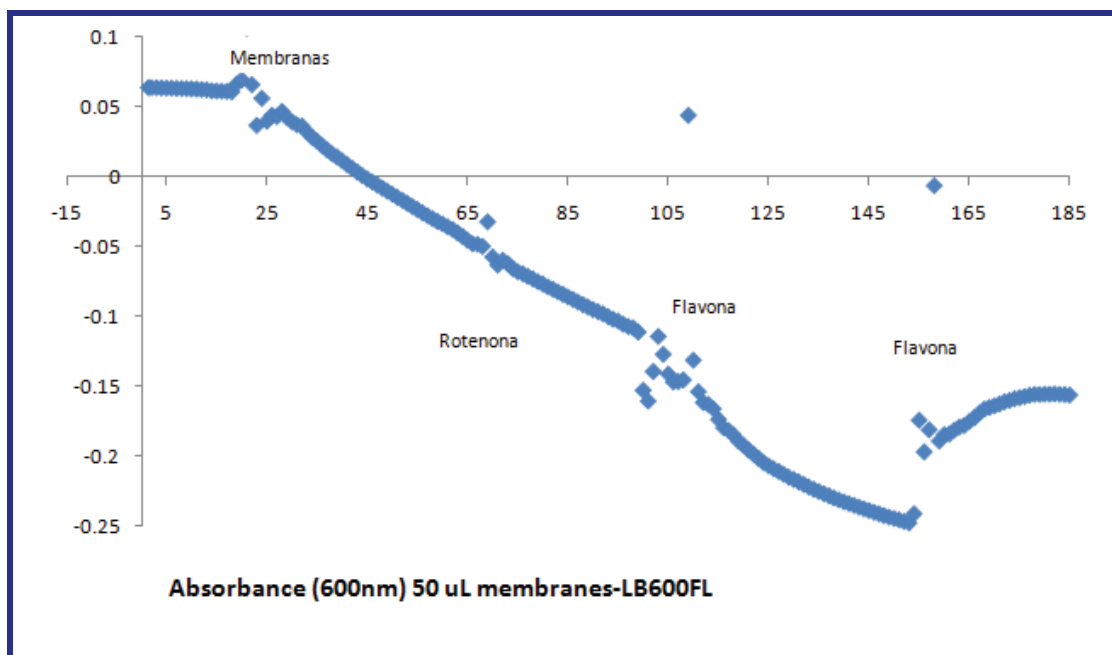


Figura 13. Figura representativa de un ensayo cinético con membranas de *E. coli* enriquecidas con la ND11. En el minuto 20 fue colocada una muestra de 20 mg/mL de proteína para seguir la absorbancia de la oxidación del NADH en presencia de DCPIP.

Cuando se realizaron los ensayos con aceptores hidrofílicos (como el DCPIP), las curvas en el gráfico de Lineweaver-Burk resultaron ser paralelas dentro de un intervalo de concentraciones de 2 a 30  $\mu\text{M}$  y 5 a 60  $\mu\text{M}$  para el DCPIP y el NADH, respectivamente (Figura 14). A altas concentraciones se observó inhibición por sustrato (que ya había sido descrito por Velázquez en 2001), y a bajas concentraciones se presentó una pequeña curvatura en presencia de ambos sustratos. A partir de estos datos, se confirmó que la cinética de la ND11 sigue un mecanismo de tipo ping-pong en presencia de estos sustratos, pero se debe considerar la inhibición por ambos sustratos.

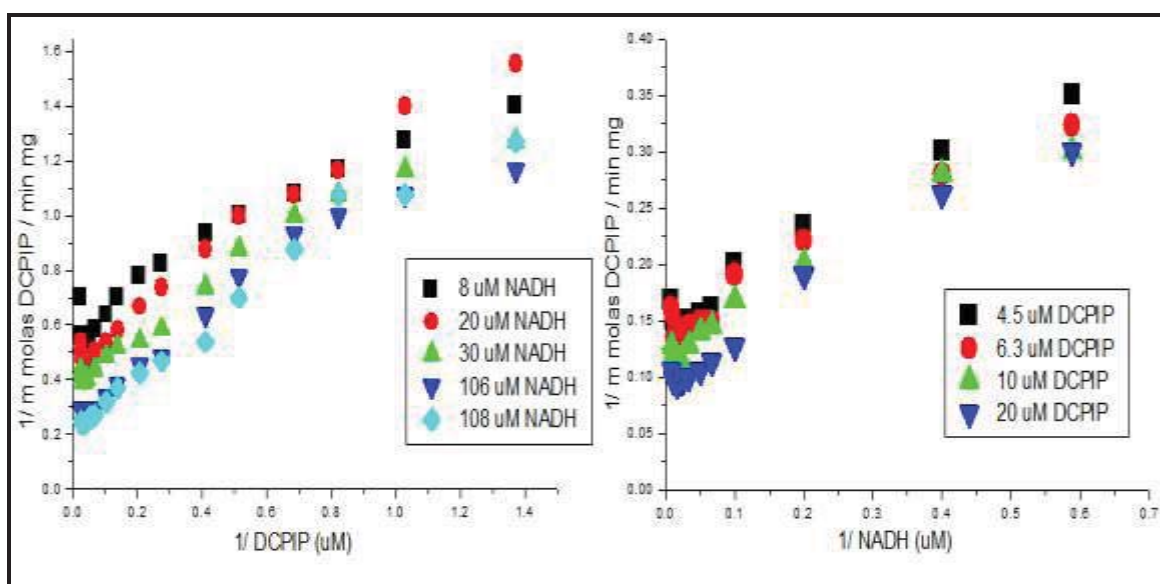


Figura 14. Dobles recíprocos de la cinética de la ND11 con DCPIP como aceptor de electrones.

En contraste con el resultado anterior, cuando se ocuparon aceptores de electrones hidrofóbicos (como las quinonas), el patrón de curvas en el gráfico de dobles recíprocos es intersectante (Figura 15), lo cual indica la presencia de un complejo ternario característico de un mecanismo secuencial. Es probable que el con estos aceptores sea al azar, pues la enzima es capaz de unir al NADH (como se plantea en el mecanismo ping-pong cuando se utiliza DCPIP), y además se sabe que análogos del NADH, como el AMP, muestran un patrón de inhibición no competitiva ante la quinona (ver figura 16). Al igual que con el DCPIP, se observa inhibición por sustrato y una ligera pérdida de la linealidad a bajas concentraciones de ambos sustratos.

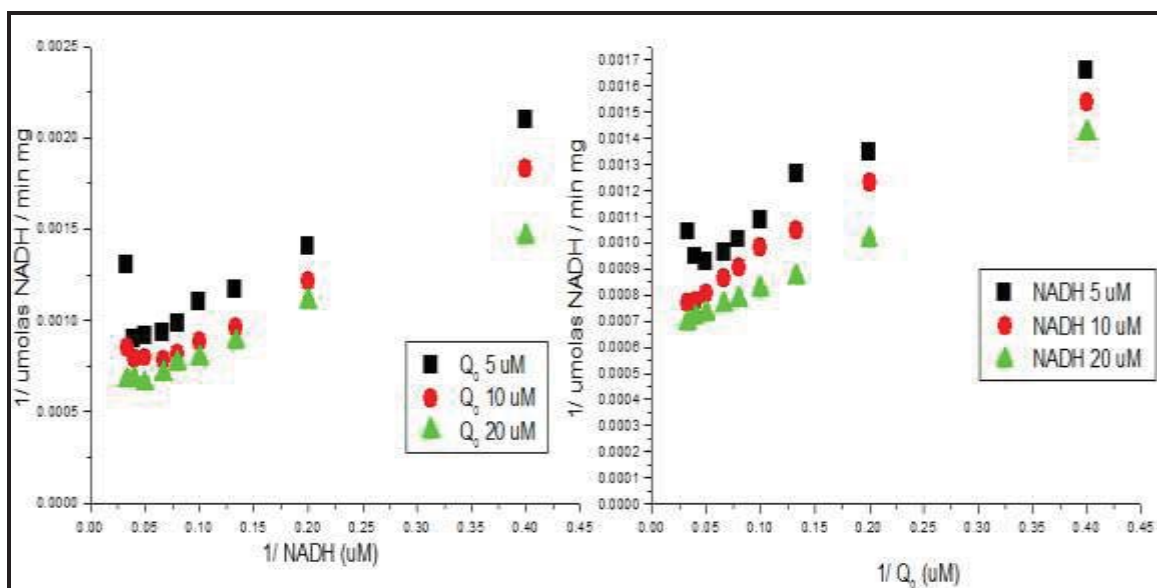


Figura 15. Dobles recíprocos de la cinética de la NDI1 con  $Q_0$  como aceptor de electrones.

Para obtener más información acerca del mecanismo cinético de la NDI1 con ambos tipos de aceptores de electrones, se utilizó el AMP como un análogo del NADH. Los gráficos resultantes se observan en la siguiente figura:

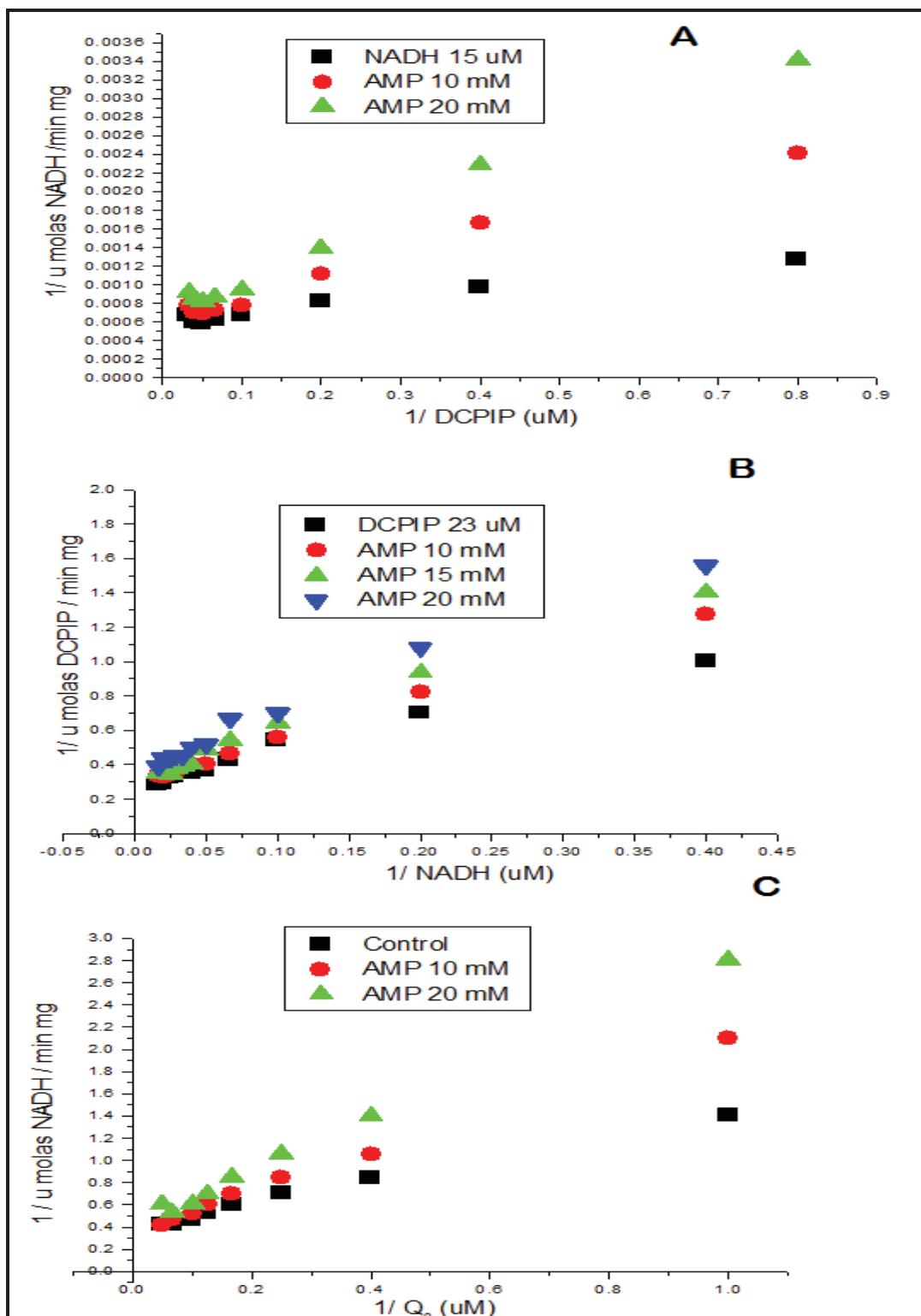
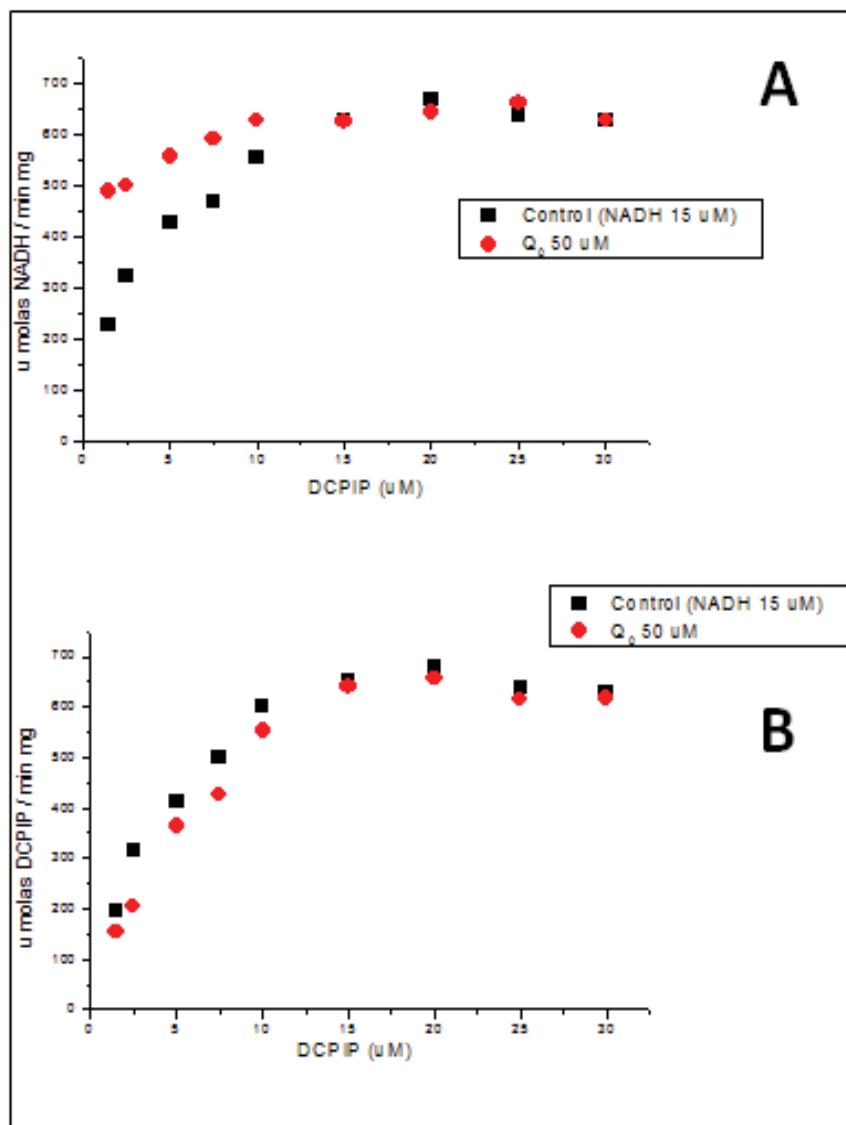


Figura 16. Gráfico de dobles recíprocos para evaluar la competencia del AMP contra el DCPIP (A), NADH (B), y la quinona cero (C).

Cuando se realizaron los experimentos de competencia entre ambos aceptores de electrones (DCPIP vs  $Q_0$ ) encontré que no hay competencia alguna por los electrones, sino que ambos aceptores son reducidos de manera simultánea (Fig 17). Lo cual indica

que la velocidad de la reacción de oxidación del NADH no es limitante, sino más bien la donación de los electrones hacia alguno de los dos aceptores.



**Figura 17.** Dobles recíprocos para evaluar la competencia entre los dos tipos de aceptores de electrones. En el panel A se ve el consumo de NADH en presencia y ausencia de 50  $\mu\text{M}$  de la  $Q_0$  y en el panel B se observa el consumo de DCPIP en presencia y ausencia de 50  $\mu\text{M}$  de la  $Q_0$ .

Al ensayar la cinética con otras quinonas más hidrofóbicas como la  $Q_1$ , la  $Q_2$  y la DBQ (decilbenzoquinona) todas las curvas resultantes en el gráfico de dobles recíprocos de utilizar estas quinonas son intersectantes y se comportan de manera semejante a lo encontrado con la  $Q_0$  (Fig 18).



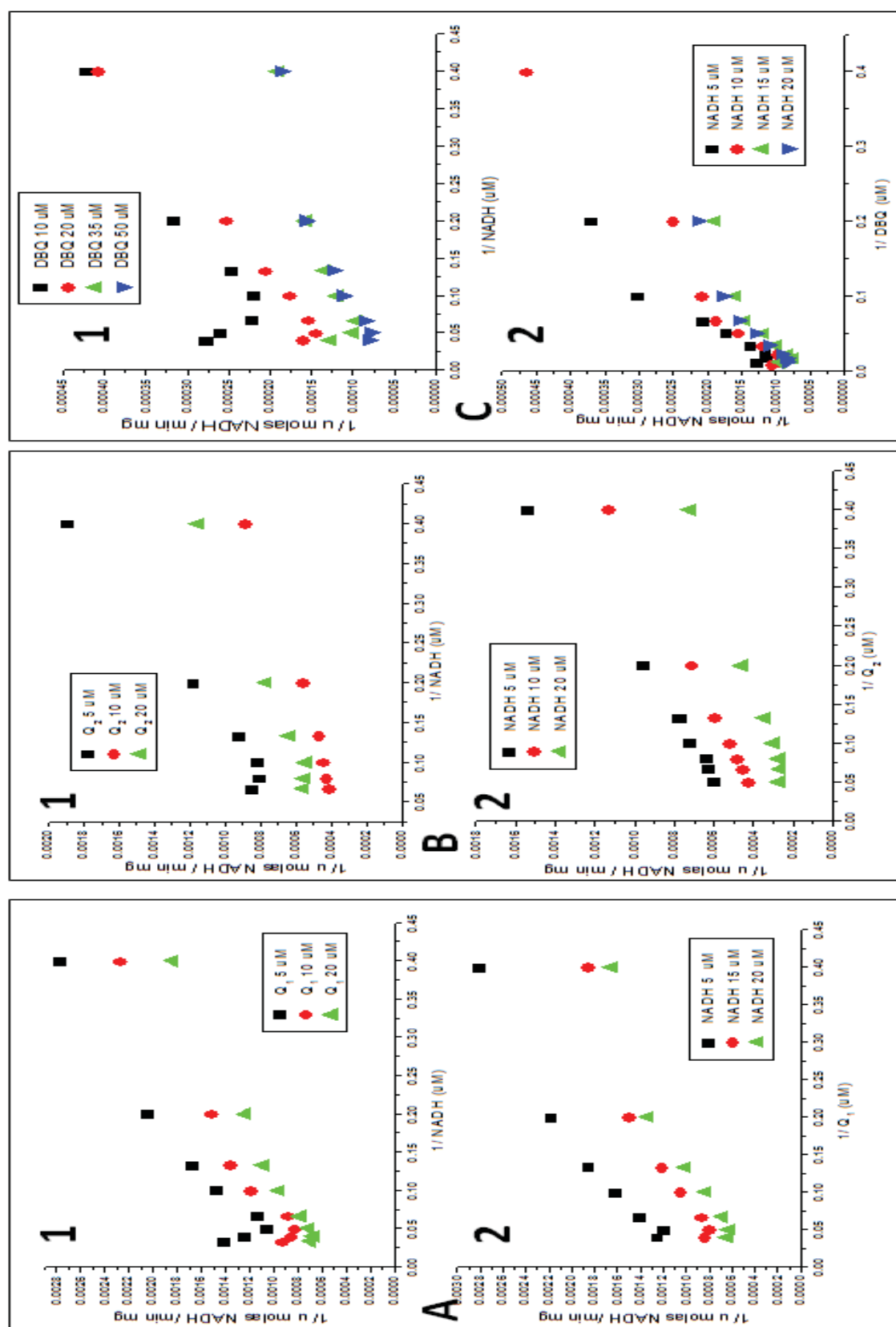


Figura 18. Gráfico de dobles recíprocos de la cinética de la NDI1 con diferentes quinonas A) Q1, B) Q2, C) DBQ.

Tomando en cuenta los resultados anteriores planteamos el siguiente modelo global para explicar la complicada cinética de la enzima (Fig 19).

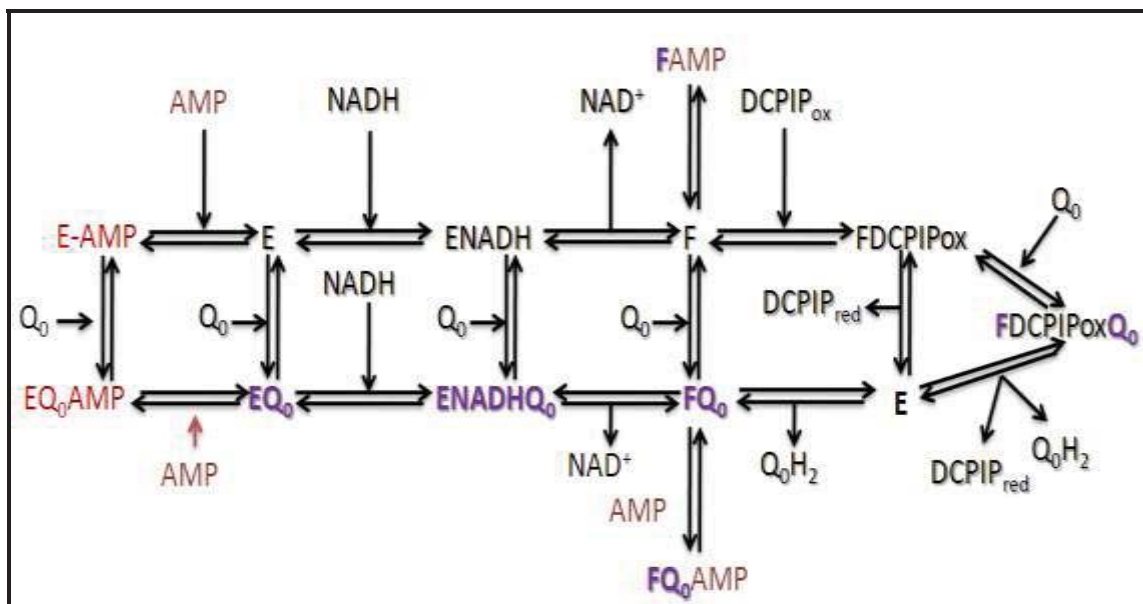


Figura 19. El modelo global de la cinética de la NDI1.

Del mecanismo planteado se desprenden varios puntos interesantes. Uno de ellos es que la enzima sigue un comportamiento dual, dependiendo de los ligandos oxidantes que se ensayen. Es decir, la enzima sigue un mecanismo no secuencial en presencia de DCPIP (u otros ligandos hidrofílicos como la duroquinona, DQ), pero en presencia de cualquier quinona hidrofóbica sigue un mecanismo secuencial al azar. Otro aspecto que se incluye en este modelo es que en presencia de ambos aceptores de electrones, los dos pueden ser reducidos y ambos son inhibidos de forma no competitiva por el AMP.

El artículo de estos resultados, que demostraban como un resultado por demás novedoso en el inicio del proyecto, fue confirmar la presencia de un complejo ternario de la enzima con el NADH y las quinonas. El trabajo fue escrito para conseguir un artículo original de investigación, pero la publicación en el 2011 de un trabajo experimental equivalente que confirmaba los resultados de este proyecto doctoral [83] nos hizo virar de nueva cuenta hacia otros objetivos.

## Los complejos de la NDI1 en la mitocondria

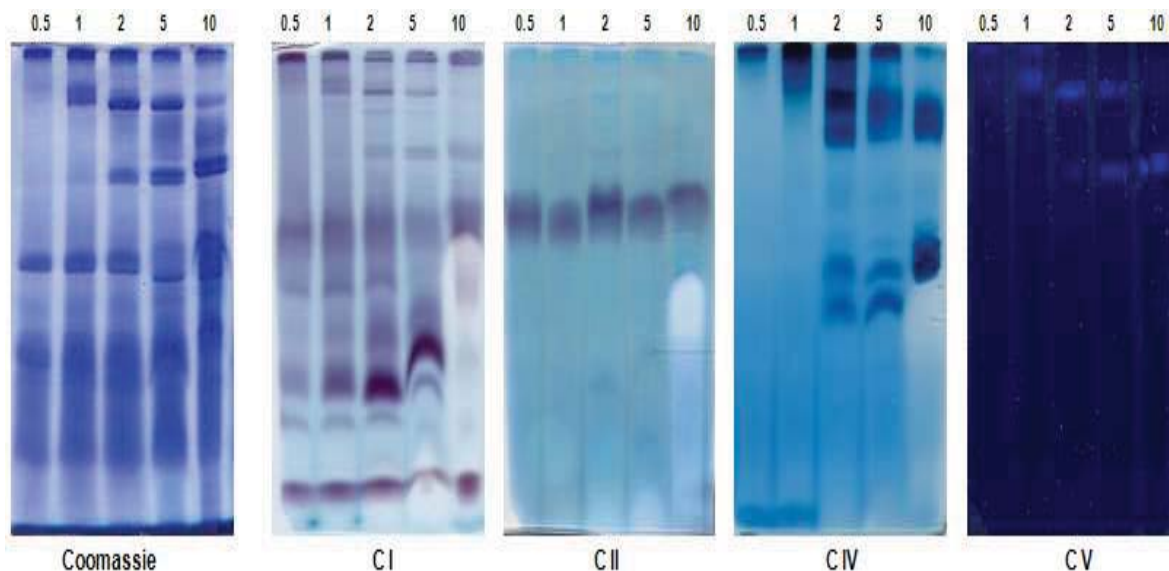
Para salvar este proyecto doctoral, pues nuestro trabajo que detectaba la presencia de dímeros cinéticamente activos en la enzima recombinante, y la formación de un complejo ternario de la enzima con sus ligandos naturales (NADH y quinonas), fue publicado por otros grupos de investigación, se decidió analizar a la enzima en su entorno natural, utilizando técnicas de zimogramas en geles nativos en condiciones no desnaturizantes.

Para conseguir este objetivo, se cultivaron a las células de *S. cerevisiae* en diferentes medios líquidos como glucosa, peptona y extracto de levadura (YPD), glucosa 1%, lactato 1% y etanol 1%, todos ellos con un pH ajustado a 4.5.

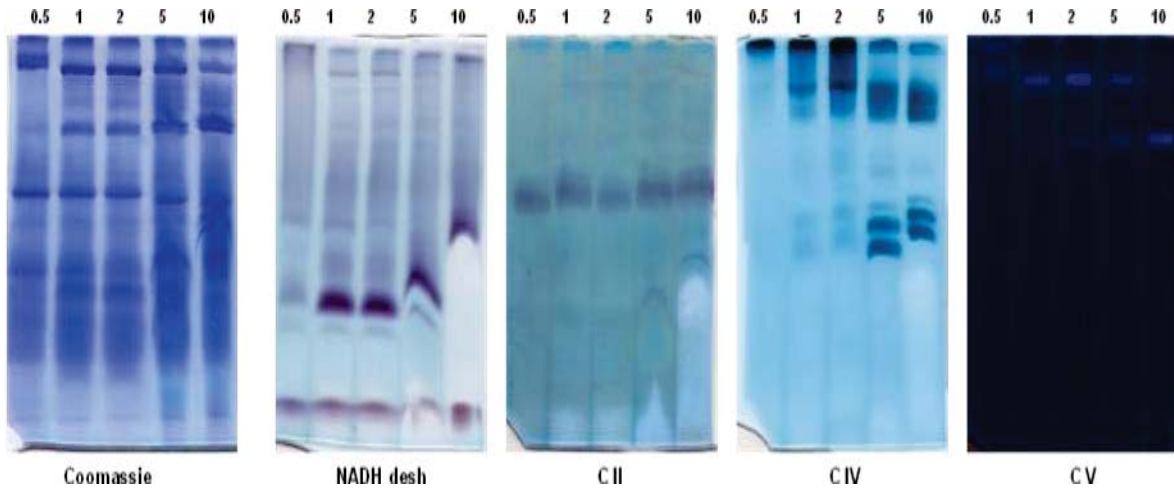
Una vez alcanzada la mitad de la fase de crecimiento logarítmico se cosecharon las células y obtuvieron las mitocondrias para solubilizarlas después utilizando diferentes detergentes como digitonina, tritón x-100 y dodecil maltósido (DDM) en distintas relaciones de detergente/proteína: 0.5, 1, 2, 5 y 10 mg/mg, para disociar con diferente fuerza las proteínas de las membranas mitocondriales. con estas muestras se realizaron los zimogramas de los geles de poliacrilamida azules nativos en gradiente (BN-PAGE), por actividad para cada complejo (excepto el complejo III); además se tiñó un gel con azul de coomasie para visualizar las proteínas.

Los zimogramas para la cepa silvestre (wild type) se muestran a continuación:

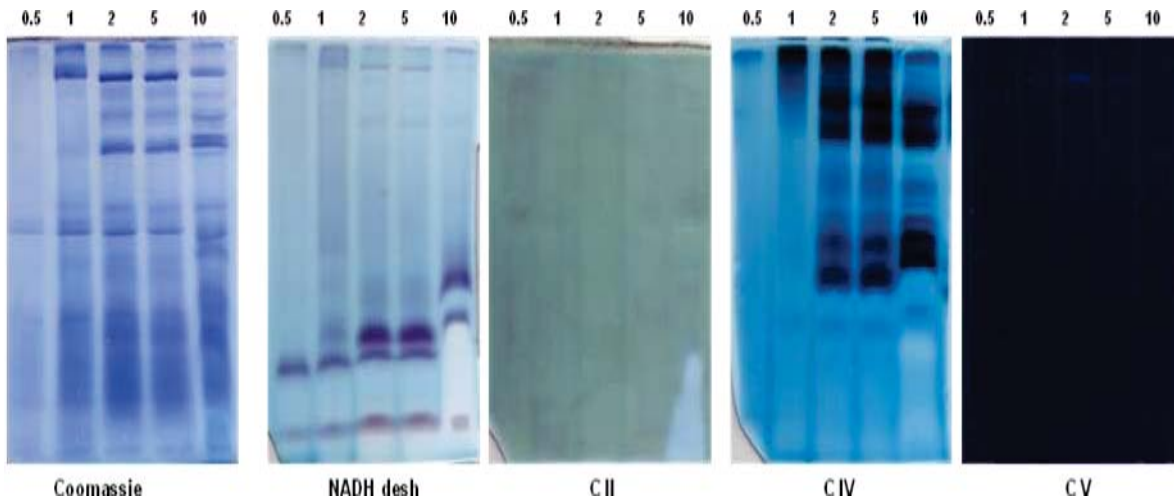
### EtOH 1 % pH 4.5 (28 hrs de cultivo)

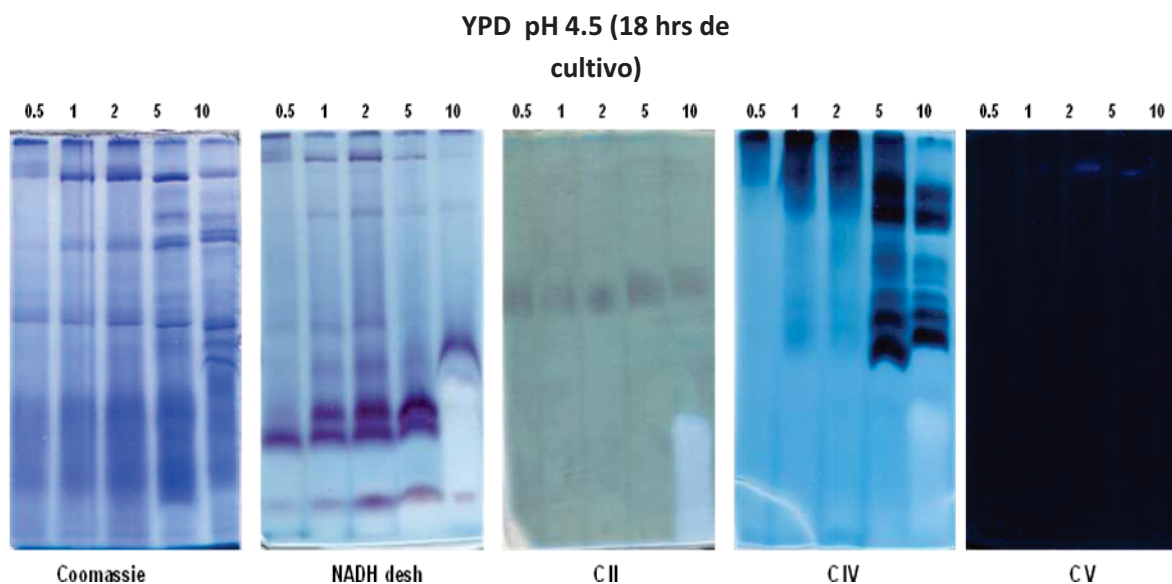


### Lactato 1 % pH 4.5 (28 hrs de cultivo)



Glucosa 1% pH 4.5 (18 hrs de cultivo)

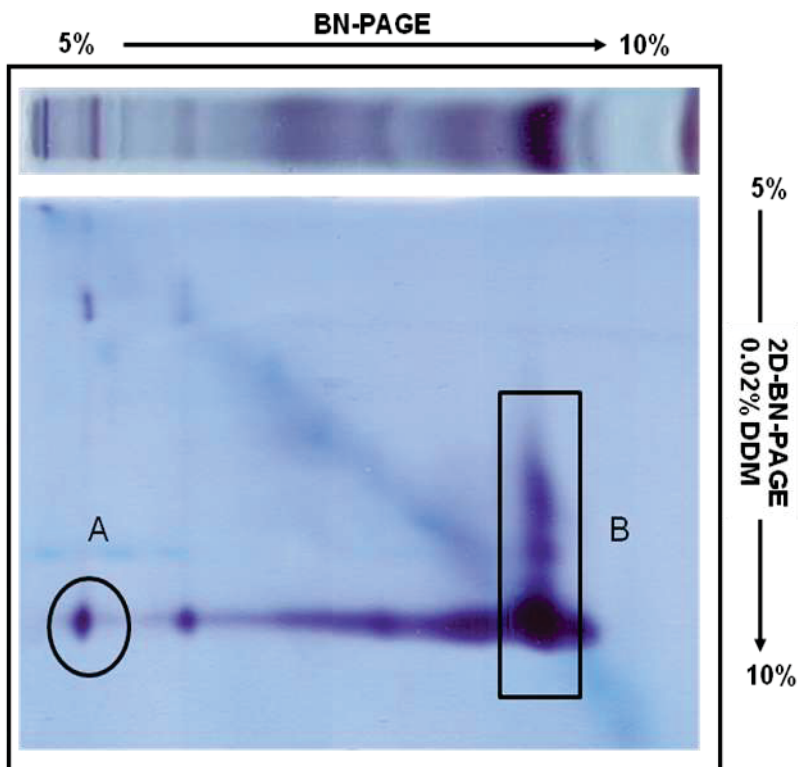




**Figura 20.** Resultado de los zimogramas en gradiente (5 al 10%) de la actividad de NADH deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa, citocromo c oxidasa y ATPasa de mitocondrias provenientes de diferentes medios de cultivo.

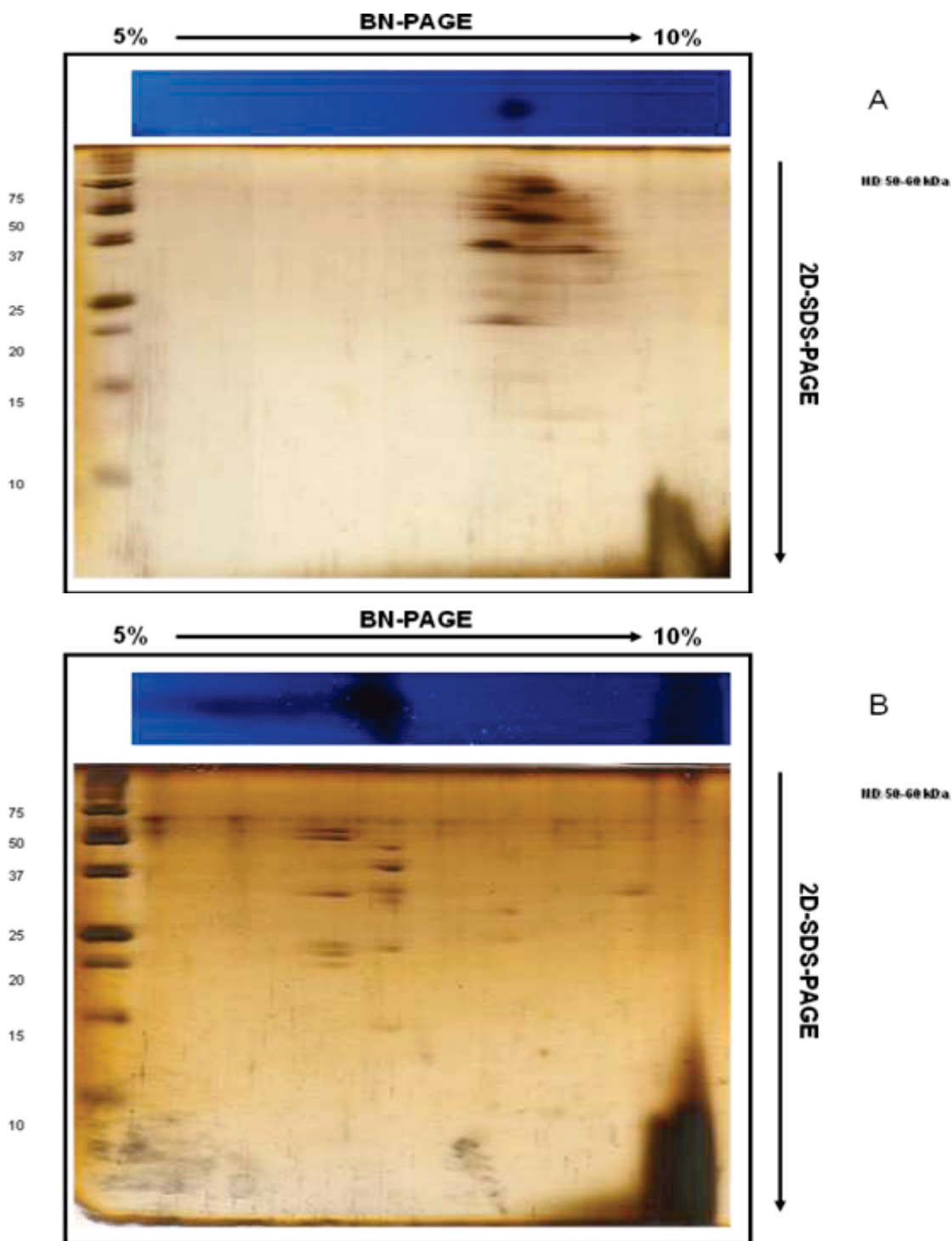
Todas las electroforesis realizadas geles nativos azules (BN-PAGE) de esta primera dimensión se realizaron con un gradiente de acrilamida que va del 5 al 10 % y se corrió la electroforesis toda la noche a 25 V. El resultado más notable fue encontrar entidades supramoleculares de mayor tamaño a los reportados por Grandier-Vanzielle en 2001 [83] que tenían actividad de NADH deshidrogenasa. Estas entidades supramoleculares se sobreponen bien con actividades de citocromo c oxidasa (complejo IV), lo que haría suponer una interacción entre la NADH deshidrogenasa y el complejo IV. Existen diferencias pequeñas al comparar las condiciones de cultivo de las levaduras en etanol, lactato, YPD y glucosa, pero estas diferencias no fueron las más notables.

Al momento de correr una electroforesis en una segunda dimensión, el carril de la proteína solubilizada con 2 mg/mg de digitonina/proteína en un gel de acrilamida-bisacrilamida con un gradiente del 5 al 14 % se obtuvieron patrones electroforéticos como el siguiente:



**Figura 21.** Resultado de la doble dimensión en condiciones desnaturalizantes en presencia de dodecil maltósido (DDM) al 0.02 %. Este gel se hizo para separar cada uno de los componentes con actividad en la primera dimensión nativa realizada.

De este gel BN-PAGE se tomaron dos regiones señaladas como A y B en la figura que mostraron actividad de NADH deshidrogenasa, para realizar una tercera dimensión en un gel en condiciones desnaturalizante. Para esto se hirvieron las tiras de gel en presencia de la mezcla que contiene SDS y  $\beta$ -mercapto etanol para disociar todas las proteínas. Al realizarse una tercera dimensión en un gel SDS-PAGE con 16 % de glicerol, se obtuvieron los siguientes perfiles de electroforésis (para la tinción de la proteína se ocupó plata), donde los puntos corresponden únicamente a aquellas proteínas asociadas con los complejos que tenían actividad de NADH deshidrogenasa. Para visualizar las proteínas se utilizó la tinción con plata.



**Figura 22. Panel A y B.** Resultados de la tercera dimensión en condiciones desnaturalizantes en presencia de docecil sulfato de sodio (SDS) de los spots señalados como A y B en la figura 21. Al utilizar detergentes aniónicos fuertes como el SDS, los complejos que aún permanecían unidos en la segunda dimensión fueron descompuestos en las proteínas que los componen.

Los puntos de proteína que se creyeron pudieran corresponder a las deshidrogenasas alternas fueron mandadas a secuenciar y se confirmó la presencia de la proteína.

Con el fin de identificar la deshidrogenasa que interactúa con las proteínas para formar supercomplejos, se utilizaron tres cepas mutantes para las deshidrogenasas externas. La primera de ellas carece de la Nde1 (cepa PK152), la segunda no posee la Nde2 (cepa PK162), y la tercera cepa corresponde a una doble mutante que no posee las dos deshidrogenasas externas (PK 1672b). Al realizar el análisis de estas mutantes se encontró que la deshidrogenasa interna se encuentra de manera invariable en los complejos multienzimáticos de alto peso molecular, y que la ausencia de una o de ambas deshidrogenasas externas, no cambia el perfil de los zimogramas realizados. Los perfiles electroforéticos de los zimogramas para las actividades de NADH deshidrogenasa y de citocromo c oxido-reductasa se muestra a continuación:

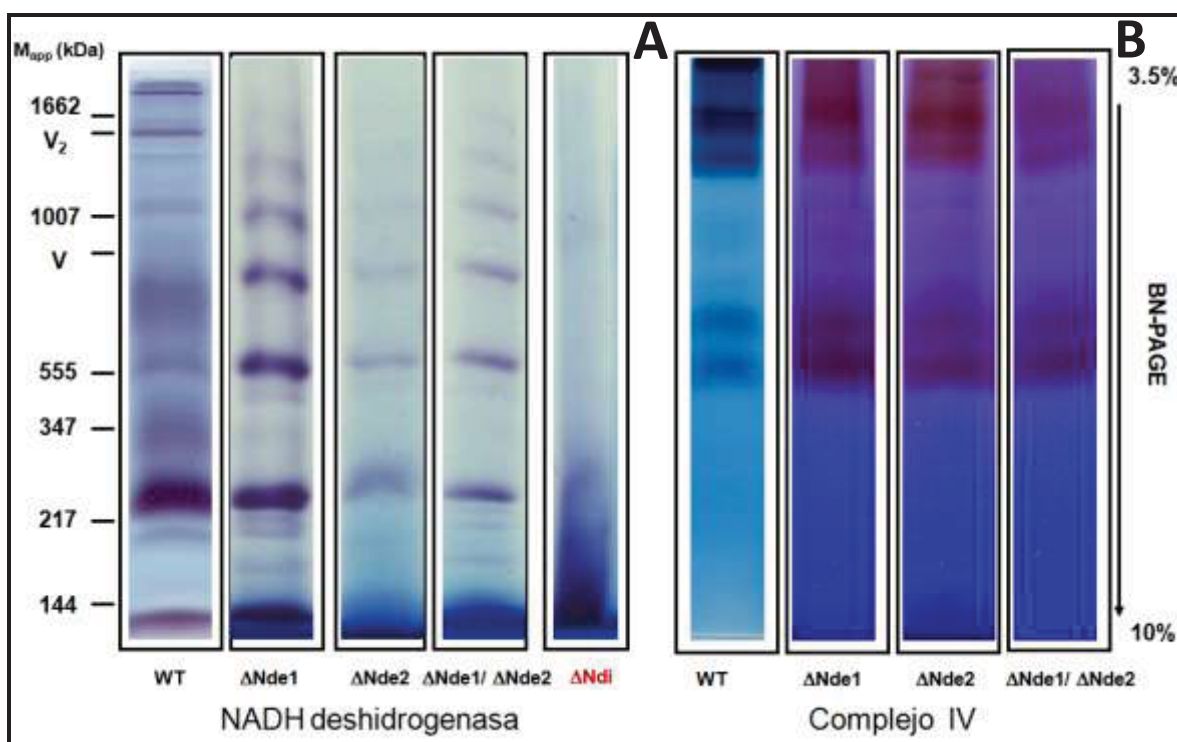
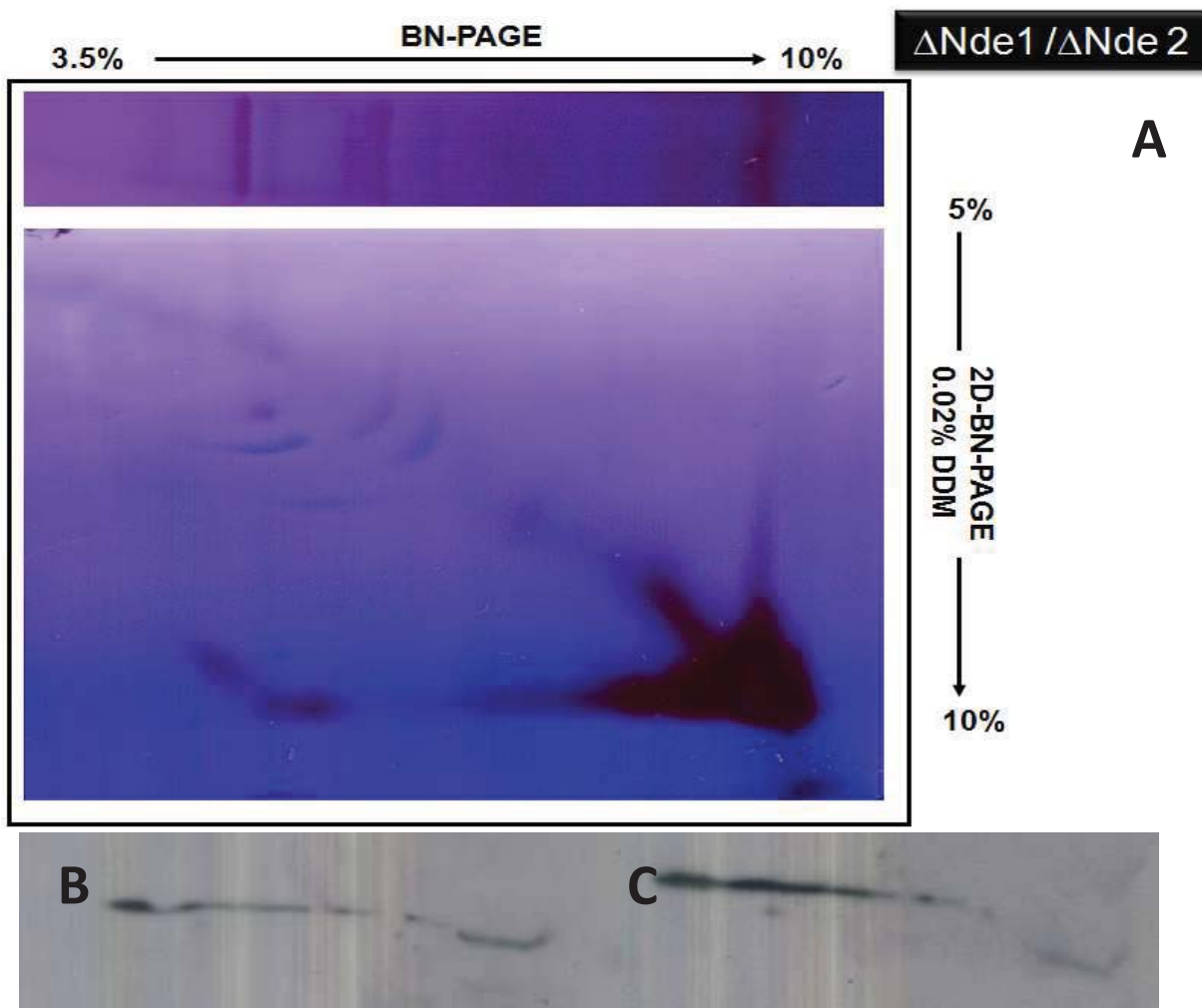


Figura 23. Panel A Zimograma revelado por actividad de NADH deshidrogenasa de las tres mutantes, Panel B. Zimograma revelado por actividad de citocromo c oxido-reductasa.

El resultado más contundente para demostrar que los supercomplejos con actividad de NADH deshidrogenasa permanecen aún en la doble mutante se observan en el siguiente gel, donde se coloca el perfil electroforético de la segunda dimensión nativa realizada en presencia de 0.002 % de dodecil maltósido. Igual de valiosa fue la información obtenida de los zimogramas de la mutante que carece de la NDI1 ( $\Delta NDI1$ ), pero si posee las dos deshidrogenasas externas (NDEI y NDEII), en la que no se observó actividad de NADHII asociada a dímeros o estructuras de mayor peso.





**Figura 24. Panel A.** Segunda dimensión del zimograma realizado con las muestras mitocondriales de la doble mutante  $\Delta Nde1\Delta Nde2$  de *S. cerevisiae*. Panel B y C. Resultados del western blot utilizando anticuerpos contra la NDI1 en una electroforesis de la cepa WT y de la doble mutante  $\Delta Nde1 \Delta Nde2$  de *S. cerevisiae*.

A partir de este gel y de las primeras dimensiones se tomaron varias secciones para ser secuenciadas por espectrometría de masas en las que se confirmó la presencia de la NDI1 formando parte de los supercomplejos. Asimismo, también se realizaron ensayos de western blot utilizando anticuerpos contra la NDI1 de *S. cerevisiae* y se confirmó la presencia de la enzima formando supercomplejos de alto peso molecular tanto en la cepa silvestre como en la doble mutante que carece de las dos deshidrogenasas externas (Figuras 24B y 24C).

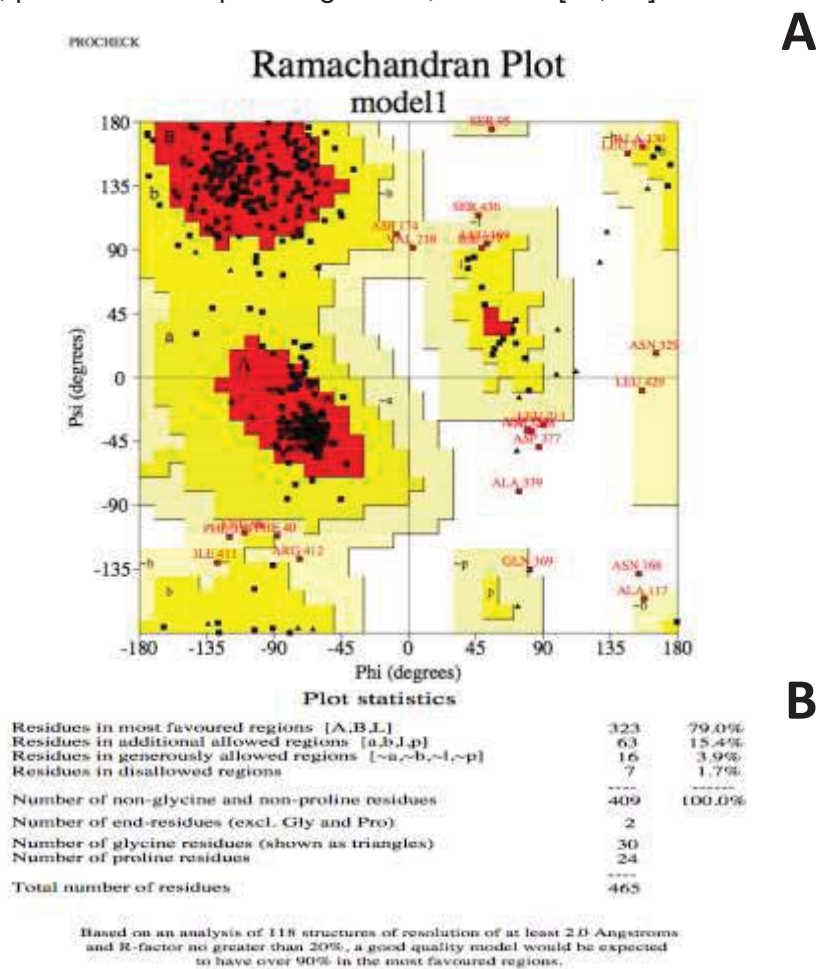
Lo más notable del trabajo realizado en esta parte del proyecto puede resumirse en los siguientes puntos:

- 1) Existe más de una especie multimérica con actividad de NADH deshidrogenasa en *S. cerevisiae* ( $M_{app}$  kDa 1662, 1007, 555, 347, 217, 145).
- 2) La mayor actividad de NADH deshidrogenasa no está asociada a monómeros (50-60 kDa) sino a dímeros (112 y 144 kDa).

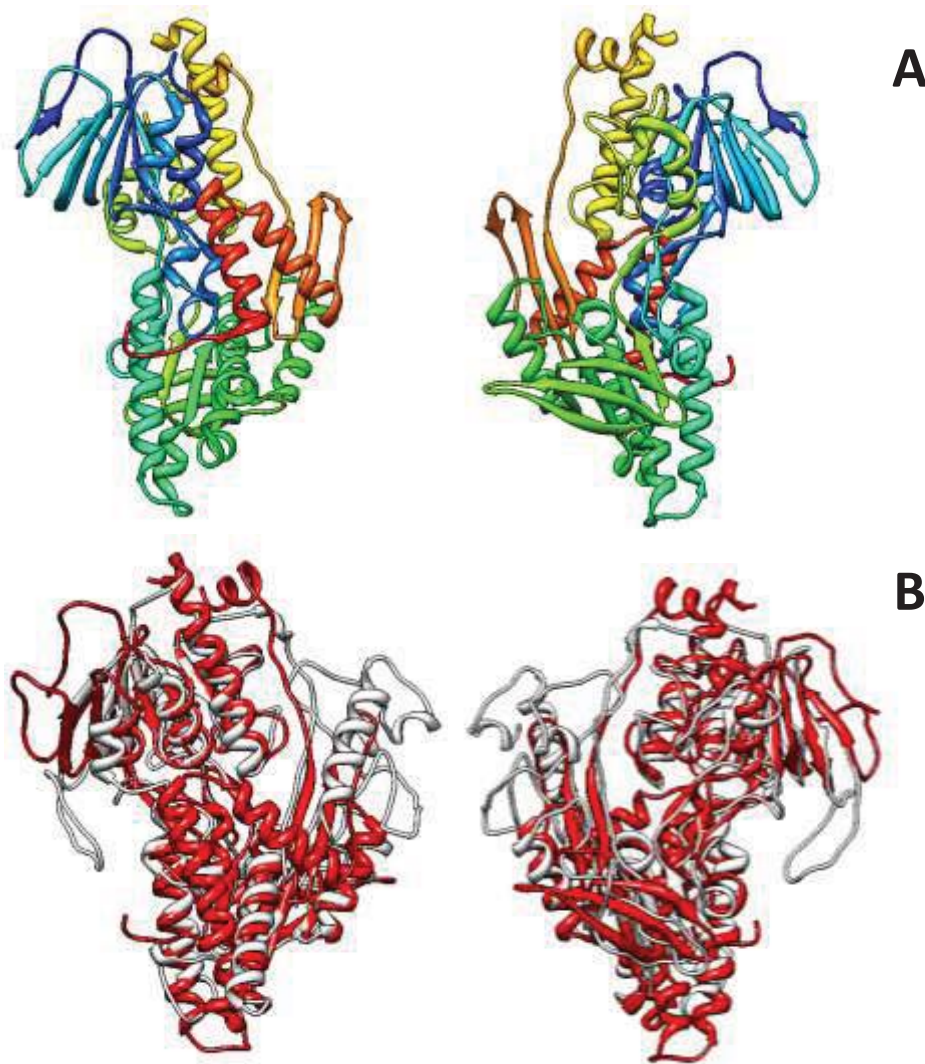
- 3) La presencia de los supercomplejos no depende de la fuente de carbono con que se suplemente el medio de cultivo.
- 4) La especie multimérica de mayor peso molecular encontrada en este trabajo (1662.4) excede en peso molecular al dímero del complejo V (1466).
- 5) Una de las especies multiméricas de mayor peso molecular está vinculada a la actividad de citocromo *c* oxidasa.
- 6) Toda la actividad de citocromo *c* oxidasa se presenta asociada a complejos multiméricos (0.5 mg/mg dig) en ausencia de detergente.
- 7) No existe una especie multimérica con actividad de NADH deshidrogenasa que tenga actividad de succinato deshidrogenasa (601).
- 8) El supercomplejo con actividad de succinato deshidrogenasa no se disocia aún con concentraciones de 10 mg digitonina/mg proteína.
- 9) Se requieren de relaciones mayores de 1mg de digitonina/mg proteína para que se presente el dímero de ATPasas (complejo V).
- 10) Las tres cepas mutantes de las NADH deshidrogenasas externas ( $\Delta nde1$ ,  $\Delta nde2$ ,  $\Delta nde1/\Delta nde2$ ) presentan complejos multiproteicos de gran peso molecular con actividad de NADH deshidrogenasa semejantes a la WT, lo que indica que:
  - 11) La Ndi1 forma parte de los supercomplejos con actividad de NADH deshidrogenasa de alto peso molecular.
  - 12) La ausencia de alguna deshidrogenasa externa, o de ambas, no afecta la presencia de los supercomplejos con actividad de Ndi1.

## DISCUSIÓN

La validez de los modelos *in silico* realizados para generar información sobre la estructura tridimensional de la NDI1 se comprobó con el gráfico de Ramachandran (Dyanarama-Ramachandran) en servidores como Procheck que describen los ángulos diédricos de las proteínas y su posición en ciertas zonas termodinámicas. Los resultados fueron satisfactorios teniendo, en varios modelos realizados por homología y entretejido, que el 79% de los residuos caían en regiones con termodinámicas favorecidas (figura 25). Sin embargo, una vez que en el año 2012 salieron los resultados de la estructura tridimensional de la NDI1 resuelta por la técnica de cristalografía de rayos X, nuestros modelos dejaron de tener mayor relevancia aunque fueron útiles para analizar la incertidumbre en la predicción. En la parte superior de la figura 26 se colocan dos vistas laterales de la estructura tridimensional de la NDI1 (clave PDB 49GK), y en la parte inferior se muestra el resultado de la superposición del modelo generado por nuestro equipo y la estructura tridimensional resuelta a 2.7 Å por el equipo de M. Iwata y colaboradores y, posteriormente por Feng Y et al, en 2012 [70, 71].



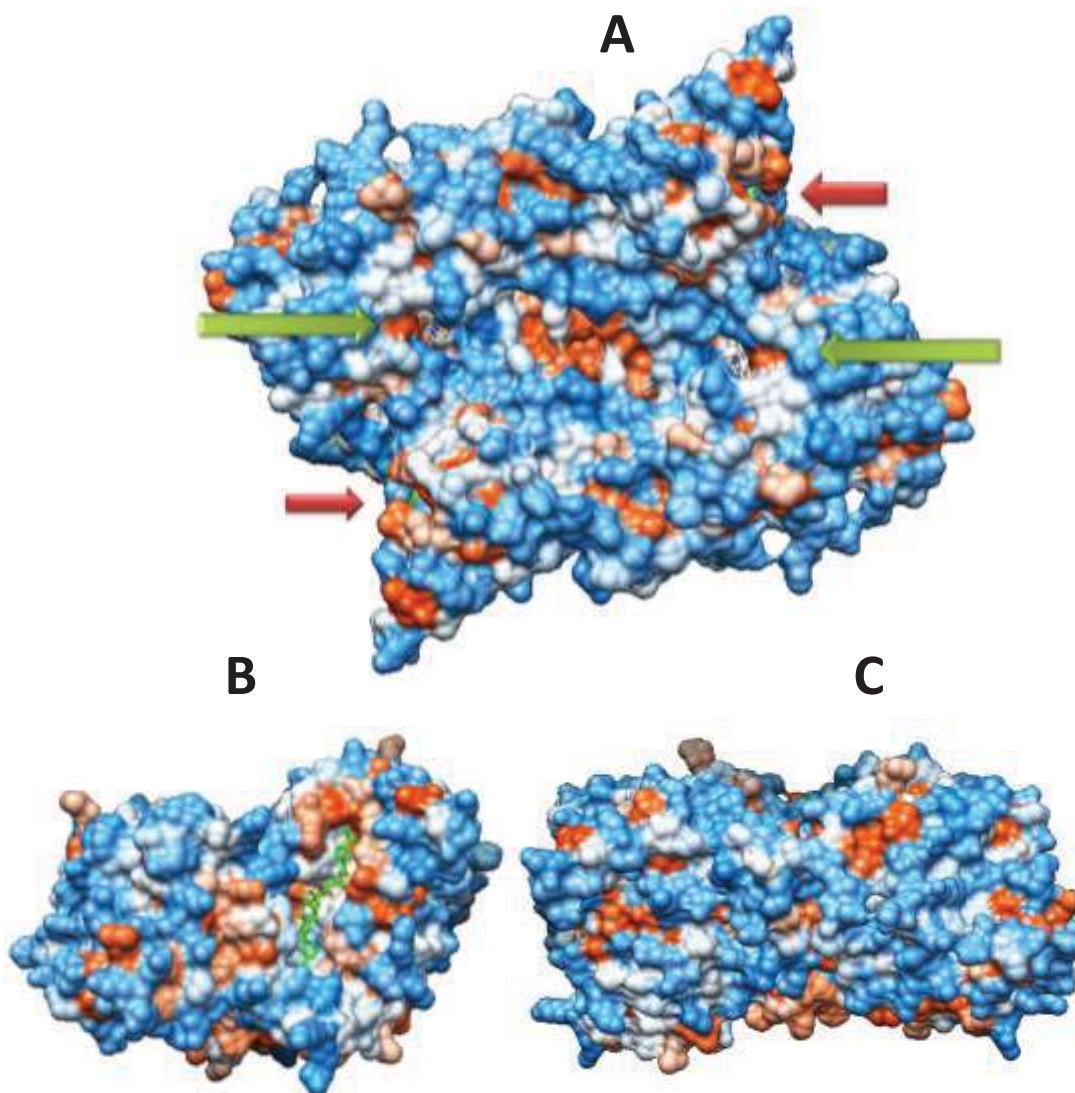
**Figura 25. Panel A.** Gráfico de Ramachandran de uno de los modelos construidos para la NDI1. **Panel B** el resumen cuantitativo de los parámetros del modelo generado.



**Figura 26 Panel A.** Vistas laterales de la estructura tridimensional resuelta en el año 2012 por la técnica de cristalografía de rayos X NDI1 (clave en PDB 49GK) de *S. cerevisiae*. **Panel B** ensamble del modelo 1 generado por la técnica de homología a partir del modelo de *Thermus thermophilus* y la estructura terciaria resuelta por cristalografía de rayos X.

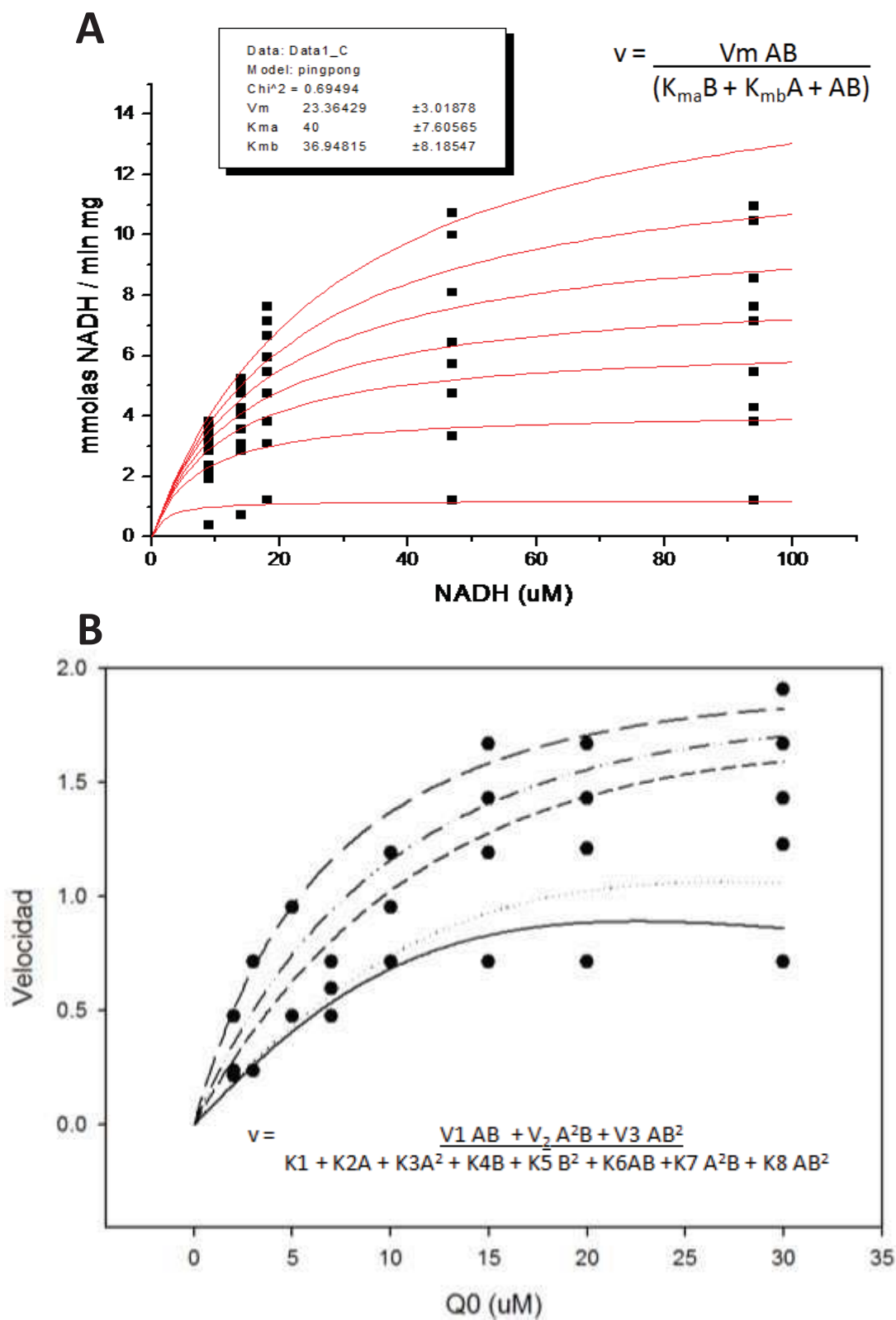
Los modelos teóricos que se obtuvieron al inicio del proyecto nos permitieron inferir la presencia de un complejo ternario en la NDI1 con sustratos oxidantes hidrofóbicos como las quinonas. Nuestra hipótesis fue confirmada experimentalmente a través de ensayos cinéticos en estado estacionario. Finalmente, al resolverse la estructura tridimensional de la enzima se observó en experimentos de co-incubación que el NADH y la quinona pueden estar unidos a la enzima en lados opuestos de la proteína.

Del lado hidrofóbico del dímero de la NDI1, como se esperaba, se encontró un canal que permite el acceso de la quinona al anillo de isoaloxacina del FAD a la quinona (señalada en verde en la figura 27), y del otro lado se encontró la entrada del NADH + H<sup>+</sup> (indicado con flechas rojas en la figura 27) también en contacto con el anillo de isoaloxacina, tal y como sugerían nuestros resultados experimentales e inferencias teóricas.



**Figura 27. Panel A.** Vista de la superficie membranal del dímero de la NDI1 de *S. cerevisiae*. Con flechas rojas se señala la posición de entrada del NADH. Con flechas verdes se señalo el anillo de isoaloxacina del FAD expuesto a la superficie membranal. **Panel B.** Vista lateral del dímero de la NDI1 en donde se observa el NADH dentro de la enzima. **Panel C.** Vista frontal de la intersección del dímero de la NDI1.

Diferentes grupos de investigación como Kersher, Brandt et al y Velázquez-Pardo, et al [1, 69] propusieron que la NDI1 funciona con un mecanismo ping pong en presencia de ligandos hidrofílicos como el DCPIP D. Por ello, para confirmar este modelo cinético se realizaron ensayos cinéticos en condiciones de estado estacionario y se hizo un ajuste global no lineal utilizando la ecuación correspondiente al mecanismo Bi-Bi. En la figura 28 se coloca el ajuste global, que en lo general es bastante bueno.

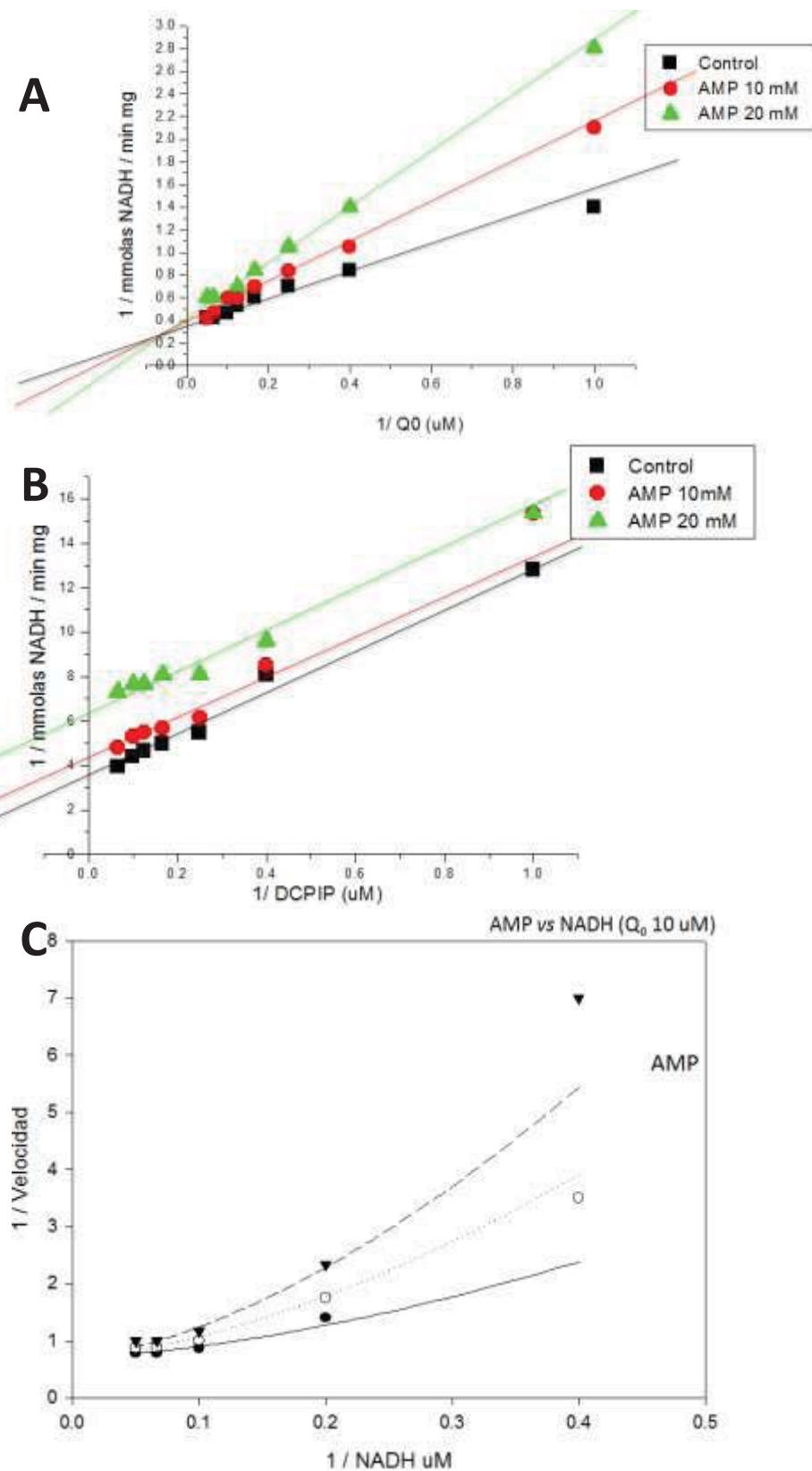


**Figura 28. Panel A.** Ajuste global no lineal de la NDI1 en presencia de DCPIP (sustrato fijo variable) y el NADH (sustrato variable). En el recuadro superior se coloca la ecuación con la que se hizo el ajuste global no lineal de los datos experimentales. El programa utilizado para realizar el ajuste no lineal de los datos fue Origin. **Panel B.** Ajuste global no lineal de la NDI1 en presencia de la quinona cero (sustrato fijo) y el NADH (sustrato fijo variable). En el recuadro superior se coloca la ecuación con la que se realizó el ajuste no lineal en el programa Sigma Plot.

Se realizaron ensayos cinéticos utilizando diversas quinonas ya que el sustrato natural es la quinona con 6 unidades isoprenoides), y el modelo que más se ajusta a los datos fue el bi-bi o azar en estado estacionario. En la figura 28 panel B se muestra el ajuste realizado.

Utilizando estrategias cinéticas de inhibición en condiciones de estado estacionario con el AMP, se encontró que este compuesto mono fosfatado da un comportamiento no competitivo con respecto a la quinona (figura 29 panel A), pero respecto al DCPIP el comportamiento es acompetitivo (panel B). Más aún, cuando el AMP se ensayó en contra del NADH, el resultado fue el esperado, resultó ser un inhibidor competitivo (panel C).

Durante los ensayos cinéticos realizados, fue interesante encontrar frecuentemente la presencia de cooperatividad negativa (ver zonas de mayor concentración en los paneles A y B de la figura 28). En ocasiones este comportamiento fue difícil de detectar pues en el gráfico de dobles recíprocos, las velocidades experimentales obtenidas con altas concentraciones de sustratos generaban una aglutinación de puntos que bien pueden ser interpretados como rectas o curvas, según la amplitud de la escala. Sin embargo, en la figura 30, donde es claro que el AMP se comporta como un inhibidor competitivo respecto al NADH es muy obvio detectar la cooperatividad, aunque en este caso la cooperatividad es positiva.



**Figura 29. Panel A** Gráfico de doble recíproco para evaluar el tipo de inhibición del AMP sobre la quinona cero. **Panel B.** Gráfico de doble recíproco para analizar la interacción entre el AMP y el DCPIP. **Panel C.** Gráfico de doble recíproco para caracterizar el tipo de inhibición entre el AMP y el NADH.



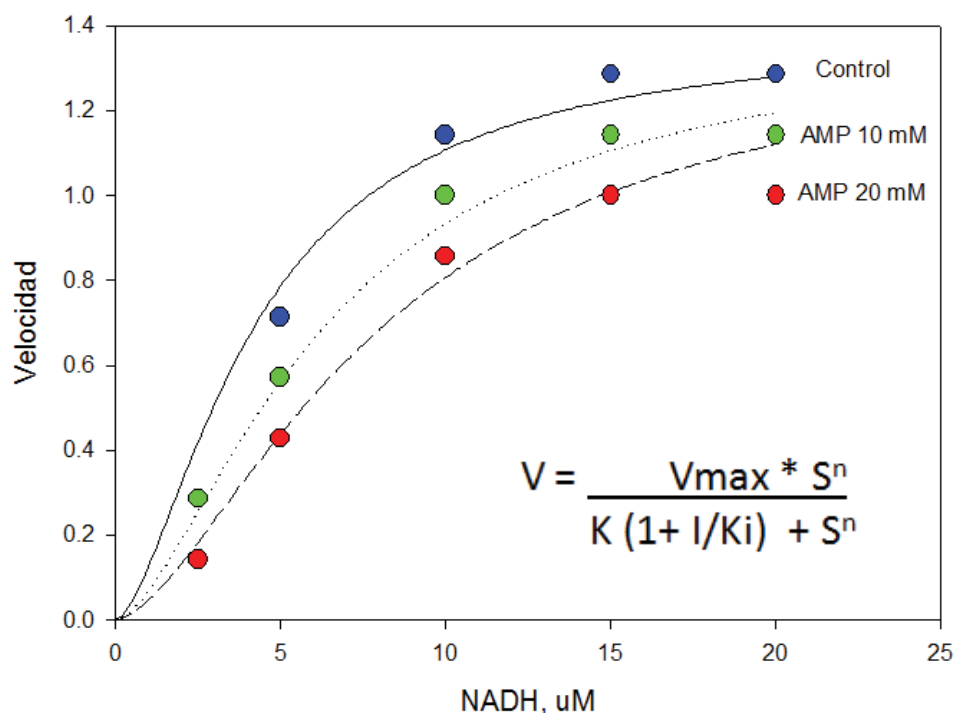


Figura 30. Gráfico directo en el que se ensaya el tipo de inhibición del AMP sobre el NADH. El programa utilizado para realizar el ajuste no lineal con la ecuación colocada en el recuadro es Sigma plot.

La inhibición competitiva que confirma la unión del DCPIP y el NADH en el mismo sitio fue evidente cuando se ensayaron cinéticas en concentraciones menores de 2  $\mu$ M de NADH (figura 31).

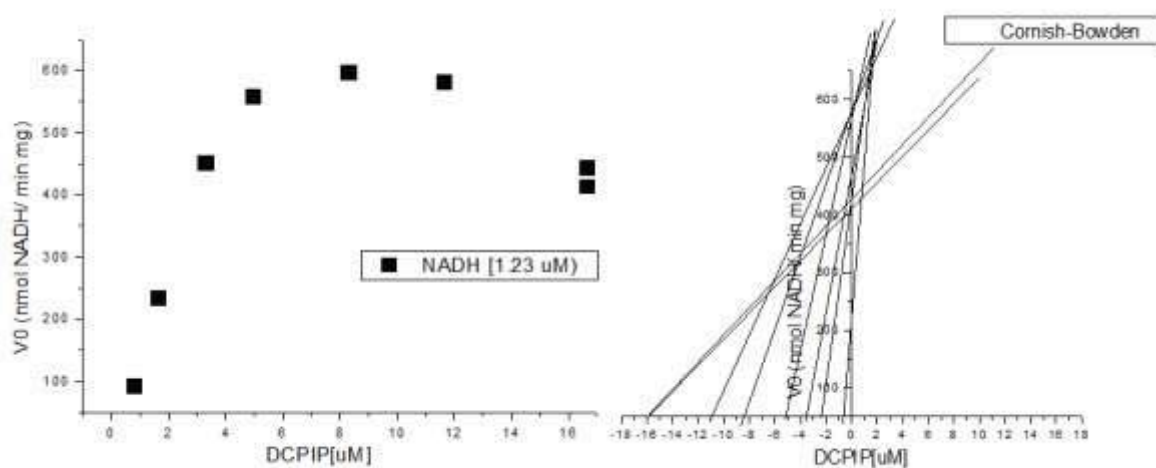
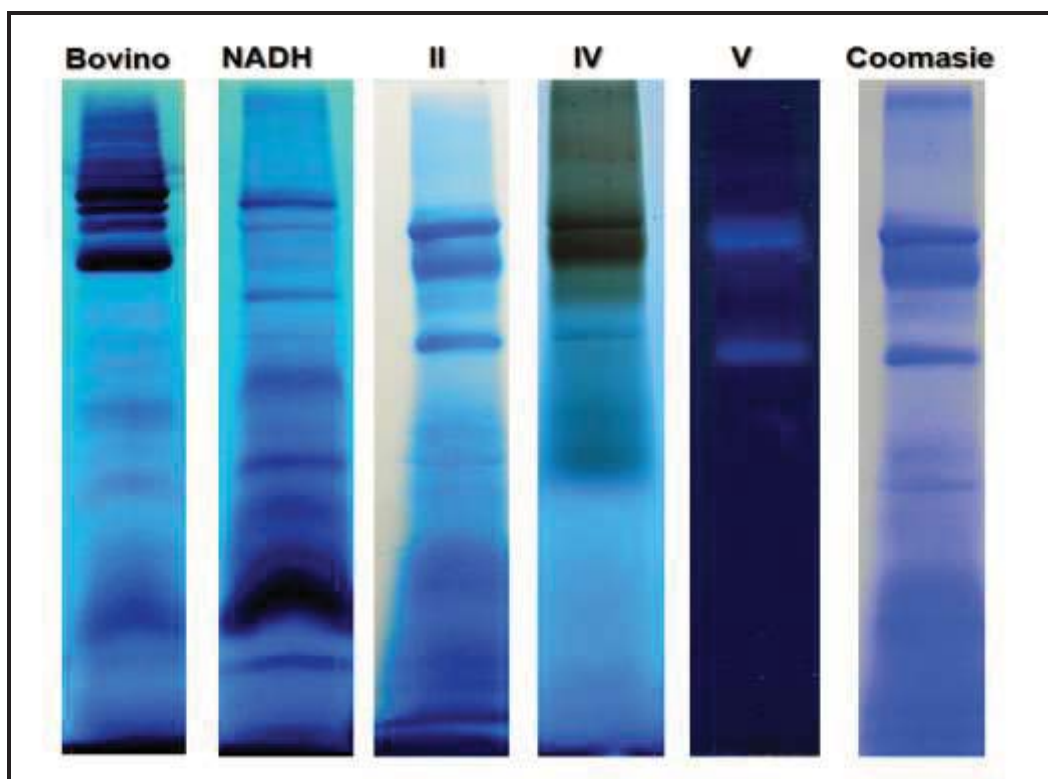


Figura 31. Panel A. Gráfico directo en el que se observa una inhibición por sustrato a bajas concentraciones de NADH. Panel B. Gráfico de Eisinger-Cornish-Bowden que muestra los dos diferentes puntos de velocidad máxima que se obtienen con la intersección de las velocidades iniciales obtenidas en condiciones de estado estacionario.

Con los resultados de los zimogramas con las muestras de mitocondrias de las diferentes mutantes que carecen de una o más deshidrogenasas se puede inferir que la NDI1 es parte fundamental de supercomplejos mitocondriales semejantes a los de mamíferos, se ha propuesto que la actividad de NADH deshidrogenasa es fundamental en estas estructuras supercuaternarias para canalizar los electrones hacia el complejo III y el IV así optimizar el funcionamiento de los componentes respiratorios.

Las preparaciones de mitocondria extraídas de las células provenientes del lisado de cultivos en 4 diferentes medios (YPD, Glu, Lact y EtOH, ajustados a pH 4.5) que se encontraban en la parte final de la fase logarítmica, se solubilizaron con diferentes relaciones de un detergente poco agresivo (digitonina) y también con otros detergentes con mayor capacidad de disociación (DDM y tritón X- 100). Sin lugar a dudas, el resultado más notable fue encontrar entidades supramoleculares de mayor tamaño a los reportados por Grandier-Vanzielle en 2001 que tenían actividad de NADH deshidrogenasa. Estas entidades supramoleculares de muy alto peso molecular se sobrepone bien con actividades de citocromo *c* oxidasa (complejo IV), lo que haría suponer una interacción entre la NADH deshidrogenasa y el super complejo III<sub>2</sub>-IV. Existen diferencias pequeñas al comparar las condiciones de cultivo de las levaduras en EtOH, Lact, YPD y Glu, pero estas diferencias no fueron las más notables. Más adelante se puede abundar experimentalmente en este tópico viendo las condiciones particulares desde el punto de la proteómica para secuenciar y establecer posibles cambios en las rutas metabólicas.



**Figura 32.** Zimogramas de la cepa WT de *S. cerevisiae*. En el carril izquierdo se coloca como control de corrimiento mitocondrias de bovino. En el segundo carril se coloca el zimograma con las manchas correspondientes a la oxidación del NADH, en el tercer carril se muestra el zimograma correspondiente a la actividad de succinato deshidrogenasa. En el cuarto carril coloco la actividad de complejo IV, en el carril V se muestra la actividad de la ATPasa (complejo V), en el carril seis coloco el gel teñido con coomasie como control de carga de la proteína.

La figura 32 muestra los geles correspondientes a los zimogramas de cada actividad en mitocondrias de la cepa WT. Los supercomplejos visibles en esta figura es congruente con los resultados previamente obtenidos con la doble mutante. De estos resultados hay que resaltar que en todas las cepas analizadas, la actividad de complejo II se encuentra en regiones de alto peso molecular, lo que indica que (al igual que la actividad de citocromo c oxidasa) este complejo se encuentra unido con otros componentes mitocondriales, pero no con las NADH deshidrogenasas. La formación de supercomplejos en las mitocondrias se argumenta debido a la necesidad de conseguir una optimización (canalización) en el flujo de electrones, así como incrementar la estabilidad de los complejos respiratorios.

Para confirmar que la ausencia de alguna de las deshidrogenasas no afectaba a la morfología de las mitocondrias de *S. cerevisiae*, se realizaron micrografías electrónicas de transmisión (figura 33). Este resultado podía resultar obvio, pues además de ser pequeñas, las deshidrogenasas apenas forman una porción minoritaria de las proteínas de las mitocondrias, en comparación con los complejos respiratorios clásicos.

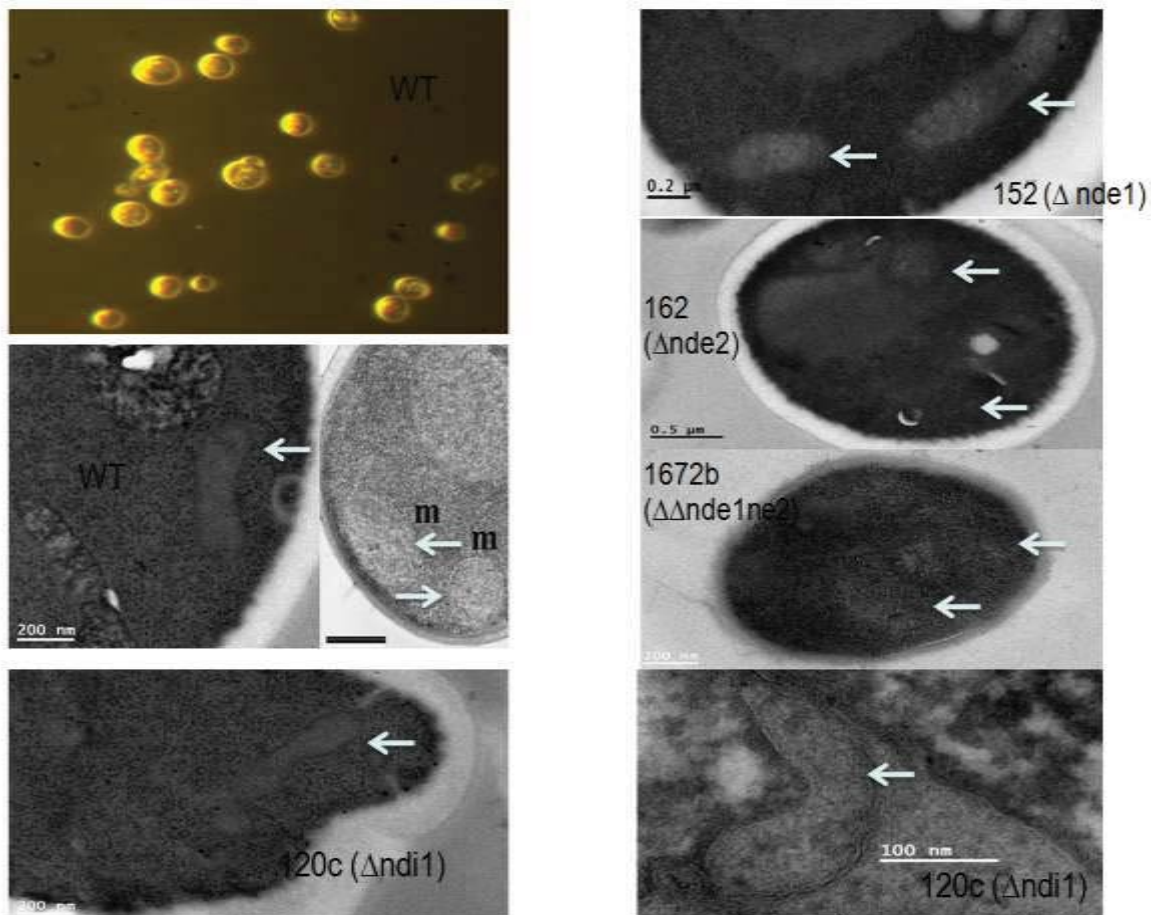


Figura 32. Micrografías obtenidas con microscopio de transmisión para evaluar la forma y topología externa de las mitocondrias de las diferentes cepas de *S. cerevisiae* analizadas en el laboratorio.

Cuando se encontró la presencia de genes homólogos a la NDI1 en animales inferiores, una de las preguntas que surgió fue conocer cómo es la distribución del otro elemento alterno: la oxidasa insensible a cianuro. Como se mencionó en la introducción, ambos elementos alternos desempeñan funciones aparentemente “redundantes” con los complejos respiratorios I y IV, respectivamente. Pero pueden desempeñar también una función central cuando fallan los complejos clásicos o bien cuando las mitocondrias están en condiciones de alto flujo de electrones. En el caso de *S. cerevisiae*, la NDI1 tiene una función fundamental pues permite la reoxidación del NADH de la matriz mitocondrial y así, posibilita una dinámica en los procesos de óxido-reducción de los equivalentes reductores formados en el ciclo de Krebs y la  $\beta$ -oxidación.

Se confirmó la presencia en los tres grandes superdominios del árbol de la vida. En la figura 33 se resumen las dos hipótesis planteadas para explicar la distribución de ambos elementos alternos.

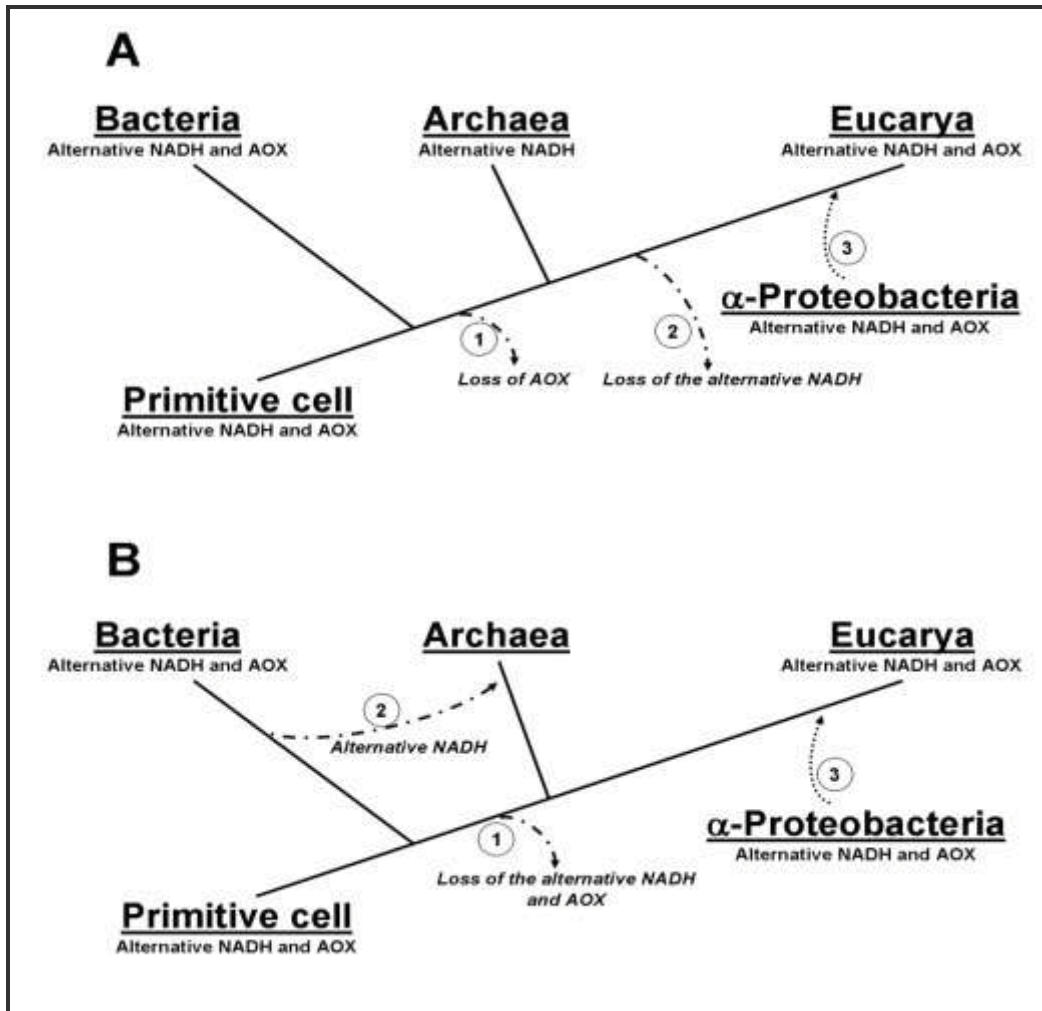
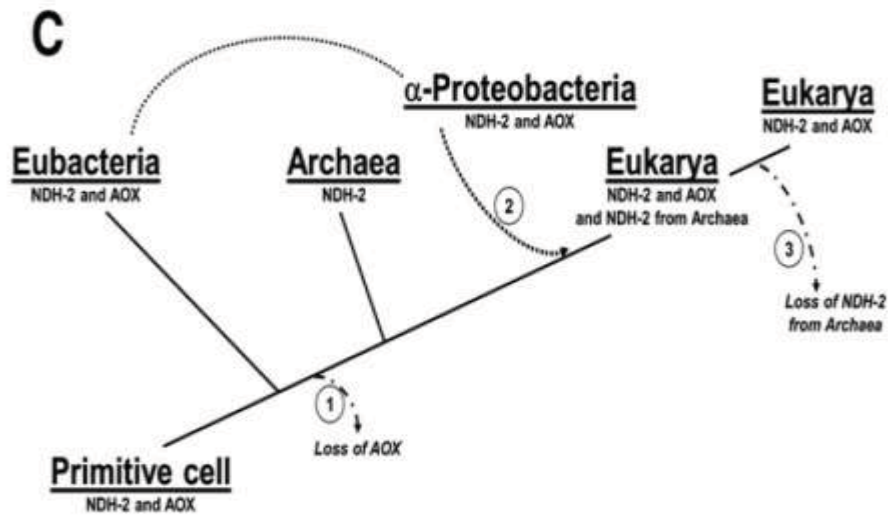


Figura 33. Posibles escenarios evolutivos para explicar la distribución de los elementos alternos NDI1 y AOX.

El primer escenario plantea que el ancestro común a las actuales bacterias, arqueas y eucariotas poseía ambos elementos alternos. Al separarse el filum de las bacterias estas conservaron ambos elementos. No así el ancestro común a las arqueas y a los eucariontes que perdieron a la AOX pero conservaron a las NDII. Al separarse el protoeucarionte primitivo este también perdió a la NDI1 conservando únicamente a los elementos clásicos de las cadenas respiratorias, pero algunos grupos eucariontes (como los hongos y las plantas) recuperaron a las NDII durante los eventos de endosimbiosis con las alfa proteobacterias.

El segundo escenario es muy semejante en la parte superior del árbol, pero contempla que las archeobacterias no conservaron su NDH-2, sino que la recuperaron posteriormente a partir de las bacterias.

Un tercer escenario, planteado por los referees de la revista CBP-D, se presenta en la siguiente figura:



Este plantea que las eubacterias originaron a las alfa proteobacterias en línea directa, y que estas cedieron sus genes de NDII a las eucariontas primitivas que conservaron su oxidasa primitiva, perdiéndolo tempranamente en la especiación reciente de las eucariotas que originó a los hongos, las plantas, los animales y demás grupos derivados.

La aportación de nuestro trabajo en este sentido plantea que ambos elementos alternos, que desempeñan un distinto en las mitocondrias tienen un carácter ancestral, y que probablemente la presencia de los dos elementos alternos sea incompatible con formas de vida móvil, por motivos energéticos.

## BIBLIOGRAFÍA

### Libros consultados:

- A.- Nelson y Cox, (2008) Lehninger Principles of Biochemistry. Freeman fifth edition. U. S. A.
- B.- Devlin, T. M. 2004. *Bioquímica*, 4ª edición. Reverté, Barcelona.
- C.- Voet D. and Voet J. 2011. Biochemistry. Forth edition. John Wiley Inc. U. S. A.
- D.- Alberts B. Molecular Biology of the cell. 4ª Edition (1994).
- E.- Atkinson D. E. 1977 Cellular Energy Metabolism and its regulation. Academic Press, Inc., New York. U. S. A.
- F.- Mckee. 2009. Principles of Biochemistry. McGrawHill. New York. U. S. A.

### Capítulos consultados:

- 1.- Kerscher, S., Dröse, S. Zickermann, H. Brandt, U. The three families of respiratory NADH dehydrogenases. Results Probl Cell Differ (45) 19 may 2007.

### Artículos y revisiones consultadas

1. Dujon, B., *The yeast genome project: what did we learn?* Trends Genet, 1996. 12(7): p. 263-70.
2. DeRisi, J.L., V.R. Iyer, and P.O. Brown, *Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale.* Science, 1997. 278(5338): p. 680-6.
3. Kniskern, P.J., et al., *Unusually high-level expression of a foreign gene (hepatitis B virus core antigen) in Saccharomyces cerevisiae.* Gene, 1986. 46(1): p. 135-41.
4. McNeil, J.B. and M. Smith, *Transcription initiation of the Saccharomyces cerevisiae iso-1-cytochrome c gene. Multiple, independent T-A-T-A sequences.* J Mol Biol, 1986. 187(3): p. 363-78.
5. Madhani, H.D. and G.R. Fink, *The riddle of MAP kinase signaling specificity.* Trends Genet, 1998. 14(4): p. 151-5.
6. Kornberg, R.D., *Eukaryotic transcriptional control.* Trends Cell Biol, 1999. 9(12): p. M46-9.
7. Burke, D.T., G.F. Carle, and M.V. Olson, *Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors.* Science, 1987. 236(4803): p. 806-12.
8. Cosma, M.P., T. Tanaka, and K. Nasmyth, *Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter.* Cell, 1999. 97(3): p. 299-311.
9. Wodicka, L., et al., *Genome-wide expression monitoring in Saccharomyces cerevisiae.* Nat Biotechnol, 1997. 15(13): p. 1359-67.

10. Harris, D.A. and A.M. Das, *Control of mitochondrial ATP synthesis in the heart*. Biochem J, 1991. 280 ( Pt 3): p. 561-73.
11. Boyer, P.D., *The ATP synthase--a splendid molecular machine*. Annu Rev Biochem, 1997. 66: p. 717-49.
12. Slater, E.C., *The mechanism of the conservation of energy of biological oxidations*. Eur J Biochem, 1987. 166(3): p. 489-504.
13. Attardi, G. and G. Schatz, *Biogenesis of mitochondria*. Annu Rev Cell Biol, 1988. 4: p. 289-333.
14. Smeitink, J.A., et al., *Mitochondrial medicine: a metabolic perspective on the pathology of oxidative phosphorylation disorders*. Cell Metab, 2006. 3(1): p. 9-13.
15. Beal, M.F., *Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration*. Ann Neurol, 2005. 58(4): p. 495-505.
16. Kujoth, G.C., et al., *Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging*. Science, 2005. 309(5733): p. 481-4.
17. Boekema, E.J. and H.P. Braun, *Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system*. J Biol Chem, 2007. 282(1): p. 1-4.
18. Hosler, J.P., S. Ferguson-Miller, and D.A. Mills, *Energy transduction: proton transfer through the respiratory complexes*. Annu Rev Biochem, 2006. 75: p. 165-87.
19. Rottenberg, H., *The generation of proton electrochemical potential gradient by cytochrome c oxidase*. Biochim Biophys Acta, 1998. 1364(1): p. 1-16.
20. Saraste, M., *Oxidative phosphorylation at the fin de siecle*. Science, 1999. 283(5407): p. 1488-93.
21. Djavadi, F.H., M. Moradi, and L. Djavadi-Ohanian, *Direct oxidation of NADPH by submitochondrial particles from Saccharomyces cerevisiae*. Eur J Biochem, 1980. 107(2): p. 501-4.
22. Palmer, J.M., J.P. Schwitzguebel, and I.M. Moller, *Regulation of malate oxidation in plant mitochondria. Response to rotenone and exogenous NAD+*. Biochem J, 1982. 208(3): p. 703-11.
23. Rustin, P. and H.T. Jacobs, *Respiratory chain alternative enzymes as tools to better understand and counteract respiratory chain deficiencies in human cells and animals*. Physiol Plant, 2009. 137(4): p. 362-70.
24. Dong, C.K., et al., *Type II NADH dehydrogenase of the respiratory chain of Plasmodium falciparum and its inhibitors*. Bioorg Med Chem Lett, 2009. 19(3): p. 972-5.
25. Small, W.C. and L. McAlister-Henn, *Identification of a cytosolically directed NADH dehydrogenase in mitochondria of Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol, 1998. 180(16): p. 4051-5.
26. Marella, M., et al., *No immune responses by the expression of the yeast ndi1 protein in rats*. PLoS One, 2011. 6(10): p. e25910.
27. Marella, M., et al., *Parkinson's disease and mitochondrial complex I: a perspective on the Ndi1 therapy*. J Bioenerg Biomembr, 2009. 41(6): p. 493-7.
28. Yagi, T., et al., *Possibility of transkingdom gene therapy for complex I diseases*. Biochim Biophys Acta, 2006. 1757(5-6): p. 708-14.

29. Marella, M., et al., *Protection by the NDI1 gene against neurodegeneration in a rotenone rat model of Parkinson's disease*. PLoS One, 2008. 3(1): p. e1433.
30. Seo, B.B., et al., *The single subunit NADH dehydrogenase reduces generation of reactive oxygen species from complex I*. FEBS Lett, 2006. 580(26): p. 6105-8.
31. Yagi, T., et al., *NADH dehydrogenases: from basic science to biomedicine*. J Bioenerg Biomembr, 2001. 33(3): p. 233-42.
32. Berardo, A., O. Musumeci, and A. Toscano, *Cardiological manifestations of mitochondrial respiratory chain disorders*. Acta Myol, 2011. 30(1): p. 9-15.
33. Overkamp, K.M., et al., *In vivo analysis of the mechanisms for oxidation of cytosolic NADH by Saccharomyces cerevisiae mitochondria*. J Bacteriol, 2000. 182(10): p. 2823-30.
34. Park, J.S., Y.F. Li, and Y. Bai, *Yeast NDI1 improves oxidative phosphorylation capacity and increases protection against oxidative stress and cell death in cells carrying a Leber's hereditary optic neuropathy mutation*. Biochim Biophys Acta, 2007. 1772(5): p. 533-42.
35. Quintana, A., et al., *Complex I deficiency due to loss of Ndufs4 in the brain results in progressive encephalopathy resembling Leigh syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(24): p. 10996-1001.
36. Sanz, A., et al., *Expression of the yeast NADH dehydrogenase Ndi1 in Drosophila confers increased lifespan independently of dietary restriction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(20): p. 9105-10.
37. Lenaz, G. and M.L. Genova, *Kinetics of integrated electron transfer in the mitochondrial respiratory chain: random collisions vs. solid state electron channeling*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. 292(4): p. C1221-39.
38. Stuart, R.A., *Supercomplex organization of the oxidative phosphorylation enzymes in yeast mitochondria*. J Bioenerg Biomembr, 2008. 40(5): p. 411-7.
39. Schagger, H., *Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria*. Biochim Biophys Acta, 2002. 1555(1-3): p. 154-9.
40. Cruciat, C.M., et al., *The cytochrome bc1 and cytochrome c oxidase complexes associate to form a single supracomplex in yeast mitochondria*. J Biol Chem, 2000. 275(24): p. 18093-8.
41. Dudkina, N.V., et al., *Respiratory chain supercomplexes in the plant mitochondrial membrane*. Trends Plant Sci, 2006. 11(5): p. 232-40.
42. Paumard, P., et al., *The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology*. EMBO J, 2002. 21(3): p. 221-30.
43. Wittig, I., et al., *Supercomplexes and subcomplexes of mitochondrial oxidative phosphorylation*. Biochim Biophys Acta, 2006. 1757(9-10): p. 1066-72.
44. Forster, J., et al., *Genome-scale reconstruction of the Saccharomyces cerevisiae metabolic network*. Genome Res, 2003. 13(2): p. 244-53.
45. Nielsen, J., *It is all about metabolic fluxes*. J Bacteriol, 2003. 185(24): p. 7031-5.
46. Vemuri, G.N., et al., *Increasing NADH oxidation reduces overflow metabolism in Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(7): p. 2402-7.
47. Yang, Y., et al., *Reaction mechanism of single subunit NADH-ubiquinone oxidoreductase (Ndi1) from Saccharomyces cerevisiae: evidence for a ternary complex mechanism*. J Biol Chem, 2011. 286(11): p. 9287-97.



48. Yamashita, T., et al., *Roles of bound quinone in the single subunit NADH-quinone oxidoreductase (Ndi1) from Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 2007. 282(9): p. 6012-20.
49. Bonner, W.D., Jr. and M. Plesnicar, *Electron transport carriers in plant mitochondria*. Nature, 1967. 214(5088): p. 616-7.
50. Rigoulet, M., et al., *Organization and regulation of the cytosolic NADH metabolism in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biochem, 2004. 256-257(1-2): p. 73-81.
51. Rigoulet, M., et al., *Electron competition process in respiratory chain: regulatory mechanisms and physiological functions*. Biochim Biophys Acta, 2010. 1797(6-7): p. 671-7.
52. Melo, A.M., T.M. Bandejas, and M. Teixeira, *New insights into type II NAD(P)H:quinone oxidoreductases*. Microbiol Mol Biol Rev, 2004. 68(4): p. 603-16.
53. Moller, I.M., *PLANT MITOCHONDRIA AND OXIDATIVE STRESS: Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species*. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 2001. 52: p. 561-591.
54. Ito-Inaba, Y., Y. Hida, and T. Inaba, *What is critical for plant thermogenesis? Differences in mitochondrial activity and protein expression between thermogenic and non-thermogenic skunk cabbages*. Planta, 2009. 231(1): p. 121-30.
55. Wagner, A.M., et al., *Regulation of thermogenesis in flowering Araceae: the role of the alternative oxidase*. Biochim Biophys Acta, 2008. 1777(7-8): p. 993-1000.
56. Watling, J.R., et al., *Mechanisms of thermoregulation in plants*. Plant Signal Behav, 2008. 3(8): p. 595-7.
57. Matus-Ortega, M.G., et al., *The alternative NADH dehydrogenase is present in mitochondria of some animal taxa*. Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics, 2011. 6(3): p. 256-63.
58. Tarrio, N., M.E. Cerdan, and M.I. Gonzalez Siso, *Characterization of the second external alternative dehydrogenase from mitochondria of the respiratory yeast Kluyveromyces lactis*. Biochim Biophys Acta, 2006. 1757(11): p. 1476-84.
59. Christensen, B. and J. Nielsen, *Metabolic network analysis. A powerful tool in metabolic engineering*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2000. 66: p. 209-31.
60. Gombert, A.K., et al., *Network identification and flux quantification in the central metabolism of Saccharomyces cerevisiae under different conditions of glucose repression*. J Bacteriol, 2001. 183(4): p. 1441-51.
61. Luttkik, M.A., et al., *The Saccharomyces cerevisiae NDE1 and NDE2 genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH*. J Biol Chem, 1998. 273(38): p. 24529-34.
62. Pahlman, I.L., et al., *Kinetic regulation of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase by the external NADH dehydrogenase in Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 2002. 277(31): p. 27991-5.
63. Yagi, T., T. Yano, and A. Matsuno-Yagi, *Characteristics of the energy-transducing NADH-quinone oxidoreductase of Paracoccus denitrificans as revealed by biochemical, biophysical, and molecular biological approaches*. J Bioenerg Biomembr, 1993. 25(4): p. 339-45.

64. Eschemann, A., et al., *HDQ (1-hydroxy-2-dodecyl-4(1H)quinolone), a high affinity inhibitor for mitochondrial alternative NADH dehydrogenase: evidence for a ping-pong mechanism.* J Biol Chem, 2005. 280(5): p. 3138-42.
65. Wierenga, R.K., P. Terpstra, and W.G. Hol, *Prediction of the occurrence of the ADP-binding beta alpha beta-fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint.* J Mol Biol, 1986. 187(1): p. 101-7.
66. Lesk, A.M., *NAD-binding domains of dehydrogenases.* Curr Opin Struct Biol, 1995. 5(6): p. 775-83.
67. Schmid, R. and D.L. Gerloff, *Functional properties of the alternative NADH : ubiquinone oxidoreductase from E-coli through comparative 3-D modelling.* Febs Letters, 2004. 578(1-2): p. 163-168.
68. Melo, A.M., M. Duarte, and A. Videira, *Primary structure and characterisation of a 64 kDa NADH dehydrogenase from the inner membrane of Neurospora crassa mitochondria.* Biochim Biophys Acta, 1999. 1412(3): p. 282-7.
69. Velazquez, I. and J.P. Pardo, *Kinetic characterization of the rotenone-insensitive internal NADH: ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from Saccharomyces cerevisiae.* Arch Biochem Biophys, 2001. 389(1): p. 7-14.
70. Feng Y, et al. Structural insight into the type-II mitochondrial NADH dehydrogenases. Nat u r e | v o l 4 9 1 | 1 5 n o v e m b e r 2 0 1 2.
71. M.Iwata, Y.Lee,T.Yamashita, T.Yagi, S.Iwata, A.D.Cameron, M.J.Maher P. The structure of the yeast NADH dehydrogenase (Ndi1) reveals overlapping binding sites for water- and lipid-soluble substrates. PROC.NATL.ACAD.SCI.USA V. 109 15247 2012).
71. Maas, M. F., Sellem, C. H., Krause, F., Dencher, N. A. & Sainsard-Chanet, A.Molecular gene therapy: overexpression of the alternative NADH dehydrogenase NDI1 restores overall physiology in a fungal model of respiratory complex I deficiency. J. Mol. Biol. 399, 31–40 (2010).
72. Kerscher, S. J. Diversity and origin of alternative NADH:ubiquinone oxidoreductases. Biochim. Biophys. Acta 1459, 274–283 (2000).
73. Melo, A.M., Bandejas, T.M., Teixeira, M., 2004. New insights into type II NAD(P)H: quinone oxidoreductases. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 68, 603–616.
74. Melo, A.M., Duarte, M., Moller, I.M., Prokisch, H., Dolan, P.L., Pinto, L., Nelson, M.A., Videira A., 2001. The external calcium-dependent NADPH dehydrogenase from Neurospora crassa mitochondria. J. Biol. Chem. 276, 3947–3951.
75. McDonald, A.E., Vanlerberghe, G.C., 2005. Alternative oxidase and plastoquinol terminal oxidase in marine prokaryotes of the Sargasso Sea. Gene 349, 15–24.
76. McDonald, A.E., Vanlerberghe, G.C., 2006. Origins, evolutionary history, and taxonomic distribution of alternative oxidase and plastoquinol terminal oxidase. Comp. Biochem. Physiol D Genomics Proteomics 1, 357–364.
77. McDonald, A.E., Vanlerberghe, G.C., Staples, J.F., 2009. Alternative oxidase in animals: unique characteristics and taxonomic distribution. J. Exp. Biol. 212, 2627–2634.
78. Melo, A.M., Duarte, M., Videira, A., 1999. Primary structure and characterisation of a 64 kDa

- NADH dehydrogenase from the inner membrane of *Neurospora crassa* mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1412, 282–287.
79. Rasmusson, A.G., Svensson, A.S., Knoop, V., Grohmann, L., Brennicke, A., 1999. Homologues of yeast and bacterial rotenone-insensitive NADH dehydrogenases in higher eukaryotes: two enzymes are present in potato mitochondria. *Plant J.* 20, 79–87.
80. Rasmusson, A.G., Soole, K.L., Elthon, T.E., 2004. Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 23–39.
81. Rigoulet, M., Aguilaniu, H., Averet, N., Bunoust, O., Camougrand, N., Grandier-Vazeille, X., Larsson, C., Pahlman, I.L., Manon, S., Gustafsson, L., 2004. Organization and regulation of the cytosolic NADH metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biochem.* 256–257, 73–81.
82. Grandier-Vazeille X<sup>1</sup>, Bathany K, Chaignepain S, Camougrand N, Manon S, Schmitter JM. Yeast mitochondrial dehydrogenases are associated in a supramolecular complex. *Biochemistry*. 2001 Aug 21;40(33):9758-69.
83. Yu Yang, Tetsuo Yamashita, Eiko, Nakamaru-Ogiso, Reaction mechanism of single subunit NADH-ubiquinone oxidoreductase (Ndi1) from *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for a ternary complex mechanism. *J. Biol. Chem.* published online January 10, 2011.
84. Michalecka AM<sup>1</sup>, Svensson AS, Johansson FI, Agius SC, Johanson U, Brennicke A, Binder S, Rasmusson AG. Arabidopsis genes encoding mitochondrial type II NAD(P)H dehydrogenases have different evolutionary origin and show distinct responses to light. *Plant Physiol.* 2003 Oct;133(2):642-52. Epub 2003 Aug 14.
85. Kerscher SJ. Diversity and origin of alternative NADH:ubiquinone oxidoreductases. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Aug 15;1459(2-3):274-83.
86. Melo AM<sup>1</sup>, Duarte M, Videira A. Primary structure and characterisation of a 64 kDa NADH dehydrogenase from the inner membrane of *Neurospora crassa* mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Aug 4;1412(3):282-7.
87. Kerscher S<sup>1</sup>, Dröse S, Zickermann V, Brandt U. The three families of respiratory NADH dehydrogenases. *Results Probl Cell Differ.* 2008;45:185-222.
88. Djavadi FH, Moradi M, Djavadi-Ohanian L. Direct oxidation of NADPH by submitochondrial particles from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem.* 1980 Jun;107(2):501-4.
89. Cramer WA<sup>1</sup>, Zakharov SD, Saif Hasan S, Zhang H, Baniulis D, Zhalnina MV, Soriano GM, Sharma O, Rochet JC, Ryan C, Whitelegge J, Kurisu G, Yamashita E. Membrane proteins in four acts: function precedes structure determination. *Methods*. 2011 Dec;55(4):415-20. doi: 10.1016/j.ymeth.2011.11.001. Epub 2011 Nov 10.
90. Gombert AD, Moreira Dos Santos M, Christensen B. Network identification and flux quantification in the central metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* under different conditions of glucose repression. *Journal of bacteriology*, 2011. 1441-1451.

