



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM  
POSGRADO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS  
Instituto de Fisiología Celular

DIFERENCIAS EN LA ASOCIACIÓN DE  
COMPLEJOS RESPIRATORIOS DE *Yarrowia*  
*lipolytica* EN RESPUESTA A LOS  
REQUERIMIENTOS ENERGÉTICOS.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A:**

**SERGIO GUERRERO CASTILLO**

Tutor: SALVADOR URIBE CARVAJAL

MÉXICO, D. F.

08/2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **RECONOCIMIENTOS**

Esta tesis se realizó bajo la asesoría del Dr. Salvador Uribe Carvajal en el laboratorio 305-07, Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Se reconoce la colaboración y asesoría del Dr. Diego González Halphen, Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

El jurado del examen estuvo constituido por:

Presidente: Dra. Marietta Tuena Sangri, Departamento de Bioquímica y Biología Estructural, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Vocal: Dra. Xochitl Pérez Martínez, Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Vocal: Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.

Vocal: Dra Marina Gavilanes Ruiz, Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM.

Secretario: Dr. Horacio Reyes Vivas, Laboratorio de Bioquímica Genética, Instituto Nacional de Pediatría.

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de este trabajo estuvo formado por:

Dra. Bertha González Pedrajo, Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Dr. José Pedraza Chaverri, Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM.

Dr. Salvador Uribe Carvajal, Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

El comité tutorial ampliado estuvo integrado por:

Dra. María Soledad Fúnes Argüello, Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.

El jurado del examen de candidatura estuvo integrado por:

Dra Marina Gavilanes Ruiz, Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM.

Dra. Bertha González Pedrajo, Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Dra. Xochitl Pérez Martínez, Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Dra. Georina Garza Ramos Martínez, Laboratorio de Ingeniería y Fisicoquímica de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.

Dra. Irma Ofelia Bernal Lugo, Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM.

Dr. Rogelio Rodríguez Sotres, Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM.

Dr. José Edgardo Escamilla Marván, Departamento de Bioquímica y Biología Estructural, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Se reconoce la colaboración, asesoría y asistencia de la QBP Miriam Vázquez Acevedo del laboratorio 325 N, Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Se reconoce el apoyo de Ramón Méndez Franco, Auxiliar de laboratorio, Instituto de Fisiología Celular, UNAM; María del Rocío Romualdo Martínez, Asistente ejecutivo, Departamento de Bioquímica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM; Leticia García Gutiérrez, Asistente de procesos, Programa en Ciencias Bioquímicas, UNAM; Adelina González Perez, Asistente de procesos, Programa en Ciencias Bioquímicas, UNAM; Sara Noguera Solano, Secretario Ejecutivo, Coordinación de enseñanza, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

El sustentante gozó de una beca para realizar los estudios de doctorado otorgada por el CONACyT (No. 176925) y por la DGAPA-UNAM para la realización de esta tesis.

	<b>Página</b>
<b>1. Resumen</b>	6
<b>2. Abstract</b>	8
<b>3. Introducción</b>	10
3.1 <i>Yarrowia lipolytica</i> como sistema de estudio	10
3.2 La cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa	11
3.2.1 NADH:ubiquinona oxidorreductasa	12
3.2.2 Succinato deshidrogenasa	14
3.2.3 Ubiquinol:citocromo <i>c</i> oxidorreductasa	15
3.2.4 Citocromo <i>c</i> oxidasa	16
3.2.5 ATP sintasa	19
3.3 Los componentes alternos	20
3.3.1 NADH deshidrogenasas de tipo II	21
3.3.2 Oxidasas alternas	23
3.4 Supercomplejos respiratorios	26
3.5 La cadena respiratoria de <i>Yarrowia lipolytica</i>	28
3.6 Mecanismos de desacoplamiento fisiológicos	29
3.6.1 El canal inespecífico mitocondrial	31
3.6.2 La proteína desacoplante (UCP)	32
3.6.3 Oxidorreductasas alternas	33
<b>4. Planteamiento del problema</b>	37
<b>5. Objetivos e hipótesis</b>	39
<b>6. Metodología</b>	40
6.1 Reactivos	40
6.2 Material biológico	40
6.3 Cultivo de células	41
6.4 Aislamiento de mitocondrias	41
6.4.1 Homogeneización de células con perlas de vidrio	41
6.4.2 Método enzimático	42
6.4.3 Determinación de la concentración de proteína	43
6.5 Mediciones del consumo de oxígeno	43
6.6 Determinación del potencial transmembranal	44
6.7 Cuantificación de actividades enzimáticas	45
6.7.1 NADH deshidrogenasa alterna (NDH2e)	45
6.7.1.1 NADH:DCPIP oxidorreductasa	45
6.7.1.2 NADH:ubiquinona oxidorreductasa	45
6.7.2 Succinato deshidrogenasa	46
6.7.3 Citocromo <i>c</i> oxidasa	46
6.7.4 ATP sintasa	47
6.8 Electroforesis nativa	48
6.8.1 Preparación de los geles	48
6.8.2 Preparación de la muestra y corrida del gel	51
6.9 Actividades en gel	52
6.9.1 NADH deshidrogenasa	52
6.9.2 Succinato deshidrogenasa y glicerol-3-fosfato deshidrogenasa	53
6.9.3 Citocromo peroxidasa	54
6.9.4 Citocromo <i>c</i> oxidasa	54
6.9.5 ATPasa	55
6.10 Geles de segunda dimensión nativa	56
6.11 Geles de segunda dimensión desnaturalizante	56

6.12 Inmunodetección	59
6.12.1 Western blot	59
6.12.2 Dot blot	60
6.13 Identificación de proteínas por secuenciación de péptidos	61
6.14 Cromatografía de intercambio iónico	61
6.14.1 Cuantificación de actividades enzimáticas de las fracciones	62
6.15 Cromatografía de exclusión molecular	63
6.16 Espectros diferenciales	63
6.17 Determinación de especies reactivas de oxígeno	64
6.17.1 Método de fluorescencia de resorufina	64
6.17.2 Fluorescencia de dihidro-2,7-diclorofluoresceína	65
6.17.3 Actividad de aconitasa	66
<b>7. Resultados</b>	68
7.1 Estudios en fase logarítmica	68
7.1.1 Los electrones del NADH externo son canalizados hacia la vía citocrómica	68
7.1.2 Supercomplejos en <i>Yarrowia lipolytica</i>	71
7.1.3 Interacción de NDH2e con la vía citocrómica	80
7.2 Comparación entre fases de crecimiento	88
7.2.1 La canalización de electrones del NADH externo hacia la vía citocrómica ocurre sólo en la fase logarítmica de crecimiento	89
7.2.2 En la fase estacionaria una fracción de NDH2e se encuentra disociada	93
7.2.3 El cociente NDH2e:vía citocrómica aumenta en la fase estacionaria	98
7.2.4 La respiración desacoplada disminuye la formación de ROS	102
<b>8. Discusión</b>	105
8.1 Estructuras supramoleculares	105
8.2 Los componentes alternos	108
<b>9. Conclusiones</b>	114
<b>10. Perspectivas</b>	115
<b>11. Bibliografía</b>	116
<b>12. Apéndice</b>	133
12.1 Abreviaturas	133
12.2 Artículos publicados	135
12.3 Artículos en preparación	135

## 2. RESUMEN

En las mitocondrias, el desacoplamiento fisiológico de la fosforilación oxidativa previene la formación de un potencial transmembranal ( $\Delta\Psi$ ) elevado. Esto es importante porque un  $\Delta\Psi$  elevado disminuye la velocidad del transporte de electrones aumentando la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que pueden provocar daño oxidativo. En las levaduras, diferentes mecanismos previenen la formación de ROS aumentando el consumo de oxígeno. Uno de estos mecanismos involucra a las oxidorreductasas alternas. Las mitocondrias de los hongos, plantas y algunos parásitos contienen cadenas respiratorias ramificadas. En las cadenas ramificadas, son posibles diferentes vías de transporte de electrones, pues además de los complejos respiratorios clásicos, contienen componentes alternos: NADH deshidrogenasas y oxidasas alternas. Las deshidrogenasas de tipo II (NDH2) catalizan la misma reacción de oxidorreducción que el complejo I cuando se encuentran en la cara matricial de la membrana interna mitocondria, u oxidan NADH externo cuando se localizan en la superficie intermembranal. A diferencia del complejo I, NDH2 no bombea protones y no es inhibida por rotenona. Las oxidasas alternas (AOX) se encuentran en la cara matricial y tampoco bombean protones. Estas enzimas catalizan la oxidación de ubiquinol reduciendo al oxígeno. De este modo, AOX puede sustituir la función de los complejos III y IV. La presencia de componentes alternos produce múltiples rutas de transferencia de electrones que pueden involucrar de 0 a 3 sitios de conservación de energía, lo cual origina variaciones de la estequiometría de bombeo de protones de 0 a  $10 \text{ H}^+/2\text{e}^-$ . Dado que ninguno de los componentes alternos bombea protones, la actividad conjunta de NDH2 y AOX no contribuye a la fuerza protón motriz y resultaría en una pérdida de energía. El objetivo de este trabajo es determinar la contribución de los componentes alternos y estudiar los mecanismos que controlan el flujo de electrones hacia los componentes alternos en condiciones de alto y bajo requerimiento energético. Como organismo modelo se utilizó *Yarrowia lipolytica* debido a que contiene tanto a los complejos respiratorios convencionales como a los componentes alternos.

Para evaluar la participación de los componentes alternos en mitocondrias aisladas se midió el consumo de oxígeno en presencia de cianuro o propilgalato, inhibidores de las vías citocrómica y alterna, respectivamente. Cuando la entrada de electrones fue a través de complejo I, ambas vías respiratorias contribuyeron al consumo de oxígeno, ya que cada inhibidor tuvo un efecto parcial. La AOX parece contribuir a la respiración en menor medida que la vía citocrómica. En cambio, al utilizar NADH externo, el cianuro inhibe completamente la respiración, sugiriendo que los electrones que provienen del NADH externo son canalizados hacia los complejos III y IV. Con base en esto se propuso una interacción entre la NDH2e (NDH2 externa) y los complejos de la vía citocrómica, como se ha sugerido mediante estudios cinéticos en otras especies. La interacción de NDH2e con el complejo IV se caracterizó mediante electroforesis nativa en gel y por cromatografía de intercambio iónico. A pesar de los diferentes puntos isoeléctricos teóricos de NDH2e y COX, estas dos enzimas co-eluyeron en una columna de DEAE Bio-Gel A gel. En este trabajo se presenta el primer ejemplo de la asociación de un componente alterno con los complejos respiratorios.

Por otra parte, se identificaron y caracterizaron diferentes supercomplejos respiratorios mediante electroforesis azul nativa (BN-PAGE). La determinación de actividades enzimáticas en gel nativo de NADH deshidrogenasa, citocromo *c* oxidasa y ATPasa, así como electroforesis desnaturante de segunda dimensión, hizo posible estimar los pesos moleculares de los complejos y supercomplejos con la siguiente estequiometría: I-III<sub>2</sub>, I-IV<sub>1</sub>, I-III<sub>2</sub>-IV<sub>4</sub>, III<sub>2</sub>-IV<sub>1</sub>, III<sub>2</sub>-IV<sub>2</sub>, IV<sub>2</sub> and V<sub>2</sub>.

Hasta este punto únicamente habíamos estudiado la interacción de NDH2e con los complejos III-IV en la fase logarítmica de crecimiento, donde la demanda energética es alta. Sin embargo, se propuso que al disminuir el requerimiento energético era posible que se activara un mecanismo para disminuir el  $\Delta\Psi$  e impedir la sobreproducción de ROS. Con el fin de probar si existía una vía desacoplada de transporte de electrones en la que participaran los componentes alternos, se determinó la actividad conjunta de los componentes alternos y sus interacciones con los demás complejos, con las respectivas comparaciones entre las fases de crecimiento logarítmica y estacionaria.

En la fase estacionaria se activó la transferencia de electrones entre los componentes alternos. Lo cual se pudo corroborar porque la respiración dependiente de NADH externo fue parcialmente sensible a los inhibidores de ambas vías respiratorias. A su vez, el control respiratorio (CR) usando NADH disminuyó en la fase estacionaria, lo cual sugiere que la oxidación de NADH externo en fase estacionaria no está acoplado a la síntesis de ATP. Como control de la integridad de las mitocondrias se utilizó piruvato-malato para generar NADH matricial y alimentar el complejo I. En ambas fases el CR fue elevado en presencia de piruvato-malato. La falta de canalización de los electrones del NADH externo hacia la vía citocrómica podría indicar que en la fase estacionaria hay una menor interacción entre estas enzimas. Por cromatografía de intercambio iónico se observó que una fracción de NDH2e se encontraba en asociación con los complejos III y IV, mientras que en su mayoría esta enzima se encontró de forma libre, capaz de reducir una poza de ubiquinona deslocalizada. Mediante electroforesis nativa se detectó una sobreproducción de NDH2 en la fase estacionaria. En cambio, a través de las actividades en gel e *in vitro*, Western blot y espectros diferenciales se observó que en esta fase disminuyó la concentración del complejo IV. La relación NDH2e:complejo IV aumentó en la fase estacionaria y probablemente provocó que el exceso de NDH2e no estuviera asociado al supercomplejo III<sub>2</sub>-IV.

Al activarse la vía desacoplada NDH2e-ubiquinona-AOX, se puede prevenir la inhibición del consumo de oxígeno que se da en condiciones no fosforilantes. Este mecanismo puede prevenir la formación de ROS y mantiene el equilibrio redox en el citoplasma. Probablemente, la asociación/disociación de NDH2e con la vía citocrómica determina qué vía respiratoria siguen los electrones de la oxidación del NADH externo.

### 3. ABSTRACT

Physiological uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation may be designed to prevent reaching a high transmembrane potential ( $\Delta\Psi$ ). A high  $\Delta\Psi$  would slow down electron transfer, overproducing reactive oxygen species (ROS), which would trigger deleterious side reactions. In yeasts, different mechanisms increase oxygen consumption, thus avoiding the overproduction of ROS. One of these physiological uncoupling mechanisms involves alternative non-proton pumping oxidoreductases. Mitochondria from fungi, plants and some parasites contain branched respiratory chains. In addition to the classical respiratory chain complexes I to IV, branched chains contain alternative oxidoreductases, which provide different electron pathways. Alternative components of the respiratory chain are NADH dehydrogenases and alternative oxidases. Type II NADH dehydrogenases catalyze the same oxidoreduction reaction as complex I when located in the matrix face of the inner mitochondrial membrane, or oxidize external NADH when facing the intermembrane space. Unlike complex I, the alternative NADH dehydrogenase (NDH2) is not a proton pump and is insensitive to rotenone. Alternative oxidases are on the matrix side of the inner mitochondrial membrane and do not translocate protons. They catalyze the oxidation of ubiquinol and the reduction of oxygen. Thus, alternative oxidase (AOX) substitutes complexes III and IV in a cyanide- or antimycin A- insensitive manner. Alternative components provide different pathways for electron transfer from reducing equivalents to molecular oxygen which may involve 3, 2, 1 or 0 energy-conserving sites, thus varying the proton pumping stoichiometry from 10 H<sup>+</sup>/2e<sup>-</sup> to zero. None of the alternative components pump protons. Thus, pairing the activities of NDH2 and AOX would not contribute to the proton motive force and would result in a waste of energy. The aim of this work was to study at which extent alternative components take part in electron transfer and to characterize the mechanism by which yeast cells control electron transfer between alternative components, avoiding it under conditions requiring high-energy, but activating it in the stationary growth phase, as the energy requirements decrease.

To evaluate the contribution of alternative components, oxygen consumption was measured in isolated mitochondria in the presence of cyanide or n-propylgallate, inhibitors of the cytochromic or the alternative pathway, respectively. When electrons were fed to complex I, both pathways seemed to contribute to oxygen consumption since each inhibitor had a partial effect. Due to electron redirection between respiratory pathways, it could not be discerned if AOX was active before the addition of cyanide or it was activated after the addition of the inhibitor. Still, AOX does seem to contribute less to respiration than the cytochromic pathway. In contrast, when NADH was used as a substrate for NDH2e (external NDH2), cyanide inhibited respiration completely, suggesting that NDH2e-derived electrons were specifically channeled to the cytochromic complexes. These results suggested that NDH2e is associated in a complex III-containing supercomplex, preventing the futile oxidation of NADH. NDH2e/Complex III/IV association was further suggested by clear native gel electrophoresis and co-elution of enzymes in ion-exchange chromatography columns. Despite the different theoretical isoelectric points of NDH2e and cytochrome *c* oxidase, these enzymes co-eluted in a DEAE Bio-Gel A chromatography column. This result was confirmed by Western blot using antibodies against NDH2e from *Yarrowia lipolytica* and against the subunit 3 of the cytochrome *c* oxidase. The interaction of NDH2e seems to be located in an interface between complexes III and IV, facing the catalytic site where ubiquinol oxidation takes place. In addition, respiratory supercomplexes were identified and characterized by blue native (BN) gel electrophoresis. After BN-PAGE, second dimension SDS-PAGE and in-gel

NADH dehydrogenase, cytochrome c oxidase and ATPase activities were used to estimate MW of complexes and supercomplexes such as: I-III<sub>2</sub>, I-IV<sub>1</sub>, I-III<sub>2</sub>-IV<sub>4</sub>, III<sub>2</sub>-IV<sub>1</sub>, III<sub>2</sub>-IV<sub>2</sub>, IV<sub>2</sub> and V<sub>2</sub>.

Until this point, we had tested the association of NDH2e and supercomplexes only in the logarithmic growth phase, where there is a high-energy demand. However, it was speculated that in conditions where less ATP is needed, a controlled uncoupling would prevent the overproduction of ROS. To test whether uncoupling did indeed occur and was mediated by alternative components, the activities and interactions of the alternative components both in the logarithmic and in the stationary growth phases were compared.

In the stationary phase, electron transfer between the alternative components was activated, i.e. the external NADH-mediated respiration was partially inhibited by either cyanide or by *n*-propylgallate. In addition, the respiratory control ratio in the presence of external NADH decreased in the stationary phase indicating external NADH-supported respiration was no longer coupled to oxidative phosphorylation. As a control of the intactness of mitochondria during the stationary growth phase, pyruvate plus malate were used as substrates and the respiratory control ratios were higher. In the stationary growth phase electron channeling between NDH2e and the cytochrome pathway was not observed indicating that the interaction between these enzymes must have been, to some extent, lost. Ion-exchange chromatographic profiles indicated that there was still a minor fraction of NDH2e attached to the cytochromic complexes, although most of the enzyme was found in a free form that most likely could reduce a non-localized ubiquinone pool. By native gel electrophoresis and in-gel NADH dehydrogenase activity it was observed that NDH2e is overexpressed during the stationary growth phase; this was further confirmed by Western blot. Conversely, the cytochrome IV concentration seemed to decrease in the stationary phase as revealed by i) in-gel cytochrome c oxidase activity, ii) Western blot against the subunit II of the cytochrome c oxidase, iii) differential spectra to quantitate the cytochromes a + a<sub>3</sub> and cytochrome b, and by iv) oxygen consumption in the presence of ascorbate and TMPD to directly measure the cytochrome c oxidase activity. Taken together, our results indicate that the ratio NDH2e: complex IV was higher in the stationary than in the logarithmic growth phase and the excess of NDH2e probably accounted for the non-channeled activity.

The NDH2e-ubiquinone-AOX uncoupled pathway, active in the stationary phase, prevented the inhibition of oxygen consumption that would result in state 4. This seems to be a mechanism to prevent the overproduction of ROS and to maintain the cytoplasmic redox. Finally, our data imply that the dynamic association / dissociation of NDH2e with complexes III and IV probably dictates which respiratory pathway will be followed by the electrons from external NADH.

## 3. INTRODUCCIÓN

### 3.1 *Yarrowia lipolytica* como sistema de estudio

*Yarrowia lipolytica* es una levadura dimórfica, heterotálica del *phylum* Ascomycota. Este organismo es un aerobio obligado que en cultivo generalmente crece como una mezcla de células levaduriformes y micelios cortos (Ruiz-Herrera y Sentandreu 2002). Anteriormente, este organismo no patógeno de la familia Dipodascaceae se ubicó dentro del género *Candida*, denominado *C. lipolytica*, posteriormente se reclasificó como *Endomycopsis lipolytica* (Wickerham y cols. 1970), luego *Saccharomycopsis lipolytica* (Yarrow 1972), y desde 1980 a la fecha se denomina *Yarrowia lipolytica*, siendo la única especie de este género (Kerscher y cols. 2002). Las primeras cepas de *Y. lipolytica* se aislaron de alimentos ricos en lípidos o en proteínas como aceite de oliva, quesos y otros productos lácteos y cárnicos. Se ha estudiado la asimilación de diversas fuentes de carbono, ya que presenta la característica única de metabolizar hidrocarburos alifáticos, polialcoholes, alcanos polimetilados, alcanos clorados y parafinas mediante hidroxilación por el sistema citocromo P-450 monooxigenasa (Barth y Gaillardin 1997). Además de su utilización en la producción tradicional de productos lácteos por sus altas actividades extracelulares de lipasas y proteasas, ha sido de gran interés biotecnológico en cuanto a la producción de ácidos orgánicos, particularmente de los ácidos cítrico y alfa-cetoglutárico cuando crece con ceras como fuente de carbono (Arzumanov y cols. 2000; Chernyavskaya y cols. 2000). También produce enzimas como la invertasa (Hong y cols. 2011).

El dimorfismo en *Y. lipolytica* es afectado por varios factores, como la temperatura, el pH del medio y las fuentes de carbono y nitrógeno. Las condiciones que afectan el dimorfismo en *Y. lipolytica* son diferentes tanto en medios sólidos como líquidos, y dependen también de la cepa utilizada (Barth y Gaillardin 1997). En algunos hongos se ha estudiado la transición del dimorfismo dependiente del pH del medio de cultivo. Por ejemplo, *Ustilago maydis* es un basidiomiceto que crece en forma de levadura a pH cercano a la neutralidad, mientras que al ser incubado en un pH ácido se induce la formación de micelio; en contraste con lo que ocurre en *Candida albicans*, el cual a pH ácido crece predominantemente como levadura (Ruiz-Herrera y cols. 1995; Ruiz-Herrera y Sentandreu 2002). Es decir, el efecto que tiene el pH sobre el dimorfismo en estas dos especies es opuesto. Se ha observado que *Y. lipolytica* se comporta como *C. albicans* con respecto a las variaciones del pH del medio (Odds 1985). *Y. lipolytica* crece completamente en forma de levadura a pH 4, mientras que a un pH cercano a la neutralidad, 80 % de las células forman micelios (Szabo y Stofanikova 2002). Estos cambios en las formas de crecimiento de *Y. lipolytica* se estudiaron anteriormente en nuestro laboratorio, ya que era necesario obtener una población predominantemente levaduriforme. En tales estudios se determinaron las condiciones de cultivo, así

como fuentes de carbono y nitrógeno para que predominara la forma de levadura en cultivos líquidos.

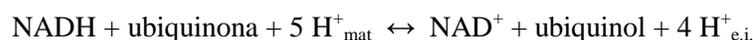
Esta levadura se ha utilizado como modelo para estudiar mutaciones y deficiencias en la actividad del complejo I, así como sitios de unión a sustratos e inhibidores (Tocilescu y cols. 2007; Tocilescu y cols. 2010), ya que es relativamente fácil de manipular genéticamente y se conoce la secuencia tanto del genoma nuclear como del mitocondrial (Davidow y cols. 1987a; Davidow y cols. 1987b; Gaillardin y Ribet 1987; Kerscher y cols. 2001a).

### **3.2 La cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa**

En los organismos aerobios existe un proceso denominado fosforilación oxidativa cuya finalidad es la interconversión de energía: la energía almacenada en moléculas reductoras se emplea para generar un gradiente de protones que, a su vez, se usa para la formación de un enlace fosfoanhídrido. Es decir, la fosforilación oxidativa consiste en la producción de ATP a partir de ADP y fosfato impulsada por un gradiente de protones, el cual a su vez se forma con la energía proveniente de reacciones de oxidorreducción con un cambio en el potencial redox positivo y de gran magnitud (Mitchell 1961; Mitchell y Moyle 1967). Durante este proceso, los electrones son transportados desde el NADH hasta el oxígeno a través de una serie de complejos multiproteicos denominados complejos respiratorios y moléculas acarreadoras. La transferencia de electrones está acoplada a la translocación vectorial de protones a través de la membrana. El gradiente de protones resultante es utilizado para la fosforilación del ADP (Hatefi y cols. 1962a; Hatefi 1985). Los complejos respiratorios son oxidorreductasas que contienen centros redox como flavina, centros hierro-azufre, citocromos o metales involucrados en la transferencia de electrones. El transporte de electrones entre los complejos se da por moléculas móviles acarreadoras como coenzima Q, también denominada ubiquinona (UQ) y por el citocromo *c*. A diferencia de los procariontes, donde la fosforilación oxidativa se lleva a cabo en la membrana plasmática, en las células eucariontes los complejos multiproteicos involucrados en este proceso se encuentran embebidos en la membrana interna de las mitocondrias. Otra diferencia importante es que en los eucariontes algunas subunidades hidrofóbicas que forman los complejos respiratorios están codificadas en el genoma mitocondrial, mientras que la mayoría de las subunidades son codificadas en el núcleo. Por lo tanto, es necesaria una coordinación en la expresión de los genes, tanto nucleares como mitocondriales, que forman un complejo.

## 3.2.1 NADH:ubiquinona oxidoreductasa

En la matriz mitocondrial, el NADH proveniente de la oxidación de diferentes intermediarios del ciclo del ácido tricarbóxico y de la  $\beta$ -oxidación es captado por una enzima denominada complejo I o NADH:ubiquinona oxidoreductasa (E.C. 1.6.5.1). Este complejo cataliza la transferencia de un par de electrones del NADH a la ubiquinona para formar ubiquinol. Esta reacción de oxidoreducción está acoplada a la translocación de cuatro protones a través de la membrana interna mitocondrial (Walker 1992).



(e.i. espacio intermembranal; mat, matriz mitocondrial)

Esta enzima, que es la más compleja de la cadena respiratoria, contribuye aproximadamente con 40% de la fuerza protón motriz generada, y en *Y. lipolytica* está compuesta por 42 subunidades (14 subunidades centrales y aproximadamente 28 subunidades adicionales). Siete de las subunidades centrales son codificadas por el genoma mitocondrial (Hinchliffe y Sazanov 2005).

El transporte de electrones desde el NADH hasta la ubiquinona se lleva a cabo por medio de cofactores redox o grupos prostéticos, los cuales se encuentran unidos de modo no covalente a diferentes subunidades del complejo I. Los electrones son transportados primero a una flavina mononucleótido (FMN) y posteriormente pasan por siete centros hierro-azufre (Fe-S) hasta llegar al sitio de unión de la ubiquinona. Cabe mencionar que a través de los centros redox se transporta un solo electrón a la vez, lo cual aumenta el riesgo de generar radicales libres (Galkin y Brandt 2005). Estructuralmente, el complejo I tiene una forma de *L* que consta de dos brazos, uno hidrofílico orientado hacia la matriz mitocondrial y el otro hidrofóbico embebido en la membrana interna. En cuanto a la función, el complejo I se divide en tres módulos: N, Q y P. En el módulo N se localizan las subunidades y centros redox involucrados en la oxidación del NADH. En este módulo se encuentran la flavina mononucleótido y ocho centros hierro-azufre. La FMN es el primer aceptor de electrones del NADH, después los electrones pasan por una cadena formada por siete centros hierro-azufre hasta llegar al sitio de reducción de la ubiquinona. El módulo Q es responsable de la reducción de la ubiquinona. Éste se localiza en la interfase entre los brazos hidrofóbico e hidrofílico. Anteriormente, se pensaba que la reducción de la ubiquinona ocurría en el interior hidrofóbico de la membrana; sin embargo, recientemente se ha resuelto la estructura cristalográfica de este complejo en *E. coli* (Efremov y cols. 2010) y en *Y. lipolytica* (Hunte y cols. 2010), en donde se encontró que el sitio de reducción de la ubiquinona se encuentra alejado de la membrana alrededor de 25 Å hacia el lado matricial. Esto quiere decir que la ubiquinona, que es un derivado

isoprenoide altamente hidrofóbico, debe desplazarse fuera de la membrana durante su reducción, por lo que se ha propuesto la existencia de una rampa proteica hidrofóbica en el complejo I (Brandt 2006). Debido a que los centros hierro-azufre en el módulo N transportan uno por uno los electrones, en el sitio de unión a ubiquinona, ésta recibe primero un electrón y se forma el radical ubisemiquinona  $UQ^{\cdot-}$ . Al llegar el segundo electrón, la  $UQ^{\cdot-}$  se reduce a ubiquinol. El módulo P es el encargado de la translocación de protones de la matriz al espacio intermembranal. En este módulo se encuentran subunidades con homología a los antiportadores  $Na^+/H^+$  bacterianos de la familia de los transportadores secundarios tipo Mrp (Bridges y cols. 2011), los cuales están involucrados en la resistencia a elevadas concentraciones de sodio utilizando la fuerza protón motriz (Hiramatsu y cols. 1998). Este módulo ha sido subdividido en dos submódulos: P proximal ( $P_P$ ) y P distal ( $P_D$ ) (Brandt 2006). A pesar de que el mecanismo de bombeo de protones ha sido ampliamente estudiado, a la fecha no se ha llegado a un consenso. Algunas hipótesis involucran un mecanismo indirecto, en donde un cambio conformacional inducido por la reacción redox impulsa el bombeo de dos protones por par de electrones en dos sitios de bombeo diferentes, uno localizado en el submódulo  $P_P$  y el otro en el  $P_D$  (Brandt 2011; Dröse y cols. 2011; González-Halphen y cols. 2011). Otro de los mecanismos propuestos indica que existen cuatro sitios de bombeo de protones, y cada uno bombea un protón por cada par de electrones (Efremov y Sazanov 2011a; Efremov y Sazanov 2011b). Tras la resolución de la estructura cristalográfica del complejo se observó un alfa-hélice de alrededor de 6 nm de longitud que probablemente conecta el módulo Q con el módulo P. Esta hélice denominada elemento de transmisión helicoidal es paralela a la membrana localizada cerca del lado matricial y conecta también los submódulos  $P_P$  y  $P_D$ . Recientemente se ha propuesto que esta hélice es responsable de la transducción de energía de un cambio conformacional localizado en el módulo Q al bombeo de protones en el módulo P (Efremov y cols. 2010).

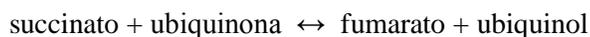
Además de su función como transportador de electrones hacia la ubiquinona, el complejo I puede llevar a cabo la reacción reversa, es decir, catalizar la reducción de  $NAD^+$  con electrones tomados de la poza de ubiquinol. Colateralmente, otros aceptores de electrones pueden ser reducidos, entre ellos el oxígeno molecular, generando de este modo el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) (Galkin y Brandt 2005). La generación de radicales libres podría ser provocada por la oxidación de la flavina mononucleótido debido a su potencial redox negativo. Pero también se podría deber a la oxidación del centro hierro-azufre N1a, ya que es el más negativo del complejo I (Yano y cols. 1995; Kushnareva y cols. 2002).

Este complejo puede ser inhibido por rotenona, DQA, amital, difenileniodonio, piericidina o por compuestos de la familia de la acetogeninas como la rolinistatina-2 (Uribe-Carvajal y cols. 2008). La mayoría de estos inhibidores, con excepción del difenileniodonio, actúan en el sitio de

oxidorreducción de la quinona. La ADP-ribosa también inhibe en forma reversible al complejo, compitiendo con el NADH por el sitio de unión a nucleótidos (Zharova y Vinogradov 1997).

### 3.2.2 Succinato deshidrogenasa

El complejo II, succinato deshidrogenasa o succinato:ubiquinona oxidoreductasa (E.C. 1.3.5.1) es una flavoproteína de la membrana interna mitocondrial. Esta enzima utiliza como sustratos succinato y ubiquinona y produce fumarato y ubiquinol (Lemire y Oyedotun 2002) (Hederstedt y cols. 1985).

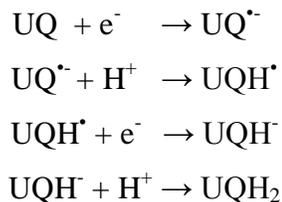


El fumarato se puede interconvertir en malato por medio de la fumarato hidratasa, mientras que el ubiquinol es oxidado posteriormente en la cadena respiratoria por el sitio II de conservación de energía. A diferencia del complejo I, la succinato deshidrogenasa no bombea protones a través de la membrana interna. La explicación para este fenómeno es que la diferencia de potenciales redox entre los pares succinato:fumarato y ubiquinona:ubiquinol no es suficiente para impulsar el bombeo, además de que no se han encontrado posibles sitios de bombeo en las subunidades con cruces transmembranales. El complejo II está compuesto por cuatro subunidades, dos hidrofílicas y dos membranales, codificadas por los genes nucleares *SDHA-D* y se ha encontrado en forma dimérica en condiciones nativas. Los centros redox constan de un flavin adenin dinucleótido (FAD) unido covalentemente a la subunidad de 70 kDa, tres centros hierro-azufre, [2Fe-2S], [4Fe-4S], y [3Fe-4S] unidos a la denominada subunidad hierro-azufre y un grupo hemo tipo *b* localizado en la membrana (Ohnishi y King 1978). El primer aceptor de electrones es la flavina, posteriormente son transferidos de uno por uno a través de los centros Fe-S, antes de entrar a las subunidades membranales, en donde se lleva a cabo la reducción de la quinona. En este mecanismo, un electrón es transportado del centro [3Fe-4S] de la subunidad Sdhb a la ubiquinona, y se produce la ubisemiquinona. La enzima debe mantener este compuesto inestable hasta que otro electrón sea transferido para generar ubiquinol, UQH<sub>2</sub> (Guo y Lemire 2003).

Del mismo modo que la flavina mononucleótido del complejo I puede reducir a otros aceptores de electrones, como el oxígeno, y producir de este modo al radical superóxido, el complejo II puede generar especies reactivas en el sitio de unión a ubiquinona (Yankovskaya y cols. 2003). Este proceso puede involucrar al radical ubisemiquinona como intermediario en el transporte del electrón. El malonato, el malato y el oxaloacetato son inhibidores competitivos de la succinato deshidrogenasa debido a su semejanza estructural con el succinato. En el sitio de formación de

ubiquinol, la carboxina y la tenoiltrifluoroacetona inhiben la entrada de ubiquinona al complejo (Mowery y cols. 1977; Ramsay y cols. 1981).

La ubiquinona reducida transporta dos electrones del complejo I o del complejo II al complejo III (Trumpower 1990b; Osyczka y cols. 2005). La ubiquinona o coenzima Q es un transportador de electrones liposoluble, derivado de la 1,4-benzoquinona que, en mamíferos, está unida a una cadena lateral de diez unidades isoprenoides ( $Q_{10}$ ), mientras que en *Saccharomyces cerevisiae* la cadena lateral contiene seis unidades isoprenoides y en *Y. lipolytica* es de nueve (Kerscher y cols. 2002). El ubiquinol es la forma reducida ( $UQH_2$ , o en su forma desprotonada  $QH^-$ ), pero puede encontrarse parcialmente reducida como ubisemiquinona ( $UQ^{\bullet-}$  o  $UQH^{\bullet}$ ). La ubisemiquinona tiene un electrón desapareado y es capaz de producir radicales superóxido cuando reacciona con el oxígeno molecular. La reacción secuencial de reducción de la coenzima  $Q_{10}$  se muestra a continuación:



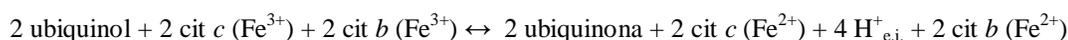
### 3.2.3 Ubiquinol:citocromo *c* oxidorreductasa

El complejo  $bc_1$  (complejo III o ubiquinol:citocromo *c* oxidorreductasa, E.C. 1. 10.2.2) es el segundo sitio de conservación de energía de la cadena respiratoria, el cual cataliza la transferencia de electrones del ubiquinol al citocromo *c* (Trumpower 1990a). Este mecanismo está acoplado a la translocación de cuatro protones de la matriz al espacio intermembranal. Colabora con la fuerza protón motriz para la síntesis de ATP (Hatefi y cols. 1962b).

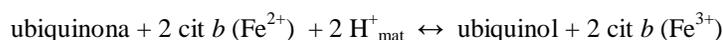
El complejo  $bc_1$  es un dímero en el cual cada uno de los monómeros que lo integran está compuesto por once subunidades proteicas, de las que solamente una, el citocromo *b*, es codificada por el genoma mitocondrial. Esta enzima contiene cuatro grupos prostéticos: dos grupos hemo tipo *b* ( $b_L$  o  $b_{565}$  y  $b_H$  o  $b_{562}$ ) localizados en la subunidad denominada citocromo *b*, un grupo hemo tipo  $c_1$ , y un centro hierro-azufre (2Fe-2S), localizado en la proteína de Rieske. El complejo III contiene dos sitios de unión a ubiquinona orientados casi transversalmente a la membrana: el sitio  $Q_i$  (interno o  $Q_N$ , negativo) se encuentra cerca de la matriz y el sitio  $Q_o$  (externo o  $Q_P$ , positivo) está localizado más cerca del espacio intermembranal (Covian y Trumpower 2005). El mecanismo de reacción del complejo III se conoce como el ciclo Q (Osyczka y cols. 2005). En esta reacción una primera molécula de ubiquinol es oxidada en el sitio  $Q_o$ . Ahí un electrón es transferido hacia el centro 2Fe-2S, posteriormente al citocromo  $c_1$  y por último hasta el citocromo *c*. La ubisemiquinona generada

por la oxidación de un electrón del ubiquinol reduce el citocromo  $b_L$ , y se regenera una molécula de ubiquinona. El citocromo  $b_L$  transfiere rápidamente el electrón al citocromo  $b_H$  localizado cerca del lado negativo (más cercano a la matriz). Por último, el electrón es transferido del  $b_H$  a una ubiquinona localizada en el sitio  $Q_i$  para generar ubisemiquinona. Una segunda molécula de ubiquinol es oxidada en el sitio  $Q_o$ , un electrón llega hasta el citocromo  $c$  vía el centro hierro-azufre y el citocromo  $c_1$ , mientras que el otro pasa por los citocromos  $b_L$  y  $b_H$  y por último reduce a la ubisemiquinona del sitio  $Q_i$  formada en la ronda anterior y regenera una molécula de ubiquinol. El bombeo de protones está dado por la desprotonación del quinol en el sitio  $Q_o$  y la protonación de la quinona reducida en el sitio  $Q_i$ , de este modo, por cada electrón son translocados dos protones de un lado a otro de la membrana interna (Xia y cols. 1997).

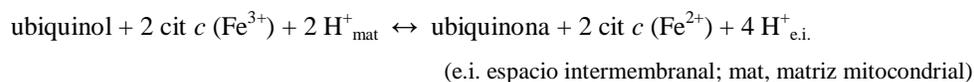
En el sitio  $Q_o$  y en el sitio de reducción del citocromo  $c$ :



En el sitio  $Q_i$ :



La reacción completa:



Recientemente, se ha sugerido que hay comunicación conformacional entre los centros P y N. Además, se ha demostrado que los electrones se equilibran rápidamente entre cuatro hemos  $b$  presentes en un complejo  $\text{III}_2$  (Covian y Trumpower 2005). La transferencia entre subunidades  $b$  se da por los hemos  $b_L$  que se encuentran más cercanos entre sí que los hemos  $b_H$ . De tal modo que puede reducirse el hemo  $b_L$  de un monómero y transferirse el electrón al hemo  $b_H$  del otro monómero. Esto resalta la funcionalidad de este complejo como una proteína dimérica.

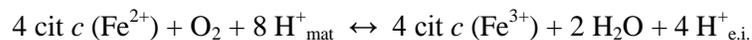
A pesar de que tanto el complejo I como el complejo III bombean cuatro protones por cada par de electrones, el complejo III es más eficiente. Esto se debe a que la diferencia de potenciales redox de sustratos y productos es menor en el complejo III, y, más importante aún, el complejo III del lado matricial capta dos protones para la reducción de la ubiquinona en el sitio  $Q_i$ ; mientras que en el complejo I, aunque también se requieren dos protones para la formación de ubiquinol, un

protón es liberado a la matriz después de la oxidación del NADH. En suma, ambos bombean cuatro protones al espacio intermembranal, pero el complejo III toma dos protones del lado matricial y el complejo I toma solamente uno.

Uno de los inhibidores clásicos del complejo III es la antimicina A (Uribe-Carvajal y cols. 2008), un derivado del dioxonano producido por bacterias del género *Streptomyces* (Ransac y Mazat 2010). La antimicina A se une al sitio  $Q_i$  de la citocromo *c* reductasa impidiendo el transporte de electrones del citocromo  $b_H$  a la ubiquinona en este sitio, lo cual provoca un incremento en la formación de especies reactivas de oxígeno por estabilización de semiquinonas en el sitio  $Q_o$  (Dröse y Brandt 2008). El mixotiazol producido por una mixobacteria es un derivado bitiazólico que por competencia con el ubiquinol también inhibe al complejo III (Uribe-Carvajal y cols. 2008). Este inhibidor al unirse al sitio  $Q_o$  impide la transferencia de electrones del ubiquinol a la proteína de Rieske. La estigmatelina, producida también por una mixobacteria, es otro potente inhibidor del complejo  $bc_1$  (Uribe-Carvajal y cols. 2008). También actúa en el sitio  $Q_o$  impidiendo el movimiento del dominio intermembranal de la proteína hierro-azufre, necesario para la transferencia de electrones. En la cadena respiratoria, los puntos de generación de especies reactivas más importantes son los sitios de oxidorreducción de ubiquinona, sobre todo cuando hay una disminución en la velocidad de transferencia de electrones, por ejemplo, en presencia de inhibidores. En el complejo III de bovino, la mayor producción de ROS se obtiene al inhibir al complejo en el sitio  $Q_i$  con antimicina A, en comparación con los inhibidores que actúan en el sitio  $Q_o$  (Chen y cols. 2003). La visión actual del mecanismo de producción de especies reactivas es que al bloquear el sitio  $Q_o$  se inhibe la entrada de electrones de la oxidación del ubiquinol a los hemo  $b_L$  y  $b_H$ , y la oxidación de un electrón del ubiquinol genera ubisemiquinona que funciona como el donador del electrón al oxígeno. Sin embargo, esta reacción no ocurre muy frecuentemente en este sitio debido a la presencia de inhibidores competitivos. En cambio, al bloquear la transferencia de electrones del hemo  $b_H$  (reducido) a la ubiquinona el sitio  $Q_i$ , los electrones de la oxidación del ubiquinol en el sitio  $Q_o$  son transferidos del hemo  $b_L$  al  $b_H$  y regresan del hemo  $b_H$  al hemo  $b_L$  en una reacción reversa. Posteriormente, del hemo  $b_L$  reducen a una ubiquinona en el sitio  $Q_o$  formando ubisemiquinona. La velocidad de esta reacción reversa no es disminuida por antimicina y depende de que exista una poza de ubiquinonas parcialmente oxidada. Es decir, la responsable de la mayor producción de ROS en el complejo III es la reducción parcial de la ubiquinona en el sitio  $Q_o$ , en vez de la oxidación parcial del ubiquinol en ese sitio (Dröse y Brandt 2008).

## 3.2.4 Citocromo *c* oxidasa

El complejo IV o citocromo *c* oxidasa (CcO o COX, E.C. 1.9.3.1) efectúa el transporte de electrones de cuatro ferri-citocromos *c* al oxígeno molecular.



(e.i. espacio intermembranal; mat, matriz mitocondrial)

La estructura nativa de la oxidasa es dimérica, cada monómero es activo y está formado hasta por 13 subunidades, de las cuales las subunidades COXI, COXII y COXIII están codificadas en el genoma mitocondrial (Kerscher y cols. 2001a). El resto de las subunidades está codificado en el genoma nuclear y son importadas por las mitocondrias. El transporte de electrones se lleva a cabo por cuatro centros redox localizados en las subunidades COXI y COXII: dos grupos hemo, *a* y *a*<sub>3</sub>, y dos centros de cobre, Cu<sub>A</sub> y Cu<sub>B</sub>. En el dominio extramembranal hacia el espacio intermembranal de la subunidad COXII se encuentra el centro Cu<sub>A</sub>, el cual se compone de dos átomos de cobre y es el aceptor de electrones del citocromo *c*. En la subunidad COXI se encuentran los dos grupos hemo y el centro Cu<sub>B</sub>. El hemo *a* recibe el electrón del centro Cu<sub>A</sub> y lo transfiere al sitio de unión y reducción del oxígeno que es un centro binuclear formado por el hierro del hemo *a*<sub>3</sub> y el cobre Cu<sub>B</sub> (Tsukihara y cols. 1995). El transporte de electrones está acoplado a la translocación de cuatro protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembranal (1 H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup>).

Los protones requeridos para la formación de agua a partir del anión O<sup>2-</sup> provienen de la matriz mitocondrial. Estos protones llegan al sitio de reducción del oxígeno por dos canales localizados en la subunidad COXI, denominados vía D y vía K, los cuales forman una secuencia de puentes de hidrógeno. En la enzima bacteriana, los protones son bombeados al espacio periplásmico por la vía D o por la vía K. Se ha propuesto que la vía D está ramificada de modo que una rama llega al sitio de reducción del oxígeno y la otra atraviesa la membrana (Pfitzner y cols. 2000). En la enzima de corazón de bovino existe un tercer canal, denominado vía H, que es una secuencia de puentes de hidrógeno por donde se bombean los protones de la matriz al espacio intermembranal (Yoshikawa y cols. 2011b).

La estructura obtenida por rayos X de la citocromo *c* oxidasa se determinó para las enzimas de bovino y de la bacteria *Paracoccus denitrificans* (Iwata y cols. 1995; Tsukihara y cols. 1995). Recientemente se han obtenido cristales en presencia de análogos del oxígeno que funcionan como inhibidores de la enzima (Muramoto y cols. 2010). La resolución de dichas estructuras ha servido para caracterizar el sitio de reducción del oxígeno y para dilucidar el mecanismo de reducción (Yoshikawa y cols. 2011a). Además, se han encontrado diferentes especies de fosfolípidos y

triglicéridos, así como tres centros metálicos,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Na^+$ , que no tienen una función en el mecanismo de oxidorreducción de la enzima (Yoshikawa y cols. 2012). Cabe mencionar que durante el mecanismo de reducción del oxígeno no se libera ninguna especie reactiva. Esto se debe a que la ruptura del doble enlace O O se lleva a cabo por una reducción no secuencial de tres electrones provenientes del  $Cu_B$ ,  $Fe^{2+}$  (hemo  $a_3$ ) y del residuo Tyr244 (a través de una molécula de agua).

La actividad de este complejo puede ser inhibida por análogos del oxígeno, tales como cianuro, azida, monóxido de carbono, óxido nítrico, dióxido de nitrógeno, entre otros (Yoshikawa y Caughey 1990).

La estequiometría del bombeo de protones de esta enzima puede variar dependiendo del potencial transmembranal o por las concentraciones intracelulares de nucleótidos de adenina (Frank y Kadenbach 1996). A este fenómeno se le conoce como “deslizamiento” (slipping). En este proceso de desacoplamiento intrínseco, la transferencia de electrones se lleva a cabo normalmente y sólo se modifica el número de protones bombeados por electrones transferidos (Azzone y cols. 1985).

### 3.2.5 ATP sintasa

La  $F_1F_0$ -ATP sintasa mitocondrial o complejo V (E.C. 3.6.3.14) es una ATP sintasa tipo F, una enzima membranal que utiliza el gradiente de protones formado por la cadena respiratoria para la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico.



(e.i. espacio intermembranal; mat, matriz mitocondrial)

Las ATP sintasas de tipo F constan de dos fracciones, una de ellas soluble denominada  $F_1$  y otra membranal, llamada  $F_0$ . Esta enzima es considerada como un nanomotor rotatorio, dado que utiliza la corriente de protones para producir un momento dinámico que genera un cambio conformacional en el sitio activo que favorece la fosforilación del ADP. La fracción  $F_0$  tiene las subunidades que forman el rotor, la base y el brazo periférico. La fracción  $F_1$  está formada por las subunidades que integran el estator. Éste se encuentra fuera de la membrana, orientado hacia la matriz. En este segmento se encuentran tres sitios de fosforilación del ADP. El flujo de los protones a través de un canal formado entre las subunidades  $a$  y  $c_{10}$  produce la rotación del anillo de subunidades  $c_{10}$  perpendicular al plano de la membrana. A este anillo se encuentra unida una

subunidad que conforma un eje central, que rota con el anillo en movimientos secuenciales de  $120^\circ$  e induce cambios conformacionales secuenciales en las tres subunidades  $\beta$  del estator (Gresser y cols. 1982). En un giro completo, cada sitio activo pasa por tres estados diferentes: abierto, relajado y tenso (Itoh y cols. 2004). El estado abierto permite la entrada de sustratos y la salida de productos. El relajado es un estado cerrado en el que se encuentran unidos el ADP y el fosfato, mientras que en el estado tenso se induce la formación del enlace fosfodiéster entre el fosfato  $\beta$  del ADP y el fosfato inorgánico para formar ATP. De este modo, por cada giro del rotor se producen tres moléculas de ATP. La estequiometría de los protones requeridos para la síntesis puede variar debido a que esta proteína presenta también el fenómeno de deslizamiento (Pietrobon y cols. 1983).

Mediante electroforesis nativa se han encontrado formas oligoméricas de esta enzima. Tales estructuras corresponden a oligómeros de ATP sintasa dimérica. En el complejo V de levaduras, las subunidades e y g son responsables de la dimerización de la enzima (Brunner y cols. 2002; Arselin y cols. 2003). Se ha propuesto que la forma dimérica del complejo facilita la función de síntesis de ATP (Minauro-Sanmiguel y cols. 2005; Couoh-Cardel y cols. 2010). La estructura dimérica induce una marcada curvatura en la membrana interna, la cual estabiliza pequeñas vesículas. A su vez, la presencia de estructuras oligoméricas se ha relacionado con la morfología de las mitocondrias y con la formación de las crestas mitocondriales (Paumard y cols. 2002).

Diferentes estructuras de subcomplejos de la  $F_1F_0$ -ATP sintasa han sido caracterizadas mediante cristalografía de rayos X, como el segmento  $F_1$  de bovino (Abrahams y cols. 1994) y de hígado de rata (Bianchet y cols. 1998) o el trímero formado por las subunidades  $\alpha_3\beta_3$  de *Bacillus* PS3 (Shirakihara y cols. 1997). Mediante estudios de microscopía electrónica se han reconstruido las estructuras tridimensionales de los dímeros de las  $F_1F_0$ -ATP sintasas del alga *Polytomella* sp. (Cano-Estrada y cols. 2010), de bovino (Minauro-Sanmiguel y cols. 2005) y de *Saccharomyces cerevisiae* (Couoh-Cardel y cols. 2010).

### 3.3 Los componentes alternos

La mayoría de los hongos, las plantas y algunos protozoarios contienen otras enzimas que catalizan alguna de las reacciones redox mencionadas anteriormente y por ello reciben el nombre de componentes alternos (Storey 1976; Joseph-Horne y cols. 2001). Cada una de estas enzimas está compuesta por una cadena polipeptídica codificada en el genoma nuclear. Se localizan en la membrana interna mitocondrial pero no contienen segmentos transmembranales. En los organismos que contienen componentes alternos, el flujo de electrones en la cadena respiratoria está ramificado: convergen de diferentes deshidrogenasas a la oxidorreducción de la ubiquinona y divergen de este punto a las vías respiratorias, de reducción de oxígeno (Joseph-Horne y cols. 2000). Estas rutas

alternas involucran las mismas reacciones que en el complejo I, o en los complejos III y IV de mamíferos, con excepción de la translocación de protones. Los componentes alternos consisten en: NAD(P)H deshidrogenasas alternas, enzimas periféricas que pueden estar localizadas hacia el lado matricial o intermembranal de la membrana interna mitocondrial, y oxidasas alternas, localizadas hacia el lado matricial (Moore y Siedow 1991; Rasmusson y cols. 2004).

### 3.3.1 NADH deshidrogenasas de tipo II

Las NADH deshidrogenasas alternas o de tipo II (NDH2) son oxidorreductasas de una sola subunidad que transfieren electrones del NADH a la ubiquinona. Cuando estas enzimas se localizan en la cara matricial de la membrana interna (NDI o NDH2i), llevan a cabo la misma reacción que el complejo I pero sin la translocación de protones. En cambio, cuando están del lado del espacio intermembranal (NDE o NDH2e) oxidan NADH externo (citoplásmico) sin la necesidad de involucrar procesos indirectos como la lanzadera de malato-aspartato.

Las reacciones para las NDH2, dependiendo del lado en que se localicen, son las siguientes:



(e.i. espacio intermembranal; mat, matriz mitocondrial)

Estas deshidrogenasas contienen como único grupo prostético un dinucleótido de adenina y flavina (FAD). Mediante un análisis por alineamiento de secuencias se encontraron dos motivos de plegamiento  $\beta\alpha\beta$  de unión a dinucleótidos; el más cercano al amino terminal puede ser el sitio de unión al FAD, mientras que el segundo parece ser el sitio de unión al NADH (Bjorklof y cols. 2000). Estas enzimas también presentan dos motivos hidrofóbicos, que probablemente corresponden al sitio de unión a la ubiquinona y de anclaje a la membrana interna (Kerscher y cols. 1999).

Por similitud de secuencias entre las lipoamida deshidrogenasas y las NDH2e de diferentes bacterias, se piensa que estas proteínas tienen ascendencia común. De hecho, se han utilizado las estructuras cristalográficas de las lipoamida deshidrogenasas de *Azotobacter vinelandii* (Mattevi y cols. 1991; Mattevi y cols. 1992) y de *Pseudomonas putida* para modelar la estructura de las NDH2.

La estructura de las deshidrogenasas alternas del parásito *Plasmodium falciparum* causante de la malaria (Fisher y cols. 2007), de *Mycobacterium tuberculosis* (Fisher y cols. 2009) y de *Escherichia coli* (Schmid y Gerloff 2004) han sido estudiadas, pero no profundamente

caracterizadas. A la fecha no existe ninguna estructura obtenida por difracción de rayos X de la proteína cristalizada.

Por estudios cinéticos se ha demostrado que estas flavoproteínas tienen un mecanismo tipo ping-pong, en donde el NADH primero reduce al grupo prostético, FAD y se libera el NAD<sup>+</sup>, después el FADH<sub>2</sub> reduce a la ubiquinona o algún aceptor artificial de electrones. Además, el AMP funciona como un inhibidor competitivo para el NADH y como incompetitivo para el DCPIP utilizado como aceptor en ese estudio (Velázquez y Pardo 2001).

A diferencia del complejo I, la actividad de estas deshidrogenasas no está afectada por inhibidores característicos del complejo I como la rotenona, DQA (2-decil-4-quinazolinilamina), amital o piericidina, pero puede ser inhibida por una clase de flavonoides (Juarez y cols. 2004) denominados flavonas, como la platanetina (3,5,7,8-tetrahidroxi, 6-isoprenilflavona) (Ravanel y cols. 1986) o por quinolonas, como la HDQ (1-hidroxi-4-dodecil-4[1H]-quinolona) (Eschemann y cols. 2005). Otras diferencias importantes entre el complejo I y la NDH2 es que la enzima alterna no es capaz de utilizar NADH desaminado como donador de electrones (Matsushita y cols. 1987) y que la transferencia de electrones del NADH a la ubiquinona en la enzima alterna debe ser de dos electrones a la vez. Es decir, se transfiere el anión hidruro en vez de los electrones y los protones por separado, como en el caso del complejo I. La propuesta de este mecanismo surgió por la falta de señales de resonancia paramagnética electrónica para ubisemiquinonas o radicales de isoaloxazina (de Vries y Grivell 1988). Además del sustrato endógeno —ubiquinona Q<sub>6</sub> en el caso de la levadura *S. cerevisiae*— la deshidrogenasa alterna puede utilizar análogos de quinona con cadenas isoprenoides más cortas como la UQ-1 y UQ-2 o decilubiquinona (DBQ) con un número de recambio mayor que con la quinona endógena. Sin embargo, cuando se utiliza duroquinona o diclorofenolindofenol (DCPIP) como aceptores de electrones, el número de recambio es incluso menor en comparación con la quinona endógena (Lenaz 1998; Bjorklof y cols. 2000).

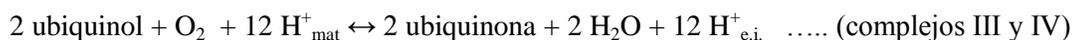
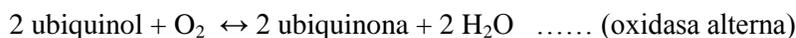
En algunas levaduras que carecen del complejo I, como *S. cerevisiae*, la presencia de las deshidrogenasas alternas permite la oxidación del NADH matricial. Las mitocondrias de *S. cerevisiae* contienen tres NADH-deshidrogenasas; una de ellas está expuesta a la matriz y las otras dos hacia el espacio intermembranal, lo cual le permite oxidar NADH externo (Marres y cols. 1991; De Vries y cols. 1992; Luttk y cols. 1998). Otros hongos, como *Neurospora crassa*, además del complejo I, contienen de tres a cuatro deshidrogenasas alternas de una sola subunidad, localizadas tanto al interior como al exterior de la membrana interna mitocondrial (Duarte y cols. 2003). Resulta interesante en *N. crassa* que durante la fase de crecimiento exponencial temprana, la NADH deshidrogenasa alterna es muy activa, y conforme avanza el estadio de crecimiento de este hongo a la fase estacionaria, disminuye la enzima alterna y predomina entonces la actividad del complejo I

(Schwitzguebel y Palmer 1982). En *Arabidopsis thaliana* por ejemplo, se han encontrado en total siete NADH deshidrogenasas tanto internas como externas, cuya expresión se encuentra influenciada por la cantidad de luz, el porcentaje de humedad, la temperatura, etc. En *Y. lipolytica* la eliminación del gen que codifica para la NDH2e no parece tener algún fenotipo apreciable, ya que esta mutante es capaz de crecer igual que la cepa silvestre tanto en medio mínimo como en medio completo (Kerscher y cols. 1999). Esto indica que en *Y. lipolytica* deben existir otras vías que puedan suplir esta función, como en el caso de *S. cerevisiae* que posee la lanzadera de etanol/acetaldehído (von Jagow y Klingenberg 1970), la lanzadera de glicerol-fosfato (Larsson y cols. 1998) y la lactato:citocromo *c* oxidorreductasa (de Vries y Marres 1987).

El principal interés del estudio de las deshidrogenasas externas en los últimos años obedece a la capacidad de estas flavoproteínas de suplir la función del complejo I. Con el fin de conocer más acerca de la estructura y función del complejo I, se han realizado diferentes mutaciones puntuales y supresiones de genes de este complejo. Dichas mutaciones generalmente afectan la actividad del complejo y por tanto, la viabilidad de las células bajo estudio. Una de las estrategias experimentales para el estudio del complejo I fue introducir una NADH deshidrogenasa al lado matricial para rescatar la función del complejo I y asimismo la viabilidad de las mutantes (Kerscher y cols. 2001b). Incluso en mitocondrias de mamífero se ha probado introducir componentes alternos para restituir la función de transporte de electrones de la cadena respiratoria (Perales-Clemente y cols. 2008). Tales estudios generan una alternativa al conocimiento y tratamiento de algunas enfermedades neurodegenerativas causadas por deficiencias en la actividad o por defectos en el ensamblaje de las enzimas de la fosforilación oxidativa, particularmente del complejo I.

### 3.3.2 Oxidasas alternas

El otro componente alternativo presente en la cadena respiratoria de algunos hongos, plantas y parásitos es la oxidasa alterna. Esta enzima actúa paralelamente al complejo  $bc_1$  —para oxidar el ubiquinol— y a la citocromo *c* oxidasa, transfiriendo los electrones al oxígeno (Storey 1976). Está compuesta por una sola subunidad codificada por el genoma nuclear, aunque se puede encontrar también formando un homodímero en algunas especies de plantas. Esta proteína se localiza siempre en el lado matricial de la membrana interna mitocondrial y no presenta segmentos transmembranales. A diferencia de las reacciones que catalizan los complejos III y IV, la reacción que cataliza la oxidasa alterna no está acoplada al bombeo de protones. Por lo tanto, si el ubiquinol es oxidado por la vía alterna en vez de la vía citocrómica, la cual involucra a los complejos III y IV, la estequiometría de bombeo de protones disminuye de  $3 H^+/e^-$  a cero.



Dado que por la vía alterna no se bombean protones al espacio intermembranal, este sistema alterno no está acoplado a la síntesis de ATP (Moore y Siedow 1991; Moore y Siedow 1992). Por esta razón, la oxidasa alterna puede generar calor y entonces es considerada como un mecanismo desacoplante (Vanlerberghe y McIntosh 1992; Siedow y Umbach 2000; Mariano y cols. 2005). En tejidos termogénicos de algunas plantas, la oxidación de sustratos por la vía alterna produce el calor necesario para volatilizar compuestos que atraen insectos polinizadores (Skubatz y cols. 1991).

El descubrimiento de la oxidasa alterna se dio por la inhabilidad del cianuro de bloquear completamente la respiración en mitocondrias de plantas. Sin embargo, no fue hasta mucho después (Bendall y Bonner 1971) cuando se determinó que la respiración resistente a cianuro y antimicina A se encuentra mediada por una proteína, cuyo extremo carboxilo contiene al centro redox que consta de dos átomos de hierro, denominado di-hierro di-carboxilato. En plantas, el extremo amino contiene un residuo conservado de cisteína, el cual está involucrado en la dimerización (Siedow y Umbach 1995). Ambos extremos se encuentran conectados por medio de una región helicoidal, en la cual se localiza el sitio de unión a ubiquinonas (Andersson y Nordlund 1999). La forma dimérica (oxidada) de la oxidasa alterna es menos activa que la forma reducida, en la cual no se forma el puente disulfuro (Umbach y Siedow 1993).

La actividad de la oxidasa alterna no es afectada por inhibidores característicos del complejo IV como  $\text{CN}^-$ ,  $\text{CO}$  o  $\text{N}_3^-$  (Lambers 1980). Pero sí es inhibida por alquilgalatos y derivados del ácido hidroxámico (Schonbaum y cols. 1971). En mitocondrias aisladas de *Candida albicans*, una levadura filogenéticamente muy cercana a *Y. lipolytica*, se han encontrado dos isoformas de oxidasas alternas, AOX1a y AOX1b. La primera se expresa constitutivamente en niveles bajos, mientras que la segunda se expresa en presencia de inhibidores del complejo IV, especies reactivas de oxígeno o en células que se encuentren en fase estacionaria (Siedow y Umbach 2000).

Dada la competencia de la vía alterna con la vía citocrómica por el ubiquinol, resulta interesante conocer el flujo de electrones hacia ambas vías en ausencia de inhibidores. Un estudio realizado con el fin de observar la participación de la oxidasa alterna en el flujo de electrones en la cadena respiratoria de mitocondrias aisladas de col (Bahr y Bonner 1973a; Bahr y Bonner 1973b), muestra que la vía resistente a cianuro no compite por los electrones con la vía citocrómica. Es decir, al utilizar inhibidores de la citocromo *c* oxidasa, los electrones divergen hacia la oxidasa alterna. En cambio, cuando se inhibe con un derivado del ácido hidroxámico, los electrones no

divergen hacia la vía citocrómica. Estos resultados indican que el flujo de electrones hacia la oxidasa alterna ocurre sólo cuando la vía citocrómica está saturada o inhibida, lo cual mantiene la poza de quinonas reducida. Es importante hacer notar que el sustrato empleado en tal estudio (Bahr y Bonner 1973a) fue succinato, y ahora se piensa que hay una dependencia selectiva del sustrato respiratorio utilizado sobre la actividad de la oxidasa alterna (Guerrero-Castillo y cols. 2009).

Tras el descubrimiento de que la actividad de la oxidasa alterna puede ser regulada en plantas por la reducción de la cistina (Umbach y Siedow 1993), o estimulada por  $\alpha$ -cetoácidos, como el piruvato (Millar y cols. 1993), se propuso que la vía alterna a la respiración no funciona sólo en condiciones saturantes de la vía citocrómica, sino que incluso esta vía puede competir por los electrones a nivel del ubiquinol. En este sentido, se ha observado que en presencia de piruvato, la oxidasa alterna se encuentra activa aún cuando la poza de quinonas no esté totalmente reducida (Hoefnagel y cols. 1995).

Un estudio posterior con mitocondrias aisladas de *Y. lipolytica*, (Medentsev y cols. 2002) apoya en sus conclusiones el modelo propuesto por Bahr y Bonner (1973), ya que al inhibir la oxidasa alterna con ácido bencilhidroxámico no se observa un incremento en el flujo de electrones por la vía citocrómica. En la interpretación de sus resultados Medentsev y sus colaboradores indican que la oxidasa alterna no compite por los electrones con el complejo  $bc_1$  y que su actividad es regulada por la actividad de la vía citocrómica.

Con base en estudios realizados por diferentes grupos, la actividad de la oxidasa alterna está regulada por:

- i) Dimerización.- Las oxidasas alternas de plantas tienen un residuo de cisteína conservado, la reducción de los puentes disulfuro separa las subunidades del homodímero, con lo cual aumenta su actividad (Umbach y cols. 2002; Umbach y cols. 2006); la tioredoxina de plantas *Trxh2* puede reducir el enlace disulfuro y activar a la oxidasa alterna (Gelhay y cols. 2004).
- ii) Los  $\alpha$ -cetoácidos.- Estos compuestos, principalmente el piruvato, incrementan alostéricamente la actividad de la oxidasa alterna cuando el puente disulfuro se encuentra en la forma reducida (Day y cols. 1994; Hoefnagel y Wiskich 1998; Gelhay y cols. 2004; Carre y cols. 2010).
- iii) El estado de oxidorreducción de la poza de quinonas.- La AOX es más activa cuando la poza se encuentra más reducida (Millenaar y cols. 1998). A este respecto habrá que considerar que el ubiquinol es el sustrato de la oxidasa alterna.

- iv) La actividad de la vía citocrómica (por competencia).- La inhibición de la vía citocrómica da como resultado el incremento de la reducción de la poza de quinonas (Ribas-Carbo y cols. 1995; Medentsev y cols. 2002).
- v) Nucleótidos de adenina (AMP, ADP) y guanina (GMP).- Estos incrementan alostéricamente su actividad probablemente mejorando la interacción ubiquinol-AOX por un mecanismo hasta ahora desconocido (Medentsev y cols. 2004).
- vi) La fase de crecimiento.- Se ha observado mayor actividad en células en fase estacionaria, debido a la expresión de la oxidasa alterna no constitutiva (Medentsev y cols. 1999).

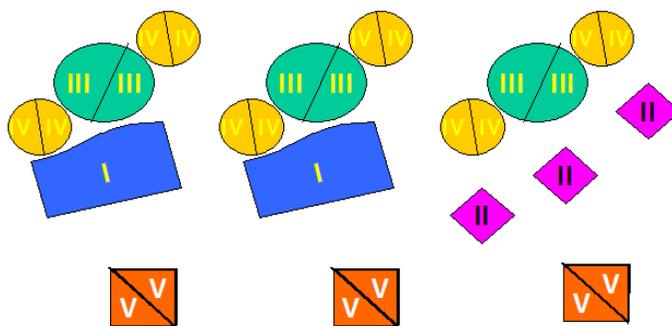
En un estudio en que se compararon 21 especies de levaduras con el fin de correlacionar la presencia del complejo I con la respiración resistente a cianuro (Veiga y cols. 2000; Veiga y cols. 2003), se encontró que 12 de 13 levaduras que presentan la oxidasa alterna, también tienen al complejo I; y por otro lado, de ocho que no presentaron la AOX, seis de ellas tampoco contienen el complejo I. Esta comparación muestra una relación entre estas dos enzimas. Por tanto, los autores proponen que la AOX podría estar involucrada indirectamente en la conservación de energía.

### **3.4 Supercomplejos respiratorios**

Inicialmente se consideraba a las proteínas de la cadena respiratoria como entidades independientes, libres de difundir en el plano de la membrana. A este modelo se le conoce como el modelo del estado fluido o de colisiones al azar (Hackenbrock y cols. 1986). En este modelo, el transporte de electrones entre complejos se lleva a cabo a través de moléculas acarreadoras que también difunden en la membrana. El hecho de que sea posible purificar cada complejo reteniendo su actividad apoya esta propuesta. Además de múltiples estudios con diversas técnicas que indicaban velocidades de difusión diferenciales y muy altas para cada componente respiratorio (Hackenbrock y cols. 1986). Sin embargo, en bacterias y en mitocondrias de mamíferos, plantas y hongos, se han descrito asociaciones supramoleculares de los complejos I, III y IV, denominadas supercomplejos respiratorios o respirasomas (Schägger y Pfeiffer 2000) que van en contra del modelo del estado fluido. El modelo del estado sólido propone que los complejos respiratorios forman heteroligómeros y debido a estas interacciones es posible la canalización de sustratos entre complejos. En este caso, la transferencia de electrones se puede dar a través de moléculas acarreadoras “secuestradas” entre los complejos en vez de haber pozas deslocalizadas de estas moléculas. Inicialmente, los supercomplejos se observaron mediante electroforesis nativa (BN-PAGE), solubilizando las proteínas membranales con detergentes neutros como la digitonina (Schägger 2001b). Recientemente, por microscopía electrónica se han obtenido imágenes y

estructuras en baja resolución de supercomplejos de plantas y levaduras con las siguientes estequiometrías  $\text{III}_2\text{-IV}_2$ ,  $\text{I-III}_2$ ,  $\text{I-III}_2\text{-IV}_1$ . Además, se ha propuesto que los supercomplejos forman estructuras lineales de mayor tamaño llamadas cuerdas respiratorias (Wittig y cols. 2006b) o estructuras en dos dimensiones denominadas parches o redes respiratorias (Nubel y cols. 2009). Además de la canalización de sustratos entre los complejos, se han propuesto otras funciones para los supercomplejos. Por ejemplo, aumentar la catálisis, impedir la liberación de intermediarios reactivos y estabilizar la estructura de los complejos dentro de los supercomplejos. Por análisis de control de flujo se encontró canalización de ubiquinona/ubiquinol entre los complejos I y III (Bianchi y cols. 2004).

Se realizó un estudio en mitocondrias de bovino para conocer la relación de los complejos respiratorios en la membrana interna mitocondrial. Con base en el contenido de FMN, FAD unida covalentemente, citocromo  $c_1$ , citocromo  $aa_3$ , y  $F_1$  se estableció la siguiente estequiometría de los complejos respiratorios individuales  $\text{I:II:III:IV:V} \rightarrow 1:1.5:3:6:3$  (Hatefi 1985; Schägger y Pfeiffer 2001). Por otro lado, por BN-PAGE utilizando diferentes concentraciones de digitonina y Tritón X-100, se han descrito asociaciones  $\text{I}_1\text{-III}_2\text{-IV}_{0-4}$ ,  $\text{III}_2\text{-IV}_{1-2}$ ,  $\text{I}_1\text{-IV}_1$  y  $\text{V}_2$  (Schägger 2001b). Tomando en cuenta la estequiometría de los complejos respiratorios individuales y las diferentes asociaciones supramoleculares encontradas, se planteó un modelo de la organización estructural de la fosforilación oxidativa (Schägger 2001a). Este modelo muestra arreglos de dos diferentes supercomplejos en una relación 2:1. Uno de los supercomplejos está formado por los complejos I, III, y IV y el segundo más pequeño sólo está formado por los complejos III y IV, sin el complejo I (Figura 1). Probablemente, el supercomplejo de menor tamaño recibe electrones de otras deshidrogenasas como la de succinato. La succinato deshidrogenasa no se encontró asociada a ninguno de los supercomplejos, debido posiblemente a que esta interacción es más débil y se rompe por la acción del detergente.



**Figura 1. Modelo de la organización estructural de la cadena respiratoria de bovino.** Basado en la identificación de diferentes supercomplejos y en la estequiometría de los complejos individuales  $\text{I:II:III:IV:V} \rightarrow 1:1.5:3:6:3$ . (Schägger 2001b).

En mitocondrias de levaduras, hongos y plantas también se ha reportado la formación de supercomplejos respiratorios. Por ejemplo, en *S. cerevisiae* se han encontrado asociaciones III<sub>2</sub>-IV<sub>1-2</sub> como en bovino, pero no se han descrito interacciones de las NADH deshidrogenasas alternas, debido posiblemente a que son proteínas periféricas (Schägger y Pfeiffer 2000).

Hasta hace poco, la mayoría de los estudios de los supercomplejos estaba limitado a la parte estructural debido a que no se conocían factores que regularan en el ensamblaje y la estabilidad de los supercomplejos. En este año, utilizando como organismo modelo a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se han descrito los primeros factores proteicos involucrados en la formación de un supercomplejo que contiene a los complejos III y IV (Chen y cols. 2012; Strogolova y cols. 2012; Vukotic y cols. 2012). La proteína Rcf1 (factor de super complejo respiratorio 1) corresponde a la familia conservada de proteínas Hig1 (gen inducido por hipoxia 1) y mediante diferentes técnicas se ha encontrado unida tanto a los complejos III y IV como al supercomplejo formado entre estos.

En un estudio en que se compararon cuatro especies de plantas se encontraron asociaciones supramoleculares entre los complejos I y III parecidas a las encontradas en mamíferos, pero sin interacciones con el complejo IV. Tampoco se encontró este tipo de asociaciones con la oxidasa alterna, por lo cual los autores propusieron que la interacción I-III limita el acceso a la AOX a su sustrato (ubiquinol), y de este modo posiblemente se regula la participación de la vía alterna (Eubel y cols. 2003; Krause y cols. 2004b).

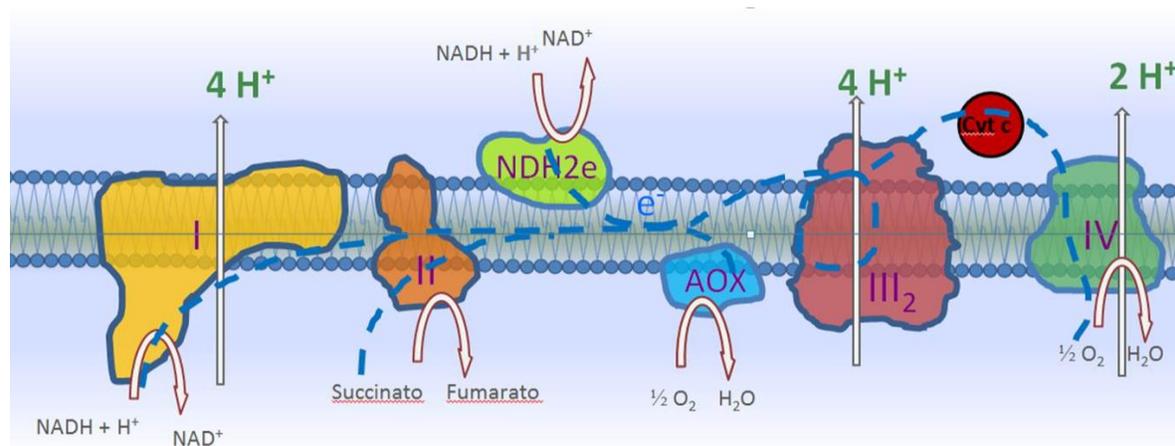
En otro reporte se evaluó la regulación de la vía respiratoria alterna por diferentes organizaciones supramoleculares. Este estudio se realizó en *Podospora anserina*, un hongo filamentoso en cuya cadena respiratoria se halla el complejo I y la oxidasa alterna (Krause y cols. 2004a). En este reporte se muestran asociaciones supramoleculares como las de mamíferos, relacionadas con la cadena respiratoria dependiente de la citocromo oxidasa, y supercomplejos I<sub>2</sub> y I<sub>2</sub>III<sub>2</sub> involucrados en la respiración resistente a cianuro. En ningún caso se encontró a la oxidasa alterna ligada a estos supercomplejos, y en cuanto a la asociación I<sub>2</sub>III<sub>2</sub> se propuso que el complejo III no estaba involucrado en el transporte de electrones, sino en la estabilización estructural y funcional del complejo I (Krause y cols. 2004a).

### **3.5 La cadena respiratoria de *Yarrowia lipolytica***

La cadena respiratoria de *Y. lipolytica* contiene los cuatro complejos respiratorios convencionales (complejos I a IV) más dos componentes alternos: una NDH2 (Kerscher y cols. 1999) y una oxidasa alterna (AOX) (Akimenko y cols. 1974; Akimenko y cols. 1979). La NDH2 está localizada en la cara intermembranal, por lo que es capaz de oxidar NADH citoplásmico. La

oxidasa alterna se localiza en la cara matricial de la membrana interna (figura 2). Estudios previos en *Y. lipolytica* sobre la actividad y regulación de la AOX indican que esta enzima se sintetiza como una forma no catalítica y se encuentra activa únicamente en la fase estacionaria de crecimiento cuando aumenta la concentración de AMP (Medentsev y Akimenko 1999). De acuerdo con los modelos estructurales de la oxidasa alterna (Andersson y Nordlund 1999), el centro activo di-hierro di-carboxilato se encuentra en medio de cuatro hélices alfa relativamente conservadas. En este motivo, las hélices 2 y 3 se encuentran orientadas antiparalelas con respecto a las hélices 1 y 4. Un análisis de esta estructura en la proteína de *Y. lipolytica* (Kerscher y cols. 2002) indica que los residuos involucrados en la unión de los átomos de hierro son E157 (hélice 1), E196 y H199 (hélice 2), E248 (hélice 3) y E301 y H304 (hélice 4). Esto concuerda con los motivos EXXH (en las hélices 2 y 4) involucrados en la unión de los centros redox reportados para otras oxidasas alternas.

La cadena lateral de la ubiquinona de *Y. lipolytica* está compuesta por nueve unidades isoprenoides ( $Q_9$ ), lo que contrasta con la ubiquinona de mamíferos que es de 10 unidades ( $Q_{10}$ ) o de *S. cerevisiae* en donde sólo es de seis ( $Q_6$ ) (Kurtzman 1994).



**Figura 2. La cadena respiratoria de *Yarrowia lipolytica*.** Los complejos respiratorios I-IV más dos componentes alternos, la NADH deshidrogenasa externa (NDH2e) y la oxidasa alterna (AOX). Las reacciones y la estequiometría de protones bombeados están representados para la transferencia de dos electrones. Las líneas discontinuas en color azul representan diferentes rutas de transporte de electrones.

### 3.6 Mecanismos de desacoplamiento fisiológicos

La gran eficiencia de los complejos respiratorios con respecto al bombeo de protones proviene de que en las reacciones redox, la transferencia de electrones es de uno por uno. La mayoría de los centros redox de la cadena respiratoria funcionan de esta manera, con intercambio de un solo electrón, lo que implica el riesgo de constituir una importante fuente de especies reactivas de oxígeno (ROS). Se ha postulado que la generación de ROS ocurre en mayor medida cuando la

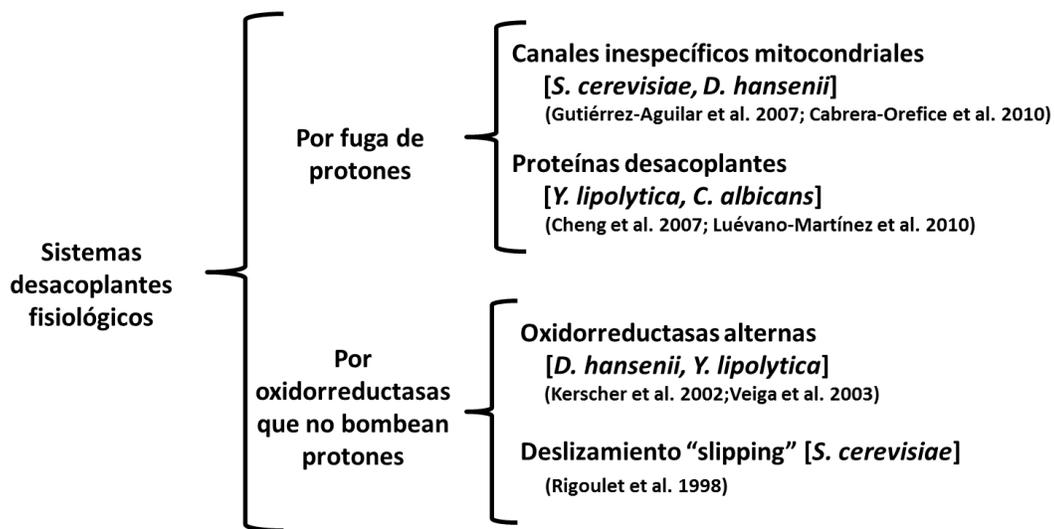
concentración de ADP disminuye y, por lo tanto, la transferencia de electrones y el consumo de oxígeno son lentos. En este escenario, el potencial transmembranal permanece elevado y se acumula ubisemiquinona, la cual participa en una reacción lateral como agente reductor del oxígeno molecular (Koshkin y cols. 2003; Rottenberg y cols. 2009). La oxidación de los centros redox o coenzimas presentes en los complejos I, II y III por el oxígeno molecular permite la generación del radical superóxido,  $O_2^{\bullet-}$ . El superóxido, a su vez, puede ser convertido secuencialmente en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), en el radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ) o en otras especies reactivas. La producción de ROS puede desencadenar procesos involucrados en la apoptosis, en el envejecimiento celular, en el desarrollo de varios estados patológicos, así como en la regulación del metabolismo celular y en la transcripción génica (Galkin y Brandt 2005; Perrone y cols. 2008; Forman y cols. 2010). Debido a la naturaleza del radical superóxido y a la gran diversidad de especies reactivas de oxígeno producidas por las mitocondrias, no se ha podido identificar el punto exacto de generación de ROS. No obstante, cabe destacar que en los tres complejos respiratorios en donde se ha observado la producción de ROS, se lleva a cabo la oxidorreducción de la ubiquinona. Aparentemente, para producir ROS en la cadena respiratoria es necesaria la formación de un radical derivado de la flavina o una ubisemiquinona, que es un intermediario con un electrón desapareado y es capaz de transferir este electrón al oxígeno molecular. Por esta razón, la ubisemiquinona es considerada la principal fuente de ROS en las mitocondrias (Chen y cols. 2003).

En el complejo I se ha identificado el sitio de generación de especies reactivas de oxígeno. Uno de los candidatos correspondía al centro hierro-azufre N2, el cual se encuentra cercano al sitio de oxidorreducción de la ubiquinona y es el centro redox con menor potencial medio de oxidorreducción de todos los centros redox asociados al complejo I. Contrario a lo que se esperaba, la flavina reducida por un electrón forma un radical y es la responsable de la reducción de un solo electrón del oxígeno para formar superóxido (Galkin y Brandt 2005; Dröse y cols. 2009). Por lo tanto, el flujo reverso de electrones, del ubiquinol al  $NAD^+$  (o sea, la reacción del complejo I en sentido inverso), generaría más radicales libres que la reacción hacia adelante.

El complejo *bc1* (III) tiene dos sitios de oxidorreducción de la ubiquinona, pero se ha observado que la oxidación del oxígeno ocurre en mayor medida en el sitio  $Q_p$ , es decir, en el sitio más cercano al lado intermembranal. De tal modo que, al bloquearse o disminuir el transporte de electrones en la cadena respiratoria, la poza de quinonas se encuentra en mayor proporción reducida, y se retarda la oxidorreducción de la ubisemiquinona, circunstancia en la cual puede donar su electrón al  $O_2$ .

En las mitocondrias existen mecanismos de eliminación de especies reactivas de oxígeno, como la actividad de enzimas como la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa, etc. Sin

embargo, existen también sistemas que pueden prevenir la formación de ROS mediante procesos de desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (Czarna y Jarmuszkiewicz 2005; Guerrero-Castillo y cols. 2011). Estos sistemas muestran estrategias diferentes dirigidas a disipar el gradiente de protones o a evitar que se forme; independientemente de cualquiera de las vías anteriores, el mecanismo en común es acelerar el transporte de electrones en la cadena respiratoria (Maxwell y cols. 1999; Czarna y Jarmuszkiewicz 2005). Ejemplos de sistemas desacoplantes que disipan el gradiente de protones son el canal inespecífico mitocondrial de levaduras y la proteína desacoplante (UCP); el sistema de oxidorreductasas alternas y el “deslizamiento” o slipping son mecanismos que no bombean protones o disminuyen la eficiencia del bombeo y el gradiente de protones (figura 3).



**Figura 3. Sistemas desacoplantes fisiológicos de mitocondrias de levaduras.** Independientemente de la síntesis de ATP, la velocidad del consumo de oxígeno puede ser acelerado por la disipación del gradiente electroquímico de protones o por reacciones redox no acopladas al bombeo de protones. Estos sistemas se encuentran presentes en diferentes especies de levaduras.

### 3.6.1 El canal inespecífico mitocondrial

En levaduras, el canal inespecífico mitocondrial (MUC) más estudiado es el de *Saccharomyces cerevisiae*  $s_c$ MUC (Prieto y cols. 1992; Guerin y cols. 1994). La apertura de este canal da por resultado una transición de permeabilidad de la membrana interna mitocondrial. Este fenómeno ha sido ampliamente estudiado en mitocondrias de mamífero, en las que el canal inespecífico es denominado poro de transición de la permeabilidad (PTP). Durante la apertura del canal, la conductancia de la membrana aumenta, lo cual abate los gradientes químicos y eléctricos (Azzolin y cols. 2010). Se han identificado y propuesto las proteínas que forman el canal inespecífico mitocondrial. Dado que son proteínas que se encuentran en las membranas interna o externa, se piensa que el canal se encuentra en los sitios de contacto entre las dos membranas. Uno

de los componentes es el canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC), localizado en la membrana externa, que permite el paso de iones, sustratos y moléculas pequeñas desde el citoplasma al espacio intermembranal. El VDAC es uno de los sitios de regulación debido a que su interacción con calcio cierra el canal inespecífico en levaduras y en el poro de mamíferos (Gincel y cols. 2001; Baines y cols. 2007; Gutiérrez-Aguilar y cols. 2007). Se ha postulado al translocador de adenin nucleótidos (ANT) y al acarreador de fosfato, ambos ubicados en la membrana interna como componentes estructurales del canal inespecífico (Leung y cols. 2008; Gutiérrez-Aguilar y cols. 2010). Un componente regulatorio del poro de mamíferos es la ciclofilina D. Es una peptidil prolil isomerasa que se encuentra en la matriz mitocondrial, y se encarga del plegamiento de proteínas que son transportadas desde el citosol a la matriz. Con respecto a la regulación del PTP, la ciclofilina D es el sitio en donde actúa el inhibidor clásico de la transición de la permeabilidad, ciclosporina A. Dependiendo del tipo de organismo y de tejido, otras proteínas pueden encontrarse asociadas al poro de mamíferos, como la hexocinasa o la creatina cinasa (Zamzami y Kroemer 2001).

En cuanto a la regulación del canal inespecífico de levaduras, el ATP induce la apertura del  $s_c$ MUC y del canal inespecífico de *Debaryomyces hansenii* ( $D_h$ MUC), mientras que el Pi y el ADP lo cierran (Prieto y cols. 1995; Cabrera-Orefice y cols. 2010). Esto sugiere que el potencial de fosforilación o la carga energética controlan la apertura del canal (Wallace y cols. 1994). Al abrirse éste, se disipa el potencial transmembranal y permite la aceleración del transporte de electrones y la disminución de la formación de especies reactivas de oxígeno (Prieto y cols. 1992; Korshunov y cols. 1997). Esto concuerda con las funciones propuestas para el canal inespecífico, tales como la disipación de energía, la detoxificación de iones de la matriz mitocondrial y la apoptosis (Bernardi y Petronilli 1996; Crompton 1999).

Con respecto a la función fisiológica de disipación de energía del canal inespecífico de levaduras, este canal se ha sugerido como un sistema desacoplante finamente regulado que abate los gradientes electroquímicos cuando la demanda energética es baja (Prieto y cols. 1992; Uribe-Carvajal y cols. 2011).

### **3.6.2 La proteína desacoplante (UCP)**

Las UCPs son proteínas integrales y se localizan en la membrana interna de las mitocondrias. Estas enzimas pertenecen a una familia de transportadores mitocondriales caracterizados por tener seis segmentos transmembranales con los extremos amino y carboxilo hacia el lado intermembranal (Miroux y cols. 1993). La primera enzima de esta familia que se caracterizó fue la de tejido adiposo marrón denominada UCP1 (Ricquier y Kader 1976). El mecanismo de transporte de estas proteínas resulta controversial dado que no se tiene certeza si lo que transportan es un protón del lado

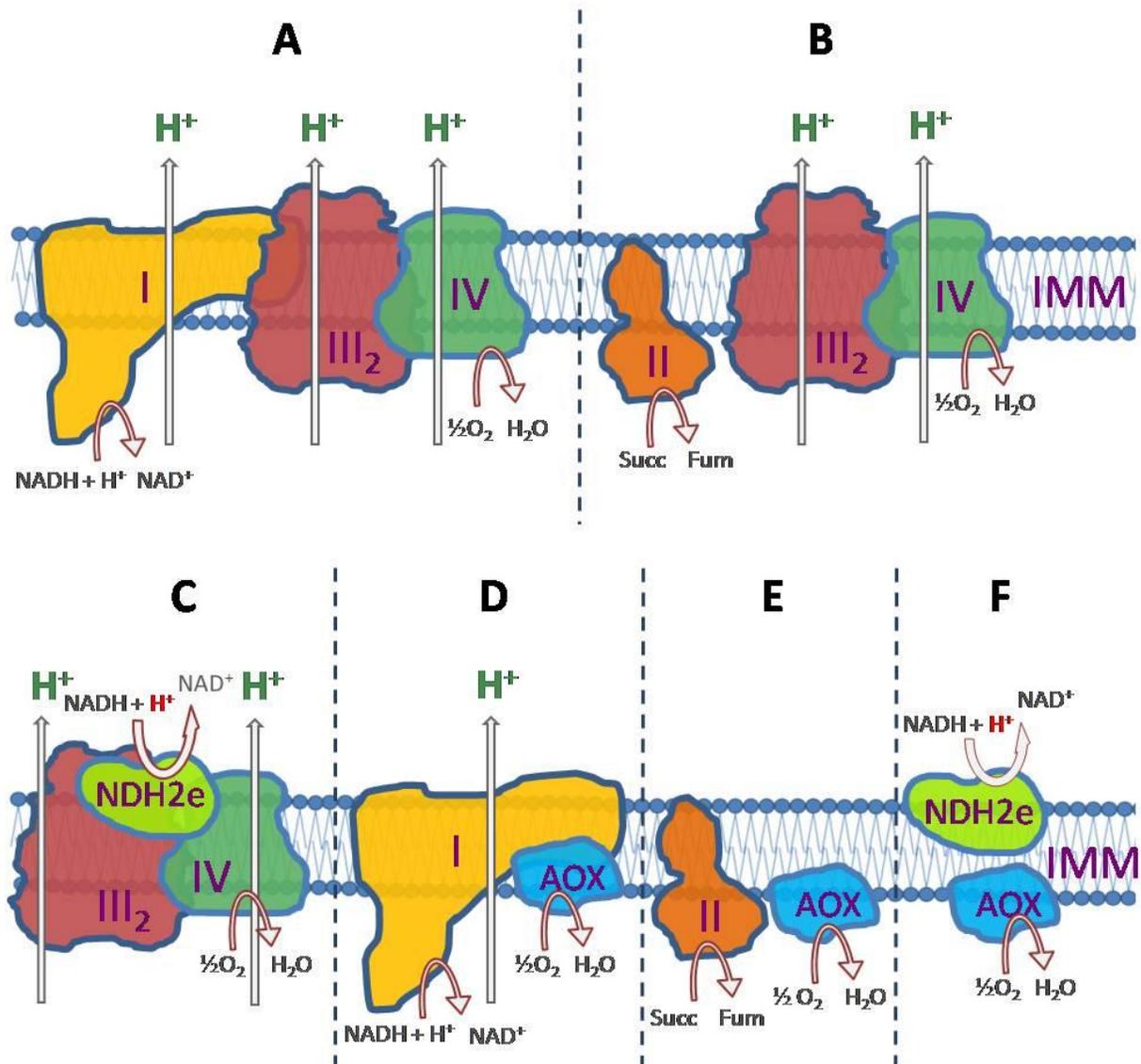
intermembranal a la matriz o un carboxilato protonado en esta misma dirección y desprotonado en la dirección opuesta. Independientemente del mecanismo, el resultado es el mismo, el abatimiento del gradiente electroquímico de protones. Por esta razón, estos transportadores se consideraron proteínas desacoplantes, ya que evitan la síntesis de ATP impulsada por el gradiente de protones que genera la cadena respiratoria. Es decir, funcionan como un corto circuito de protones que produce energía en forma de calor (Nicholls y Locke 1984). Al abatirse el gradiente de protones, se acelera la utilización de equivalentes reductores y, por tanto, la oxidación de lípidos y carbohidratos. Además, la actividad de la UCP logra mantener el balance redox de la poza de ubiquinona y reducir los niveles de especies reactivas de oxígeno (Ledezma y cols. 2002).

Se ha identificado la presencia de proteínas desacoplantes en tejidos termogénicos de plantas y en organismos unicelulares como protozoarios y hongos (Jarmuszkiewicz y cols. 2001; Jarmuszkiewicz y cols. 2002; Navet y cols. 2005). La función termogénica en organismos unicelulares resulta bastante improbable, ya que sería prácticamente imposible formar un gradiente de temperatura entre la célula y su entorno. Sin embargo, en *Acanthamoeba castellanii* la expresión de la UCP aumenta cuando crecen las células a 4 °C (Jarmuszkiewicz y cols. 2004). La propuesta más aceptada para la función de la UCP en organismos unicelulares es mantener el balance redox y prevenir la formación de ROS (Kowaltowski y cols. 1998; Goglia y Skulachev 2003; Ricquier 2005). Probablemente debido a que la UCP acelera el transporte de electrones, disminuye la producción endógena de ROS (Krauss y cols. 2005) y las enzimas detoxificantes de ROS no se saturan. Por ejemplo, una mutación que suprime la expresión de la UCP en *Candida albicans*, la hace más susceptible al estrés oxidativo que la cepa silvestre y esto afecta la invasibilidad de la levadura (Cavalheiro y cols. 2004; Cheng y cols. 2007). En *Y. lipolytica* se encontró un acarreador con actividad de UCP que aumenta su expresión en la fase estacionaria de crecimiento, en donde es necesario el desacoplamiento para mantener acelerado el flujo de electrones cuando no hay síntesis de ATP (Luévano-Martínez y cols. 2010). La proteína desacoplante (UCP) se activa en presencia de ROS, por lo cual se ha propuesto que esta enzima puede monitorear el estado redox de la cadena transportadora de electrones (Echtay y cols. 2002).

### 3.6.3 Oxidorreductasas alternas

En las cadenas respiratorias ramificadas, además de la reacción llevada a cabo por el complejo I, la ubiquinona puede ser reducida por diferentes deshidrogenasas que no funcionan como bombas de protones. Ejemplos de estas deshidrogenasas son la succinato deshidrogenasa, las NADH deshidrogenasas alternas (internas y externas), la dihidroorotato deshidrogenasa mitocondrial, la deshidrogenasa de la flavoproteína transferidora de electrones (ETF:ubiquinona

oxidorreductasa) y la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial. La ubiquinona reducida (que es el punto de convergencia y divergencia de electrones) puede ser oxidada por dos diferentes vías respiratorias: la vía citocrómica, integrada por los complejos III y IV; o por la vía alterna, que consta únicamente de la oxidasa alterna. Como resultado, existen múltiples vías de transporte de electrones de equivalentes reductores hasta el oxígeno. La estequiometría del bombeo de protones acoplado a las reacciones redox depende del número de bombas que intervienen en cada ruta. De este modo, el número de protones bombeados por par de electrones puede variar de  $5 \text{ H}^+/\text{e}^-$  (cuando se utilizan tres bombas) a cero, y en mitocondrias aisladas puede ser hasta de  $-0.5 \text{ H}^+/\text{e}^-$  (Guerrero-Castillo y cols. 2011). La estequiometría negativa se da en el caso de que los electrones sean transferidos del NADH al oxígeno por medio de la NDH2e y la AOX. Esto se debe a que la flavina de la NDH2e recibe un anión hidruro del NADH, el cual es transferido a la ubiquinona para generar la especie  $\text{UQH}^-$  (ubiquinol desprotonado). Esta especie toma un protón de espacio intermembranal para formar  $\text{UQH}_2$ . Al ser oxidado el ubiquinol por la oxidasa alterna, son liberados los protones hacia la matriz o utilizados en la formación de agua a partir de oxígeno. Como resultado neto, un protón desaparece del espacio intermembranal, y disminuye así el gradiente electroquímico de protones.



**Figura 4. En las cadenas ramificadas varía el número de bombas de protones que participan en la transferencia de electrones.** A) 3 bombas son utilizadas y bombean 5  $H^+/e^-$ ; B) 2 bombas activas, 3  $H^+/e^-$ ; C) 2 bombas activas, 2.5  $H^+/e^-$ ; D) 1 bomba activa, 4  $H^+/e^-$ ; E) cero bombas, 0  $H^+/e^-$ ; F) cero bombas -0.5  $H^+/e^-$ . I-IV, complejos respiratorios I a IV, respectivamente; NDH2e, NADH deshidrogenasa externa; AOX, oxidasa alterna; IMM, membrana interna mitocondrial. Los protones en rojo no contribuyen (c) o contribuyen negativamente (f) al bombeo de protones.

Esto no ocurre en el caso de que el ubiquinol generado por deshidrogenasas alternas internas o succinato deshidrogenasa (panel E) sea oxidado por la oxidasa alterna. Es decir, en estas reacciones redox, no hay cambios en el gradiente electroquímico de protones.

En los paneles B y C de la figura 4, los complejos III y IV son las únicas bombas de protones involucradas y se esperaría que el número de protones bombeados sea el mismo (6  $H^+/2e^-$ ). Sin embargo, en mitocondrias aisladas un protón del espacio intermembranal es utilizado para la

reducción de la ubiquinona a ubiquinol, y posteriormente el complejo  $bc_1$  lo regresa al mismo espacio, por lo tanto no se puede considerar bombeado y la cuenta da  $5 H^+/2e^-$  (Guerrero-Castillo y cols. 2011).

Se han propuesto diversas funciones para los componentes alternos, como la de actuar como disipadores de energía, y restablecer el transporte de electrones en condiciones de un elevado potencial transmembranal, lo cual permite que continúe el ciclo del ácido tricarbóxico independientemente de la síntesis de ATP (Lambers 1982). Además, se ha sugerido que tienen un papel importante sobre la regulación de la formación de especies reactivas, al prevenir su generación (Popov y cols. 1997; Clifton y cols. 2005), y en la regulación del estado redox citoplásmico.

### 4. Planteamiento del problema

En las cadenas respiratorias ramificadas como la de *Y. lipolytica*, en donde existen diferentes vías de transporte de electrones, resulta interesante conocer cuál de las vías siguen los electrones y cómo se regulan las diferentes vías. Con respecto a la competencia por los electrones entre la AOX y la vía citocrómica existen dos modelos. En el primer modelo se había sugerido que la AOX no compite por los electrones con la vía citocrómica (Bahr y Bonner 1973a). Es decir, la oxidasa alterna se encuentra activa sólo cuando la vía citocrómica está saturada o inhibida. En mitocondrias de *Y. lipolytica* se reportó este comportamiento y se ha afirmado que la actividad de la AOX está regulada por la actividad de la vía citocrómica (Medentsev y cols. 2002). Sin embargo, tras el descubrimiento de que la actividad de la AOX puede ser regulada en plantas por la reducción de un puente disulfuro (Umbach y Siedow 1993), o estimulada por  $\alpha$ -cetoácidos, como el piruvato (Millar y cols. 1993), se propuso un segundo modelo, en donde la vía alterna funciona no sólo en condiciones saturantes de la vía citocrómica, sino que esta vía puede incluso competir por los electrones a nivel del ubiquinol (Hoefnagel y cols. 1995; Day y cols. 1996). Dado que se tienen evidencias experimentales para respaldar ambos modelos del flujo de electrones por la vía alterna (Bahr y Bonner 1973a; Day y Wiskich 1995; Day y cols. 1996), planteamos un modelo en el que el flujo de electrones por ambas vías depende del sustrato y que está regulado por la canalización de los electrones entre complejos. Es decir, que existe una ruta para los electrones provenientes del NADH externo y otra para los electrones del NADH matricial, lo cual apoya ambos modelos planteados anteriormente. En la fase exponencial de crecimiento, el requerimiento energético de la célula es elevado, por lo cual debe evitarse un ciclo fútil de oxidación de equivalentes reductores (NADH y FADH<sub>2</sub>) que podría ocurrir por el flujo de electrones desde el NADH hasta el O<sub>2</sub> a través de la NDE y la AOX. Esta ruta no generaría el gradiente de protones requerido para la síntesis de ATP, por lo tanto debe evitarse en esta fase de crecimiento. Es decir, los electrones del NADH externo deben ser canalizados hacia la vía citocrómica para evitar que lleguen a la oxidasa alterna y se pierda la energía en forma de calor. Para que ocurra la canalización de electrones se propone que existe una interacción de la NDH<sub>2</sub>e con los complejos de la vía citocrómica. En cambio, los electrones del NADH interno pueden seguir ambas vías respiratorias, lo que concuerda con la correlación de la presencia de oxidasa alterna con el complejo I (Veiga y cols. 2003).

Por otro lado, cuando se alcanza la fase estacionaria de crecimiento, la velocidad de la respiración disminuye (Medentsev y Akimenko 1999). Como el gradiente de protones se mantiene elevado, el flujo de electrones en la cadena respiratoria disminuye y la probabilidad de formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) aumenta. Los sitios de oxidorreducción de la ubiquinona son la principal fuente de ROS. Esto se debe a la formación de un intermediario reactivo que puede

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

---

donar un electrón al oxígeno molecular y producir de ese modo el radical superóxido,  $O_2^-$  (Chen y cols. 2003). Para prevenir la formación de especies reactivas de oxígeno y como medio de disipación de energía, en la fase estacionaria sería oportuno un ciclo fútil que acelere el flujo de electrones. El cual, como se mencionó anteriormente, puede darse por la actividad combinada de los componentes alternos. La interacción entre la NDH2e con la vía citocrómica debe perderse o disminuir en esta fase lo cual debe afectar la canalización de los electrones del NADH externo hacia los sitios de conservación de energía. Es decir, en la fase estacionaria se debe activar la vía NDH2e-UQ-AOX para desacoplar la fosforilación oxidativa.

### 5. Objetivos e hipótesis

#### *Objetivo general*

Estudiar la participación de los componentes alternos en el flujo de electrones y en la formación de interacciones supramoleculares con los complejos respiratorios de la cadena respiratoria de *Y. lipolytica*.

#### *Objetivos específicos*

- Caracterizar la actividad de las vías respiratorias en presencia de diferentes sustratos oxidables.
- Detectar e identificar asociaciones entre complejos respiratorios y entre complejos y componentes alternos.
- Comparar los patrones de inhibición de ambas vías respiratorias y las interacciones de los componentes alternos con complejos respiratorios entre condiciones de alta y baja demanda energética.

#### *Hipótesis*

Si el flujo de electrones en las vías respiratorias depende del sustrato respiratorio, entonces los electrones de cada sustrato seguirán una ruta que depende de las interacciones entre complejos y componentes alternos. Es decir, lo que dicta la vía respiratoria que siguen los electrones son las asociaciones entre complejos y componentes respiratorios. Si estas asociaciones son modificadas en respuesta a las necesidades energéticas de la célula, las vías que siguen los electrones también variarán de acuerdo a los cambios en las interacciones.

Si en una cadena respiratoria ramificada los electrones pueden ser canalizados a través de diferentes vías, entonces cuando la célula requiera de un alto aporte energético, los sustratos serán oxidados por la vía que bombee más protones, mientras que en exceso de energía, los electrones seguirán rutas con menor eficiencia de bombeo.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Reactivos

Los compuestos NADH, n-propilgalato, n- $\beta$ -D-dodecilmaltósido, digitonina, MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico), manitol, piruvato, malato, citocromo *c*, rotenona, antimicina A, ADP, MgCl<sub>2</sub>, CCCP, CaCl<sub>2</sub>, TEA (trietanolamina), glucosa, DOC (ácido desoxicólico sal de sodio), NADP<sup>+</sup>, hexocinasa, isocitrato deshidrogenasa (IDH), ATP, safranina-O, y lactato de sodio se adquirieron de Sigma Chem., Co. (St Louis MO. EUA). El azul de Coomassie G se adquirió en Serva (Heidelberg, Alemania). La acrilamida y el SDS se adquirieron en BioRad. Los compuestos KCl, ácido fosfórico, sulfato cúprico, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y MgSO<sub>4</sub> se adquirieron en J.T. Baker-México, S. A. El tartrato de sodio y potasio se adquirió en Merck-México, S.A. El extracto de levadura se adquirió en DIFCO Laboratorios (Detroit, MI, EUA). Todos los demás reactivos fueron de la mejor calidad asequible comercialmente.

### 6.2 Material biológico

Se utilizaron células de *Y. lipolytica* de la cepa silvestre E150 [*Mat B his-1, ura3-302, leu2-270, xpr2-322* (Casaregola y cols. 1997)], de una cepa carente de la subunidad de 51 kDa del complejo I:  $\Delta$ nubmH1 [*Mat A his-1, ura3-302, leu2-270, xpr2-322 nubm::URA3, NUGM-HT2 X::NDH2i* (Kerscher y cols. 2001b)] y de la mutante carente de la deshidrogenasa externa: cepa GB5.2 o  $\Delta$ NDH2e [*Mat B his-1, ura3-302, leu2-270, xpr2-322, NDH2::URA3* (Garofano y cols. 2006)]. Todas las cepas de *Y. lipolytica* fueron donadas por el Dr. Ulrich Brandt (Universidad Goethe, Centro de Química Biológica, Fráncfort, Alemania). El anticuerpo contra la NADH deshidrogenasa externa de *Y. lipolytica* fue un regalo del Dr. Stefan Kerscher (Universidad Goethe, Centro de Química Biológica, Fráncfort, Alemania). Los anticuerpos de ratón contra las subunidades COXIII y COXII de la citocromo *c* oxidasa de *S. cerevisiae* se adquirieron en Mitoscience (Eugene, OR, EUA). Los anticuerpos secundarios anti IgG de ratón o anti IgG de conejo se adquirieron en Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, EUA). Los anticuerpos generados en conejo contra la subunidad  $\beta$  de la ATP sintasa de *Polytomella sp.* y contra la subunidad V (proteína hierro-azufre o subunidad de Rieske) del complejo *bc*<sub>1</sub> de bovino se generaron por la QBP Miriam Vázquez Acevedo en el laboratorio del Dr. Diego González Halphen (Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México). Las mitocondrias de corazón de bovino fueron un regalo de la Dra. Marietta Tuena Sangri

(Departamento de Bioquímica, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México).

### **6.3 Cultivo de células**

Las células se crecieron en medio sólido en cajas de YPD-agar (extracto de levadura 1%, peptona 2%, dextrosa 2%, agar 1%) durante tres días a 30 °C. De allí se tomó una asada para inocular un precultivo líquido de 100 ml del medio YD (extracto de levadura 1%, dextrosa 2%) y se crecieron las células durante 24 h a 30 °C. Finalmente, todo el volumen del precultivo se utilizó para inocular 1 l del mismo medio (YD) y se dejó crecer durante 15 h para alcanzar la fase logarítmica de crecimiento, 24 h para alcanzar la fase estacionaria temprana o 90 h para alcanzar la fase estacionaria tardía. Se utilizó el medio sin peptona para obtener en su mayoría células levaduriformes (Perez-Campo y Dominguez 2001), debido a que la formación de micelio dificulta la ruptura de las células con perlas de vidrio que se lleva a cabo durante la obtención de mitocondrias. En YD se observó un crecimiento predominantemente levaduriforme y la producción de biomasa fue mucho mayor que al utilizar medios con glutamina como fuente de nitrógeno, que también genera células levaduriformes (Ruiz-Herrera y Sentandreu 2002).

### **6.4 Aislamiento de mitocondrias**

#### **6.4.1 Homogeneización de células con perlas de vidrio**

Después de crecer, las células se lavaron con agua destilada tres veces por centrifugación a 5000 rpm (3798×g) por 5 min, se resuspendieron en medio de extracción. Se homogeneizaron empleando un homogeneizador (Bead-Beater Biospec Products, U.S.A) y perlas de vidrio de 0.45 mm de diámetro mediante tres pulsos de 20 s (Uribe y cols. 1985), con una camisa de hielo, y se aislaron las mitocondrias por centrifugación diferencial (Peña y cols. 1977) a 4 °C utilizando una centrífuga Sorvall R5B en un rotor GSA a 2500 rpm (1000×g) por 5 min. Posteriormente, se centrifugó el sobrenadante a 12000 rpm (22600×g) por 10 min. El sedimento se debe ver café (rojizo) oscuro en forma de corazón con un círculo más claro en el centro. El sedimento se resuspendió en 500 µl de medio de isotónico con un pincel fino tratando de deshacer todos los grumos. Se juntaron todos los volúmenes en un solo tubo y se agregó más medio isotónico (lo que baste para llegar a un volumen de 30 ml) y a continuación se centrifugó nuevamente a 5500 rpm (4400×g) por 5 min. Se debe vaciar el sobrenadante en otro tubo con cuidado de no llevarse la parte blanca (ya que ésta no se adhiere completamente al tubo). El sobrenadante se centrifugó a 12000 rpm (22600×g) por 10 min. El sedimento se debe ver café (rojizo) oscuro en forma de corazón.

Finalmente, se resuspendió el sedimento en 300  $\mu$ l de medio isotónico y se le determinó la concentración de proteína.

Medio isotónico: manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH 6.8 ajustado con trietanolamina (TEA). Se puede utilizar Tris-maleato ( $pK_{a2}=6.07$ ) 10 mM en lugar de MES ( $pK_a=6.15$ ).

Medio de extracción: medio isotónico con albúmina sérica bovina 0.1%.

### 6.4.2 Método enzimático

El método descrito para aislar mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae* (Guerin y cols. 1979) se adaptó para *Y. lipolytica* como se describe a continuación. Las células se lavaron con agua destilada por centrifugación a 5000 rpm ( $3600\times g$ ) por 5 min. El sedimento se resuspendió en el medio de preincubación (A) durante 15 min en agitación constante (240 rpm) a 30 °C. Para lavar las células del 2-mercaptoetanol se centrifugan 3 veces a 3000 rpm ( $1367\times g$ ) por 5 min cada vez, resuspendiendo las células en el medio de lavado de células (B). Después de la tercera centrifugación, las células se colocan en el medio de digestión (C). Se incuban de 10 a 25 min a 30 °C en agitación constante (240 rpm). Durante la incubación con la zimoliasa, se debe monitorear continuamente la densidad óptica. Una vez que la densidad óptica disminuye a 50-70% de la inicial, se centrifuga a 3000 rpm ( $1367\times g$ ) por 5 min y el sedimento se lava dos veces por centrifugación a 3000 rpm ( $1367\times g$ ) por 5 min con medio de lavado de protoplastos (D). A partir de este momento todos los procedimientos deben realizarse a 4 °C. El sedimento de la segunda centrifugación se resuspende en medio de homogeneización (E) y se coloca en un homogeneizador tipo Dounce o tipo Potter-Elvehjem con vástago estriado. El homogeneizador se coloca en hielo y se rompen las células introduciendo el vástago 20 veces. Esta suspensión se coloca en tubos previamente enfriados y se centrifuga a 2500 rpm ( $904\times g$ ) por 5 min, el sobrenadante se centrifuga a 12000 rpm ( $21000\times g$ ) por 10 min. El pellet se resuspende cuidadosamente con un pincel fino o con una pipeta succionando el volumen varias veces con cuidado de no generar burbujas. Se juntan en un solo tubo las suspensiones y se agrega el volumen de medio de homogeneización necesario para llegar a 30 ml. Se centrifuga a 5500 rpm ( $4380\times g$ ) por 5 min y el sobrenadante resultante se centrifuga a 12000 rpm ( $21000\times g$ ) por 10 min. El sedimento final se resuspende en 500  $\mu$ l del medio de homogeneización y se le determina la concentración de proteína.

A) Medio de preincubación: Tris 100 mM, 2-mercaptoetanol 0.1 M, pH 9.3

B) Medio de lavado de células: KCl 0.5 M, Tris-Cl 10 mM, pH 7.0

- C) Medio de digestión: Sorbitol (de preferencia desionizado) 1.35 M, EGTA 1 mM, ácido cítrico 10 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  10 mM, zimoliasa 1.25 mg/g peso húmedo
- D) Medio de lavado de protoplastos: Sorbitol 0.75 M (de preferencia desionizado), manitol 0.4 M (de preferencia desionizado), Tris 10 mM, albúmina sérica bovina 0.1%, pH 6.8
- E) Medio de homogeneización: Manitol 0.6 M, EGTA 2 mM, Tris 10 mM, albúmina sérica bovina 0.2%, pH 6.8

Los volúmenes de cada medio dependen de la cantidad de biomasa de la cual se parte. Por ejemplo, para un aislamiento a partir de dos litros de medio de cultivo en fase logarítmica basta con 100 ml del medio de preincubación, 600 ml de medio de lavado de células, 100 ml de medio de digestión, 400 ml de lavado de protoplastos, 150 ml de medio de homogeneización. El medio de digestión se puede dividir en dos partes: en una de éstas se solubiliza la zimoliasa y en la otra se resuspenden las células y luego se mezclan.

### 6.4.3 Determinación de proteína

La concentración de proteína de la suspensión de mitocondrias se determinó mediante el método de Biuret (Gornall y cols. 1949) en un espectrofotómetro Beckman DU-50 a 540 nm. A 2 ml del reactivo de Biuret se le añadieron 125  $\mu\text{l}$  de desoxicolato de sodio al 1%, 350  $\mu\text{l}$  de agua destilada y 25  $\mu\text{l}$  de la suspensión de mitocondrias. El cambio en la absorbancia debido a la interacción del ión  $\text{Cu}^{2+}$  con los enlaces peptídicos genera una coloración violeta, proporcional a la concentración de proteína de la muestra.

Para preparar el reactivo de Biuret se disuelven 3 g de tartrato de sodio y potasio en 200 ml de agua desionizada y hervida durante 5 min una vez que ésta se enfría. Posteriormente, se le añade 0.75 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . Por otra parte, se disuelven 15 g de NaOH en 100 ml de agua desionizada y hervida durante 5 min. Por último, se añade poco a poco la solución de hidróxido en la solución del tartrato con el cobre y se afora a 500 ml con agua destilada y hervida. Se recomienda enjuagar con el agua desionizada y hervida todo el material que se utilice en la preparación del reactivo.

### 6.5 Mediciones del consumo de oxígeno

La concentración de oxígeno se midió con un electrodo tipo Clark inmerso en una cámara con agitación y temperatura regulada como se describió anteriormente (Estabrook 1967). El electrodo se conectó a un oxímetro Ysi-5300 con graficador o con una computadora a través de un voltímetro (Stereon). Alternativamente, se utilizó un medidor de oxígeno Strathkelvin modelo 782 (Warner/Strathkelvin Instruments) con un electrodo tipo Clark inmerso en una cámara de 1 o de 0.1

ml. En ambos instrumentos la temperatura fue constante, 30 °C, controlada por un baño HAAKE-FE-2 (Thermo Electron, Karlsruhe). La reacción se llevó a cabo en medio de respiración. Se utilizó una concentración de mitocondrias de 0.5-1.0 mg/ml para cada experimento. Dependiendo del experimento se añadieron diferentes sustratos respiratorios para inducir el estado estacionario (Estado 4): NADH 1 mM, succinato 10 mM, glicerol-3-fosfato 5 mM o piruvato-malato 5 mM (de cada uno). Cuando se requirió evaluar la respiración en estado fosforilante (Estado 3), se añadió ADP 400  $\mu$ M. Para inducir un estado desacoplado se añadió CCCP 0.6  $\mu$ M. Como inhibidores de la respiración se utilizaron cianuro de potasio 100  $\mu$ M, n-propilgalato 50  $\mu$ M, rotenona 2.5  $\mu$ M, Antimicina A 10  $\mu$ M, mixotiazol 10  $\mu$ M. Los valores de control respiratorio (CR) se obtuvieron calculando el cociente de la velocidad del consumo de oxígeno en estado 3 sobre el estado 4.

Medio de respiración: Manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH 6.8 (ajustado con TEA), KCl 20 mM, fosfato 4 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM.

### 6.6 Determinación del potencial transmembranal

En las mitocondrias, la fracción del potencial transmembranal ( $\Delta\Psi$ ) a la cual contribuyen los protones puede aumentar por la actividad de la cadena respiratoria o de la ATP sintasa al hidrolizar ATP. Para determinar el potencial transmembranal se puede utilizar safranina (Akerman y Wikstrom 1976). El rojo básico 2 o safranina es un colorante catiónico y por lo tanto es atraído hacia la matriz mitocondrial negativa. Cuando se abate el  $\Delta\Psi$ , la atracción del colorante hacia la matriz disminuye o se pierde. Estos cambios se pueden determinar espectrofotométricamente o por fluorescencia. La absorbancia a 511 nm aumenta cuando hay un incremento en el  $\Delta\Psi$ , esto se puede monitorear en un espectrofotómetro de doble longitud de onda con agitación constante, en modo dual (AMINCO DW 2000, Olis, Inc., Bogart, GA, EUA), utilizando 533 nm como punto isobéptico, para eliminar el cambio en la absorbancia debido a la adición de mitocondrias. Alternativamente, se puede medir la fluorescencia de la safranina, la cual disminuye cuando hay un incremento en el  $\Delta\Psi$ . Se utilizó un fluorómetro SLM AMINCO (SLM Instruments, Inc., Urbana, IL, EUA); las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 495 y 586 nm, respectivamente. En ambos ensayos la temperatura se mantuvo constante a 30°C y el volumen final fue de 2 ml. Es posible escalar todo a 200  $\mu$ l y monitorear los cambios en la fluorescencia utilizando un lector de placas multimodal Polarstar Omega (BMG, Labtech, Ortenberg, Alemania) en el modo de intensidad de fluorescencia utilizando el filtro de excitación de 485-12 nm y el de emisión de 590-10 nm.

Mezcla de reacción: Medio de respiración, safranina 10  $\mu\text{M}$ , sustrato respiratorio (NADH 1 mM o piruvato + malato 5 mM (c/u).

Adiciones: mitocondrias aisladas 0.5 mg de proteína /ml, CCCP 0.6  $\mu\text{M}$ .

### **6.7 Cuantificación de actividades enzimáticas**

#### **6.7.1 NADH deshidrogenasa alterna (NDH2e)**

##### **6.7.1.1 NADH:DCPIP oxidorreductasa**

Para determinar la actividad de la NADH deshidrogenasa externa se utilizó diclorofenolindofenol (DCPIP) como aceptor artificial de electrones (Velázquez y Pardo 2001). Se monitoreó la disminución de la absorbancia a 340 nm por la oxidación del NADH o la disminución en la absorbancia a 600 nm por la reducción del DCPIP en un espectrofotómetro. A 340 nm, únicamente la especie reducida del NAD absorbe, mientras que a 600 nm, la especie oxidada del DCPIP tiene una coloración azul y absorbe luz de esta longitud de onda, al reducirse cambia a la forma incolora. Los ensayos se realizaron con mitocondrias aisladas en presencia de inhibidores del complejo I y de las vías citocrómica y alterna. Esta reacción es específica para la NADH deshidrogenasa externa debido a que el NADH no puede atravesar la membrana interna en mitocondrias intactas.

Mezcla de reacción: Medio de respiración, NADH 0.5 mM, DCPIP 100  $\mu\text{M}$ , cianuro 100  $\mu\text{M}$ , n-propilgalato 50  $\mu\text{M}$ , rotenona 10  $\mu\text{M}$ , mitocondrias aisladas 0.1-0.5 mg de proteína/ml.

Los ensayos se realizaron a 30 °C. El volumen final fue de 2 ml cuando se midió la absorbancia en un espectrofotómetro AMINCO DW 2000 (Olis Inc., Bogart, GA, EUA) en modo Split; y de 200  $\mu\text{l}$  cuando se determinó la actividad en placas en el lector multifuncional Synergy HT (Biotek, VT, EUA). Se utilizó un coeficiente de extinción molar para el NADH de  $\epsilon=6.3 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$ .

##### **6.7.1.2 NADH:ubiquinona oxidorreductasa**

También se determinó la actividad de la deshidrogenasa externa con el aceptor de electrones natural y en ausencia de inhibidores de las vías citocrómica y alterna. En este ensayo únicamente el complejo I se encontraba inhibido. Como control negativo de esta actividad se utilizó la cepa mutante GB5.2 o  $\Delta\text{NDH2e}$ .

Mezcla de reacción: Medio de respiración, NADH 0.5 mM, rotenona 10  $\mu$ M, mitocondrias aisladas 0.1-0.5 mg de proteína/ml.

### 6.7.2 Succinato deshidrogenasa

La actividad de la succinato deshidrogenasa se determinó utilizando un aceptor artificial de electrones. En esta reacción el succinato se oxida a fumarato y al reducirse el diclorofenolindofenol (DCPIP,  $E^{\circ} = 0.217$  V) se interrumpe una secuencia de dobles enlaces conjugados cuando el nitrógeno localizado en medio de los dos anillos aromáticos cambia de hibridación  $sp^2$  a  $sp^3$ , ocasionando un cambio de color de azul a incoloro (amarillo). Este cambio se monitoreó en un espectrofotómetro y se cuantificó así el cambio en la absorbancia a 600 nm en función del tiempo. La reacción se debe hacer en presencia de rotenona para impedir el flujo reverso de electrones hacia el complejo I y de inhibidores de las vías citocrómica y alterna para que reduzcan únicamente al aceptor artificial.

Mezcla de reacción: medio de respiración, succinato 10 mM, DCPIP 100  $\mu$ M, rotenona 10  $\mu$ M, cianuro de sodio 100  $\mu$ M, n-propilgalato 50  $\mu$ M, mitocondrias 0.1-0.5 mg de proteína/ml.

El ensayo se realizó a 30 °C en un espectrofotómetro Aminco DW 2000 (Olis Inc. Bogart, GA, EUA), el volumen final fue de 2 ml; alternativamente se utilizó un lector de placas multifuncional modelo Synergy HT (BioTek), el volumen final fue de 200  $\mu$ l por pozo. Para convertir de unidades de absorbancia/mg de proteína/ml a moles/mg de proteína/ml se utilizó un coeficiente de extinción molar para el DCPIP de  $21 \times 10^3$   $cm^{-1}$ . Nótese que si se requiere hacer el ensayo utilizando proteínas solubilizadas o la deshidrogenasa pura no es necesario utilizar el medio de respiración, en vez de éste se puede utilizar un amortiguador Tris 10 mM, pH 7.0.

### 6.7.3 Citocromo *c* oxidasa

La cuantificación de la actividad citocromo *c* oxidasa se realizó con un ensayo de polarografía utilizando un electrodo de tipo Clark como se describió en 6.5 (mediciones del consumo de oxígeno). El ensayo se hizo en presencia de mixotiazol para inhibir al complejo III. Como donador de electrones se utilizó ascorbato y TMPD. El ascorbato mantiene al TMPD en un estado reducido y éste último dona los electrones al citocromo *c* que es el sustrato de la citocromo *c* oxidasa. El otro sustrato es el oxígeno que se reduce a agua.

Mezcla de reacción: Medio de respiración, ascorbato 5 mM, TMPD 0.6 mM, mixotiazol 10  $\mu$ M, mitocondrias aisladas 0.05-0.1 mg de proteína/ml.

Después de observar un consumo constante de oxígeno se adicionó cianuro 100  $\mu$ M. Se reportó la actividad sensible a cianuro como ng átomo  $O_2$ /min/mg de proteína o como nmol  $O_2$ /min/mg de proteína.

### 6.7.4 ATP sintasa

La determinación de la síntesis de ATP más comúnmente utilizada en el laboratorio es acoplando la reacción de producción de ATP a un sistema enzimático. El ATP que sintetizan las mitocondrias es utilizado por la hexocinasa para producir glucosa-6-fosfato a partir de glucosa. La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa oxida a la glucosa-6-fosfato y genera  $\delta$ -gluconolactona y NADPH. Se mide el cambio en la absorbancia del NADPH a 340 en un espectrofotómetro en función del tiempo para obtener la velocidad de síntesis de ATP (Trautschold y cols. 1995).

Sin embargo, se utilizó otro método debido a que no es posible determinar la síntesis de ATP en equilibrio rápido utilizando NADH como sustrato respiratorio porque éste también absorbe a 340 nm. Además, los inhibidores de la oxidasa alterna del ácido salicil-hidroxiácido (SHAM) y del n-propilgalato (nPG) también provocan interferencia en la lectura. Por estas razones se decidió emplear otro método para cuantificar la síntesis de ATP acoplado a una reacción luminiscente (Manfredi y cols. 2002). La cantidad de ATP se determinó mediante la reacción de la luciferasa (Wulff y Döppen 1985). Esta enzima cataliza la formación de AMP-luciferina a partir de ATP y luciferina (un derivado benzotiazólico). La oxoluciferina reacciona con el oxígeno molecular formando oxoluciferina en un estado energético excitado. Después, la oxoluciferina regresa a su estado energético basal liberando energía en forma de luz. Las determinaciones se realizaron en un luminómetro ATP-photometer (Lab-Line Instruments Inc., IL, EUA). El proceso de cuantificación consta de dos partes: primero se lleva a cabo, por un tiempo determinado, la reacción de síntesis de ATP en mitocondrias aisladas, de la misma forma en que se determina el consumo de oxígeno en estado III; posteriormente, se cuantifica la concentración de ATP en las muestras.

Mezcla de reacción de síntesis de ATP: medio de respiración, sustrato respiratorio (NADH 1 mM, succinato 10 mM o piruvato + malato 5 mM [de cada uno], ADP 1 mM, mitocondrias aisladas 0.2-0.5 mg/ml).

Mezcla de reacción para la cuantificación de ATP: amortiguador de luciferasa (MOPS 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM, pH 7.8), 30 µl del extracto de cola de luciérnaga (luciferina-luciferasa) y 10-50 µl de la reacción de síntesis de ATP.

Preparación del extracto de luciérnaga: 100 mg de extracto de cola de luciérnaga se reconstituyen en 1 ml de agua destilada agitando en un vortex durante 5 min. Se centrifuga a 10000 rpm (12000 ×g) por 15 min y el sobrenadante transparente amarillo pálido se toma con una pipeta Pasteur con cuidado de no tomar las partículas que flotan hasta arriba del tubo y tampoco llevarse el sedimento. Este debe conservarse en hielo en un tubo cubierto de la luz.

Se coloca la mezcla de reacción de síntesis de ATP en tubos de ensayo. Las mitocondrias se añaden hasta el final. El volumen final debe ser de 1 ml. La reacción se lleva a cabo por 3 min a 30 °C en agitación. Inmediatamente, se toma una alícuota de 100 µl de esta mezcla y se coloca en un frasco vial de 10 ml que contiene 900 µl de la mezcla de reacción para la cuantificación de ATP, incluyendo el extracto de luciérnaga. Se agita manualmente de forma vigorosa durante 6 s y se toma la lectura en el luminómetro. Para la cuantificación es necesario realizar una curva estándar con concentraciones conocidas de ATP de 0 a 5 µM. Se reporta como nmol ATP/mg de proteína/min. Nótese que en caso de añadir inhibidores o desacoplantes se utilizan las mismas concentraciones que para la determinación del consumo de oxígeno.

### **6.8 Electroforesis nativa**

#### **6.8.1 Preparación de los geles**

Los geles de acrilamida para electroforesis nativa se describieron por primera vez hace 21 años (Schägger y von Jagow 1991). El protocolo de la preparación de los geles y su formulación ha mejorado. En el laboratorio, los geles se prepararon prácticamente como se indica en (Wittig y cols. 2006a). El método fue recopilado en la tesis de doctorado del Dr. Robert van Lis (Laboratorio de Bioenergética e Ingeniería de las Proteínas, UMR 7281, CNRS/AMU, Marsella, Francia). La electroforesis nativa se desarrolló para separar proteínas con un peso molecular con un rango de 50 kDa a 10 MDa, aunque recientemente se ha generado una matriz de acrilamida que separa hasta 45 MDa (Strecker y cols. 2010). Las proteínas migran en su forma nativa, por lo cual es posible determinar su actividad enzimática, sus estados oligoméricos, interacciones proteína-proteína, etc. Para el caso de las proteínas membranales, es necesario solubilizar las membranas con detergentes neutros para mantener la estabilidad y la actividad de las proteínas de interés o sus interacciones con otras proteínas. Los geles azules nativos (BN) llevan azul de Coomassie de Serva (Serva blue G-

250) en el amortiguador del cátodo, mientras que en los geles claros nativos (CN) el amortiguador del cátodo es incoloro. Normalmente se hace un gradiente de acrilamida dependiendo del tamaño de las proteínas a separar. En el caso de proteínas de la cadena respiratoria se puede utilizar un gradiente de 5 a 15% para resolver los complejos individualmente. Si se desea caracterizar supercomplejos respiratorios es necesario un gradiente de 4 a 12%. Para preparar los geles se pueden preparar previamente las siguientes soluciones:

- Solución AB: acrilamida al 48.5%, bis-acrilamida 1.5%.
- Amortiguador 3X nativo: ácido  $\epsilon$ -aminocaproico 1.5 M, bis-Tris 150 mM/imidazol 75 mM, pH 7.0 (ajustado con HCl).
- Glicerol al 80 %.
- Persulfato de amonio al 10 %.

Para geles grandes en cámaras de electroforesis Gibco BRL vertical de 1.5 mm de espesor la formulación es la siguiente:

Tabla 1. Preparación de los geles nativos de gradiente

	Acrilamida H		Acrilamida L		Concentrador
	12 %	15 %	4 %	5 %	4 %
<b>Solución AB</b>	4.6 ml	5.7 ml	1.6 ml	1.9 ml	0.5 ml
<b>Amortiguador 3X nativo</b>	6.2 ml	6.2 ml	6.2 ml	6.2 ml	2 ml
<b>Glicerol 80 %</b>	4.7 ml	4.8 ml	1.2 ml	1.2 ml	
<b>Agua destilada</b>	3 ml	1.8 ml	9.5 ml	9.2 ml	3.5 ml
<b>TEMED</b>	18 $\mu$ l	18 $\mu$ l	18 $\mu$ l	18 $\mu$ l	9 $\mu$ l
<b>Persulfato de amonio 10%</b>	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	32 $\mu$ l
<b>Vol. Final (ml)</b>	18.57	18.57	18.57	18.57	6.04

En caso de utilizar digitonina para solubilizar, se agregan 40  $\mu$ l de una solución al 5% tanto a la mezcla de acrilamida H como a la de acrilamida L durante la preparación. El TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina) y el persulfato se añaden hasta el final. Las dos soluciones se colocan en un aditamento formador de gradientes. Existen dos maneras de formar el gradiente: i) se puede colocar la mezcla de acrilamida H en el contenedor más cercano a la salida y la acrilamida L en el otro contenedor, y la manguera de salida se coloca entre los dos vidrios en la parte de arriba; o, ii) se coloca la acrilamida L en el contenedor más cercano a la salida del aditamento formador de gradientes y la acrilamida H en el otro contenedor y se adapta una cánula larga a la punta de la

manguera de salida que llegue hasta la parte de debajo en medio de los dos vidrios. Se debe tener mucho cuidado al retirar la cánula para no estropear el gradiente, por tal razón, los geles se realizaron de la primera forma. El agitador magnético se debe colocar en el contenedor cercano a la salida del aditamento. Una vez vaciados ambos contenedores, se agrega lentamente la mezcla del concentrador en la parte de arriba y, con cuidado, se coloca el peine y se deja polimerizar por 30 min.

Amortiguadores de corrida del gel:

- Amortiguador del cátodo para BN (1): Tricina 50 mM, Bis-Tris 15 mM (o imidazol 7.5 mM), azul de Coomassie de Serva 0.02 %.
- Amortiguador del cátodo para BN (2): Tricina 50 mM, Bis-Tris 15 mM (o imidazol 7.5 mM), azul de Coomassie de Serva 0.002 %.
- Amortiguador del cátodo para CN: Tricina 50 mM, Bis-Tris 15 mM (o imidazol 7.5 mM).
- Amortiguador del cátodo para hrCN: Tricina 50 mM, Bis-Tris 15 mM (o imidazol 7.5 mM), laurilmaltósido 0.01%, desoxicolato de sodio 0.05%.
- Amortiguador del ánodo: bis-Tris 50 mM (o imidazol 25 mM), pH 7.0 (ajustado con HCl).

Los amortiguadores BN 1 y 2 se utilizan para los geles azules. Estos geles tienen mayor resolución en comparación con los geles claros y las proteínas se separan únicamente por su peso molecular. El azul de Coomassie es suficientemente soluble en agua pero puede también unirse a proteínas membranales por sus propiedades hidrofóbicas. Al unirse a las proteínas, el colorante proporciona a las proteínas una carga negativa, y provoca que incluso proteínas básicas migren hacia el ánodo durante la corrida del gel. Debido a la carga negativa en la superficie de las proteínas, causada por la unión del colorante, éstas se repelen entre sí evitando bandas barridas en el gel.

En los geles claros nativos (CN), las proteínas migran de acuerdo a su peso molecular y a su carga intrínseca. Las condiciones en que se lleva a cabo este tipo de electroforesis en gel son menos disruptivas que en el caso de BN. Se prefieren los geles CN cuando las interacciones proteína-proteína son más débiles y no es posible observarlas en BN.

La electroforesis en geles claros nativos de alta resolución (hrCN) es más parecida a la electroforesis BN que a la CN. En los geles hrCN, las proteínas migran solamente de acuerdo a su peso molecular, ya que la carga negativa está dada por la adición de desoxicolato 0.05% en el amortiguador del cátodo. En estos geles es posible realizar actividades enzimáticas con la misma

resolución (sin barridos) y con el mismo patrón de migración que en BN, pero con la ventaja de que no es necesario desteñir el gel después de la tinción de actividad.

### 6.8.2 Preparación de la muestra y corrida del gel

Para los tres tipos de electroforesis nativa, las mitocondrias se solubilizan con n-dodecil- $\beta$ -D-maltósido (LM), Tritón X-100 o digitonina durante 30 min en hielo. El material no solubilizado después de la incubación con el detergente se separa por ultracentrifugación. Al sobrenadante se le añade el azul de Coomassie para geles BN o se carga directamente al gel en los casos de geles CN y hrCN (Schägger 2001a; Wittig y cols. 2007). El detergente utilizado y su concentración varían dependiendo del tipo de interacciones que se desee preservar. El LM tiene mayor capacidad de remover lípidos de las proteínas en comparación con el Tritón-X100 o la digitonina. Es por ello que el LM se considera más agresivo que los otros dos, a pesar de que los tres detergentes son neutros. Por ejemplo, solubilizando mitocondrias con LM no es posible observar supercomplejos en los geles nativos. La digitonina preserva las interacciones entre complejos y por lo tanto, es el detergente más utilizado en el estudio de los supercomplejos.

Soluciones:

- Amortiguador de muestra: ácido  $\epsilon$ -aminocaproico 750 mM, bis-Tris 50 mM (o imidazol 25 mM) pH 7.0 (ajustado con HCl)
- Solución de azul de Coomassie (Serva blue G-250) al 5% en amortiguador de muestra
- Laurilmaltósido (LM o n- $\beta$ -D-dodecilmaltósido) 10 %
- Digitonina 5 %
- Tritón-X100 10 %

La preparación que se muestra en la tabla 2 es para cargar un pozo en un gel grande en cámaras de electroforesis Gibco BRL vertical de 1.5 mm de espesor con un peine de 10 pozos. Cada pozo tiene 200  $\mu$ l de capacidad, pero es fundamental cargar un menor volumen de muestra para que no se transfieran las muestras de un pozo a otro.

Tabla 2. Preparación de las muestras para electroforesis nativa en gel.

	LM para BN	LM para CN o hrCN	Dig para BN	Dig para CN o hrCN
Mitocondrias	1 mg*	1 mg*	1 mg*	1 mg*
Amortiguador de muestra	130 µl	140 µl	90 µl	100 µl
Azul de Coomassie al 5%	10 µl	—	10 µl	—
Detergente	40 µl	40 µl	80 µl	80 µl
Volumen final	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl

\*En una suspensión de mitocondrias de 50 mg/ml (que es la concentración de proteína que comúnmente se obtiene) 1 mg de mitocondrias equivale a 20 µl.

Primero, se resuspenden las mitocondrias en el amortiguador de muestra frío y entonces se agrega el detergente frío con la pipeta subiendo y bajando el volumen varias veces. Mientras se agrega el detergente se observa el tubo a contraluz para verificar que se esté solubilizando la muestra. Se deja en hielo durante 30 min agitando por inversión los tubos cada 5 min. Se ultracentrifuga a 33 000 rpm (100000×g) durante 30 min a 4 °C y al sobrenadante se le agrega el azul (sólo en geles BN). Una vez mezclado el azul con la muestra se carga el gel y se corre a un amperaje constante de 30 mA a 4 °C. En el caso de los geles BN, primero se utiliza el amortiguador del cátodo 1 hasta un tercio del gel, para los dos tercios siguientes es necesario cambiar al amortiguador del cátodo 2. Para geles CN y hrCN, el amortiguador del cátodo es el mismo durante toda la corrida.

Todos los procedimientos se realizan a 4 °C o en el cuarto frío. Con los volúmenes de detergente indicados en la tabla de preparación de la muestra, las relaciones detergente:proteína quedan 2 g de LM/g de proteína o 4 g de digitonina/g de proteína.

## 6.9 Actividades en gel

Las actividades en gel nativo sirven para identificar las bandas correspondientes a cada enzima. En el caso de correr un solubilizado de mitocondrias en el gel, es posible identificar en dónde migra cada complejo respiratorio. Estas determinaciones no son cuantitativas, pero permiten distinguir cambios en la actividad de los complejos cuando se compara entre diferentes condiciones.

### 6.9.1 NADH deshidrogenasa

Para la actividad de NADH deshidrogenasa en gel, después de la electroforesis nativa, los geles nativos se incubaron en una solución con NADH como sustrato de las deshidrogenasas y un agente oxidante que se precipita y cambia de coloración en el sitio en donde se reduce (Zerbetto y cols. 1997). En esta tinción se utilizó bromuro de nitro-azul de tetrazolio (NBT), que en su forma oxidada es amarillo y cambia a morado al reducirse. Puede utilizarse alguna otra sal de tetrazolio

como el MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolio) para el mismo fin. En esta reacción, el NADH es oxidado por la flavina unida a las deshidrogenasas y esta última reduce directamente al tetrazolio. Es decir, para el caso del complejo I, los electrones no pasan por el resto de centros redox hierro-azufre y por lo tanto, la reacción no puede ser inhibida por compuestos que actúen en el sitio de unión a la ubiquinona. Mediante esta tinción es posible detectar la actividad del complejo I, de supercomplejos que contengan complejo I y de NADH deshidrogenasas alternas.

Soluciones:

- NADH 100 mM
- Solución de NBT: 60 mg de NBT disueltos en 2.8 ml de formamida y 1.2 ml de agua
- Tris 10 mM, pH 7.0 (ajustado con HCl)

El gel o algunos carriles del gel se incuban durante 10-30 min en agitación a temperatura ambiente usando de 10 a 40 ml (un volumen que cubra completamente el gel) del amortiguador Tris 10 mM. Se añaden de 100 a 400  $\mu$ l de NADH dependiendo del volumen final para tener una concentración final de NADH 1 mM y el suficiente volumen (entre 300  $\mu$ l y 1 ml) de NBT para tener una concentración final de 0.5 mg/ml. Si se realizó la tinción en un gel hrCN se puede directamente escanear el gel o tomar una fotografía. En el caso de geles BN es necesario desteñir el gel después de la tinción de actividad con una solución de ácido acético-metanol (1:1) antes de escanearlo.

### **6.9.2 Succinato deshidrogenasa y glicerol-3-fosfato deshidrogenasa**

El principio de esta tinción es el mismo que para el caso de NADH deshidrogenasa y se utiliza el amortiguador Tris 10 mM, pH 7.0 y NBT, pero en vez de utilizar NADH como sustrato se utiliza succinato o glicerol-3-fosfato a una concentración final 5 mM en los dos casos.

- Succinato 500 mM (pH 6.8 ajustado con Tris)
- Glicerol-3-fosfato 500 mM (pH 6.8 ajustado con Tris)

Estas tinciones son mucho menos sensibles que la de NADH deshidrogenasa, por lo tanto, tarda mucho más en generarse la coloración morada. Se pueden dejar varias horas agitando los geles a temperatura ambiente en las soluciones hasta conseguir la aparición de bandas con actividad.

### 6.9.3 Citocromo peroxidasa

Recientemente, se reportó una técnica de tinción de actividad específica para el complejo III utilizando un aceptor de electrones (algún peróxido) presente en un kit de tinción de Pierce (1-Step™ TMB blotting, Pierce, Rockford, IL, EUA) y tetrametilbenzidina, que funciona como el agente reductor y es sustrato de peroxidasa (Smet y cols. 2011). En el laboratorio se utilizó peróxido de hidrógeno como agente oxidante y tetrametilbenzidina, el cual al oxidarse se precipita y cambia de coloración de amarillo a azul claro. En realidad, la actividad utilizando peróxido de hidrógeno no es específica para el complejo III, sino que se determina la actividad de peroxidasa presente en los citocromos. Entonces, el citocromo *b* presente en el complejo II, los citocromos *a* y *a*<sub>3</sub> en el complejo IV y el citocromo *c* pudieran dar positivos también en un gel nativo. Una característica importante de esta actividad es que puede realizarse en geles desnaturalizantes, dado que no requiere que las enzimas se encuentren en su estado nativo.

Soluciones:

- Amortiguador de acetato de sodio 100 mM, pH 5.0
- 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) 20 mM en metanol al 70%
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 mM

Se incuba el gel en agitación a temperatura ambiente en el amortiguador de acetato de sodio usando un volumen que cubra el gel, se añade la tetrametilbenzidina a una concentración final 0.2 mM y hasta el final H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 µM. La coloración azul comienza a aparecer desde los primeros minutos, y en ese momento hay que escanear el gel. Después cambia a color verde y por último se vuelve amarillo.

### 6.9.4 Citocromo *c* oxidasa

La actividad de citocromo *c* oxidasa en gel se determinó utilizando diaminobenzidina como agente oxidante y citocromo *c* como donador de electrones y sustrato de la citocromo *c* oxidasa (Zerbetto y cols. 1997). La forma oxidada de diaminobenzidina disuelta tiene un color rojo pálido mientras que la forma reducida se precipita y cambia de color a café (en algunos casos es café verdoso). La reacción es específica para el complejo IV, pero la mayoría de los reportes añaden catalasa a la reacción para evitar que peróxidos contaminantes oxiden a la diaminobenzidina en presencia de algún citocromo. Es decir, que la reacción pueda hacerse inespecífica, apareciendo bandas en donde corren otras hemoproteínas que pueden no ser el complejo IV.

Soluciones:

- Amortiguador de fosfatos 50 mM (sales de sodio) pH 7.4
- citocromo *c* de corazón de caballo 10 mg/ml
- 3',5'-diaminobencidina 20 mg/ml

Se incuban los geles en el amortiguador de fosfatos a temperatura ambiente en agitación y se añaden el citocromo *c* y la diaminobencidina. La reacción puede tardar de 0.5 a 2 h en generar las bandas de actividad. En caso de añadir catalasa la concentración final debe ser 20 U/ml.

### 6.9.5 ATPasa

Esta tinción de actividad consiste en determinar la actividad de hidrólisis de ATP de la ATP sintasa (complejo V) en el gel. En esta reacción se utiliza nitrato de plomo y el ATP se hidroliza a ADP y fosfato inorgánico, el cual se intercambia con el nitrato formando fosfato de plomo, que forma un precipitado blanco en la banda correspondiente (Wittig y Schagger 2005; Wittig y cols. 2007). Para esta reacción no es necesario que el complejo V se encuentre completamente ensamblado. Es decir, el segmento F1 de la ATP sintasa que contiene el sitio de hidrólisis de ATP entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  también presenta actividad. Asimismo, la forma dimérica y otros subcomplejos tanto del monómero como del dímero generan bandas positivas. Los subcomplejos son las holoenzimas, monomérica o dimérica, a las cuales les falta(n) alguna(s) subunidad(es) pero son activos, por lo menos con respecto a la tinción en gel.

Soluciones:

- Amortiguador de incubación: glicina 270 mM, Tris 35 mM, pH 8.4
- Amortiguador de actividad: glicina 270 mM, Tris 35 mM, pH 8.4, ATP 8 mM, MgSO<sub>4</sub> 14 mM, Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0.2 %
- Solución para detener la reacción: metanol al 50 %.

Los geles se incuban en agitación, a temperatura ambiente, durante 3 h en el amortiguador de incubación (preparado el mismo día). Posteriormente, se incuban en el amortiguador de actividad sin ATP (preparado el mismo día) utilizando un volumen que cubra el gel, y al último se añade el ATP. La reacción tarda entre 15 y 30 min. También se puede incubar directamente en el amortiguador de actividad, pero la reacción puede tardar un poco más y se forma un precipitado en la solución en vez de en el gel. Para esta reacción es preferible hacer electroforesis hrCN.

### 6.10 Geles de segunda dimensión nativa

La segunda dimensión nativa sirve para separar los supercomplejos en los complejos que los conforman a partir de una separación en una primera dimensión. Con esta técnica es posible identificar cuáles complejos están presentes en los diferentes supercomplejos (Wittig y cols. 2006a). Para ello, se corre la primera dimensión azul nativa (BN) utilizando un detergente que conserve las interacciones entre complejos, por ejemplo, digitonina. Al finalizar la primera electroforesis azul nativa, el carril o los carriles que se van a someter a la segunda dimensión se incuban en el amortiguador del cátodo para BN (2) con laurilmaltósido durante 30 min a 4 °C. El laurilmaltósido conserva las interacciones entre las subunidades de un mismo complejo, pero rompe las interacciones entre complejos, por lo cual disocia a los supercomplejos. Después se carga el carril completo sobre un gel nativo de gradiente de acrilamida de 4 a 12 %, igual que la primera dimensión, excepto por el amortiguador del cátodo, el cual contiene LM al 0.02%. En vez del peine de 10 pozos, se utiliza un peine ciego, el cual sólo contiene dos pequeños pozos de cada lado.

En las cámaras grandes de electroforesis (Gibco BRL vertical) el volumen del amortiguador del cátodo es aproximadamente 500 ml. Por lo tanto para que el LM quede 0.02% se necesitan 100 mg. Para la incubación del carril de la primera dimensión con el amortiguador del cátodo con LM se necesitan entre 10 y 20 ml. A este volumen se le agrega todo el LM, es decir, los 100 mg de LM, de modo que queda el LM al 1-0.5%, dependiendo si se disolvió en 10 o en 20 ml. Después de la incubación por 30 min, se diluye el LM hasta 0.02% con el amortiguador del cátodo para BN (2) cuanto baste para 500 ml (Wittig y cols. 2006b).

### 6.11 Geles de segunda dimensión desnaturalizante

Para la segunda dimensión desnaturalizante se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida Tricina-SDS (Schägger y von Jagow 1987). Un carril completo de la primera dimensión nativa (BN o hrCN) se cortó, se incubó en una solución desnaturalizante y se colocó de forma horizontal arriba de un gel de tricina-SDS de acrilamida al 12% y se corrió el gel (Schägger 2006). Los complejos respiratorios que migraron como una sola banda en el gel nativo se separan en sus respectivas subunidades de acuerdo a su tamaño (Schägger 2001b). Esta técnica permite identificar cada complejo por su patrón de separación en subunidades.

Soluciones:

- Solución desnaturalizante: Tris 100 mM, tricina 100 mM, SDS 1%, 2-mercaptoetanol 1%.
- Acrilamida 30%: Acrilamida 30%, bis-acrilamida 0.8%.

- Amortiguador para gel desnaturalizante 3X: Tris 3M, SDS 0.3%, pH 8,45 (ajustado con HCl).
- Glicerol 80%.
- Amortiguador del cátodo: Tris 100 mM, Tricina 100 mM, SDS 0.1%.
- Amortiguador del ánodo: Tris 100 mM, pH 8.9 (ajustado con HCl).

Tabla 3. Preparación de los geles de tricina-SDS.

	Separador		Concentrador
	12 %	14 %	4 %
<b>Acrilamida 30%</b>	12 ml	14 ml	1.6 ml
<b>Amortiguador desnaturalizante 3X</b>	12 ml	12 ml	3 ml
<b>Glicerol 80 %</b>	4 ml	4 ml	—
<b>Agua destilada</b>	2 ml	—	3.5 ml
<b>TEMED</b>	10 µl	10 µl	10 µl
<b>Persulfato de amonio 10%</b>	100 µl	100 µl	100 µl
<b>Vol. Final (ml)</b>	30.11	30.11	8.21

El carril de la primera dimensión nativa se puede colocar en el gel desnaturalizante de dos formas: i) se prepara el gel separador de acrilamida al 14 %, se deja polimerizar y después se añade el gel concentrador de acrilamida al 4 % con el peine ciego (que tiene solamente dos pequeños pozos a los costados). Una vez polimerizada la acrilamida, se separan los vidrios con mucho cuidado tratando de que el gel quede completamente adherido a uno de los vidrios. Se coloca el carril de la primera dimensión, preincubado en la solución desnaturalizante durante 30 min en agitación a temperatura ambiente, sobre el gel de concentrador, y se coloca el vidrio tratando de que no queden burbujas de aire. Una vez cerrados los vidrios se coloca el gel en la cámara y se agrega el amortiguador del cátodo. Con ayuda de dos espátulas y con mucho cuidado, se empuja hacia abajo el carril para sacar las burbujas de aire que queden atrapadas entre el carril y el gel concentrador. Es fundamental que no queden burbujas de aire para el buen corrimiento del gel de segunda dimensión. ii) se coloca el carril de la primera dimensión nativa preincubado, como se mencionó anteriormente, entre los dos vidrios. Por un costado del carril se añade la mezcla del gel separador y se deja polimerizar por 30 min. Después, por un costado, se añade el gel concentrador tratando de que no queden burbujas entre el carril y la mezcla del gel concentrador. Se deben inclinar ligeramente los vidrios para que las burbujas de aire salgan al momento de añadir el gel concentrador. Una vez polimerizado el gel concentrador se corre el gel.

El gel se corre primero a 50 mV durante 30 min y después se aumenta el voltaje a 100 mV. Estos geles tardan entre 10 y 12 h en correr a ese voltaje.

Las bandas polipeptídicas en el gel se pueden teñir con azul de Coomassie (Schagger y cols. 1986). Los geles se incuban primero en solución fijadora durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Se transfieren a la solución teñidora y se incuban durante 1-2 h a temperatura ambiente en agitación constante. Por último, para revelar las bandas, se incuban los geles en solución desteñidora hasta que se destiña el fondo y queden sólo las bandas de proteína teñidas. Se colocó un papel absorbente para eliminar el exceso de azul de la solución.

- Solución fijadora: metanol 50 %, ácido acético 10 %.
- Solución teñidora: azul de Coomassie (Serva blue G 250, ó brilliant blue) 0.1%, ácido acético 10 %.
- Desteñidora: ácido acético 10 %, etanol 40 %.

En caso de que las proteínas de interés se encuentren en muy poca cantidad y no sean detectadas en el gel con la tinción con azul de Coomassie, el gel se puede teñir con plata o con Sypro<sup>®</sup> (Smejkal y cols. 2004), ya que esas tinciones son mucho más sensibles. Existen diferentes técnicas de tinción con plata pero la más sensible de todas es la que se describe a continuación (Rabilloud y cols. 1992). Para esta tinción los geles se incubaron en solución fijadora durante 30 min. Después se incubaron en una solución fijadora más diluida que contiene metanol 5 % y ácido acético al 7 % durante 2-3 h. Posteriormente, se colocaron en una solución con glutaraldehído al 10 % por 30 min. Los geles se lavaron dos veces con agua destilada, 30 min cada lavado. Se tiñen los geles con la solución C, incubándolos 15 min en agitación en un recipiente de vidrio (pyrex). Se lavan dos veces con agua destilada, 15 min cada lavado. Se agrega la solución reveladora (D) para desarrollar el color de las bandas. La reacción se detiene con ácido acético al 50 %.

Soluciones:

- Solución fijadora: metanol 50 %, ácido acético 10 %.
- Solución fijadora diluida: metanol 5%, ácido acético 7 %.
- Glutaraldehído 10 %.
- Solución A: disolver 0.8 g de nitrato de plata en 4 ml de agua destilada.
- Solución B: mezclar 21 ml de hidróxido de sodio al 0.36 % y 1.4 ml de hidróxido de amonio puro.

- Solución C (teñidora): adicionar la solución A gota a gota a la solución B en agitación (en un vaso de vidrio, sin que se forme un precipitado de color café) y aforar a 100 ml.
- Solución D (reveladora): mezclar 1 ml de ácido cítrico al 1% y 50 µl de formaldehído al 37 % y aforar a 100 ml.

Notas: i) si el gel se pone negro (es decir, se tiñe más de lo requerido) se puede aclarar el fondo con la solución fijadora de Kodak (diluida 1:7); ii) después de la tinción se puede incubar de 5 a 10 min con la solución fijadora de Kodak (diluida 1:7) para aumentar el contraste. Este procedimiento oscurece las bandas de color café y aclara el fondo del gel; iii) si se deja el gel demasiado tiempo en la solución fijadora de Kodak diluida se destiñe completamente y desaparecen las bandas.

### 6.12 Inmunodetección

#### 6.12.1 Western blot

Las proteínas de los geles nativos (BN, CN o hrCN) o de geles de segunda dimensión desnaturizante (2D-Tricina-SDS-PAGE) se transfieren a membranas de nitrocelulosa (BioRad, Hercules, CA, EUA) o de fluoruro de polivinilideno (PVDF, Millipore, Billerica, MA, EUA) para realizar las inmunodetecciones. En esta técnica, las membranas se incuban con un anticuerpo (primario) que reconoce específicamente alguna proteína. Después se añade otro anticuerpo (secundario) que reconoce y une específicamente al anticuerpo primario. El anticuerpo secundario está acoplado covalentemente a una enzima, cuya actividad es la responsable de la señal detectada.

Para la transferencia de las proteínas del gel a la membrana se utiliza una cámara de transferencia en semiseco modelo Hoefer TE 77, Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, EUA). Se colocaron tres piezas de papel filtro (Whatman) remojadas en el amortiguador positivo sobre la superficie de la cámara de transferencia. Luego se puso la membrana previamente remojada en el amortiguador positivo sobre los papeles filtro. El gel se incubó en el amortiguador negativo 5-10 min y se coloca sobre la membrana tratando de que no queden burbujas de aire en medio. Sobre el gel, se colocaron tres piezas más de papel filtro, remojadas en el amortiguador negativo y se cerró la cámara. La transferencia se realizó a amperaje constante ( $1 \text{ mA/cm}^2$ ) durante 1.5-2.5 h dependiendo de la concentración del gel. Para geles de acrilamida al 14 % se recomiendan 2.5 h de transferencia.

Después de la transferencia se lava la membrana con agua destilada por un minuto y se tiñe con rojo de Ponceau. Se destiñe con agua después de escanear o tomar foto y se bloquea la membrana en TBS con leche en polvo 10 %. Se lava la membrana dos veces durante 5 min cada vez con TTBS. La membrana se incuba con el anticuerpo primario en TTBS con leche en polvo 1% a temperatura ambiente durante 1.5 h. Se lava de nuevo la membrana dos veces durante 5 min cada

vez con TTBS. Se incuba con anticuerpo secundario en TTBS con leche en polvo 1% durante 2 h a temperatura ambiente y se lava nuevamente dos veces con TTBS durante 5 min cada lavado.

Cuando se utiliza un anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina, se revela con una solución de bicarbonato de sodio, BCIP (sal p-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato) y NBT (bromuro de tetrazolio nitro-azul). Las bandas pueden tardar en aparecer hasta 30 min. Se lava la membrana y se escanea.

Las membranas pueden reutilizarse para inmunodetección de otra proteína. Se incuba durante 60 min a 60 °C en solución de stripping y comienza el procedimiento desde el bloqueo de la membrana.

Soluciones:

- Amortiguador positivo: Tris 150 mM, tricina 50 mM, metanol 40 %.
- Amortiguador negativo: ácido  $\epsilon$ -aminocapróico 300 mM, SDS 0.05%.
- Rojo de Ponceau: rojo de Ponceau 0.1 % en ácido acético 1 %.
- TBS: Tris 20 mM, pH 7.5 (ajustado con HCl), NaCl 0.5 M.
- TTBS: Tris 20 mM, pH 7.5 (ajustado con HCl), NaCl 0.5 M, Tween-20 0.5 ml/l.
- Solución reveladora de bicarbonato:  $\text{NaHCO}_3$  100 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, pH 9.8.
- NBT: 60 mg de NBT en 2.8 ml de dimetilformamida y 1.2 ml de agua destilada.
- BCIP: 30 mg de BCIP en 4 ml de dimetilformamida.
- Solución de stripping: Tris 50 mM, pH 8.0, SDS 1%, 2-mercaptoetanol 1%.

Notas: La leche en polvo que se utilizó fue marca Svelty descremada, 0% grasa (Nestlé). Los anticuerpos utilizados están descritos en material biológico (ver sección 6.2).

### 6.12.2 Dot blot

Las pruebas tipo dot blots se utilizaron para confirmar la presencia de proteínas en las fracciones obtenidas de la cromatografía de intercambio iónico. Se colocan gotas de 2.5  $\mu\text{l}$  de cada fracción sobre una membrana de nitrocelulosa espaciadas por 1 cm. Se deja secar la membrana para que las proteínas se adhieran a la membrana. Se bloquea la membrana y se incuba con los anticuerpos correspondientes como se ha descrito para la inmunodetección tipo Western. Para las dot blots es fundamental que el anticuerpo primario genere una banda única en un ensayo tipo Western blot. Para lo cual es necesario titular el anticuerpo y utilizar una dilución que sólo reconozca a la proteína de interés.

### 6.13 Identificación de proteínas por secuenciación de péptidos

De los geles nativos CN o BN se cortaron las bandas y se mandaron al Yale Cancer Center Mass Spectrometry Resource y W.M. Keck Foundation Biotechnology Resource Laboratory (New Haven, CT, EUA) para secuenciación de péptidos por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Mediante el algoritmo Mascot (Hirosawa y cols. 1993) automatizado se buscaron los resultados de la espectrometría de masas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Para la secuenciación por amino terminal, las proteínas de un gel desnaturante de tricina-SDS se transfirieron a una membrana de Problott. Primero, se preincubó el gel en el amortiguador de transferencia CAPS en frío. El papel de Problott se cortó del tamaño del gel y se sumergió en metanol absoluto y luego en el amortiguador de transferencia CAPS. El amortiguador CAPS se utiliza comúnmente en secuenciación de amino terminal y en otros sistemas de análisis de aminoácidos para evitar la interferencia o mala interpretación en los resultados al utilizar el amortiguador Tris-glicina. En la rejilla de la cámara de transferencia se colocaron tres papeles filtro (Whatman) sumergidos previamente en el amortiguador de transferencia. Sobre el papel filtro se colocaron primero el gel y después el papel Problott y se cubrieron con tres papeles filtro. Se transfirieron las proteínas a 400 mA durante 2.5 h. Posteriormente, se lavó el papel Problott en agua bidestilada y se teñió con la solución teñidora durante 5 min en agitación a temperatura ambiente. Se destiñó con la solución fijadora y se lavó el papel con agua durante 5 min. Se dejó secar el papel y se cortaron las bandas de interés. Las bandas cortadas se mandaron al Laboratorio de Microsecuenciación de Proteínas, Instituto Pasteur, París, Francia y se analizaron por el Dr. J. d'Alayer en un secuenciador (Applied Biosystems) como se ha reportado anteriormente (Atteia y cols. 1997).

Soluciones:

- Amortiguador de transferencia CAPS: Caps 10 mM, metanol 10 %, pH 11 (ajustado con NaOH en frío).
- Solución teñidora: azul de Coomassie brillante R250 0.1 %, metanol 50 %.
- Solución fijadora: metanol 50 %, ácido acético 10 %.

### 6.14 Cromatografías de intercambio iónico

Las mitocondrias se suspenden a una concentración de proteína de 10 mg/ml en amortiguador A. A esta suspensión de mitocondrias se le adiciona 0.8-2 g/g proteína de n-β-D-dodecilmaltósido (LM) para solubilizar las proteínas membranales. La solución madre de LM se prepara a 100 mg/ml

(10 %). La mezcla se agita durante 30 min en hielo y se centrifuga a 30 000 rpm (100 000 g) por 30 min, utilizando un rotor 60Ti. El sobrenadante se carga en una columna de intercambio aniónico de DEAE Bio-Gel A previamente equilibrada con el amortiguador B, como se describió anteriormente (Ljungdahl y cols. 1986; Vázquez-Acevedo y cols. 2006). A diferencia de los métodos reportados, en la preparación del amortiguador B en este trabajo no se incluyó NaCl 100 mM y, por tanto, excluimos también el paso de diálisis de las muestras. Las dimensiones de la columna utilizada son de 15 cm de largo por 3 cm de diámetro. La columna con la muestra adsorbida se lava con tres volúmenes de columna (~150 ml) y después se eluye la muestra con cuatro volúmenes de columna utilizando un gradiente continuo de NaCl desde 0 a 400 mM en el amortiguador B. Se colectan fracciones de 1 ml y la concentración de proteína de cada fracción se determina espectrofotométricamente a 280 nm. Todos los pasos se realizaron a 4 °C.

Amortiguador A: MgSO<sub>4</sub> 1 mM, PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 1 mM, HEPES 50 mM, pH 8.0 y TLCK 50 µg/ml.

Amortiguador B: amortiguador A más LM 0.1 mg/ml.

### 6.14.1 Cuantificación de actividades enzimáticas de las fracciones

La determinación de las actividades enzimáticas de cada fracción se realiza monitoreando cambios en la absorbancia en un lector de placas BioRad 550 equipado con cuatro filtros, o en un lector de placas multimodal Synergy HT equipado con monocromadores (Biotek, VT, EUA). De cada fracción se toman 20 µl de muestra y se adicionan a 160 µl del amortiguador, por último se agregan 20 µl más de los sustratos correspondientes para la determinación de cada actividad. El volumen final en todos los casos fue de 200 µl y todas las lecturas se realizaron a 30 °C.

Para la actividad de NADH deshidrogenasa, se midió la absorbancia a 570 nm siguiendo la reducción del bromuro de azul de tetrazolio (NBT). La mezcla de reacción debe llevar Tris 10 mM, pH 7.0, NADH 1 mM y 0.5 mg/ml de bromuro de azul de tetrazolio. La reacción tarda entre 0.5 y 5 min en generar la coloración violeta, dependiendo de la actividad de las muestras. En esta reacción el NADH es oxidado por la flavina de las NADH deshidrogenasas y es esta misma la que reduce el NBT para cambiar la coloración de amarillo a violeta. En el caso del complejo I, la reacción es insensible a rotenona y a otros inhibidores que actúan en el sitio de unión de la ubiquinona.

La actividad de citocromo *c* oxidasa se determinó siguiendo la absorbancia de la diaminobencidina a 490 nm. La mezcla de reacción contiene: amortiguador de fosfatos (sales de sodio) pH 7.4, citocromo *c* de corazón de caballo 0.5 mg/ml, diaminobencidina 1mg/ml. La

actividad de citocromo *c* oxidasa es mucho más lenta que la de la oxidación del NADH, por lo tanto, las lecturas de punto final se toman después de 30-60 min.

La actividad de citocromo peroxidasa se cuantificó determinando la absorbancia de la tetrametilbencidina a 630 nm de longitud de onda. La mezcla de reacción debe llevar un amortiguador de acetato de sodio 100 mM, pH 5.0, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina 2 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 mM. En este caso, la reacción, muy rápida, forma un color azul, después cambia a verde y por último, regresa a su coloración amarilla, como antes de reaccionar. La lectura debe hacerse dentro del primer minuto después de adicionar los sustratos.

La actividad de ATPasa se midió a 415 nm por turbidez de la muestra. Se utilizó amortiguador Tris 10 mM, Glicina 270 nM, pH 8.0 preparado el mismo día de la medición, MgSO<sub>4</sub> 14 mM, ATP (sal de sodio) 8 mM, Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0.2%. Esta reacción tarda alrededor de 0.5 a 3 h. La ATPasa hidroliza el ATP de ello resulta ADP y fosfato, el cual desplaza al nitrato y se genera fosfato de plomo. De ese modo se forma un precipitado de color blanco que hace turbia la solución.

### 6.15 Cromatografía de exclusión molecular

Las fracciones de la cromatografía de intercambio iónico con actividad de NADH deshidrogenasa y citocromo *c* oxidasa —y en donde se confirmó, por Western blot, que se encontraban tanto la NDH2e como la COX— se juntaron y se concentraron utilizando una cámara de ultrafiltración de 10 ml Amicon® con nitrógeno a una presión de 40 psi. Aproximadamente 1 ml se carga en una columna de 60 cm de largo por 1.5 cm de diámetro de Sephacryl S-200, la cual tiene un rango de separación de 5000 a 300000 Da y se colectan fracciones de 1 ml. A cada fracción se le determina la concentración de proteína y las actividades enzimáticas descritas anteriormente (ver cromatografías de intercambio iónico).

### 6.16 Espectros diferenciales

El contenido de citocromos en mitocondrias aisladas se determinó mediante la obtención de espectros diferenciales. Los espectros oxidados se obtienen después de colocar 4 mg de proteína de mitocondrias en 2 ml de medio isotónico (manitol 0.6 M, ácido maleico 10 mM, pH 6.8 ajustado con TEA) y agitar fuertemente con un vortex durante 1 minuto. Los espectros oxidados con ferricianuro se obtienen con mitocondrias 2mg/ml en medio isotónico con K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 100 μM. Los espectros oxidados con ferricianuro se asignan como líneas basales. A las mismas celdas donde se obtuvieron los espectros oxidados se les adiciona, con una espátula pequeña, unos granitos de hidrosulfito de sodio (ditionita de sodio), y se obtienen los espectros reducidos. El barrido se realiza de 500 a 680 nm en un espectrofotómetro AMINCO DW2000 (Olis Inc. Bogart, GA, EUA). El

contenido de citocromos por mg de proteína se calcula utilizando los siguientes coeficientes de extinción molar: citocromos  $a+a_3$   $\epsilon_{605-630\text{ nm}} = 24\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Yonetani 1960); citocromo  $b$   $\epsilon_{563-577\text{ nm}} = 28.5\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Berden y Slater 1970). Especificaciones del espectrofotómetro: núm. de incrementos 600; lecturas por dato 10; Slits 2 nm; cambio de lámpara a 300 nm; ancho de banda 8 nm.

### 6.17 Determinación de especies reactivas de oxígeno

#### 6.17.1 Método de fluorescencia de resorufina

La velocidad de producción de especies reactivas de oxígeno se determinó mediante el método de Amplex® Red peróxido de hidrógeno/ peroxidasa (Zhou y cols. 1997). El superóxido generado en las mitocondrias aisladas se dismuta a peróxido de hidrógeno por las enzimas antioxidantes superóxido dismutasas, tanto la localizada en la matriz mitocondrial como la que se añade al ensayo. El peróxido de hidrógeno difunde al exterior de las mitocondrias, en donde funciona como sustrato de la peroxidasa, que a su vez oxida al Amplex Red generando resorufina ( $\epsilon_{571\text{ nm}} = 54\text{ cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$ ). Los ensayos se realizan como se describió anteriormente (Dröse y Brandt 2008); se utilizó un lector de placas multimodal Synergy HT Biotek (VT, EUA) con longitudes de onda de excitación y emisión de 540 y 600 nm, respectivamente. La mezcla de reacción debe contener: Amortiguador de respiración (Manitol 0.6 M, MES 5 mM [pH 6.8], KCl 20 mM, fosfato 10 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM), Amplex Red 10  $\mu\text{M}$ , peroxidasa de rábano 0.1 unidades/ml, superóxido dismutasa 100 unidades/ml. Como sustratos respiratorios se utilizan NADH 0.5 mM, piruvato + malato 10 mM o succinato 10 mM. Las mitocondrias aisladas se agregan a una concentración de proteína final de 0.3 mg/ml (60 mg de proteína/ pozo).

Antes del inicio de la lectura se deben preparar las siguientes soluciones:

Solución A. Amortiguador de respiración, Amplex Red 20  $\mu\text{M}$ , peroxidasa de rábano 0.2 unidades/ml, superóxido dismutasa 200 unidades/ml y el sustrato correspondiente al doble de la concentración final.

Solución B. Amortiguador de respiración con las mitocondrias aisladas 0.6 mg/ml.

En caso de que se requiera añadir inhibidores, se pueden pipetear directamente en el pozo antes de cualquier otra adición. Posteriormente, se añade la solución con mitocondrias (Solución B) y justo antes de introducir la placa en el lector se añade la solución A y se toma la lectura durante 10 min.

La velocidad de producción de ROS se determina por el cambio en la fluorescencia de la resorufina en función del tiempo. Este cambio es lineal en un intervalo de 0 a 10 min

aproximadamente. Para cambiar de unidades de fluorescencia a nmol de  $H_2O_2$  por unidad de tiempo se realizó una curva estándar de peróxido de hidrógeno de 0 a 1 nmol por pozo en ausencia de mitocondrias.

### 6.17.2 Fluorescencia de dihidro-2,7-diclorofluoresceína

Alternativamente, para determinar la velocidad de formación de especies reactivas de oxígeno se utilizó el método de fluorescencia de diclorofluoresceína (Halliwell y Whiteman 2004). Este método no es tan específico como el del Amplex Red, ya que el diacetato de diclorofluoresceína reacciona con especies reactivas más agresivas como el radical oxhidrilo y no con especies reactivas primarias como el superóxido o el peróxido de hidrógeno (Baird y cols. 2006). Por lo tanto, la fluorescencia no se genera inmediatamente y el cambio de fluorescencia en función del tiempo no es lineal al inicio. La fluorescencia de la diclorofluoresceína se monitoreó a longitudes de onda de excitación y emisión de 488 y 525 nm, respectivamente, en un lector de placas multimodal Synergy HT (Biotek, VT, EUA). La mezcla de reacción debe contener: amortiguador de respiración (manitol 0.6 M, MES 5 mM [pH 6.8], KCl 20 mM, fosfato 10 mM,  $MgCl_2$  1 mM),  $H_2$ -DCF-DA 10  $\mu$ M y el sustrato respiratorio correspondiente, NADH 0.5 mM, piruvato-malato 10 mM o succinato 10 mM. Las mitocondrias se añadieron a una concentración de proteína igual a 0.3 mg/ml (60  $\mu$ g/pozo). El volumen final fue de 200  $\mu$ l.

Previo al inicio de la lectura se preparan las siguientes soluciones:

Solución A. Amortiguador de respiración,  $H_2$ -DCF-DA 20  $\mu$ M y el sustrato correspondiente al doble de la concentración final.

Solución B. Amortiguador de respiración con las mitocondrias aisladas 0.6 mg/ml.

La adición de inhibidores o desacoplantes se realiza en cada pozo antes de cualquier otra adición. Posteriormente, se añade la solución B y antes de tomar la lectura se añade la solución A. Se monitorea la fluorescencia durante 60 min. Las pendientes se deben calcular después de 30 min del ensayo, debido a que durante la primera media hora no hay una relación lineal. Para cambiar de unidades de fluorescencia a nmol de DCF se puede hacer una curva patrón utilizando DCF en vez de  $H_2$ -DCF-DA. Cuando el ensayo se realiza en ausencia de esterasa la velocidad de oxidación del  $H_2$ -DCF-DA es mucho mayor que en presencia de esta hidrolasa, debido a que cuando la esterasa remueve los grupos acetatos de la  $H_2$ -DCF, ya no puede permear al interior de la mitocondria y el ensayo se vuelve específico para la detección de ROS producidas en el exterior.

### 6.17.3 Determinación de aconitasa

La aconitasa (aconitato hidratasa; EC 4.2.1.3) es una proteína hierro-azufre que cataliza reversiblemente la interconversión de citrato en isocitrato, vía cis-aconitato, tanto en el ciclo de Krebs como en el del glioxilato. Contiene un centro [4Fe-4S] en el sitio activo. En eucariontes hay dos isoformas, citosólica y mitocondrial. Ambas tienen otra función además de la catalítica en regulación de la expresión de genes mitocondriales (la isoforma mitocondrial) y en la regulación del metabolismo de hierro (la citosólica). Se puede inhibir competitivamente por compuestos análogos al citrato, como fluorocitrato, o por fluoroacetato. También se inhibe con agentes que causan estrés oxidativo, como peroxinitrito, peróxido de hidrógeno y superóxido, que inactivan a la enzima cambiando el centro 4Fe-4S a 3Fe-4S; por ello la aconitasa es considerada como un marcador de estrés oxidativo mitocondrial y celular (Gardner y cols. 1994).

La actividad se puede determinar de dos formas:

1. En una reacción acoplada a isocitrato deshidrogenasa
2. Determinación directa de la absorbancia del intermediario cis-aconitato.

A continuación se describe únicamente el método acoplado a isocitrato deshidrogenasa. Soluciones madre y amortiguadores: Tris-Cl 50 mM pH 7.4, citrato de sodio 0.5 M, NADP<sup>+</sup> 0.2 M, MnCl<sub>2</sub> 0.6 M, isocitrato deshidrogenasa (IDH) 62 U/ml.

La determinación se puede hacer en el lector de placas multimodal (Biotek) o en el Polarstar Omega (BMG) midiendo la absorbancia a 340 nm. Primero, se deben preparar dos soluciones:

Solución A: Tris-Cl 50 mM pH 7.4, citrato 10 mM, MnCl<sub>2</sub> 1.2 mM, NADP<sup>+</sup> 0.4 mM, IDH 2.5 U/ml.

Solución B (muestra): Tris-Cl 50 mM pH 7.4, mitocondrias aisladas (permeabilizadas o solubilizadas con un detergente neutro) 2 mg/ml.

El volumen de las soluciones A y B debe ser igual. Primero se coloca en la placa la solución B y justo antes de comenzar a leer se agrega la solución A. Se colocan 100 µl de cada solución por pozo, pero hay que considerar preparar un volumen mayor para poder pipetear bien con la pipeta multicanal. Un mililitro extra del volumen calculado a utilizar es suficiente. Por ejemplo, si se requiere utilizar 20 pozos, en teoría bastaría con preparar 2 ml de cada solución, pero es imposible pipetear bien los últimos pozos con la pipeta multicanal; entonces, se debe preparar por lo menos 3 ml de cada solución. Hay una fase lag en la formación del NADPH en ensayos con poca actividad de aconitasa que corresponde a un retraso en el cambio en absorbancia a 340 nm debido a la

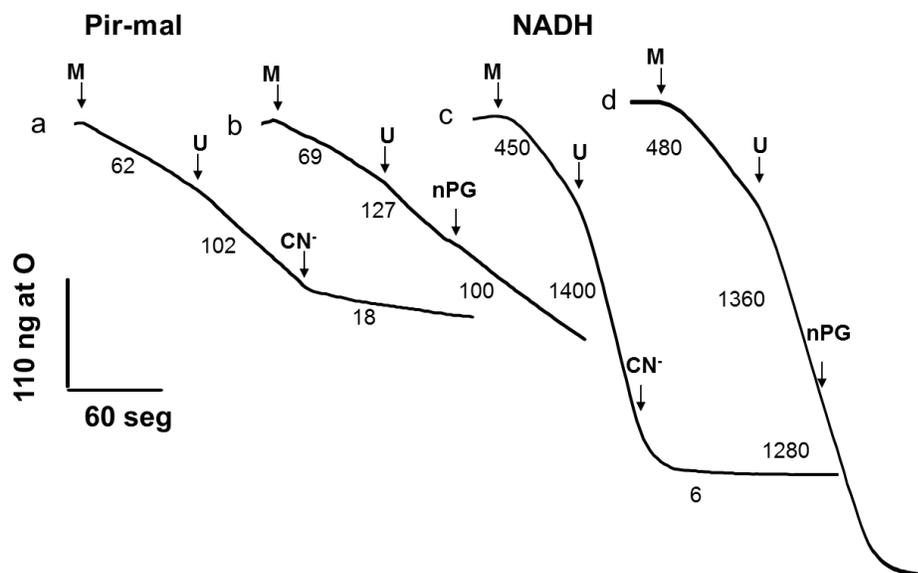
acumulación del cis-aconitato, después de eso se debe tomar la pendiente. A las pendientes obtenidas se les debe restar el blanco (pozos que en vez de sol. B tienen únicamente 100 µl de Tris-Cl 50 mM pH 7.4, pero que sí llevan sol. A).

## 7. Resultados

### 7.1 Resultados en fase logarítmica de crecimiento

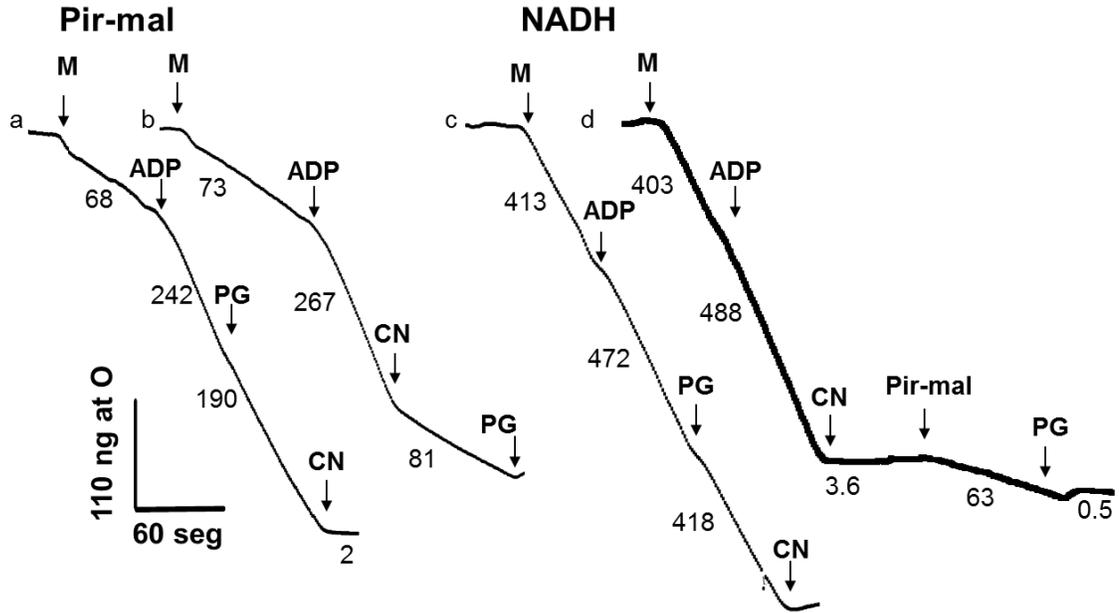
#### 7.1.1 Los electrones del NADH externo son canalizados hacia la vía citocrómica

Diversas deshidrogenasas realizan la interconversión de ubiquinona a ubiquinol, el cual puede ser oxidado tanto por la vía alterna como por la vía citocrómica. Esto permite que existan dos rutas de transporte de electrones posibles para cada sustrato oxidable. Sin embargo, las asociaciones entre complejos y la canalización de electrones, la capacidad catalítica de cada enzima, la afinidad por los sustratos y productos, la cantidad de proteínas y la modulación de su actividad ante diferentes metabolitos, dan como resultado que la distribución de los electrones entre las dos vías respiratorias no sea equitativa. De hecho, en *Y. lipolytica* y en una mutante de *Schizosaccharomyces pombe* que contiene una AOX de planta, estudios sobre la contribución de la oxidasa alterna a la respiración señalan a la citocrómica como la vía predominante (Medentsev y cols. 2002; Albury y cols. 2010). En presencia de activadores de la oxidasa alterna o en condiciones que favorezcan su actividad, como la presencia de agentes oxidantes, de inhibidores de la vía citocrómica o durante la fase estacionaria de crecimiento, se ha observado una mayor contribución de la vía alterna a la respiración (Clifton y cols. 2005; Hanqing y cols. 2010). En los experimentos realizados en nuestro laboratorio con mitocondrias aisladas, observamos que la contribución de la oxidasa alterna varía dependiendo del sustrato (figura 5). Cuando se utilizó piruvato-malato como sustrato respiratorio para generar NADH matricial, la velocidad del consumo de oxígeno, tanto en estado estacionario (estado 4), como en estado desacoplado (estado U) fue mucho más lenta que cuando se utilizó NADH. En estado desacoplado se analizó el efecto de los inhibidores de las vías citocrómica y alterna. Al utilizar piruvato-malato como sustrato, los inhibidores de ambas vías presentaron un efecto parcial. Es decir, al inhibir una de las vías, la otra se mantiene activada, aunque la vía citocrómica parece contribuir más al consumo de oxígeno que la vía alterna. En cambio, cuando se utilizó NADH como sustrato respiratorio, la respuesta a los inhibidores fue diferente. El cianuro bloqueó casi completamente el consumo de oxígeno, mientras que el propilgalato tuvo un efecto mínimo sobre la respiración.



**Figura 5. Efecto del sustrato en la respuesta del estado desacoplado a inhibidores.** La inhibición por cianuro ( $\text{CN}^-$ ) o n-propilgalato (nPG) se determinó en estado desacoplado. Mezcla de reacción: manitol 0.6 M, MES 5 mM, KCl 20 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, fosfato 4 mM, piruvato-malato 10 mM (trazos a y b) o NADH 1 mM (trazos c y d). En donde se indica se adicionaron 0.5 mg/ml de mitocondrias aisladas de *Y. lipolytica* (M), 0.6 mM de CCCP (U) y cianuro 100  $\mu\text{M}$  o n-PG 50  $\mu\text{M}$ . Los números indican el consumo de oxígeno en ngatO/mg de proteína/minuto. Se muestran trazos representativos, n = 5.

Para complementar estos datos en una condición fisiológica, se determinó el efecto de los inhibidores en estado III, es decir, el estado fosforilante (figura 6). La inhibición de la respiración mostró el mismo patrón de dependencia de sustratos. Por ejemplo, la adición de propilgalato tuvo un efecto inhibitorio mayor en mitocondrias que respiran piruvato-malato que con NADH como sustrato. A su vez, la adición de cianuro a mitocondrias en estado fosforilante con piruvato-malato como sustrato (figura 6, trazo b) disminuye la respiración de 267 a 81 ng at O /mg proteína /minuto. En comparación, en las mitocondrias con NADH como sustrato respiratorio (trazo d), el cianuro disminuye la respiración de 488 a 3.6 ng at O/mg proteína/minuto. Es decir, el cianuro inhibe completamente la respiración mediada por NADH externo. En esa misma condición, después de la adición de cianuro, se añadió piruvato-malato y se restableció el consumo de oxígeno, el cual fue sensible a propilgalato. Al parecer, el ubiquinol producido por la oxidación del NADH externo no puede ser oxidado por la vía alterna. Esto implicaría la existencia de pozas de ubiquinona con diferente accesibilidad, lo cual nos llevó a proponer que hay una canalización de electrones probablemente por medio de una asociación entre la NDH2e y los complejos de la vía citocrómica.



**Figura 6. Respuesta diferencial del estado fosforilante a inhibidores y su dependencia del sustrato.** La inhibición por cianuro (CN<sup>-</sup>) o n-propilgalato (nPG) se determinó en estado III. Mezcla de reacción: se utilizaron las mismas condiciones que en la figura 1. En donde se indica, se adicionó ADP 1 mM y se realizaron las mismas adiciones que en la figura 1, excepto CCCP. En el trazo d se añadió piruvato-malato 10 mM en donde se indica. Los números indican el consumo de oxígeno en ng at O/mg de proteína/minuto. Se muestran trazos representativos, n = 5.

Con el fin de ilustrar de otro modo las diferencias en la inhibición mediada por cianuro dependiendo del sustrato respiratorio, se realizó un gráfico de Dixon, en el que está representado el inverso de la velocidad de respiración en función de la concentración del inhibidor (figura 7). En presencia de NADH como sustrato, el cianuro presentó una correlación lineal en la que se indica un sistema de inhibición simple con una constante de inhibición aparente ( $K_i$ ) de 8  $\mu$ M. En cambio, con piruvato-malato como sustrato no fue posible calcular la  $K_i$ , debido al comportamiento no lineal que corresponde a un sistema de inhibición parcial. Dado que al utilizar NADH, el cianuro se comportó como un inhibidor no competitivo simple, no fue necesario variar la concentración de sustrato para calcular la  $K_i$  (Wedding y cols. 1973).

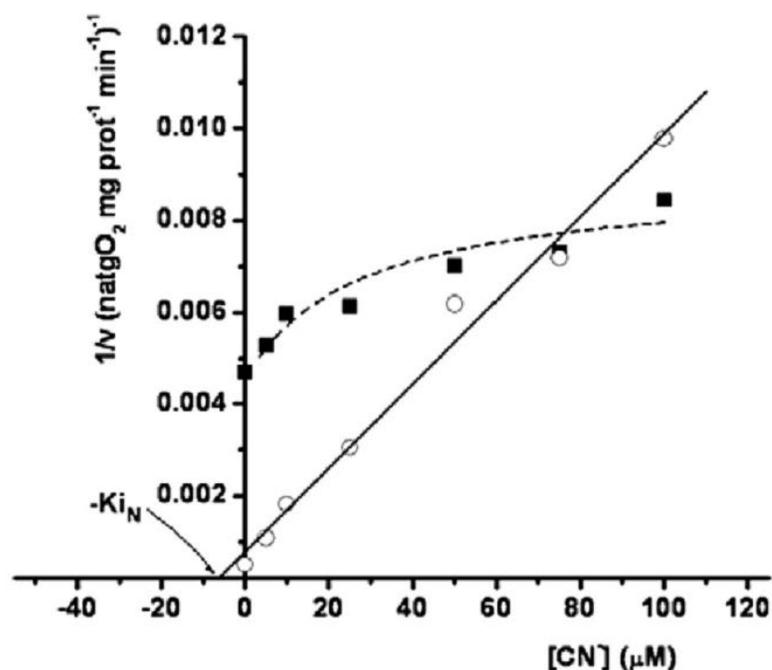


Figura 7. Gráfico de Dixon de la velocidad de consumo de oxígeno en función de diferentes concentraciones de cianuro en estado desacoplado. La mezcla de reacción fue la misma que en la figura 1. NADH 1 mM (○), piruvato-malato 10 mM (■),  $K_{iN}$  = constante de inhibición aparente para el cianuro en presencia de NADH.

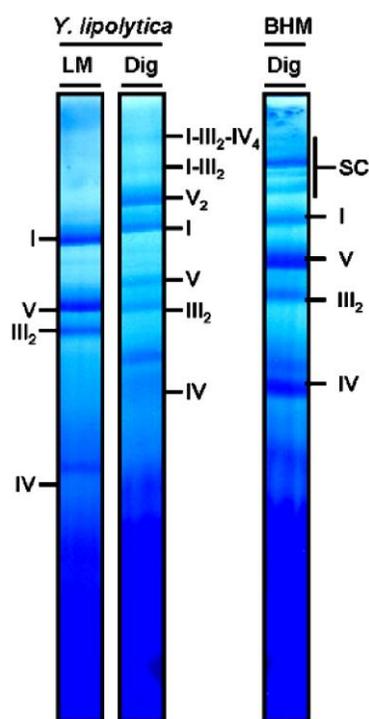
### 7.1.2 Supercomplejos en *Yarrowia lipolytica*

Las asociaciones entre complejos respiratorios que llevan a la formación de supercomplejos han sido ampliamente estudiadas en diferentes especies de mamíferos, plantas, bacterias y algunos hongos (Schägger y Pfeiffer 2000; Dudkina y cols. 2006; Marques y cols. 2007). Debido a que los resultados de la oximetría sugerían una interacción entre la NDH2e y los complejos de la vía citocrómica, se decidió buscar interacciones entre complejos mediante electroforesis en geles azules nativos. Dado que no se habían detectado ni caracterizado previamente los supercomplejos de *Y. lipolytica*, fue necesario hacer un análisis detallado de los supercomplejos presentes en este organismo. Para ello, se probaron diferentes detergentes neutros para solubilizar las proteínas de membrana: n-β-D-dodecilmaltósido (o laurilmaltósido, LM), digitonina y Tritón X-100.

El dodecilmaltósido en una relación de 0.25-0.5 mg/mg de proteína preserva las interacciones entre complejos. Sin embargo, únicamente se observó un supercomplejo formado por los complejos I y III<sub>2</sub> y también el complejo V dimérico (figura 8). Al aumentar la relación detergente:proteína a 2 mg/mg se rompen las interacciones entre complejos pero se preservan las interacciones entre las subunidades de un mismo complejo. Por esta razón se decidió utilizar el dodecilmaltósido a 2 mg/mg proteína, pues de este modo cada complejo migra, en los geles, separado de los otros complejos.

Cuando se solubilizaron las mitocondrias con Tritón X-100 las bandas se observaron generalmente más barridas. A una relación de 2 mg de Tritón X-100/mg de proteína, los complejos migran independientemente unos de otros. En cambio, al aumentar la relación a 4 mg/mg de proteína se observó la presencia de supercomplejos. Esto se debe a que en la membrana los supercomplejos que contienen a los complejos III y IV se asocian en partículas grandes que no pueden ser solubilizadas por Tritón X-100 en baja concentración o que son estructuras demasiado grandes para entrar en el gel (Schägger 2001b). Sin embargo, el barrido de las bandas no permitió la identificación y caracterización de los supercomplejos.

La digitonina es el detergente utilizado por excelencia para el estudio de los supercomplejos. Por lo tanto, se probaron diferentes relaciones detergente:proteína con el fin de obtener la mejor resolución de las bandas. La relación óptima fue de 4 mg de digitonina/mg de proteína. Los mejores resultados se obtuvieron utilizando mitocondrias frescas, aisladas el mismo día de la solubilización y de la electroforesis nativa. A continuación se muestra un gel azul nativo de mitocondrias solubilizadas con dodecilmaltósido o con digitonina (figura 8). Las bandas se asignaron conforme a la identificación de los complejos mediante pruebas posteriores (ver a continuación).



**Figura 8. Gel azul nativo de mitocondrias de *Y. lipolytica*.** Las mitocondrias aisladas en fase logarítmica se solubilizaron con dodecilmaltósido (LM) o con digitonina (Dig) y se corrió la muestra en un gel de poliacrilamida con un gradiente de concentración de 4 a 12 %. Como control y marcador de peso molecular se corrieron mitocondrias de corazón de bovino (BHM) solubilizadas con 4 mg de digitonina/mg de proteína. I, complejo I; III<sub>2</sub>, complejo III dimérico; IV, complejo IV; V, complejo V; V<sub>2</sub>, complejo V dimérico; I-III<sub>2</sub>, supercomplejo formado por el complejo I y el complejo III dimérico; I-III<sub>2</sub>-IV<sub>4</sub>, supercomplejo formado por los complejos I, III dimérico y 4 complejos IV; SC, supercomplejos de bovino [previamente caracterizados (Schägger y Pfeiffer 2001)].

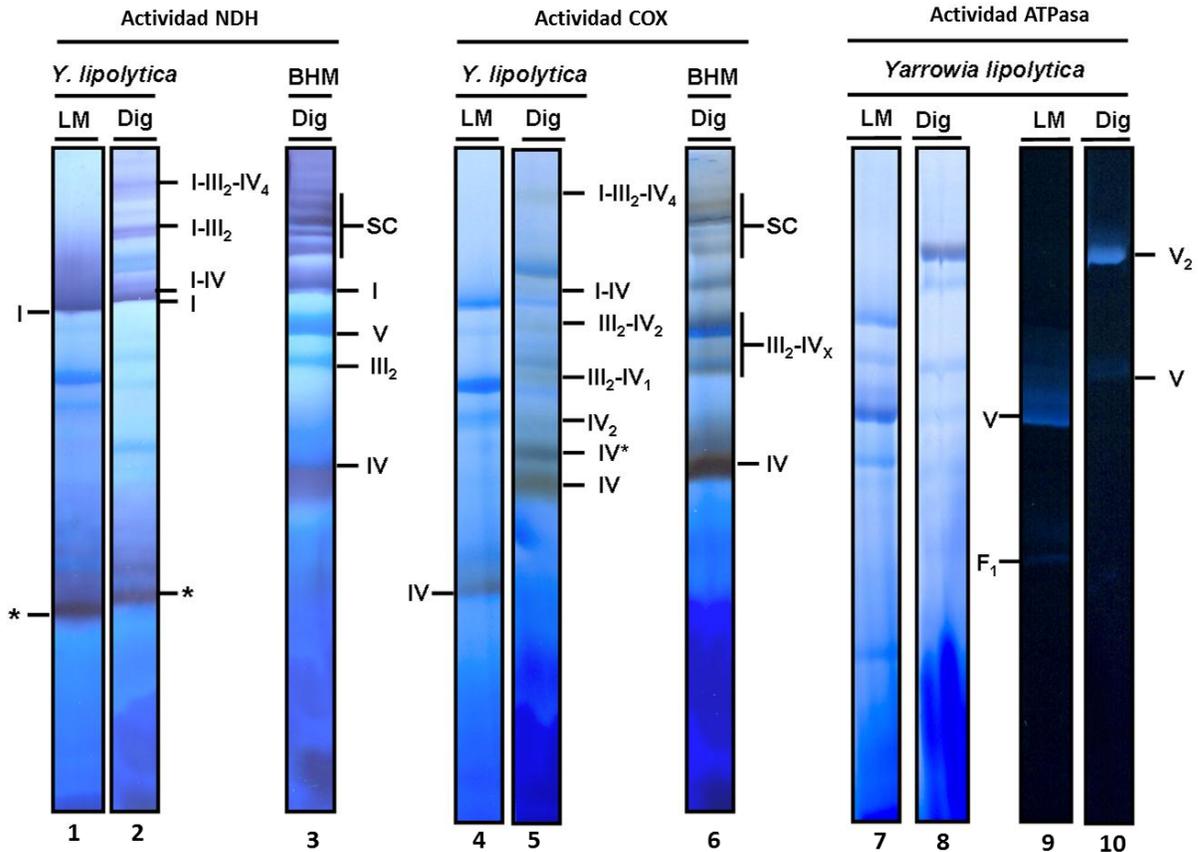
En este tipo de geles, los complejos respiratorios migran únicamente conforme a su masa molecular. En el carril LM, que corresponde a las mitocondrias solubilizadas con dodecilmaltósido, los complejos migraron independientemente unos de otros; de arriba hacia abajo se observaron los complejos I, V, III<sub>2</sub> y IV. El complejo II no se alcanzó a distinguir debido al exceso de colorante en la parte inferior del gel. Las diferencias más importantes entre los dos carriles son que en el de mitocondrias solubilizadas con digitonina, además de los complejos individuales, se observaron tres supercomplejos que migran por arriba del complejo I, y que corresponden a un supercomplejo formado por los complejos I y III dimérico, al complejo V dimérico y a un supercomplejo formado por los complejos I, III y IV; el complejo IV monomérico migró una distancia menor en comparación con el carril LM; y se observó una banda extra entre los complejos I y V.

La identidad de cada complejo no puede ser revelada únicamente con el gel azul nativo. Para saber cuál banda corresponde a cada complejo fue necesario hacer ensayos de actividad en gel, geles desnaturalizantes de segunda dimensión, y posteriormente, se graficaron las masas moleculares de cada complejo en función de las distancias de migración en el gel azul nativo. Con todos estos datos fue posible asignar la identidad a cada banda, tanto de complejos individuales como de los supercomplejos. Asimismo, con base en su masa molecular estimada y conociendo los complejos que forman cada supercomplejo fue posible proponer una estequiometría tentativa para los supercomplejos observados.

En la figura 9 se pueden observar las tinciones de actividad en gel para NADH deshidrogenasa, citocromo *c* oxidasa y ATPasa. En los primeros tres carriles, las bandas de color morado corresponden a todas las enzimas que tienen actividad de NADH deshidrogenasa. En el carril LM se observan únicamente dos bandas definidas que corresponden al complejo I y a la NADPH deshidrogenasa. Por arriba de la banda marcada con el asterisco se observan algunas bandas menos definidas que probablemente corresponden a la NADH deshidrogenasa alterna. En el segundo carril (Dig), además de las bandas ya detectadas en el carril LM, de arriba hacia abajo, se observaron tres supercomplejos, I-III<sub>2</sub>-IV<sub>4</sub>, I-III<sub>2</sub> y I-IV. La estequiometría se propuso con base en el peso molecular estimado (ver figura 13). En las mitocondrias de bovino se identificó el complejo I y los supercomplejos S<sub>0</sub>-S<sub>4</sub>. Estos supercomplejos están formados por el complejo I monomérico, el complejo III dimérico y de cero a cuatro copias del complejo IV, respectivamente.

En los carriles 4 a 6 de la figura 9 se detectaron bandas de color café debido a la actividad de la citocromo *c* oxidasa. En el carril LM se observó sólo una banda correspondiente al complejo IV monomérico. En cambio en el carril Dig, se caracterizaron siete bandas que corresponden al complejo IV monomérico en dos isoformas, al dímero del complejo IV y a diferentes asociaciones del complejo IV con otros complejos. En particular, resalta el supercomplejo I-IV debido a que esta

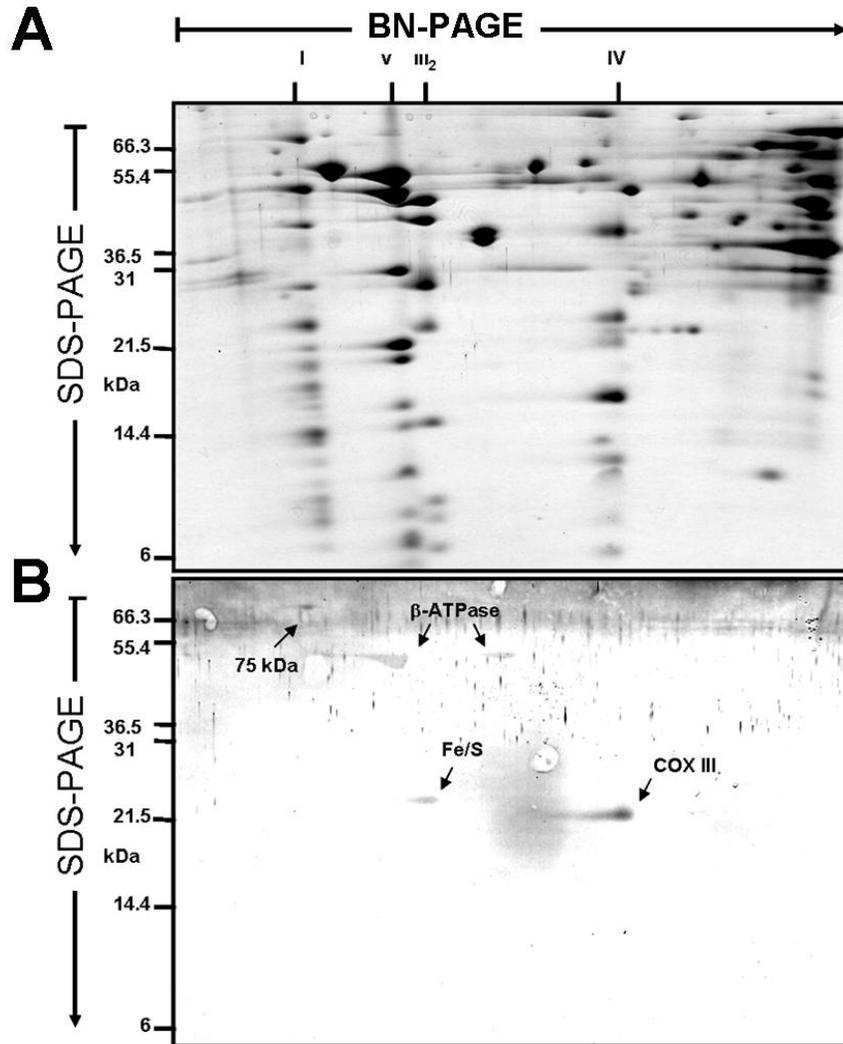
asociación no es funcional en cuanto al transporte de electrones. Sin embargo, la función de tal interacción tiene que ver, al parecer, con la estabilidad de la estructura de alguno de los dos complejos involucrados. En las mitocondrias de bovino se observaron bandas parecidas a lo reportado anteriormente (Schägger y Pfeiffer 2000).



**Figura 9. Tinciones de actividad en gel.** El gel azul nativo de la figura 8 se tiñó con actividad de NADH deshidrogenasa (tinción morada, carriles 1-3), citocromo *c* oxidasa (tinción café, carriles 4-6), ATPasa (tinción blanca, carriles 7-10). I, complejo I; III<sub>2</sub>, complejo III dimérico; IV, complejo IV; IV\*, complejo IV de mayor peso molecular, probablemente formado como un artefacto de la técnica (Schägger 2002), o al que no le falta ninguna subunidad; V, complejo V. Los supercomplejos identificados fueron I-III<sub>2</sub>, I-III<sub>2</sub>-IV<sub>4</sub>, I-IV, III<sub>2</sub>-IV<sub>1</sub>, III<sub>2</sub>-IV<sub>2</sub>, IV<sub>2</sub> y V<sub>2</sub> con las estequiometrías denotadas por los subíndices. En las mitocondrias de bovino: SC, supercomplejos; III<sub>2</sub>-IV<sub>x</sub>, supercomplejo formado por el complejo III dimérico y 1 o 2 copias del complejo IV. \* NADH deshidrogenasa alterna o NADPH deshidrogenasa; F<sub>1</sub>, el segmento soluble de la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP sintasa.

En los carriles 7 y 8, y 9 y 10 de la figura 9 se muestra el gel teñido con la actividad de ATPasa fotografiado con fondo blanco y fondo negro, respectivamente. En el carril LM se observó el complejo V monomérico y una banda menos definida que corresponde al segmento F<sub>1</sub> de la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP sintasa. En el carril Dig, se observaron dos bandas identificadas como el monómero y el dímero del complejo V.

Para identificar las bandas en los geles azules, además de las actividades en gel se resolvieron las subunidades de cada complejo en geles desnaturalizantes de segunda dimensión. Se utilizó LM para que los complejos migraran independientemente unos de otros y poder identificarlos mediante los anticuerpos. En estos geles, cada complejo tiene un patrón único de bandas que lo caracterizan (figura 10-A). De este modo, del complejo I se alcanzan a observar aproximadamente 23 bandas. De las 42 subunidades que contiene, algunas tienen pesos moleculares parecidos y no se alcanzan a separar, como las subunidades de 51 y 49 kDa, 40 y 39 kDa, que se ven como una sola mancha.



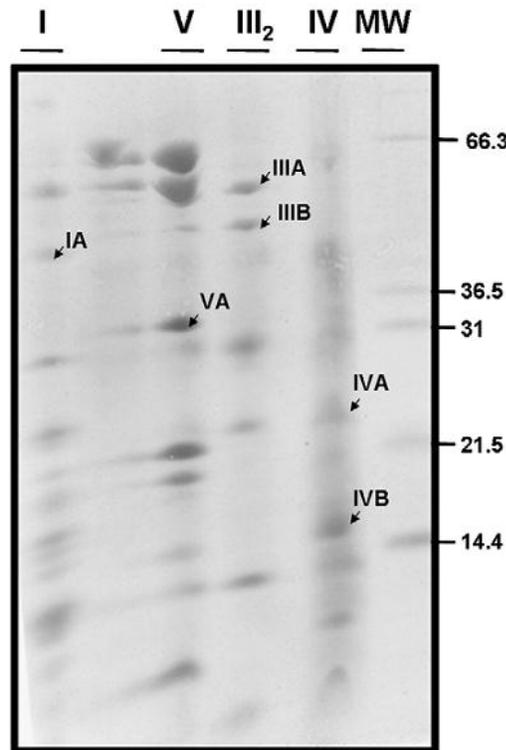
**Figura 10. Gel desnaturalizante de segunda dimensión e inmunoréplica para la identificación de complejos respiratorios.** A) Gel de tricina-SDS teñido con azul de Coomassie. De la primera dimensión, el carril de las mitocondrias solubilizadas con dodecilmaltósido (LM) se recortó y se colocó horizontalmente en la parte superior del gel desnaturalizante. El patrón vertical de las bandas de cada complejo separado en sus respectivas subunidades está indicado en la parte superior del gel. B) membrana de nitrocelulosa inmunoteñida con anticuerpos contra la subunidad V del complejo III de bovino (Fe/S), la subunidad β de la ATP sintasa de *Polytomella* sp. y la subunidad III del complejo IV de *Saccharomyces cerevisiae*. El anticuerpo contra la proteína de Rieske (subunidad V del complejo III) reconoció además a la subunidad de 75 kDa del complejo I de *Y. lipolytica*.

En la misma figura se observa que el complejo V se resuelve en 13 bandas, las cuales son las más intensas y siempre las primeras en teñirse, independientemente de la técnica de tinción. Del mismo modo que en el complejo I, no todas las subunidades se alcanzan a observar debido a que algunas migran como una misma mancha. Del complejo III se observaron ocho de las 11 subunidades que lo componen. El complejo IV se disgregó en nueve subunidades y, como en casi todos los geles de segunda dimensión, se observó un doblete horizontal de bandas, que corresponden al complejo IV completo y probablemente al complejo IV que carece de la subunidad VIa (Nijtmans y cols. 1998).

De cada complejo, excepto del complejo I, se identificó alguna de sus subunidades mediante Western blot con anticuerpos generados contra subunidades de complejos de otras especies (figura 10-B). El anticuerpo que reconoció a la proteína hierro-azufre del complejo III también reconoció a la subunidad de 75 kDa del complejo I. Ambas subunidades cuentan con centros hierro-azufre; la proteína de Rieske tiene un centro binuclear 2Fe/2S, mientras que la subunidad de 75 kDa del complejo I cuenta con tres centros: dos tetranucleares 4Fe/4S y uno binuclear (Ohnishi y cols. 1998), y probablemente tengan algún motivo conservado que reconoció el anticuerpo. El anticuerpo contra la subunidad  $\beta$  del ATP sintasa generó dos manchas, una en el monómero del complejo V y la otra que corresponde a una pequeña fracción del segmento  $F_1$  que se alcanza a liberar cuando las mitocondrias se solubilizan con dodecilmaltósido. El anticuerpo contra la subunidad COXIII del complejo IV reconoció una banda de aproximadamente 21 kDa.

Algunas otras subunidades se identificaron por secuenciación del extremo amino. Para ello se cortaron las bandas del gel nativo, se colocaron en diferentes carriles en un gel de segunda dimensión (figura 11) y este gel se transfirió a una membrana de ProBlot, de la cual se cortaron las bandas señaladas en el gel y se mandaron a secuenciar por degradación de Edman (Tabla 4).

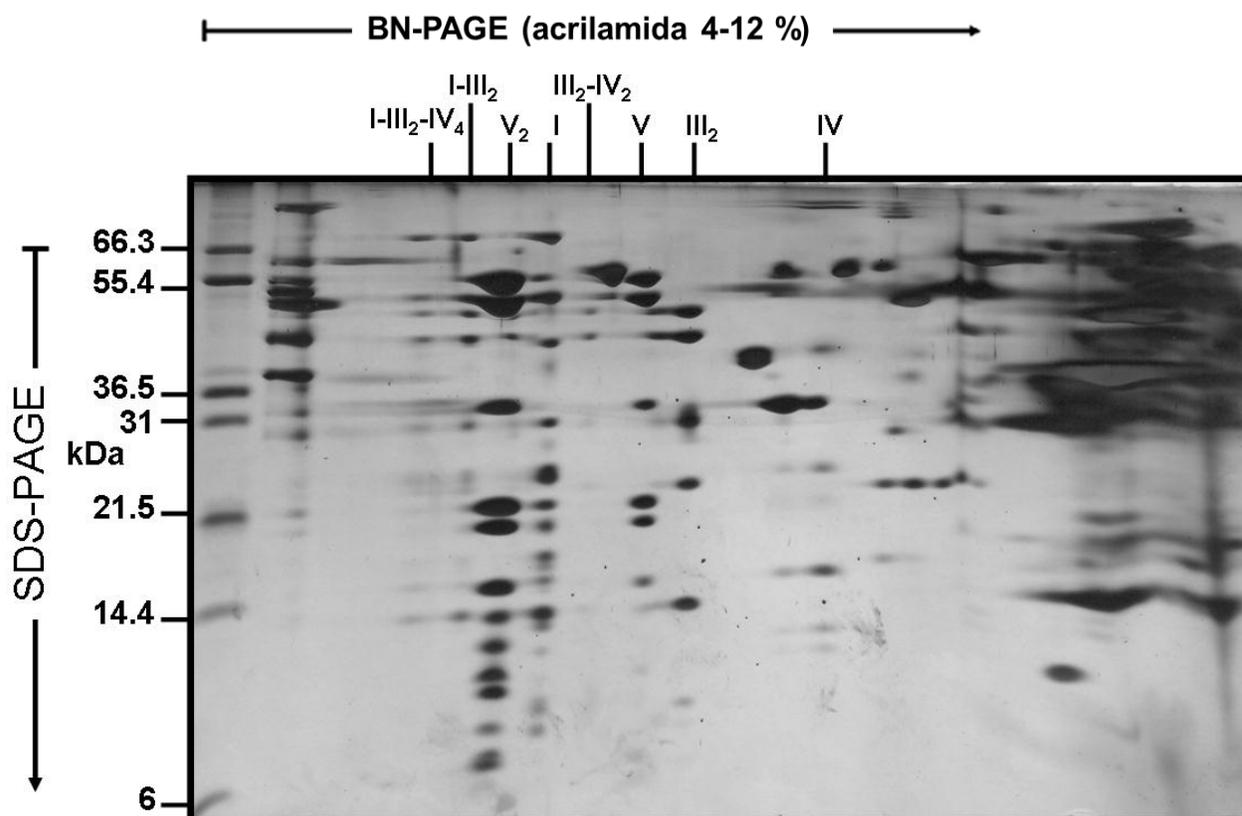
Una vez caracterizado el patrón de cada complejo en la segunda dimensión desnaturizante, se resolvió en segunda dimensión el carril del gel nativo de las mitocondrias solubilizadas con digitonina (figura 12). Este gel sirvió para afirmar la presencia de supercomplejos y saber de cuáles complejos está formado cada supercomplejo. Sobre todo debido a que no existía una técnica con buena resolución para la tinción de actividad del complejo III. Entonces, la presencia de los complejos I y IV en los supercomplejos era suficientemente clara por las actividades en gel, pero si el complejo III formaba parte o no de los supercomplejos detectados se confirmó por el gel desnaturizante de segunda dimensión.



**Figura 11.** Gel desnaturalizante de segunda dimensión de las bandas cortadas correspondientes a cada complejo. Gel de tricina-SDS teñido con azul de Coomassie antes de transferir a la membrana de ProBlot. De la primera dimensión, del carril de las mitocondrias solubilizadas con dodecilmaltósido se cortaron las bandas de cada complejo y se cargaron en los pozos del gel. Las bandas señaladas se cortaron de la membrana y se identificaron por secuenciación del extremo amino. Las etiquetas no corresponden a los nombres de las subunidades. Los nombres completos de cada subunidad están reportados en la tabla 4.

**Tabla 4.** Proteínas analizadas por secuenciación del extremo amino-terminal cortadas de la figura 11.

Banda	Nombre de la proteína u homología en el BLAST	Secuencia del amino terminal	GI
IA	NADH-ubiquinona oxidoreductasa subunidad de 39 kDa (NUEM)	NSVESLAQ	50551529
IIIA	Precursor del complejo ubiquinol:citocromo <i>c</i> reductasa, proteína core 1	ATTVSX	50545043
IIIB	Precursor del complejo ubiquinol:citocromo <i>c</i> reductasa, proteína core 2	FSTAEAAGVKV	50555522
IVA	Precursor de la subunidad 2 de la citocromo <i>c</i> oxidasa (polipéptido II)	VPVPY	50550873
IVB	COX5A precursor mitocondrial de la cadena VA de la citocromo <i>c</i> oxidasa	AHVISTPTL	50555089
	COX4, citocromo <i>c</i> oxidasa cadena IV	HKAVKPAE	50553496
VA	ATP3 complejo F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATPasa, subunidad gamma del segmento F <sub>1</sub>	ATLREIEMR	50555031



**Figura 12. Gel desnaturalizante de segunda dimensión de las mitocondrias aisladas en fase logarítmica solubilizadas con digitonina.** Gel de tricina-SDS teñido con plata. De la primera dimensión, el carril de las mitocondrias solubilizadas con digitonina (Dig) se recortó y se colocó horizontalmente en la parte superior del gel desnaturalizante. El patrón vertical de bandas de cada complejo separado en sus respectivas subunidades está indicado en la parte superior del gel. I, complejo I; III<sub>2</sub>, complejo III dimérico; IV, complejo IV; V, complejo V; I-III<sub>2</sub>, I-III<sub>2</sub>-IV<sub>4</sub> y III<sub>2</sub>-IV<sub>2</sub> son supercomplejos formados por los complejos indicados con la estequiometría tentativa en subíndices.

En la figura 12 es importante resaltar que en la región de masas moleculares superiores a la masa total del complejo, se observaron los patrones de bandas correspondientes a los supercomplejos. Por ejemplo, el patrón de bandas correspondientes al complejo I monomérico, se repite dos veces más en los supercomplejos asignados como I-III<sub>2</sub> y I-III<sub>2</sub>-IV<sub>4</sub> confirmando la presencia del complejo I en estas asociaciones. En estos supercomplejos también es clara la presencia del complejo III, del cual en particular es fácil detectar las proteínas core 1 y core 2, que son las subunidades más grandes de este complejo. Sin embargo, resultó difícil detectar por esta técnica las bandas que corresponden al complejo IV, probablemente por la poca cantidad de proteína. Con respecto al complejo V, no se observó una separación en los segmentos F<sub>1</sub> y F<sub>0</sub> como cuando se solubilizó con dodecilmaltósido y la población más abundante fue la forma dimérica, en donde se alcanzaron a observar 14 subunidades del complejo.

Ya conocida la composición de cada supercomplejo, era necesario asignar la estequiometría de los complejos en cada supercomplejo. Las mitocondrias de bovino, además de que permitieron la

comparación en la formación de los supercomplejos, sirvieron como marcador de pesos moleculares, ya que se conocen los pesos de los complejos respiratorios. Después de graficar el logaritmo de base 10 de las masas moleculares de los complejos respiratorios de bovino en función de su distancia de migración en el gel azul nativo, se trazó una recta que sirvió para interpolar los complejos y supercomplejos de *Y. lipolytica* (figura 13). De esta forma, fue posible calcular las masas moleculares tanto de los complejos individuales como de los supercomplejos, y asignar la estequiometría de cada supercomplejo.

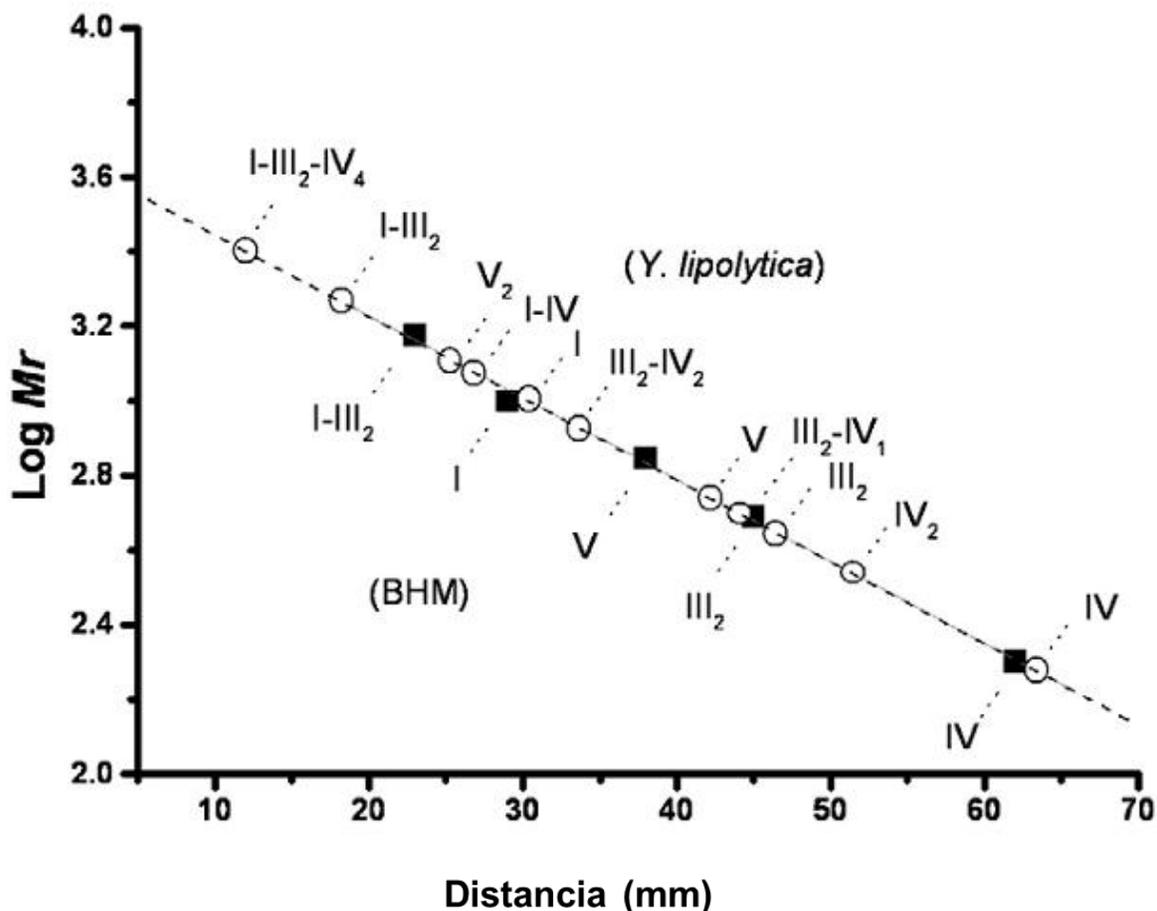


Figura 13. Estimación de las masas moleculares relativas de los complejos y supercomplejos de *Y. lipolytica*. Para conocer la masa estimada de los complejos y supercomplejos de *Y. lipolytica* (○) se midió la distancia de migración en el gel azul nativo de cada uno de ellos y se interpolaron los puntos en la curva. La curva estándar se generó a partir de las masas moleculares de los complejos de mitocondrias de bovino (BHM, ■).

En la tabla 5 se muestran las masas moleculares estimadas de los complejos respiratorios, así como una comparación entre las masas estimadas y las masas esperadas de los supercomplejos. Las masas estimadas se obtuvieron por inter o extrapolación a partir de la curva de la figura 13. Las masas esperadas de los supercomplejos se calcularon a partir de la suma de las masas moleculares de los complejos individuales. Por ejemplo, la masa molecular estimada del supercomplejo I-III<sub>2</sub>

por extrapolación en la curva fue de  $1750 \pm 124$  kDa, mientras que la masa molecular esperada fue de 1418 kDa, que corresponde a la suma de la masa del complejo I (960 kDa) más la masa del complejo III<sub>2</sub> (458 kDa). Todas las masas estimadas a partir de la curva se encontraron por arriba de las masas esperadas (teóricas). Esto se puede deber a que existan proteínas que se pierdan cuando los supercomplejos se disocian. Por ejemplo, las subunidades e, g y k del complejo V de levaduras se encuentran en la forma dimérica de la enzima pero no en la monomérica (Arnold y cols. 1998).

**Tabla 5.** Las masas estimadas de los complejos y supercomplejos de *Y. lipolytica* mediante BN-PAGE.

Complejos	Masa molecular estimada (kDa)	Supercomplejos <sup>a</sup>	Masa molecular estimada (kDa)	Masa molecular esperada (kDa)
<b>I</b>	960 ± 50	I-III <sub>2</sub>	1750 ± 124	1418
<b>II</b>	ND	I-III <sub>2</sub> -IV <sub>4</sub>	2339 ± 69	2174
<b>III<sub>2</sub></b>	458 ± 16	I-IV	1217 ± 46	1149
<b>IV</b>	189 ± 9.9	III <sub>2</sub> -IV <sub>2</sub>	858 ± 30	826
<b>V</b>	543 ± 10	V <sub>2</sub>	1231 ± 70	1086

ND, no determinado

Los pesos esperados para cada supercomplejo corresponden a la suma de los pesos individuales de cada complejo

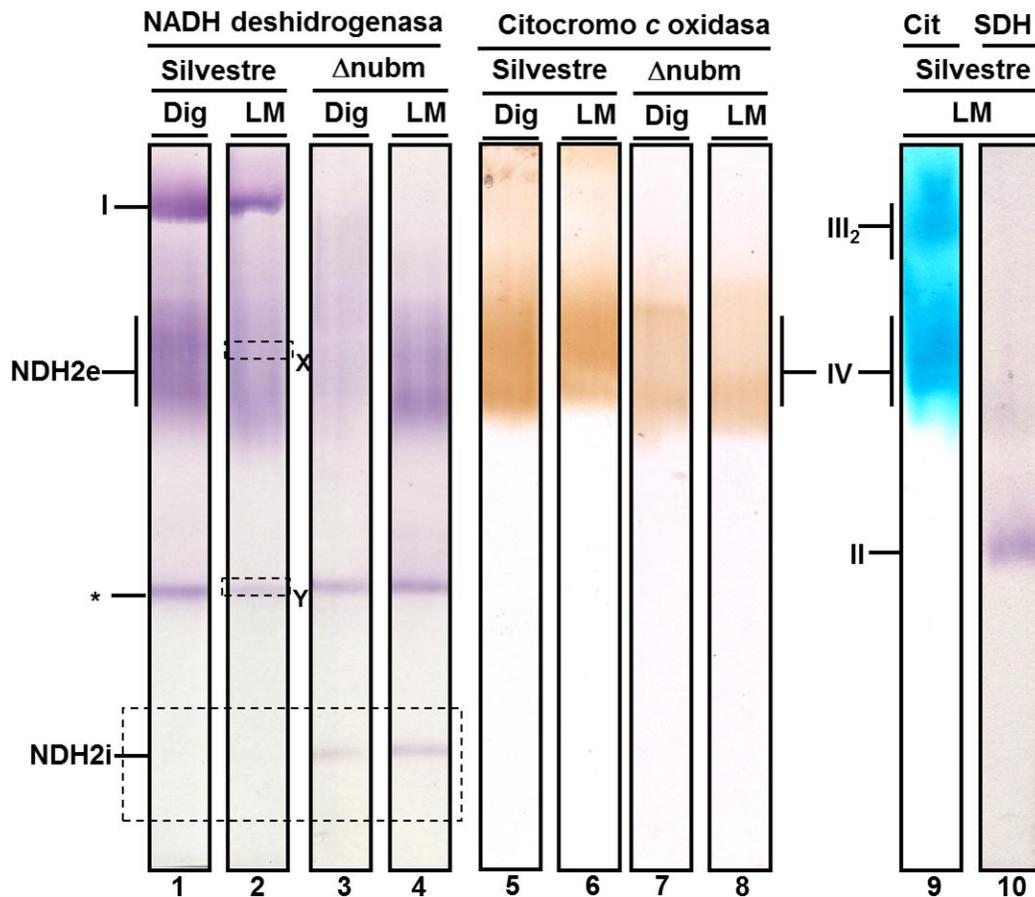
<sup>a</sup> Los subíndices indican el número de copias de cada complejo que forman parte de los supercomplejos

Con base en los resultados obtenidos, en *Y. lipolytica* se observaron asociaciones entre los complejos respiratorios que forman supercomplejos con las siguientes estequiometrías propuestas: I<sub>1</sub>-III<sub>2</sub>, I<sub>1</sub>-III<sub>2</sub>-IV<sub>4</sub>, I<sub>1</sub>-IV<sub>1</sub>, III<sub>2</sub>-IV<sub>1</sub>, III<sub>2</sub>-IV<sub>2</sub>, IV<sub>2</sub> y V<sub>2</sub>. De estos supercomplejos, el supercomplejo III<sub>2</sub>-IV<sub>2</sub> es común en todas las especies en las que se han caracterizado los supercomplejos. En la teoría de las cuerdas respiratorias se ha propuesto que oligómeros de este supercomplejo forman la estructura central o “alma” de la cuerda (Nubel y cols. 2009; Dudkina y cols. 2010).

### 7.1.3 Interacción de NDH2e con la vía citocrómica

Los resultados del consumo de oxígeno sugirieron una interacción entre la NADH deshidrogenasa externa y los complejos de la vía citocrómica. Esta interacción no se observó en la electroforesis azul nativa probablemente por interferencia del colorante. Por esta razón se probaron otros tipos de electroforesis nativas que no utilizan azul de Coomassie. Después de solubilizar las mitocondrias se cargaron geles claros nativos (CN) o geles claros nativos de alta resolución (hrCN). La diferencia entre ambos radica en que en los de alta resolución, el amortiguador del cátodo contiene detergente y por lo tanto se obtienen bandas más definidas. Sin embargo, la migración de las proteínas en ambos geles también es diferente. Mientras que en la electroforesis nativa clara las proteínas migran de acuerdo a su peso molecular y a su carga intrínseca, en la de alta resolución

únicamente migran con base en su peso molecular. Esto se debe a que el detergente presente en el amortiguador del cátodo al unirse a las proteínas les transfiere carga negativa. Entonces, en un gel claro de alta resolución, las proteínas migran prácticamente igual que en un gel azul nativo con menor resolución, pero con la ventaja de que no intervienen colorantes. Este tipo de geles resultan prácticos para los ensayos de actividad en gel, debido a que no es necesario desteñir el Coomassie después de la tinción por actividad enzimática. Dado que los geles claros nativos no involucran detergentes en el amortiguador del cátodo, para buscar la interacción entre la NDH2e y los complejos III y IV, se decidió utilizar geles CN.

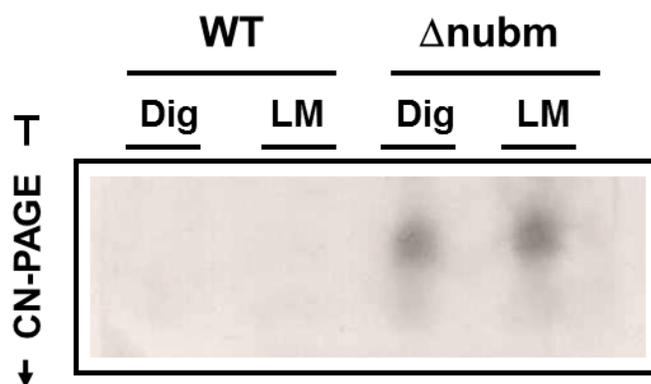


**Figura 14. Tinciones de actividad en gel después de electroforesis clara nativa.** El gel claro nativo se tiñó con actividad de NADH deshidrogenasa (tinción morada, carriles 1-4), citocromo *c* oxidasa (tinción café, carriles 5-8), citocromo peroxidasa (tinción azul, carril 9) y succinato deshidrogenasa (SDH) (tinción morada, carril 10). \*, NADPH deshidrogenasa; NDH2e, NADH deshidrogenasa externa; NDH2i, NADH deshidrogenasa interna; I, complejo I; II, complejo II; III<sub>2</sub>, complejo III dimérico; IV, complejo IV. El área marcada dentro de la línea punteada a la altura de NDH2i se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para posterior inmunodetección. El área marcada dentro de las líneas punteadas marcadas como “X” y “Y” se cortaron del gel y se sometieron a secuenciación de péptidos por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). La cepa silvestre corresponde a la cepa E150; la mutante Δubm, carece de actividad en el complejo I, pero presenta una deshidrogenasa alterna interna (NDH2i). Dig, digitonina; LM, dodecilmaltósido.

El gel claro, después de la electroforesis, se incubó con diferentes sustratos y colorantes para realizar tinciones de actividad para NADH deshidrogenasa, citocromo *c* oxidasa, citocromo peroxidasa y succinato deshidrogenasa (figura 14). A diferencia de los geles azules y claros de alta resolución, en los geles claros, al solubilizar con digitonina, no se observaron supercomplejos. Dado que las condiciones de los geles CN son menos agresivas que los geles BN o hrCN, es posible que se hayan preservado estructuras más grandes y que no hayan entrado en el gel. En los primeros dos carriles de izquierda a derecha (carriles LM y Dig de la tinción NDH) se observó el mismo número de bandas. De arriba hacia abajo se identificaron el complejo I, la NDH2e y una NADPH deshidrogenasa. Con respecto a la citocromo *c* oxidasa, no se observó una banda definida, pero a la misma altura de la NDH2e se observa una mancha barrida que podría corresponder a diferentes poblaciones del complejo IV. El complejo III, revelado por la actividad de citocromo peroxidasa (mancha superior azul) migró en el gel más cercano al complejo I. Por último, el complejo II se observó por debajo del complejo IV, pero ligeramente arriba de la NADPH deshidrogenasa. La localización de las actividades de la NDH2e y del complejo IV sugirió que estas enzimas podrían estar interaccionando. Es importante resaltar que la NDH2e es una proteína con un punto isoeléctrico (teórico) de 8.45. En un gel claro las proteínas son resueltas también por su carga intrínseca y tanto el amortiguador de muestra como el amortiguador del cátodo están en un pH cercano a 7.0. Entonces, la deshidrogenasa externa no debería poder ser observada en el gel, a menos que interaccione con una proteína que tenga carga intrínseca negativa, como el complejo IV, que la acarree durante la electroforesis. El punto isoeléctrico teórico de la proteína completa, es decir, con la presecuencia mitocondrial se calculó de 9.01 usando el programa Compute pI/MW (Bjellqvist y cols. 1993). En cambio, la proteína madura, sin los primeros 30 aminoácidos (Garofano y cols. 2006), fue de 8.45.

Utilizamos una cepa mutante como control negativo de la interacción. La cepa mutante  $\Delta$ numH1 ( $\Delta$ numb) es una cepa carente de la subunidad de 51 kDa del complejo I. Esta subunidad contiene el nucleótido de flavina, indispensable para la oxidación del NADH por el complejo I. Por lo tanto, en la mutante  $\Delta$ numb el complejo I no es activo. Normalmente, en *Y. lipolytica*, una mutación que comprometa al complejo I funcionalmente no es viable porque es un organismo aerobio obligado y no contiene NADH deshidrogenasas internas como otros hongos. Sin embargo, para poder realizar mutaciones puntuales en genes del complejo I o eliminaciones completas de genes, la NDH2e se redirigió hacia la matriz mitocondrial (Kerscher y cols. 2001b). Para ello, se eliminaron alrededor de 100 aminoácidos del extremo amino y se reemplazó por la presecuencia de localización mitocondrial de la subunidad de 75 kDa del complejo I (que es una subunidad que tiene localización matricial). De este modo, se rescató la función del complejo I y la viabilidad de esta

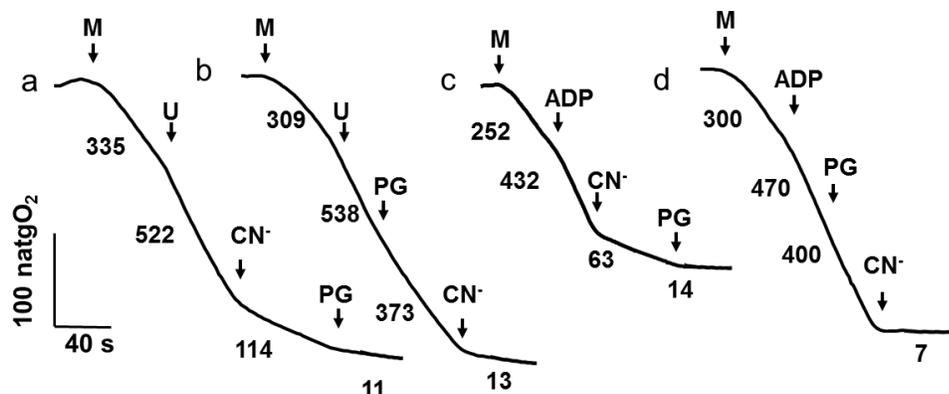
mutante (Kerscher y cols. 2001b). Entonces la mutante  $\Delta$ ubm no presenta actividad del complejo I, pero contiene las dos versiones de la NADH deshidrogenasa alterna: la externa (NDH2e) con un pI teórico de 8.45 y que pesa 60 kDa y una versión interna (NDH2i) con un pI teórico de 6.0 que pesa 55 kDa aproximadamente. Cuando se analizaron los carriles correspondientes a la mutante  $\Delta$ ubm del gel claro de la figura 14, se observaron tres bandas de actividad de NADH deshidrogenasa: la banda barrida de la NDH2e, la NADPH deshidrogenasa y una banda en la parte inferior del gel, que no se encontró en la cepa silvestre, que debe corresponder a la versión interna de la NDH2 (NDH2i). De hecho, esta parte del gel (marcada dentro de un recuadro punteado) se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se identificó con el anticuerpo contra la NDH2e de *Y. lipolytica* (figura 15). Dado que aparece únicamente en la mutante, pero no en la silvestre, se etiquetó como NDH2i. Es importante resaltar que la NDH2i migra hasta la parte inferior del gel de forma libre, mientras que la externa no se encontró en esta parte del gel. Es decir, la forma externa sólo se detectó en la parte superior asociada al complejo IV.



**Figura 15. Inmunodetección de la versión interna de la NDH2 mediante Western blot.** El área dentro de la línea punteada a la altura de NDH2i de la figura 14 se transfirió a nitrocelulosa y se incubó con el anticuerpo anti NDH2e de *Y. lipolytica*.

La interacción entre la NDH2 y el complejo IV debe ocurrir únicamente en la cara externa de la membrana interna mitocondrial. Entonces en la mutante  $\Delta$ ubm, en la que existe una versión interna, ésta no debe asociarse a la vía citocrómica pues se perdería la sensibilidad completa al cianuro. Es decir, cuando la NADH deshidrogenasa interna oxide NADH matricial, el ubiquinol generado podrá ser oxidado por ambas vías respiratorias. Para comprobar esto se determinó el consumo de oxígeno de la mutante  $\Delta$ ubm, inhibiéndolo con cianuro o con propilgalato en estado desacoplado (U) y en estado fosforilante (figura 16). Al contrario de lo que ocurre con el NADH externo en la cepa silvestre, en la mutante  $\Delta$ ubm al alimentar la cadena respiratoria con piruvato-

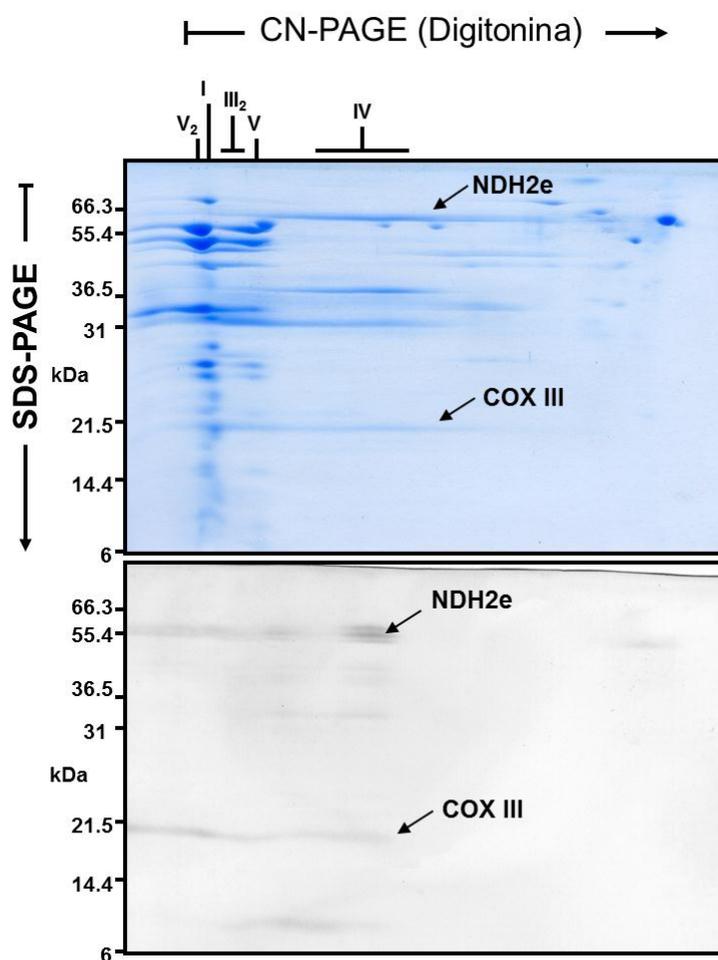
malato (generando NADH interno), el consumo de oxígeno no se inhibe completamente al adicionar únicamente cianuro (figura 16, trazos a y c) y la inhibición por propilgalato es mayor que en la silvestre (trazos b y d).



**Figura 16.** Consumo de oxígeno de la mutante  $\Delta numb$  en presencia de piruvato-malato para generar NADH matricial y alimentar la NDH2i. Se utilizaron las mismas condiciones que las utilizadas en las figuras 5 y 6 para probar la sensibilidad a inhibidores en la mutante  $\Delta numb$ . Se probó la sensibilidad a cianuro y a propilgalato en el estado desacoplado (trazos a y b, respectivamente) y en el estado fosforilante (trazos c y d, respectivamente) (n=5).

Con el fin de identificar la asociación de las bandas de la NDH2e y de las subunidades del complejo IV, los carriles del gel claro de la figura 14, correspondientes a la cepa silvestre, se sometieron a segunda dimensión desnaturalizante. Este gel se tiñó con azul de Coomassie (figura 17, panel superior), y sólo se observan manchas definidas a la altura de los complejos V<sub>2</sub>, I, III<sub>2</sub> y V. Es importante resaltar que el orden en el que migran los complejos III<sub>2</sub> y V monomérico cambió en los geles CN por las cargas intrínsecas de estas proteínas. Como era de esperarse por el barrido observado en la figura 14 a la altura tanto de la NDH2e como del complejo IV, en la segunda dimensión desnaturalizante no aparecen manchas definidas, sino barridos horizontales. Una réplica de este gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para posteriormente identificar las proteínas por Western blot. En la parte inferior de la figura 17 se identificaron dos barridos horizontales que corresponden a la NDH2e y a la subunidad 3 de la citocromo *c* oxidasa. A pesar del barrido en el gel, en esta membrana se observa una comigración de estas dos proteínas. Además del Western blot, para identificar tanto la NDH2e como las subunidades de los complejos de la vía citocrómica, se cortaron dos segmentos de diferentes bandas del gel claro nativo y se identificaron las subunidades por secuenciación de péptidos por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Los resultados de estas bandas marcadas como X y Y se muestran en la tabla 6. Únicamente en la banda X se encontraron péptidos pertenecientes a la NDH2e, en donde también se hallaron subunidades de la citocromo *c* oxidasa, algunas subunidades del complejo III y del complejo V. Esto podría deberse a que el complejo V es el más abundante de

las proteínas de la fosforilación oxidativa y que la resolución de las proteínas en los geles claros no es buena. En la banda Y se encontró una NADPH deshidrogenasa, la oxidorreductasa de la flavoproteína transferidora de electrones y la glicerolfosfato deshidrogenasa.



**Figura 17. Inmunodetección de NDH2e y la subunidad 3 de la citocromo c oxidasa en gel desnaturante de segunda dimensión.** Un carril Dig del gel CN se corrió en segunda dimensión desnaturante. En la parte superior se muestra el gel teñido con azul de Coomassie. En la parte inferior se muestran las bandas decoradas con los anticuerpos anti-*Y*NDH2e y anti COXIII de *S. cerevisiae*.

Los datos de la electroforesis clara nativa favorecen la interacción propuesta por los experimentos de oximetría entre la NDH2e y la vía citocrómica. Sin embargo, con el fin de tener más evidencias respecto a esta interacción, se utilizó otro método de separación: en este caso se realizó una cromatografía en columna de intercambio iónico. En esta columna, las proteínas que interaccionen entre sí migrarán juntas eluyendo en la misma fracción a pesar de su diferente carga intrínseca. Para la separación de los complejos respiratorios se utiliza comúnmente una matriz con carga positiva, como perlas de agarosa con un grupo dietilaminoetilo (DEAE) para retener proteínas con carga intrínseca negativa (Ljungdahl y cols. 1987). La columna de DEAE Bio-Gel A,

previamente equilibrada, se cargó con las mitocondrias solubilizadas con 2 mg de LM/mg de proteína. Después de un lavado con tres volúmenes de columna, se eluyó la muestra con un gradiente continuo de 0 a 400 mM de NaCl. Se obtuvieron 108 fracciones de 2 ml cada una. A cada fracción se le determinó la concentración de proteína por absorbancia a 280 nm y las actividades de NADH deshidrogenasa y citocromo *c* oxidasa (figura 18).

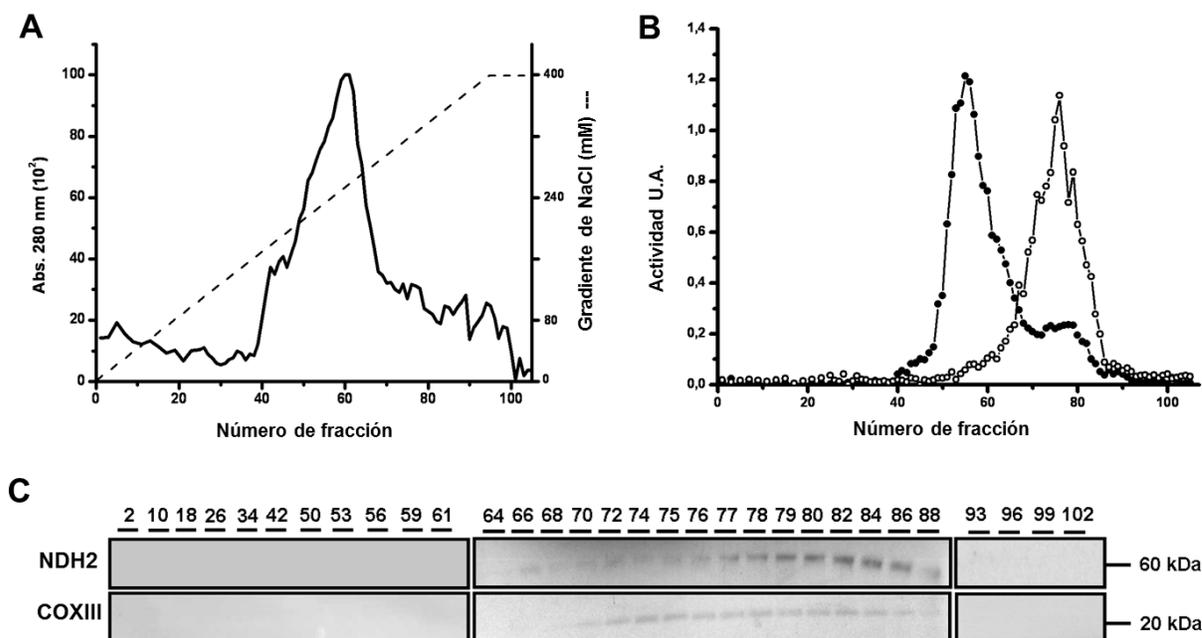
**Tabla 6.** Proteínas identificadas por análisis de LC-MS/MS en las bandas del gel CN de la figura 14.

Banda	Nombre de la proteína u homología por BLAST	GI	Peso molecular esperado (kDa)
X	IV Citocromo <i>c</i> oxidasa cadena V.A	50555089	18.9
	Citocromo <i>c</i> oxidasa cadena IV	50553496	17.4
	Citocromo <i>c</i> oxidasa cadena VI	50552712	17.1
	Citocromo <i>c</i> oxidasa subunidad II	54035892	27.6
	*** YINDH2 [ <i>Yarrowia lipolytica</i> ]	50556896	65.8
	Malato deshidrogenasa	50550873	35.9
	III Proteína citocromo <i>b</i> [ <i>Yarrowia lipolytica</i> ]	12718941	43.7
	Ubiquinol:citocromo <i>c</i> reductasa cadena II	50555522	44.2
	Ubiquinol:citocromo <i>c</i> reductasa subunidad 7	50554693	14.6
	V Complejo F1F0-ATPasa subunidad $\alpha$	50555055	58
ATP sintasa cadena $\beta$ , precursor mitocondrial	50545874	59.7	
ATP sintasa proteína conferidora de sensibilidad a oligomicina, precursor mitocondrial	50550557	17.1	
ATP3 complejo F1F0-ATPasa, F1 subunidad gamma	50555031	31	
ATP sintasa cadena $\delta$ , precursor mitocondrial	50551323	17.8	
ATP4 complejo F1F0-ATPasa F0 subunidad B	50556498	24	
Y	NADPH deshidrogenasa	50546080	46.2
	Flavoproteína transferidora de electrones: ubiquinona oxidorreductasa, precursor mitocondrial	50548749	71.7
	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa	50546785	67.5

IV, subunidades del complejo IV  
 III, subunidades del complejo III  
 V, subunidades del complejo V  
 \*\*\* NADH deshidrogenasa externa

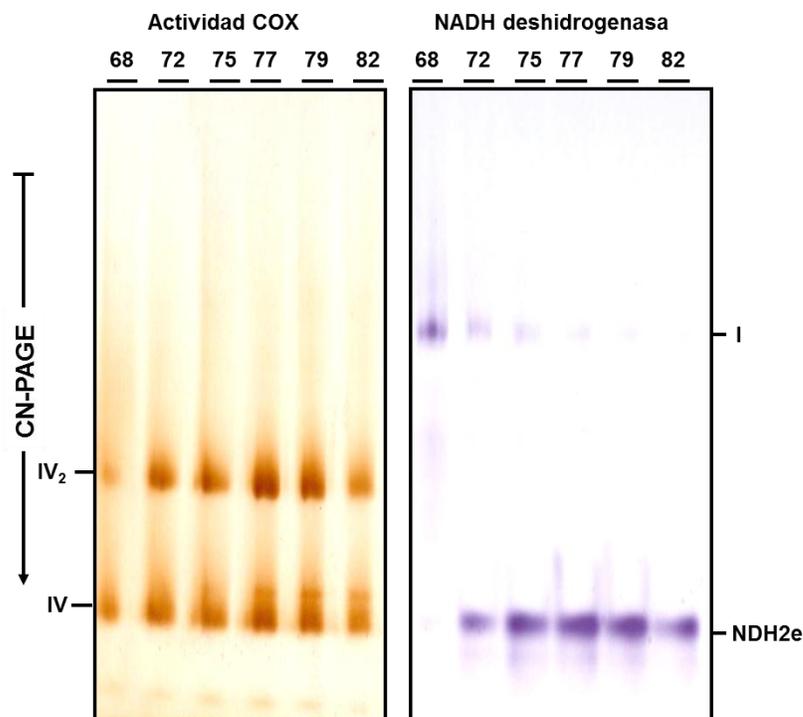
En el panel A de la figura 18 se graficó la concentración de proteína determinada como la absorbancia a 280 nm. Se observó un pico grande con un máximo en la fracción número 60, en donde migraron los complejos I y V. Al determinar la actividad de NADH deshidrogenasa (puntos negros en el panel B de la figura 18), se observaron dos poblaciones principalmente. El pico más grande corresponde al complejo I, lo cual se pudo determinar mediante electroforesis nativa de las respectivas fracciones. El pico menor que va de las fracciones 70 a 88, aproximadamente, corresponde a la NDH2e. Esto se pudo determinar por electroforesis nativa e identificando a esta proteína con ayuda de un anticuerpo específico (figura 18, panel C). La actividad de citocromo *c* oxidasa (círculos en el panel B, figura 18) reveló sólo un pico con actividad que coincide con el segundo pico de actividad de NADH deshidrogenasa. La presencia de la citocromo *c* oxidasa en estas fracciones se corroboró mediante Western blot, utilizando un anticuerpo contra la subunidad 3 de la citocromo *c* oxidasa (figura 18, panel C). Dadas las diferencias con respecto a la carga intrínseca de ambas proteínas, la comigración de la NDH2e y del complejo IV en la columna es un indicativo de la interacción entre estas proteínas. Al ser positiva la carga de la NDH2e al pH de las

soluciones de cargado de la columna, lavado y elución, era de esperarse que esta proteína no se retuviera en la columna, o eluyera en fracciones previas, a menos que se asociara con otra proteína como, en este caso, con el complejo IV.



**Figura 18. Determinación de la interacción entre la NDH2e y el complejo mediante cromatografía de intercambio iónico.** A) Perfil de la concentración de proteína de las fracciones. B) Determinación de actividades enzimáticas de cada fracción; (●) NADH deshidrogenasa; (○) citocromo *c* oxidasa. U. A. unidades arbitrarias de absorbancia, tomando como blanco el amortiguador con reactivos. C) Inmunodetección en gel desnaturalizante de NDH2e y de la subunidad 3 de la citocromo *c* oxidasa de las fracciones que se indican en la parte superior.

Además del Western blot, las fracciones se sometieron a electroforesis azul nativa (no mostrado) y clara nativa (figura 19) para asegurarnos de que la asignación de identidad de los picos de NADH deshidrogenasa haya sido la correcta. Es decir, que el primer pico corresponde al complejo I y que el segundo corresponde a la NDH2. En este gel se pueden observar dos poblaciones de citocromo *c* oxidasa, una monomérica, que comigra con la banda de actividad de la NDH2e, y otra dimérica que, al parecer, no esta interaccionando con NDH2e.



**Figura 19. Electroforesis en gel claro nativo de las fracciones de la cromatografía en columna de intercambio iónico.** Tinciones de actividad en gel para citocromo *c* oxidasa y NADH deshidrogenasa. Los números indican las fracciones de la columna de la figura 18 que se sometieron a la electroforesis clara nativa. I, complejo I; IV, complejo IV monomérico; IV<sub>2</sub>, complejo IV dimérico; NDH<sub>2e</sub>, NADH deshidrogenasa externa.

En conjunto, la inhibición completa por cianuro del consumo de oxígeno dependiente de la oxidación del NADH externo y la comigración de la NDH<sub>2e</sub> con el complejo IV, tanto en los gels claros nativos como en la columna de intercambio iónico, sugieren que la NDH<sub>2e</sub> está asociada al complejo IV, el cual a su vez se encuentra en interacción con el complejo III, y forman los supercomplejos III<sub>2</sub>-IV<sub>1</sub> y III<sub>2</sub>-IV<sub>2</sub>.

## 7.2 Comparación entre fases de crecimiento

En diferentes tipos de microorganismos, la producción de ATP por las reacciones catabólicas no está coordinada con el requerimiento de ATP en las reacciones anabólicas (Van Urk y cols. 1988; Neijssel y cols. 1990). Es decir, cuando hay un exceso de la fuente de energía, la actividad de las reacciones catabólicas es mayor a pesar de que haya un bajo requerimiento de ATP. Sin embargo, el exceso de energía disminuye la velocidad de las reacciones catabólicas, por tanto, las células cuentan con mecanismos fútiles que consumen ATP o bien, son capaces de producir menos ATP con la misma cantidad de equivalentes reductores (Ito y Seymour 2005).

En la fase exponencial de crecimiento, la fuente de energía está en exceso y el requerimiento de ATP para las reacciones anabólicas es elevado. En cambio, en la fase estacionaria disminuye la producción de biomasa, y entonces el requerimiento de ATP para las reacciones anabólicas es

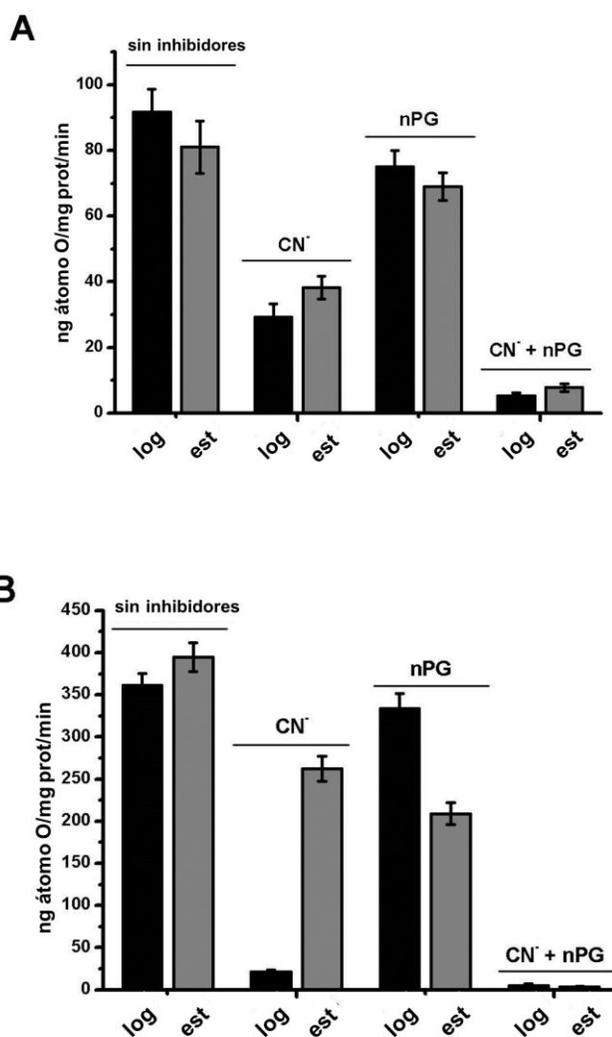
menor. En el caso de carencia de sustratos que sirvan como fuente de energía, el consumo de oxígeno también disminuye, y esto incrementa la formación de especies reactivas de oxígeno que a su vez disminuye la síntesis de los complejos respiratorios. Si la fuente de energía no se ha terminado pero cesa el crecimiento celular, habrá una disminución en la concentración de ADP, que mantiene el potencial transmembranal mitocondrial elevado, desacelera el consumo de oxígeno y produce una mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno.

En esta etapa del proyecto se utilizaron células de *Y. lipolytica* cosechadas en fases de crecimiento exponencial y estacionaria, para evaluar condiciones de alto y bajo requerimiento energético, respectivamente.

### **7.2.1 La canalización de electrones del NADH externo hacia la vía citocrómica ocurre sólo en la fase logarítmica de crecimiento**

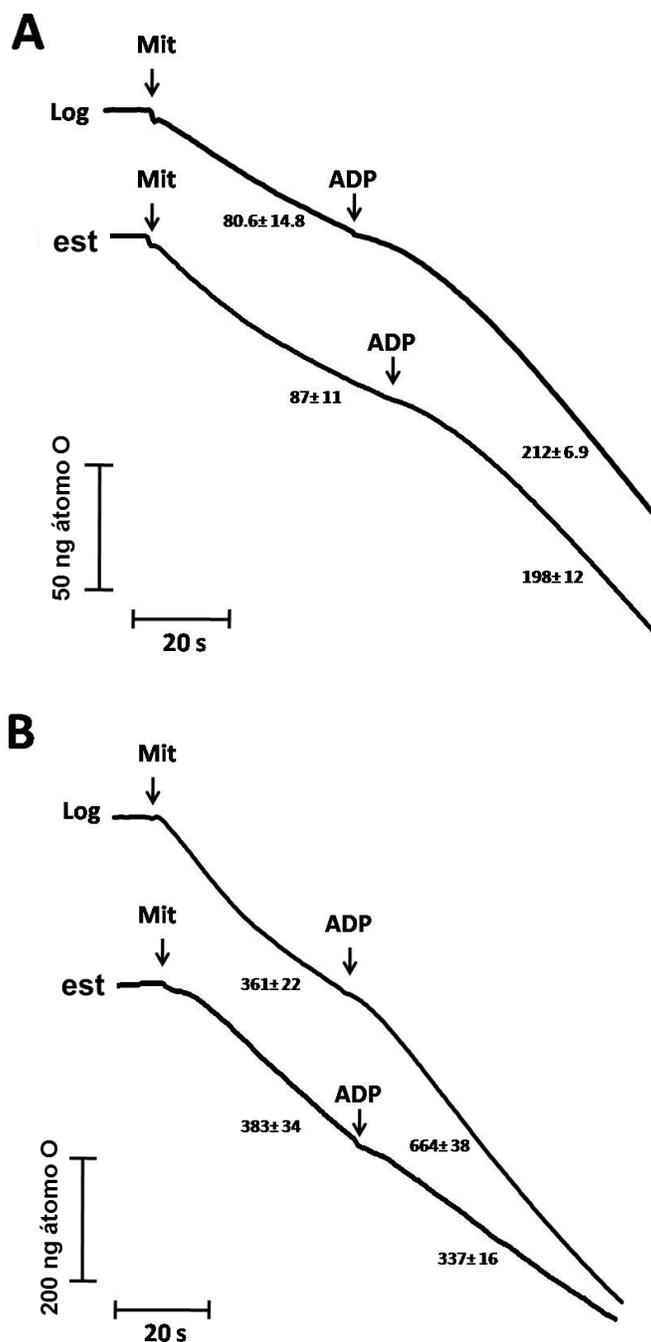
En las levaduras, el requerimiento de ATP es alto en la fase logarítmica y disminuye cuando las células entran en fase estacionaria. Como consecuencia, en la fase logarítmica, el consumo de oxígeno debe ser elevado para producir el ATP necesario. En cambio, durante la fase estacionaria, la forma de mantener un consumo de oxígeno alto sería promoviendo un desacoplamiento controlado (Guerrero-Castillo y cols. 2011). En particular, en la cadena respiratoria de *Y. lipolytica* es posible modular la estequiometría de protones bombeados en función del número de bombas de protones activas (figura 4). Con el fin de probar si existen diferentes rutas de transporte de electrones para un mismo sustrato que dependan de las necesidades energéticas, se determinó la actividad respiratoria de mitocondrias aisladas en diferentes fases de crecimiento (figura 20). Como sustratos respiratorios se utilizó NADH externo o piruvato-malato, para generar NADH matricial, y para determinar la actividad de cada vía respiratoria se determinó el consumo de oxígeno en presencia de inhibidores de la citocromo *c* oxidasa y de la oxidasa alterna. En el panel A, utilizando piruvato-malato como sustrato, de manera general, no se observaron diferencias en la respiración entre fases de crecimiento en las distintas condiciones probadas. En presencia de cianuro disminuye aproximadamente a la mitad, mientras que con propilgalato la disminución en la respiración es de 10-15% en comparación con la condición en ausencia de inhibidores. Al utilizar los inhibidores de ambas vías la respiración se abate casi completamente. En el panel B se utilizó NADH externo como sustrato respiratorio para alimentar la NDH2e. En ausencia de inhibidores no se observaron diferencias entre fases de crecimiento. En cambio, a diferencia de lo que ocurrió con piruvato-malato como sustratos, tanto en presencia de cianuro como de propilgalato se observaron diferencias entre fases de crecimiento, i.e., la inhibición de la respiración por cianuro es mucho mayor en la fase logarítmica en comparación con la fase estacionaria. Cuando se midió la inhibición

de la respiración en presencia de propil-galato, se observó lo contrario. Es decir, en la fase logarítmica prácticamente no se inhibe la respiración, mientras que en la fase estacionaria se inhibe aproximadamente a la mitad. En presencia de ambos inhibidores la respiración se detiene completamente, como cuando se usa piruvato-malato. Estos resultados indican que la actividad conjunta de los componentes alternos se da únicamente en la fase estacionaria de crecimiento y que probablemente la interacción NDH2e-vía citocrómica evite el flujo de electrones entre los componentes alternos durante la fase logarítmica.



**Figura 20. Comparación entre fases de crecimiento del efecto de inhibidores de la respiración.** Mezcla de reacción: manitol 0.6 M, MES 5 mM, KCl 20 mM, fosfato 4 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 6.8. El consumo de oxígeno se midió con un electrodo de tipo Clark en una cámara de 1 ml a 30 °C. La velocidad de respiración se midió utilizando piruvato-malato 5 mM (A) o NADH 1 mM en presencia de rotenona 2.5 μM (B). Donde se indica, se determinó la velocidad de consumo de oxígeno en presencia de cianuro 100 μM y/o propilgalato 50 μM (n = 5).

Además de los patrones de inhibición de la respiración, se evaluó el acoplamiento de la síntesis de ATP con el consumo de oxígeno utilizando los mismos sustratos que en la figura 20. Esto permite de manera indirecta relacionar la proporción del flujo de electrones que responde a la concentración de ADP, es decir la proporción de electrones que se dirige hacia la vía citocrómica. Como medida del acoplamiento de la fosforilación oxidativa, se determinó la velocidad de consumo de oxígeno en estados estacionario y fosforilante (figura 21) y se calcularon los respectivos controles respiratorios (CR). El control respiratorio se define como el cociente de la velocidad de respiración en estado III (fosforilante) entre la velocidad de respiración en estado IV (estacionario). En presencia de piruvato-malato como sustrato, no se encontraron diferencias entre fases de crecimiento con respecto a la velocidad de respiración en estados III y IV ni en el CR. Los valores de CR en las fases logarítmica y estacionaria fueron de  $2.3 \pm 0.1$  y  $2.13 \pm 0.2$ , respectivamente. En cambio, cuando se determinaron las velocidades de consumo de oxígeno en estados estacionario y fosforilante en presencia de NADH externo como sustrato, se encontraron diferencias únicamente en el estado fosforilante. Antes de la adición de ADP no se detectaron cambios, las velocidades de consumo de oxígeno fueron de  $361 \pm 22$  en la fase logarítmica y  $383 \pm 34$  en la fase estacionaria. En cambio, en estado fosforilante, la velocidad de consumo de oxígeno en fase logarítmica fue de  $664 \pm 38$  y disminuyó a  $337 \pm 16$  en la fase estacionaria. El valor del CR fue de  $1.82 \pm 0.06$  en la fase logarítmica mientras que en la fase estacionaria no hubo un aumento de la respiración en respuesta a la adición de ADP. Estos resultados, en conjunto con los patrones de inhibición, sugieren que en la fase estacionaria se activa una vía desacoplada que involucra ambos componentes alternos. Es decir, la vía NDH2e-ubiquinona-AOX se encuentra activa sólo en fase estacionaria de crecimiento. Este desacoplamiento no es generado por un incremento en la permeabilidad de la membrana, dado que no se observaron diferencias con piruvato-malato como sustrato.



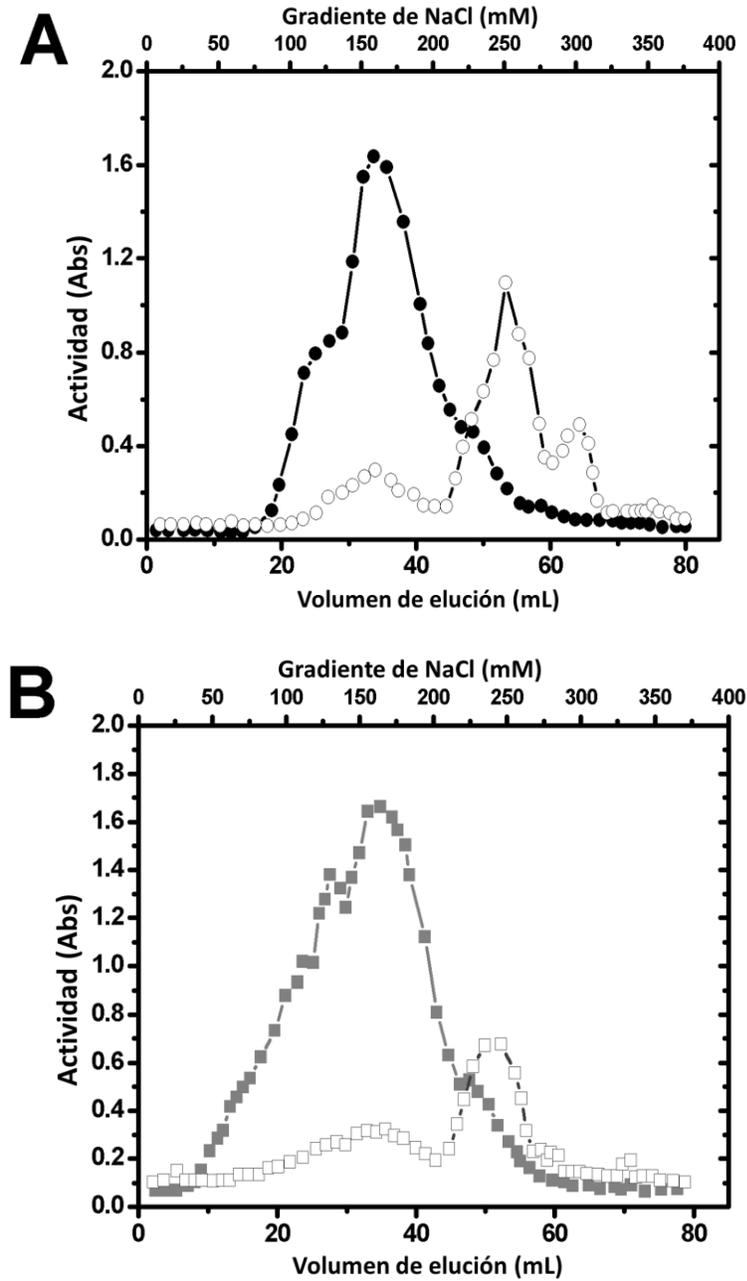
**Figura 21. Controles respiratorios de mitocondrias aisladas en fases logarítmica y estacionaria de crecimiento. Comparación entre fases de crecimiento del efecto de inhibidores de la respiración.** La mezcla de reacción es igual que en la figura 20. El consumo de oxígeno se midió con un electrodo de tipo Clark en una cámara de 1 ml a 30 °C. La velocidad de respiración se midió utilizando piruvato-malato 5 mM (A) o NADH 1 mM en presencia de rotenona 2.5 μM (B). Donde se indica, se adicionó ADP 1 mM. Se muestran trazos representativos (n = 5 para piruvato-malato; n = 9 para NADH).

### 7.2.2 En la fase estacionaria una fracción de NDH2e se encuentra disociada

En los experimentos realizados en la fase logarítmica de crecimiento (sección 7.1) se encontró una interacción entre la NDH2e y el complejo IV. Esta interacción explica la canalización de electrones de la NDH2e a la vía citocrómica. Entonces, en la fase estacionaria, al perderse la canalización de los electrones a la vía citocrómica, pues el ubiquinol generado por la NDH2e puede ser oxidado tanto por el complejo III como por la AOX, la interacción NDH2e-vía citocrómica debe disminuir o perderse. Para determinar si la pérdida de la canalización de electrones está relacionada con la asociación NDH2e-complejo IV, se analizó esta interacción en ambas fases de crecimiento. Las mitocondrias aisladas de fases logarítmica y estacionaria se solubilizaron con dodecilmaltósido y las proteínas se separaron por cromatografía de columna de intercambio aniónico con una matriz de DEAE Bio-Gel A gel. El dodecilmaltósido se utiliza comúnmente como un detergente que separa los supercomplejos cuando se utiliza a una relación 1:1 (en mg) detergente:proteína. Sin embargo, a concentraciones menores, con este detergente es posible detectar algunas interacciones en electroforesis en geles nativos. Para caracterizar la asociación NDH2e con los complejos de la vía citocrómica en las dos fases de crecimiento analizadas, se utilizaron diferentes relaciones detergente:proteína que variaron de 0.8 a 2.0 mg/mg de proteína. En la figura 22 se muestra el perfil de actividades de NADH deshidrogenasa y de citocromo *c* oxidasa de las fracciones de las columnas cargadas con mitocondrias de fase logarítmica y estacionaria solubilizadas con 0.8 mg de dodecilmaltósido/mg de proteína. Para comparar las actividades de cada fracción entre las diferentes columnas, se tomó la precaución de utilizar exactamente los mismos volúmenes de los amortiguadores de cargado de la columna, de lavado y de elución. A diferencia de lo que ocurre al solubilizar la proteínas con 2 mg de dodecilmaltósido/mg de proteína, usando 0.8 mg /mg de proteína se conservan parcialmente algunas interacciones.

Con respecto a la actividad de NADH deshidrogenasa, en el panel A (fase logarítmica) de la figura 22, se observó actividad de las fracciones 20 a 60, mientras que en el panel B (fase estacionaria) la actividad se detectó desde la fracción 10 hasta la fracción 60. La actividad de la deshidrogenasa externa resultó difícil de comparar entre las dos fases de crecimiento debido a la interferencia del complejo I, supercomplejos que contienen al complejo I y otras deshidrogenasas capaces de oxidar NADH. No se observó una separación clara de los picos de actividad correspondientes a cada enzima. Sin embargo, se tomaron algunas fracciones y se corrieron geles claros nativos con el fin de identificar en cuáles fracciones se encontraban: el complejo I, los supercomplejos que contienen el complejo I y las demás enzimas capaces de llevar a cabo la reacción de reducción del NBT a partir de electrones de la oxidación del NADH. Las principales

diferencias entre los paneles A y B de la figura 22 se encontraron en los picos de actividad en las fracciones 18 y 28.

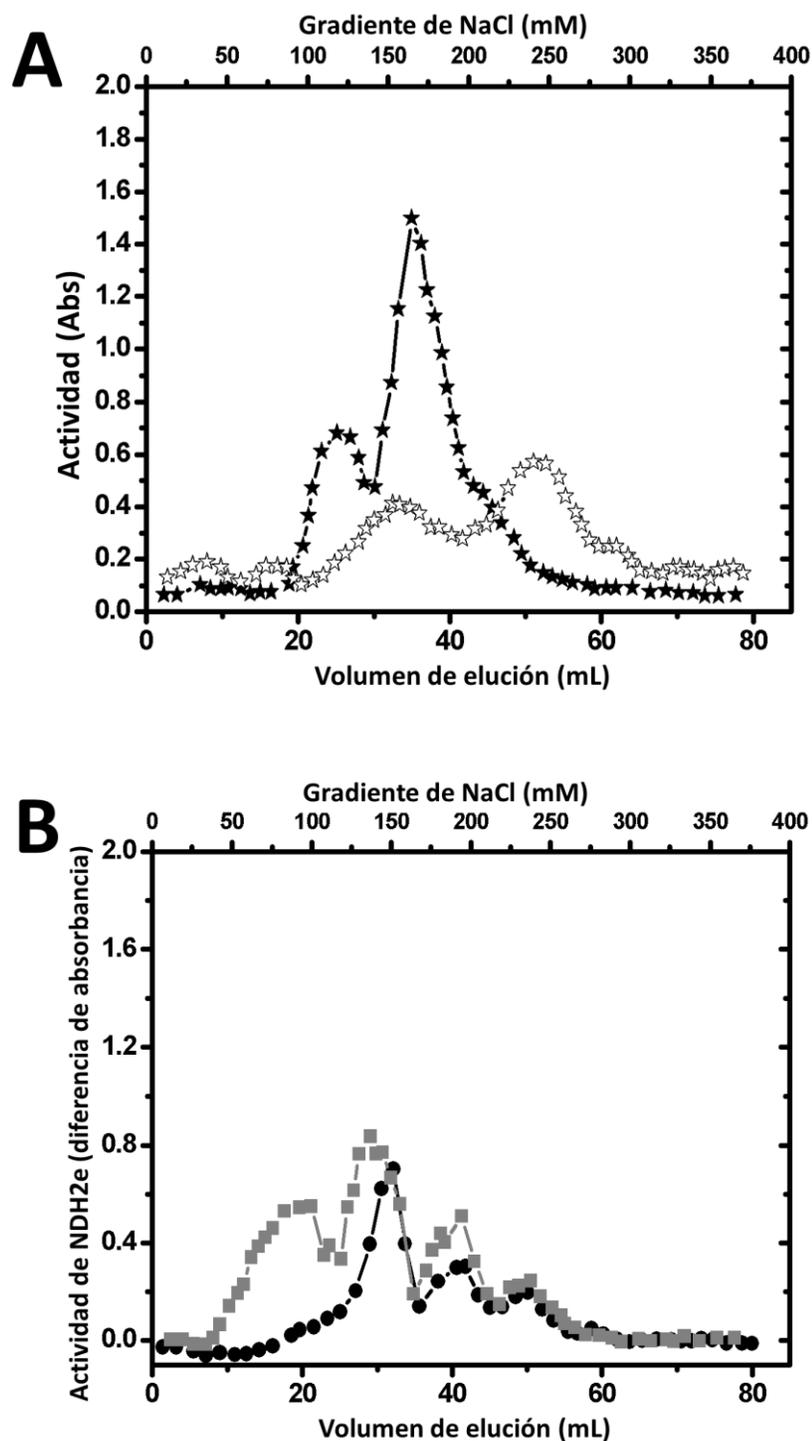


**Figura 22. Perfiles de actividad de las fracciones de las columnas de intercambio iónico de mitocondrias de la cepa silvestre solubilizadas con dodecilmaltósido.** Las mitocondrias se solubilizaron con 0.8 mg de dodecilmaltósido/mg de proteína y cargadas en una columna de DEAE Bio-Gel A gel previamente equilibrada. Se lavó la columna y se eluyó con un gradiente continuo de 0 a 400 mM de NaCl. Se colectaron fracciones de 1 ml y se determinó la actividad de NADH deshidrogenasa (● y ■) y de citocromo *c* oxidasa (○ y □). **(A)** mitocondrias aisladas en fase logarítmica. **(B)** mitocondrias aisladas en fase estacionaria. Se muestra un experimento representativo (n = 2 con 0.8 mg de dodecilmaltósido/mg de proteína, pero se probaron relaciones detergente:proteína de 1.2, 1.6 y 2.0, encontrando una fracción libre de NDH2e a todas las relaciones analizadas).

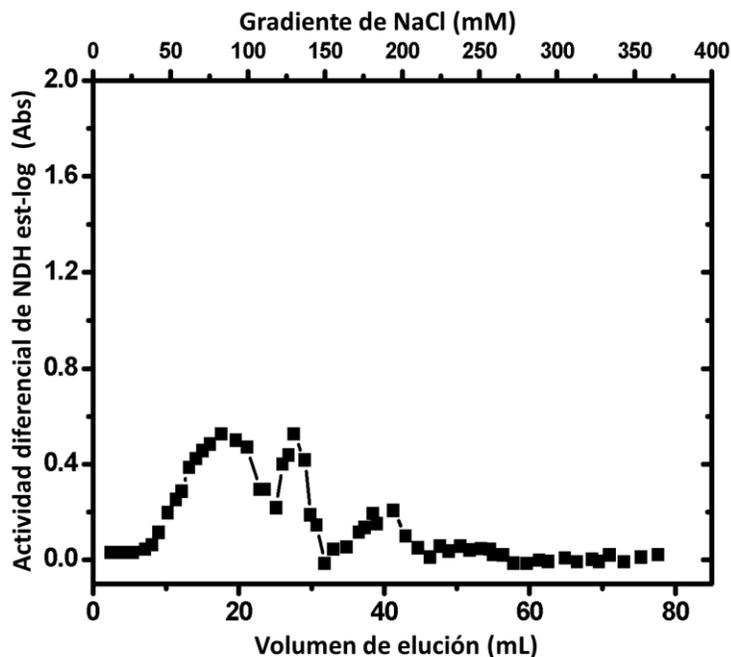
En cuanto a la actividad de la citocromo *c* oxidasa, los picos de actividad detectados fueron los mismos en ambas fases de crecimiento. El primer pico corresponde al complejo IV asociado a otra proteína, el cual no se había encontrado al solubilizar con una mayor relación detergente:proteína (2 mg/mg), mientras que el segundo pico representa el complejo IV monomérico. En general, la actividad del complejo IV en la fase estacionaria fue menor que en la fase logarítmica.

Con el fin de identificar correctamente el (los) pico(s) de actividad de NADH deshidrogenasa que corresponde(n) a la NDH2e, se solubilizaron mitocondrias de la cepa mutante GB5.2 (*Δndh2*) que carece de esta enzima, y se cargó otra columna en las mismas condiciones (figura 23-A). En la actividad de NDH de las fracciones de esta columna se observó: un pico en la fracción 25 aproximadamente, cuya proteína no se ha identificado; el pico que corresponde al complejo I en la fracción 35; el pico de supercomplejos que contienen al complejo I en la fracción 39; y el pico que probablemente corresponda a la NADPH deshidrogenasa en la fracción 46. Se hizo una sustracción del perfil de actividad de NADH deshidrogenasa de columna de la cepa mutante de los perfiles de actividad de las columnas de la cepa silvestre en ambas fases de crecimiento. La actividad diferencial resultante corresponde a la actividad de la NDH2e (figura 23-B). Al restar la actividad de la mutante de la actividad de la silvestre en fase logarítmica se observaron tres picos a 150, 190 y 230 mM de NaCl. Esto indica que a esa relación detergente:proteína se encontraron diferentes poblaciones de la NADH deshidrogenasa externa. El mismo tratamiento con la fase estacionaria arrojó los mismos tres picos encontrados en la fase logarítmica más un pico que eluye primero a 80 mM de NaCl. Esta actividad debe corresponder a una fracción de la NDH2e que, al no estar asociada con el complejo IV, eluye en fracciones anteriores.

De manera similar, se analizó la diferencia de actividad de NADH deshidrogenasa entre las fases logarítmica y estacionaria. Es decir, se sustrajo la actividad de la columna en fase logarítmica de la actividad de la columna en fase estacionaria. El perfil resultante se muestra en la figura 24. A pesar de que se realizó el mismo tratamiento de los datos, el objetivo fue distinto. En la figura 23-A se buscó asignar cuáles de los picos de actividad corresponden a la NDH2e, mientras que en la figura 24 sólo se muestran las diferencias de actividad de NADH deshidrogenasa entre las fases de crecimiento. Aquí, la diferencia más clara es un pico de actividad que eluye a 80 mM de NaCl.



**Figura 23.** Perfil de actividad de las fracciones de la columna de intercambio iónico de mitocondrias aisladas de la cepa mutante *Δndh2* y la actividad diferencial. (A) Las mitocondrias de la cepa GB5.2 (*Δndh2*) se solubilizaron con 0.8 mg de dodecilmaltósido/mg de proteína y cargadas en una columna de DEAE Bio-Gel A gel previamente equilibrada. Se lavó la columna y se eluyó con un gradiente continuo de 0 a 400 mM de NaCl. Se colectaron fracciones de 1 ml y se determinó la actividad de NADH deshidrogenasa (símbolos llenos) y de citocromo *c* oxidasa (símbolos vacíos). (B) Actividad de NDH2e en las columnas de la cepa silvestre en fase logarítmica (●) y en fase estacionaria (■). La actividad de NDH2e se obtuvo por la diferencia de absorbancia de las fracciones.

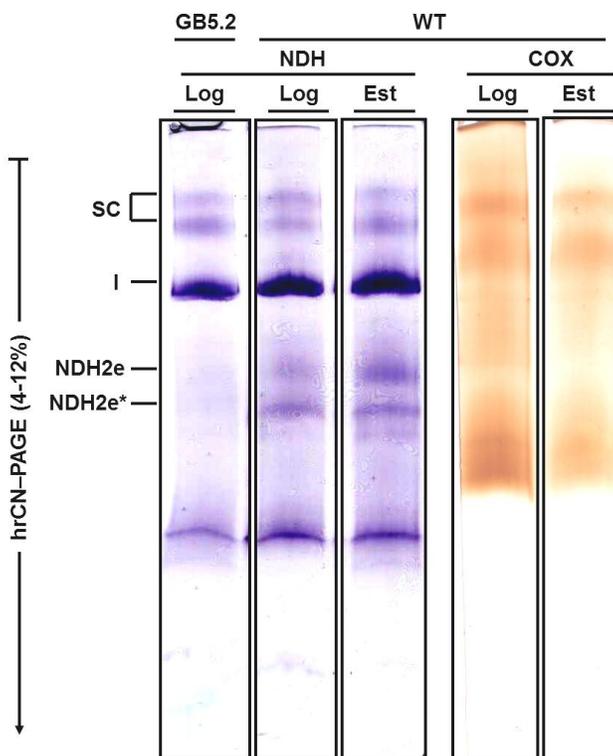


**Figura 24. Diferencia de actividades NDH entre las fases de crecimiento.** Se sustrajo la actividad de NADH deshidrogenasa de la columna en fase logarítmica de la actividad de NADH deshidrogenasa de la columna en fase estacionaria. Es decir, los cuadros negros (■) corresponden a la resta de ■ menos ●, ambos tomados de la figura 22.

Para corroborar que la NDH2e eluyó en las fracciones asignadas previamente, se tomó una alícuota de las fracciones y se realizó un ensayo tipo dot blot. Se colocó una gota de 2.5  $\mu$ l de cada fracción sobre una membrana de nitrocelulosa y se incubó con anticuerpos contra la NDH2e y contra la subunidad 2 de la citocromo oxidasa (figura 25-A). La densidad óptica de las manchas se cuantificó utilizando el programa ImageJ (figura 25-B y C). Se encontró una buena correlación entre la actividad de la NDH2e (figura 23-B) con la cuantificación de esta proteína (figura 25-B). Con el uso del anticuerpo se detectó una población de la NDH2e en las primeras fracciones de la columna en fase estacionaria que no aparece en las fracciones de la columna en fase logarítmica. Esto concuerda con la diferencia de actividad de NDH entre la mutante  $\Delta ndh2$  y la cepa silvestre en ambas fases de crecimiento (figura 23-B) y con la diferencia de actividad de NDH entre ambas fases de crecimiento (figura 24). En conjunto, la determinación de la actividad de NDH2e y su identificación mediante el anticuerpo mostraron que la NDH2e es más abundante en la fase estacionaria y que una fracción de la NDH2e eluyó de forma no asociada al complejo IV.

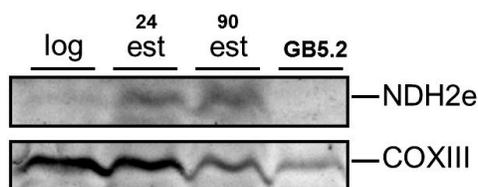


electrones directamente de otras deshidrogenasas que reducen a la ubiquinona. El supercomplejo III<sub>2</sub>-IV<sub>2-4</sub> se ha encontrado en todas las especies en las que se han identificado supercomplejos. La relación 1:2 entre los complejos III:IV lleva a suponer que si la estequiometría III<sub>2</sub>-IV<sub>4</sub> es verdadera, no hay un exceso de ninguno de los complejos involucrados, es decir, que no se encuentran de forma libre y que todo el complejo III está asociado al complejo IV, y viceversa. La interacción de la NDH2e con los complejos de la vía citocrómica se sugiere que ocurre en la interfase entre los complejos III y IV. De este modo, la NDH2e estaría anclada al complejo IV con su sitio activo orientado hacia el sitio Q<sub>o</sub> del complejo III. Hasta ahora se desconoce la relación NDH2e:citocromo *c* oxidasa, pero al parecer en la fase logarítmica toda la NDH2e se encuentra asociada a la vía citocrómica, mientras que en la fase estacionaria una fracción interacciona con la vía citocrómica y además hay una fracción no asociada. Probablemente, un incremento en la cantidad de NDH2e o una disminución en la cantidad de citocromo *c* oxidasa o ambos sea lo que desencadene la liberación de la NDH2e de los complejos de la vía citocrómica. Al disminuir los sitios de interacción por la disminución de los complejos III y IV, el exceso de NDH2e produciría ubiquinol que no sería canalizado hacia la vía citocrómica y por lo tanto podría ser oxidado también por la vía alterna. Con el fin de determinar si en la fase estacionaria aumenta la cantidad de NDH2e o disminuye la cantidad de los complejos de la vía citocrómica se realizaron ensayos de actividad en gel nativo (figura 26). Las mitocondrias aisladas se solubilizaron con 4 mg de digitonina/mg de proteína y se corrieron en un gel claro nativo de alta resolución. El gel se incubó con los sustratos correspondientes y agentes oxidantes como indicadores de la actividad. En la cepa mutante GB5.2 (o  $\Delta ndh2e$ ), que carece de la NDH2e, se observaron de arriba hacia abajo (de mayor a menor peso molecular): dos supercomplejos que contienen el complejo I, el complejo I monomérico y una banda que corresponde a la NADPH deshidrogenasa. En los siguientes dos carriles se corrió el solubilizado de mitocondrias silvestres; en ambos carriles se observaron las mismas bandas que en la cepa mutante, más dos bandas que se asignaron como NDH2e y NDH2e\*. La intensidad de la banda marcada como NDH2e aumentó en la fase estacionaria en comparación con la banda en la fase logarítmica. Con respecto a la actividad en gel de citocromo *c* oxidasa, no pareció haber un patrón diferente de bandas; sin embargo, de forma general se encontró, por la disminución de la intensidad de las bandas, que es menor la actividad total de este complejo en la fase estacionaria.



**Figura 26. Actividad en gel de NADH deshidrogenasa (NDH) y de citocromo *c* oxidasa (COX).** Las actividades en gel se determinaron después de la electroforesis nativa de alta resolución. Además de la actividad de NDH2e, el complejo I y otras oxidorreductasas son capaces de oxidar NADH y también dan bandas positivas (color morado). La actividad de NDH2e se pudo asignar en los carriles de la cepa silvestre (WT) debido a la carencia de bandas en la mutante carente,  $\Delta ndh2$  (GB5.2). Las bandas marcadas como NDH2e y NDH2e\* probablemente corresponden a la fracción libre y a la que interacciona con la vía citocrómica, respectivamente. I, complejo I; IV, complejo IV; SC, supercomplejos. Se muestra un gel representativo en el cual se cargaron 500  $\mu\text{g}$  de proteína por carril ( $n = 3$ ).

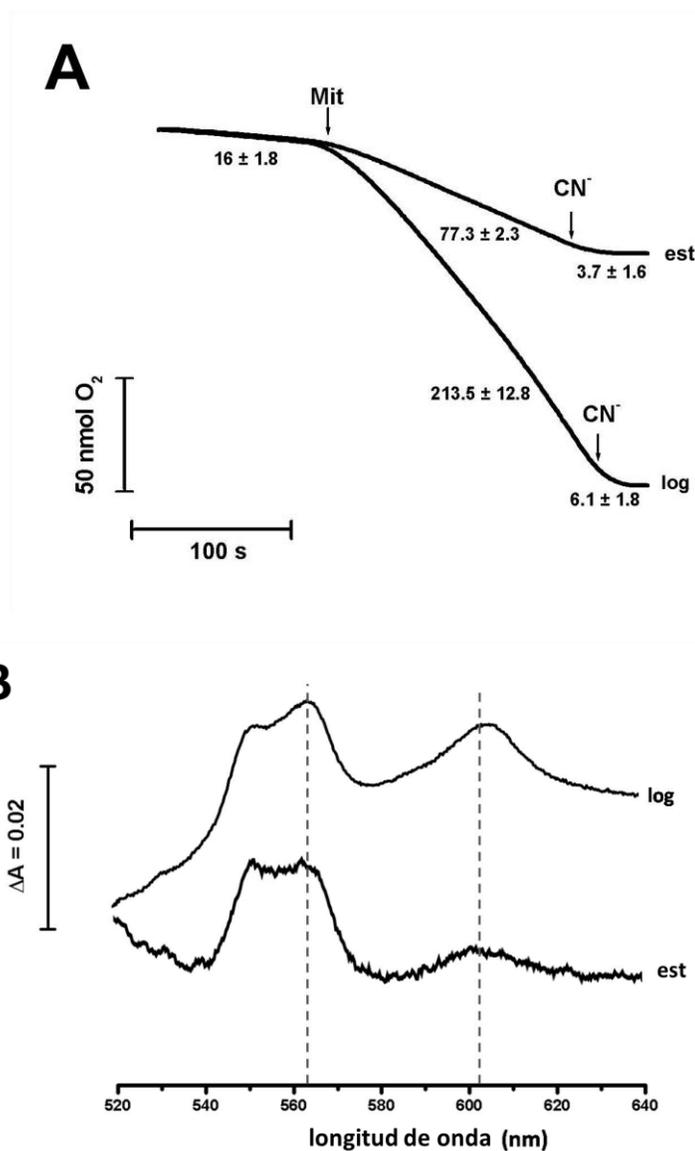
Para correlacionar los cambios en la actividad observados en los geles claros con la cantidad de proteína, se determinó cualitativamente mediante Western blot la cantidad de NDH2e y de complejo IV (figura 27).



**Figura 27. Estimación de la cantidad de NDH2e y de la subunidad COXIII en diferentes fases de crecimiento.** Se realizó un Western blot contra la NDH2e y contra la subunidad 3 del complejo IV en mitocondrias aisladas en fase logarítmica (log) o estacionaria (est). Los números en la fase estacionaria indican los tiempos de cultivo en horas. Se muestra una membrana representativa ( $n = 3$ ).

Para hacer un análisis cuantitativo de los cambios en la cantidad de estas proteínas entre ambas fases de crecimiento, se determinó la actividad *in vitro* tanto de la NDH2e como del complejo IV y la cantidad de citocromos  $a+a_3$  mediante espectros diferenciales. La actividad NADH:DCPIP oxidorreductasa de mitocondrias aisladas en ambas fases de crecimiento se determinó por el cambio en la absorbancia a 600 nm/min/mg de proteína. En la fase logarítmica, la actividad resultó de  $0.147 \pm 0.0062$  nmol/min/mg de proteína, mientras que en la fase estacionaria fue de  $0.235 \pm 0.0124$ . La actividad del complejo IV se monitoreó mediante un ensayo de oximetría utilizando ascorbato y TMPD (figura 28-A). En estos trazos se determinó el consumo de oxígeno por unidad de tiempo. En la fase logarítmica, la pendiente que corresponde al consumo de oxígeno fue aproximadamente tres veces mayor que en la fase estacionaria. En la figura 28-B se muestran espectros diferenciales representativos de ambas fases de crecimiento. El contenido de citocromos  $b$  se calculó por la diferencia del valor de absorbancia a 563 nm menos la absorbancia a 577 nm. Se obtuvieron valores muy parecidos en ambas fases de crecimiento. La cuantificación de citocromos  $a + a_3$  se realizó por la diferencia de los valores de absorbancia a 605-630 nm. El contenido de citocromos  $a+a_3$  se calculó de 0.07 nmol/mg de proteína en la fase logarítmica y disminuyó a 0.03 nmol/mg de proteína en la fase estacionaria.

Numéricamente no fue posible calcular la relación NDH2e:complejo IV. Sin embargo, con los resultados mostrados hasta ahora es claro que esta relación aumentó en la fase estacionaria en comparación con la fase logarítmica. Con respecto a NDH2e en la fase estacionaria, se encontró mayor cantidad de proteína y también mayor actividad en gel. En cambio, la concentración y actividad de la citocromo  $c$  oxidasa disminuyó en la fase estacionaria. Esto concuerda con lo predicho sobre el aumento de la fracción de NDH2e que no interacciona con los complejos de la vía citocrómica. Así, en la fase estacionaria, al disminuir la cantidad de citocromo  $c$  oxidasa y encontrándose NDH2e en exceso, hay menos sitios donde pueda interaccionar NDH2e con la vía citocrómica, lo que provoca que la NDH2e sobrante se encuentre libre (no asociada al complejo IV).

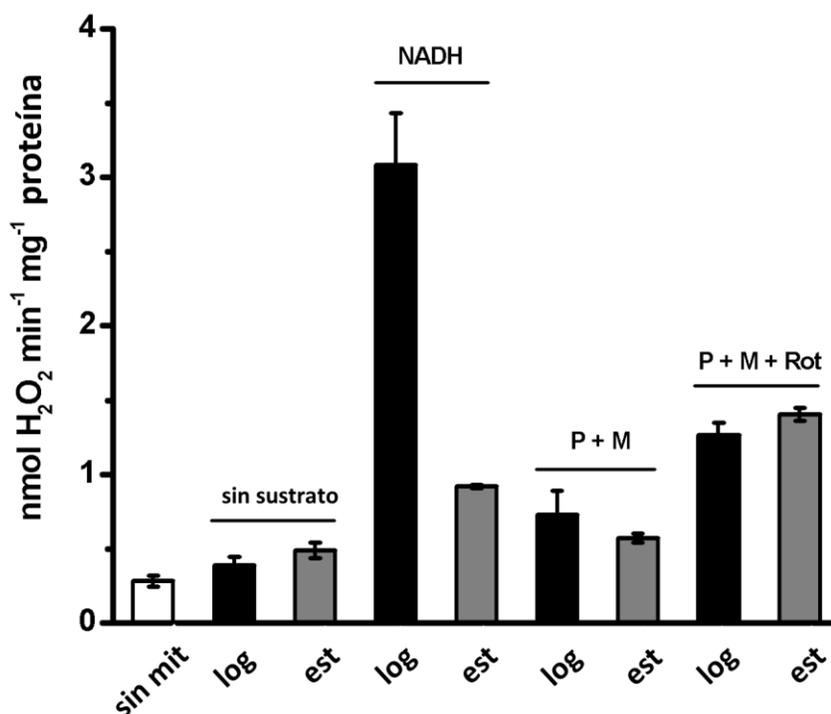


**Figura 28. Cuantificación de la actividad del complejo IV y contenido de citocromos en las dos fases de crecimiento.** (A) La actividad de la citocromo *c* oxidasa se determinó como el consumo de oxígeno sensible a cianuro de mitocondrias aisladas en presencia de ascorbato 5 mM, TMPD 0.6 mM y mixotiazol 10 μM. Se añadió 0.1 mg de proteína/ml de mitocondrias aisladas en la fase logarítmica (log) o en fase estacionaria (est). Los números indican la velocidad de consumo de oxígeno en ng at O/min/mg de proteína. (B) Espectros de absorbancia reducido (con hidrosulfito de sodio) menos oxidado (con ferricianuro de potasio) de mitocondrias aisladas en fases logarítmica (log) o estacionaria (est). En ambos espectros se utilizaron 2 mg de proteína/ml y se realizaron los barridos de 500 a 680 mμ. Las líneas discontinuas indican los picos correspondientes a los citocromos *b* y *a+a<sub>3</sub>*. En los trazos de actividad, así como en los espectros diferenciales se muestran trazos representativos (n = 5).

#### 7.2.4 La respiración desacoplada disminuye la formación de ROS

En condiciones de potencial transmembranal elevado, la velocidad de consumo de oxígeno disminuye, lo cual desencadena la producción de superóxido sobre todo en sitios en donde la transferencia de electrones ocurre unitariamente (Dröse y Brandt 2012). En particular, la reacción lateral de reducción de oxígeno molecular para la formación de superóxido ocurre en los sitios de

oxidorreducción de la ubiquinona y de flavina. Los complejos I y III han sido reportados como los principales formadores de ROS en la cadena respiratoria (Chen y cols. 2003; Dröse y cols. 2009). En las mitocondrias de *Y. lipolytica*, dado que en la fase estacionaria se activa una vía de transporte de electrones desacoplada a través de los componentes alternos, se espera que, como los electrones no son específicamente canalizados hacia la vía citocrómica sino que pueden repartirse entre ambas vías respiratorias, la producción de especies reactivas sea menor que en la fase logarítmica. Con el objetivo de probar si la actividad combinada de los componentes alternos en la fase estacionaria disminuye la velocidad de formación de especies reactivas de oxígeno, se cuantificó la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en mitocondrias aisladas. Para determinar la cantidad de peróxido de hidrógeno producido, se monitoreó la fluorescencia de la resorufina, un compuesto que se forma por la oxidación del Amplex<sup>®</sup> Red (figura 29).



**Figura 29. Cuantificación de peróxido producido por mitocondrias en fases de crecimiento logarítmica y estacionaria.** La formación de peróxido de hidrógeno en mitocondrias aisladas se realizó en un lector de placas multimodal Synergy (BioTek) monitoreando la fluorescencia en función del tiempo durante 10 min. El valor de la pendiente del cambio de fluorescencia se transformó a nmol de peróxido utilizando una curva estándar de 0 a 5 nmol/ml. La mezcla de reacción fue la siguiente: amortiguador de respiración, Amplex Red 10 μM, peroxidasa de rábano 0.1 unidades/ml, superóxido dismutasa 100 unidades/ml, mitocondrias 0.3 mg/ml y NADH 0.5 mM o piruvato-malato (P + M) 10 mM. Donde se indica se adicionó rotenona (Rot) 10 μM. (n=5).

En la figura 29 se graficó la velocidad de generación de peróxido de hidrógeno en mitocondrias aisladas en ambas fases de crecimiento. En ausencia de sustratos, la producción de

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no presentó diferencias entre las fases de crecimiento. Se utilizó el amortiguador con NADH pero sin mitocondrias, como control, que demuestra que el NADH no aumenta la fluorescencia del Amplex Red. Cuando se utilizó NADH externo como sustrato respiratorio, se observó una menor producción de especies reactivas en la fase estacionaria. Esto se puede deber a que el ubiquinol generado por la NDH2e puede ser oxidado también por la AOX, lo cual disminuye la producción de superóxido. En cambio en la fase logarítmica, los electrones del NADH externo son dirigidos hacia la vía citocrómica, en donde el complejo III es el principal generador de ROS (Chen y cols. 2003). La velocidad de producción de peróxido utilizando piruvato-malato como sustrato resultó ser similar entre ambas fases de crecimiento, lo cual está de acuerdo con los datos de oximetría, en donde ambas vías respiratorias se encuentran activas en ambas fases de crecimiento. Con el fin de inducir un aumento en la producción de ROS por el complejo I se adicionó rotenona, con la cual se bloquea el sitio de unión a la ubiquinona y se mantienen reducidos tanto los centros hierro-azufre como el nucleótido de flavina. La reducción parcial (con un solo electrón) de la flavina forma un radical que reduce el oxígeno molecular y forma superóxido (Galkin y Brandt 2005). En la figura 29, en presencia de rotenona, se observó un incremento en la formación de ROS dependiente del complejo I. Sin embargo, del mismo modo que en ausencia de rotenona, no se observaron diferencias entre fases de crecimiento.

Alternativamente, se determinó la velocidad de formación de especies reactivas de oxígeno utilizando diclorofluoresceína. A pesar de que este método es menos específico debido a que la diclorofluoresceína se oxida con radicales más agresivos como el radical oxhidrilo, se observó el mismo patrón que con el Amplex Red. Es decir, con NADH externo en la fase logarítmica la producción de ROS es mayor que en la fase estacionaria y en presencia de piruvato-malato como sustratos, no se encontraron diferencias entre fases de crecimiento.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Estructuras supramoleculares

Desde la detección e identificación de asociaciones entre complejos de la fosforilación oxidativa, la visión y el estudio de la cadena respiratoria y de la ATP sintasa se han modificado. A partir de este enfoque se han desarrollado nuevas teorías sobre la estructura y función de estas proteínas (Schägger 2001b; Sunderhaus y cols. 2007). Algunas de las nuevas ideas se han llegado a comprobar experimentalmente, mientras que para otras sigue siendo un reto evidenciarlas. Un ejemplo de las propuestas iniciales, que ya se han comprobado, es la canalización de electrones entre complejos. Las mitocondrias solubilizadas con digitonina son capaces de reducir el oxígeno en presencia de NADH como donador de electrones, no así las solubilizadas con dodecilmaltósido (Acin-Perez y cols. 2008). Lo cual implica que puede haber transporte de electrones desde el complejo I hasta el complejo IV en ausencia de membrana interna mitocondrial. Además, existe evidencia de canalización de ubiquinona/ubiquinol entre los complejos I y III (Bianchi y cols. 2004).

Con respecto a otra de las funciones que se han atribuido a los supercomplejos, que es la estabilización de un complejo en particular, se ha encontrado, en bacterias y en mitocondrias de humano, que el complejo I mantiene su estructura y permanecen las subunidades ensambladas solamente cuando este complejo forma parte de asociaciones supramoleculares con los demás complejos (Acin-Perez y cols. 2004; Schägger y cols. 2004; Stroh y cols. 2004). El complejo V forma una cadena de dímeros que induce una curvatura en la membrana interna y está involucrada en la morfología de las crestas mitocondriales (Paumard y cols. 2002; Strauss y cols. 2008). Algunas otras funciones, como el secuestro de intermediarios reactivos (Schägger 2002), o arreglos estructurales mayores, como la formación de oligómeros de supercomplejos (Nubel y cols. 2009), continúan siendo ideas por comprobar. Mediante electroforesis azul nativa, se han observado diferentes patrones de asociación entre los complejos I, III y IV que han llevado a proponer la existencia de “cuerdas respiratorias” (Wittig y cols. 2006b). Se ha sugerido que estos arreglos podrían estar formados por oligómeros de supercomplejos, en donde un polímero del supercomplejo  $\text{III}_2\text{-IV}_4$  corresponde a la estructura principal y que el complejo I interacciona lateralmente con ésta. Dada la relación estequiométrica entre los complejos, se ha propuesto que el complejo I se asocia a dos de cada tres supercomplejos  $\text{III}_2\text{-IV}_4$  y el sobrante probablemente recibe electrones de otras deshidrogenasas, por ejemplo, de la succinato deshidrogenasa (Schägger 2001b). La técnica para separar mediante electroforesis nativa estructuras de hasta 45 MDa ya se encuentra disponible (Strecker y cols. 2010); sin embargo, hace falta mejorar las condiciones de la solubilización de los complejos para poder observar y caracterizar las posibles asociaciones entre supercomplejos.

Los supercomplejos mejor caracterizados son los de mitocondrias de corazón de bovino. Los supercomplejos I-IV y I-III<sub>2</sub>-IV<sub>0.4</sub> se describieron mediante electroforesis azul nativa (Schägger y Pfeiffer 2000). Se ha propuesto que todos estos supercomplejos, en realidad, forman parte del supercomplejo I-III<sub>2</sub>-IV<sub>4</sub> y que al solubilizar con digitonina se puede mantener íntegro o disociarse una(s) copia(s) del complejo IV. Esto explica la variación en el número de copias del complejo IV en los supercomplejos. Además de las asociaciones entre complejos descritas mediante geles azules nativos, en mitocondrias de mamíferos, de plantas y de algunos microorganismos, se ha caracterizado la estructura de interacciones similares I-III<sub>2</sub> (Dudkina y cols. 2005) y I-III<sub>2</sub>-IV<sub>1</sub> (Schafer y cols. 2007) mediante reconstrucción tridimensional de imágenes de microscopía electrónica. Incluso en mitocondrias de *S. cerevisiae*, que carece de complejo I, y por lo tanto de supercomplejos mayores, se han observado diferentes arreglos del supercomplejo III<sub>2</sub>-IV<sub>2</sub> (Heinemeyer y cols. 2007).

Antes de que se caracterizaran los supercomplejos en mitocondrias de *Y. lipolytica* (Guerrero-Castillo y cols. 2009) se habían realizado algunos intentos de observarlos con resultados negativos (Stroh y cols. 2004; Wittig y cols. 2007). Tales estudios sugerían que las interacciones complejo-complejo en *Y. lipolytica* debían ser más lábiles que las interacciones entre complejos de plantas o mamíferos, o que el complejo I de *Y. lipolytica* era suficientemente estable en comparación con el de la bacteria *Paracoccus denitrificans* o el de humano y no necesitaba asociarse a otros complejos para mantener estable su estructura (Kashani-Poor y cols. 2001). En nuestros primeros intentos de observar supercomplejos en mitocondrias de *Y. lipolytica*, utilizamos mitocondrias que se aislaron previamente y almacenadas a -70 °C. Con esas mitocondrias no se observaron supercomplejos, o se detectaron en muy baja cantidad. Posteriormente, utilizando mitocondrias frescas (aisladas el mismo día de la solubilización) y electroforesis azul nativa, fue posible evidenciar la presencia de supercomplejos en mitocondrias de *Y. lipolytica*. Las interacciones entre los complejos de *Y. lipolytica* deben ser menos fuertes que las interacciones en otras especies, dado que en otras especies se mantienen las interacciones aún después del ciclo de congelación (-70°C)/descongelación. Con excepción de una estructura dimérica del complejo I, los supercomplejos y las estequiometrías propuestas para los supercomplejos encontrados son muy parecidas a lo reportado anteriormente en mitocondrias de *Neurospora crassa* (Marques y cols. 2007) o posteriormente en mitocondrias de *Y. lipolytica* (Nubel y cols. 2009).

El supercomplejo I-IV es una de las estructuras encontradas que requiere particular atención dado que desde el punto de vista del transporte de electrones no tiene ninguna función. Es decir, el complejo IV no puede aceptar electrones provenientes directamente del complejo I. Aunque la diferencia de los potenciales redox estándar de los sustratos y productos es favorable, los sitios activos de ambos complejos son diferentes y por tanto el sitio activo de un complejo no puede

reconocer al sustrato o producto del otro complejo. Este supercomplejo ha sido descrito tanto en mitocondrias de mamíferos como en mitocondrias de hongos como *N. crassa* (Marques y cols. 2007). A pesar de que se le ha atribuido únicamente una función estructural, es decir, para estabilizar alguno de los dos complejos involucrados, la idea más aceptada es que el supercomplejo I-IV es un remanente de algún supercomplejo mayor que contenga también al complejo III.

Con excepción del complejo II, los complejos respiratorios convencionales I, III y IV se han encontrado como parte de asociaciones supramoleculares. Esto se puede deber a que la interacción de la succinato deshidrogenasa con los demás complejos respiratorios sea más lábil y se pierda durante la electroforesis o que este complejo forme interacciones con otras proteínas como las del ciclo del ácido cítrico (Ardehali y cols. 2004). De la misma forma, en mitocondrias de plantas y hongos que contienen componentes alternos, tampoco se han encontrado los componentes alternos asociados a los complejos convencionales. Sin embargo, aunque se ha propuesto que algunos supercomplejos detectados en *Podospora anserina* involucran a la oxidasa alterna como la oxidasa terminal (Krause y cols. 2004b), la asociación directa de la AOX con otros complejos carece de suficiente evidencia experimental. Con respecto a las NADH deshidrogenasas alternas de *S. cerevisiae* se ha demostrado, por estudios cinéticos, que existe canalización en la transferencia de electrones desde equivalentes reductores hasta el oxígeno molecular (Boumans y cols. 1998). En ese reporte mostraron, titulando con antimicina A, que tanto el ubiquinol como el citocromo *c* no son libres de difundir en una poza, sino que la cadena respiratoria se comporta como una unidad funcional. Es decir, de forma indirecta se demostró que tanto la succinato deshidrogenasa como las NADH deshidrogenasas externas e interna se encuentran asociadas a los complejos citocrómicos. Debido a que este comportamiento se describió utilizando tanto succinato como NADH interno o externo, se propuso que en presencia de un sólo sustrato, una fracción de los complejos citocrómicos estaría activa, mientras que los complejos que no interaccionan con la deshidrogenasa respectiva se encontrarían inactivos. Como parte de esta tesis se publicó el primer reporte sobre la interacción de un componente alterno (la NDH2e) con complejos respiratorios (Guerrero-Castillo y cols. 2009). Dicha interacción se propuso con base en la sensibilidad a inhibidores de la actividad de las vías respiratorias, electroforesis en gel en condiciones nativas y por cromatografías de intercambio iónico y de filtración en gel.

Estudios con mitocondrias de algunos hongos sugieren que la formación de los supercomplejos es independiente de que sean activos. En mutantes de *N. crassa* carentes de alguna subunidad del complejo I involucrada en la actividad del complejo, se han encontrado asociaciones del complejo I (disfuncional) con los complejos III y IV (Marques y cols. 2007). Asimismo, en mitocondrias de una mutante de *Podospora anserina* deficiente del complejo IV, se encontraron los

supercomplejos I<sub>2</sub>-III<sub>2</sub> y I<sub>2</sub>. Cabe mencionar que el dímero del complejo I únicamente ha sido observado en mitocondrias en donde los componentes alternos están presentes. Incluso, en mitocondrias de *Y. lipolytica* se reportó por otro grupo (Nubel y cols. 2009). En nuestros geles de segunda dimensión BN/SDS-PAGE no observamos ningún patrón de bandas que correspondiera al complejo I dimérico. En todas las repeticiones realizadas encontramos, en la misma vertical, subunidades tanto del complejo I como del complejo III, y por el peso molecular no es posible que sea un supercomplejo I<sub>2</sub>-III<sub>2</sub>.

Tomando en cuenta la fragilidad de los supercomplejos de *Y. lipolytica*, por las condiciones que se requieren para poder observarlos, resultó interesante conocer si estas asociaciones dependían de las necesidades energéticas de la célula o si su formación dependía de la fase de crecimiento de las células en cultivo. En *Podospora anserina* las asociaciones entre complejos cambian en respuesta al envejecimiento de las células (Krause y cols. 2006). Se probaron tiempos de cultivo desde 24 h, que es cuando las células se encuentran en la fase estacionaria, hasta 90 h. Sin embargo, no encontramos un patrón diferente en la formación de supercomplejos en comparación con los detectados en la fase logarítmica (resultados no mostrados).

### 8.2 Los componentes alternos

En la mayoría de los hongos y en las plantas, la presencia de oxidorreductasas alternas amplía el número de rutas que pueden tomar los electrones en la cadena respiratoria. Sin embargo, al desviar los electrones de las bombas de protones disminuye la eficiencia de la fosforilación oxidativa y, por tanto, pueden funcionar como un mecanismo desacoplante. En mitocondrias en las que coexisten NDH2 y AOX, el hecho de que ninguna transloque protones cuando realiza su función redox se podría considerar una desventaja. Energéticamente, el peor de los escenarios sería la actividad secuencial o combinada de los componentes alternos, i.e., el paso de electrones a través de la vía NDH2e-ubiquinona-AOX, la cual es considerada una ruta fútil. Por tanto, donde coexistan NDH2 y AOX, la actividad combinada de ambas debe ser altamente controlada, al menos cuando el requerimiento energético sea elevado.

Considerando a las interacciones proteína-proteína como un mecanismo de regulación del flujo de electrones por canalización, existen dos posibilidades para evitar el paso de electrones entre los dos componentes alternos:

- i) la primera, que ya ha sido sugerida en otros hongos como *Podospora anserina* (Krause y cols. 2004b), *Pichia membranifaciens* y *Debaryomyces hansenii* (Veiga y cols. 2003), es que la AOX reciba directamente los electrones del complejo I. En esta ruta, por lo menos, ya se ocupó el primer sitio de conservación de energía. Al respecto, cabe

mencionar que existe una alta correlación en las levaduras que contienen el complejo I y la oxidasa alterna. Del mismo modo, las levaduras que no presentan AOX, tampoco tienen complejo I (Kerscher y cols. 2002). En nuestro trabajo no observamos la asociación de AOX con el complejo I, ni con ningún otro complejo ni componente alterno.

- ii) Otro modo de garantizar el bombeo de protones cuando los componentes alternos están constitutivamente expresados y activos es la interacción de NDH2e con el complejo III, que a su vez se encuentra asociado al complejo IV. Así, al canalizar los electrones a los sitios de conservación de energía II y III se evita la ruta fútil.

En este trabajo se muestra evidencia de que en condiciones en que la célula tiene una alta demanda energética, necesaria para poder reproducirse, los componentes alternos se encuentran activos pero no de modo secuencial o de manera conjunta. Es decir, aunque el producto de una de las enzimas alternas sea el sustrato de la otra, éste no llega a la segunda enzima porque es canalizado hacia la vía que sí conserva la energía mediante una interacción entre la NDH2e con el complejo IV. En cambio, cuando la demanda energética disminuye (el potencial transmembranal es elevado, lo que desacelera el transporte de electrones y aumenta el riesgo de generar especies reactivas), la actividad combinada de los componentes alternos se hace posible debido a que una fracción de NDH2e pierde la asociación con la vía citocrómica.

La interacción entre NDH2e y los complejos de la vía citocrómica fue inicialmente sugerida por la inhibición completa por cianuro de la respiración dependiente del NADH externo, como si no estuviera presente la oxidasa alterna. Además, el propilgalato prácticamente no inhibió el consumo de oxígeno o tuvo un efecto mínimo. En las mismas muestras de mitocondrias, pero energizadas con sustratos que generan NADH matricial, tanto el cianuro como el propilgalato presentaron efectos inhibitorios parciales. Esto indica que, en mitocondrias de *Y. lipolytica* aisladas en la fase logarítmica, la oxidasa alterna es activa, mas no oxida el ubiquinol que proviene de la NDH2e. Estos resultados implican que el ubiquinol generado por la NDH2e no presenta un comportamiento de poza, sino que hay alguna(s) molécula(s) de ubiquinona atrapada(s) entre la NDH2e y el supercomplejo III<sub>2</sub>-IV<sub>1,2</sub>. En cambio, el ubiquinol producido por el complejo I puede ser oxidado por el complejo III o por la AOX. De igual manera, el ubiquinol producido por la NDH2, cuando ésta se encuentra en el lado matricial (NDH2i, en la mutante  $\Delta$ ubm), presenta un comportamiento de poza, ya que los electrones son capaces de seguir ambas vías respiratorias. Esto sugiere que la interacción entre la NDH2 y la vía citocrómica ocurre sólo cuando la deshidrogenasa alterna se encuentra en el lado intermembranal. En contraste con *Y. lipolytica*, que no contiene NADH

deshidrogenasas internas, el hongo filamentoso, *Neurospora crassa*, contiene tanto el complejo I como una NDH2i capaz de oxidar el NADH matricial. El papel fisiológico de esta enzima cuando se encuentra orientada hacia la matriz es diferente que cuando se localiza hacia el espacio intermembranal. Por ejemplo, en *N. crassa*, la NDH2i se expresa más en la fase logarítmica temprana y es utilizada preferencialmente en comparación con el complejo I (Schwitzgubel y Palmer 1982). Esto podría responder a que, a pesar de que la NDH2i produce una relación ATP/O menor, se necesita mucho menos energía para sintetizarla en comparación con el complejo I, formado por múltiples subunidades (Marques y cols. 2005).

En la fase estacionaria de crecimiento no se observó canalización de los electrones del NADH externo hacia la vía citocrómica. Esto concuerda con un reporte previo en el que, utilizando mitocondrias de *Y. lipolytica* en presencia de antimicina A, los electrones de la oxidación de NADH externo podían ser aceptados por la vía alterna (Medentsev y cols. 2002). A pesar de que los resultados obtenidos son similares, nuestra interpretación es distinta a la del grupo de Akimenko y colaboradores. Ellos sugieren que los electrones llegan a la oxidasa alterna únicamente cuando la vía citocrómica está bloqueada. En cambio, nosotros hemos observado que la vía alterna tiene cierta dependencia por el sustrato oxidable utilizado y sobretodo por su localización. Es decir, los electrones provenientes del NADH externo no siguen la misma ruta que cuando el NADH es interno. Además, en presencia de piruvato-malato como sustratos, la adición de propilgalato inhibió parcialmente la respiración, lo cual indica que la oxidasa alterna se encuentra activa independientemente de la actividad de la vía citocrómica. A diferencia de las oxidasas alternas de los hongos (Umbach y Siedow 2000), en las plantas los  $\alpha$ -cetoácidos incrementan la actividad de la oxidasa alterna (Umbach y cols. 1994; Millar y cols. 1996). El piruvato y otros cetoácidos actúan en un residuo de cisteína (C127 en *Arabidopsis thaliana*), localizado a un lado de la región embebida en la membrana (Zhu y cols. 2010). Este residuo no está presente en *Y. lipolytica* y por lo tanto los cetoácidos no activan a su oxidasa alterna. La falta de activación por cetoácidos se ha observado también en mitocondrias de *Acanthamoeba castellanii* (Djajanegara y cols. 1999). En presencia de  $\alpha$ -cetoácidos se ha propuesto que la AOX de plantas actúa paralelamente a la vía citocrómica. Es decir, la oxidasa alterna puede competir por los electrones con el complejo III (Hoefnagel y cols. 1995), disminuyendo la relación ATP/O. Esto descarta la propuesta de que funcionaba como una válvula de escape sólo cuando la vía citocrómica estaba saturada.

La asociación de la NDH2e con la vía citocrómica se detectó mediante las tinciones de actividad posteriores a la electroforesis clara nativa. En estos geles se encontró una banda que contenía actividad de NADH deshidrogenasa, que no correspondía al complejo I, y de citocromo *c* oxidasa. Incluso, cuando se cargó el carril completo del gel nativo sobre un gel de segunda

dimensión desnaturalizante, con los anticuerpos respectivos, se encontró una comigración de la NDH2e con el complejo IV. Además de la electroforesis nativa se utilizó otra técnica de separación de proteínas para corroborar la interacción. La co-migración de la NDH2e con el complejo IV en una columna de intercambio catiónico, a pesar de sus diferentes puntos isoeléctricos, de nuevo sugirió que estas proteínas se encuentran asociadas. El punto isoeléctrico calculado de la NDH2e tiene un valor de 8.45 para la proteína madura, sin su presecuencia mitocondrial, mientras que el de la citocromo *c* oxidasa está en un valor entre 5.4 y 7 (Schägger y cols. 1994; Bernroitner y cols. 2009). La diferencia en estos valores no permitiría que estas proteínas co-migraran en la columna de intercambio catiónico a menos que interaccionaran entre sí. Con respecto a la NDH2i, el pI calculado para la versión interna de la deshidrogenasa es de 6.0; disminuye debido a que para su redireccionamiento al lado matricial se eliminaron los primeros 101 residuos (Kerscher y cols. 2001b). El hecho de que tenga un pI menor permite que la NDH2i migre en un gel claro nativo ajustándose mejor a una curva de masa molecular contra distancia de migración en el gel. En cambio, la migración de la deshidrogenasa externa (pI 8.45) en un gel claro nativo, cuando migra separada de la citocromo *c* oxidasa, no se ajusta a dicha curva. Con base en la separación de las proteínas por electroforesis nativa, en la columna de intercambio catiónico se propuso la interacción de NDH2e con el complejo IV que, mediante geles azules, se demostró que interacciona con el complejo III y forma un supercomplejo III<sub>2</sub>-IV<sub>2</sub>. La interacción III<sub>2</sub>-IV<sub>2</sub> se había observado previamente en mitocondrias de *S. cerevisiae* mediante electroforesis nativa y se propuso el arreglo tridimensional por reconstrucción de imágenes (Heinemeyer y cols. 2007). La interacción de la NDH2e con este supercomplejo probablemente ocurre en la interfase de los complejos III y IV, de modo que los sitios activos de la deshidrogenasa y del complejo III se encuentren cara a cara.

Inicialmente, en este trabajo se estudió la participación de los componentes alternos en el transporte de electrones y en su asociación con los complejos respiratorios en la fase logarítmica de crecimiento. Sin embargo, en la fase estacionaria, al disminuir el requerimiento de ATP y aumentar el riesgo de generar especies reactivas de oxígeno, sería posible desacoplar reguladamente la fosforilación oxidativa por medio de los componentes alternos. Otros mecanismos propuestos para desacoplar la fosforilación oxidativa de manera regulada son el canal inespecífico mitocondrial (Manon y cols. 1998; Crompton y cols. 1999; Gutiérrez-Aguilar y cols. 2007), que en *Y. lipolytica* parece no estar activo (datos no publicados), y la proteína desacoplante. En *Y. lipolytica* se encontró un transportador de oxaloacetato que presenta actividad protonofórica en respuesta a un incremento del potencial transmembranal y que es regulada por nucleótidos y ácidos grasos como la UCP típica (Luévano-Martínez y cols. 2012).

Dependiendo de la fase de crecimiento y de los requerimientos metabólicos, las necesidades energéticas de las células de levaduras pueden presentar grandes variaciones (Werner-Washburne y cols. 1993). La sobreproducción de ROS es el principal riesgo cuando la velocidad de la cadena respiratoria disminuye en respuesta a una menor necesidad de ATP (Koshkin y cols. 2003; Tudella y cols. 2004). En estas condiciones, un incremento en la relación  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  en el espacio citoplasmático sería desfavorable para las vías catabólicas. La ruta de transporte de electrones desacoplada, NDH2e-ubiquinona-AOX, que no se observó durante la fase logarítmica, fue posible debido a la actividad combinada de los componentes alternos en la fase estacionaria. En esta fase de crecimiento, el cianuro no inhibió completamente la respiración dependiente de NADH externo y el propilgalato presentó un efecto mayor en comparación con la fase logarítmica. Además, la disminución del control respiratorio resultó ser dependiente del sustrato. En las mitocondrias energizadas con piruvato-malato no se obtuvieron cambios en los valores de CR entre fases de crecimiento, mientras que con NADH externo parecían estar desacopladas.

El cambio en los patrones de inhibición del consumo de oxígeno y la pérdida de la canalización de electrones hacia la vía citocrómica en la fase estacionaria se puede explicar por las diferencias entre fases de crecimiento de la asociación de la NDH2e con los complejos de la vía citocrómica. Sin embargo, con las evidencias obtenidas hasta este punto, no es posible descartar que exista algún otro tipo de modificación en las enzimas que permita su disociación. En la fase estacionaria, una población de NDH2e se encontró no asociada al complejo IV, es decir, migró de forma libre en la columna de intercambio iónico. Se desconoce la relación estequiométrica entre la NDH2e y los complejos de la vía citocrómica, pero la liberación de la NDH2e del supercomplejo  $\text{III}_2\text{-IV}_4$  puede ocurrir porque la NDH2e no tenga en dónde interaccionar, lo cual se haría posible mediante un aumento en la relación NDH2e:III-IV. El aumento en esta relación se puede dar por un incremento en la cantidad de NDH2e o por una disminución de los complejos III y IV. Los resultados apuntaron a que ocurren ambos cambios. Así, la población libre de NDH2e es capaz de reducir una poza de ubiquinona que puede seguir ambas vías respiratorias. El flujo de electrones entre los componentes alternos, i.e., la vía NDH2e-ubiquinona-AOX funcionaría independientemente del  $\Delta\Psi$ , lo cual previene la formación de ROS y restablece el balance  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  en el citoplasma.

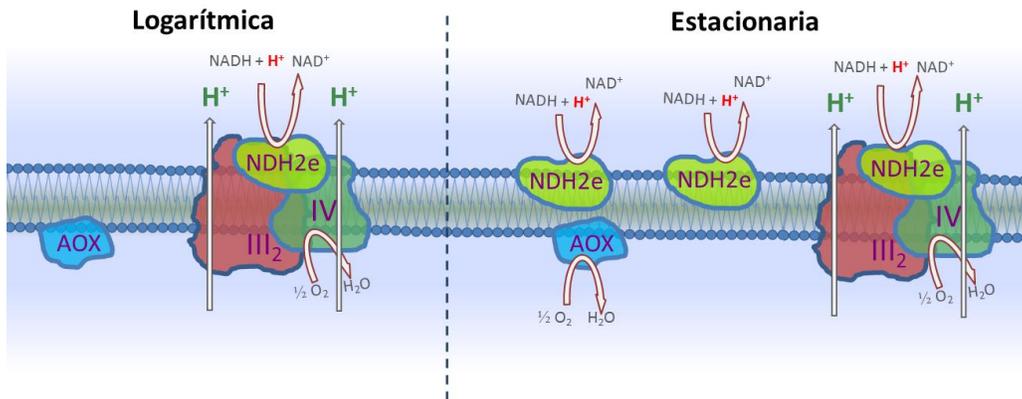
Anteriormente, en organismos que presentan oxidasas alternas, se había sugerido que las diferentes vías respiratorias pueden encenderse o apagarse por cambios en las asociaciones entre complejos, es decir, las interacciones que tienen como oxidasa terminal a la oxidasa alterna o a la citocromo oxidasa pueden ser dinámicas. Estos cambios en las asociaciones de componentes alternos con complejos respiratorios clásicos se presentan en diferentes estadios de crecimiento en

mitocondrias de *Podospora anserina* (Krause y cols. 2006). A través de este mecanismo, el bombeo de protones se ajusta para cumplir las necesidades energéticas de la célula o a disminuir la formación de ROS. Incluso en bacterias, en donde el transporte de electrones involucra mucho más elementos, la contribución de diferentes deshidrogenasas y oxidasas terminales depende de la fuente de carbono (Barros y cols. 2004; Megehee y Lundrigan 2007). En otros organismos eucariontes, no se sabe sobre la contribución de deshidrogenasas alternas pero existe evidencia de que la oxidasa alterna se activa parcialmente en la fase estacionaria (Umbach y Siedow 2000; Morales y cols. 2006), y desacopla la síntesis de ATP de la respiración, lo que acelera el consumo de oxígeno y previene la sobreproducción de ROS.

9. CONCLUSIONES

- En *Y. lipolytica* en fase logarítmica, la NDH2e canaliza sus electrones hacia la vía citocrómica mediante interacción con supercomplejos que contienen a los complejos III y IV.
- En la fase estacionaria de crecimiento, la relación NDH2e:vía citocrómica aumenta, los sitios de unión se saturan y una fracción de NDH2e queda libre.
- La fracción libre es capaz de reducir una poza deslocalizada de ubiquinona que puede seguir ambas vías respiratorias.
- Al activarse la vía NDH2e-AOX se desacopla la fosforilación oxidativa y se previene la formación de especies reactivas de oxígeno.

El cambio de la fase logarítmica a la estacionaria genera que las células de *Y. lipolytica* aumenten la cantidad de NDH2e y disminuyan la de citocromo *c* oxidasa. El cambio en la relación estequiométrica de estas proteínas resulta en que la NDH2e se libere de la vía citocrómica y se pierda la canalización de electrones (figura 30). En esta condición el producto de la NDH2e puede ser sustrato de la oxidasa alterna lo cual genera un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, puede regular el estado redox citoplasmático y previene la formación mitocondrial de ROS.



**Figura 30. Modelo de la actividad secuencial de los componentes alternos.** Durante la fase logarítmica de crecimiento, la NDH2e se encuentra asociada al complejo IV, el cual a su vez interactúa con el complejo III. Esto permite la canalización de los electrones entre la NDH2e y la vía citocrómica. En cambio en la fase estacionaria, el exceso de NDH2e que no interactúa con la vía citocrómica reduce una poza de ubiquinona con diferente accesibilidad, que puede ser oxidada por la vía alterna.

### 10. PERSPECTIVAS

Comparar entre fases de crecimiento el efecto de diferentes sustratos respiratorios sobre la síntesis de ATP. Para ello se puede cuantificar la síntesis de ATP en mitocondrias aisladas mediante la técnica descrita en la metodología, o de preferencia se podría utilizar la técnica con el isótopo fósforo-31.

Determinar la expresión de la isoforma 2 de la oxidasa alterna (AOX2) en ambas fases de crecimiento. Dado que hasta ahora no es posible diferenciar entre las actividades de las dos isoformas, la cuantificación de la expresión génica proveería evidencias indirectas de la actividad de la isoforma 2.

Identificar a la(s) subunidad(es) de los complejos de la vía citocrómica involucradas en la interacción con la NDH2e. A partir de las fracciones de la columna de DEAE-Biogel A es posible concentrar la proteína y separar mediante filtración en gel. Posteriormente, la fracción enriquecida con las enzimas que forman el supercomplejo se incubaba en presencia de entrecruzadores y se realizan las pruebas para identificar a las proteínas que interaccionan entre sí.

Conocer el mecanismo de regulación de la expresión y los factores involucrados en la disminución de la cantidad de COX y en el aumento de NDH2e en la fase estacionaria.

En la fase estacionaria, identificar si existe alguna otra modificación, además del cambio en la relación NDH2e:COX, que permita la disociación de NDH2e del complejo IV.

Crear a las células en fase logarítmica en condiciones de estrés oxidativo o en presencia de inhibidores de la vía citocrómica y evaluar la contribución a la respiración de las dos isoformas de la oxidasa alterna.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Abrahams, J. P., Leslie, A. G., Lutter, R. y Walker, J. E. (1994). Structure at 2.8 Å resolution of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370**(6491): 621-628.
- Acin-Perez, R., Bayona-Bafaluy, M. P., Fernandez-Silva, P., Moreno-Loshuertos, R., Perez-Martos, A., Bruno, C., Moraes, C. T. y Enriquez, J. A. (2004). Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria. *Mol Cell* **13**(6): 805-815.
- Acin-Perez, R., Fernandez-Silva, P., Peleato, M. L., Perez-Martos, A. y Enriquez, J. A. (2008). Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell* **32**(4): 529-539.
- Akerman, K. E. y Wikstrom, M. K. (1976). Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett* **68**(2): 191-197.
- Akimenko, V. K., Golovchenko, N. P. y Medentsev, A. G. (1979). The absence of energy conservation coupled with electron transfer via the alternative pathway in cyanide-resistant yeast mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **545**(3): 398-403.
- Akimenko, V. K., Medentsev, A. G. y Golovchenko, N. P. (1974). Some properties of *Candida lipolytica* yeast mitochondria. *FEBS Lett* **45**(1): 22-25.
- Albury, M. S., Elliott, C. y Moore, A. L. (2010). Ubiquinol-binding site in the alternative oxidase: mutagenesis reveals features important for substrate binding and inhibition. *Biochim Biophys Acta* **1797**(12): 1933-1939.
- Andersson, M. E. y Nordlund, P. (1999). A revised model of the active site of alternative oxidase. *FEBS Lett* **449**(1): 17-22.
- Ardehali, H., Chen, Z., Ko, Y., Mejia-Alvarez, R. y Marban, E. (2004). Multiprotein complex containing succinate dehydrogenase confers mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(32): 11880-11885.
- Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R. A. y Schagger, H. (1998). Yeast mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *EMBO J* **17**(24): 7170-7178.
- Arselin, G., Giraud, M. F., Dautant, A., Vaillier, J., Brethes, D., Coulary-Salin, B., Schaeffer, J. y Velours, J. (2003). The GxxxG motif of the transmembrane domain of subunit e is involved in the dimerization/oligomerization of the yeast ATP synthase complex in the mitochondrial membrane. *Eur J Biochem* **270**(8): 1875-1884.
- Arzumanov, T. E., Sidorov, I. A., Shishkanova, N. V. y Finogenova, T. V. (2000). Mathematical modeling of citric acid production by repeated batch culture. *Enzyme Microb Technol* **26**(9-10): 826-833.
- Attea, A., Dreyfus, G. y Gonzalez-Halphen, D. (1997). Characterization of the alpha and beta-subunits of the F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase from the alga *Polytomella* spp., a colorless relative of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta* **1320**(3): 275-284.
- Azzolin, L., von Stockum, S., Basso, E., Petronilli, V., Forte, M. A. y Bernardi, P. (2010). The mitochondrial permeability transition from yeast to mammals. *FEBS Lett* **584**(12): 2504-2509.
- Azzone, G. F., Zoratti, M., Petronilli, V. y Pietrobon, D. (1985). The stoichiometry of H<sup>+</sup> pumping in cytochrome oxidase and the mechanism of uncoupling. *J Inorg Biochem* **23**(3-4): 349-356.

- Bahr, J. T. y Bonner, W. D., Jr. (1973a). Cyanide-insensitive respiration. I. The steady states of skunk cabbage spadix and bean hypocotyl mitochondria. *J Biol Chem* **248**(10): 3441-3445.
- Bahr, J. T. y Bonner, W. D., Jr. (1973b). Cyanide-insensitive respiration. II. Control of the alternate pathway. *J Biol Chem* **248**(10): 3446-3450.
- Baines, C. P., Kaiser, R. A., Sheiko, T., Craigen, W. J. y Molkenin, J. D. (2007). Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol* **9**(5): 550-555.
- Baird, S. K., Kurz, T. y Brunk, U. T. (2006). Metallothionein protects against oxidative stress-induced lysosomal destabilization. *Biochem J* **394**(Pt 1): 275-283.
- Barros, M. H., Bandy, B., Tahara, E. B. y Kowaltowski, A. J. (2004). Higher respiratory activity decreases mitochondrial reactive oxygen release and increases life span in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **279**(48): 49883-49888.
- Barth, G. y Gaillardin, C. (1997). Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol Rev* **19**(4): 219-237.
- Bendall, D. S. y Bonner, W. D. (1971). Cyanide-insensitive Respiration in Plant Mitochondria. *Plant Physiol* **47**(2): 236-245.
- Berden, J. A. y Slater, E. C. (1970). The reaction of antimycin with a cytochrome b preparation active in reconstitution of the respiratory chain. *Biochim Biophys Acta* **216**(2): 237-249.
- Bernardi, P. y Petronilli, V. (1996). The permeability transition pore as a mitochondrial calcium release channel: a critical appraisal. *J Bioenerg Biomembr* **28**(2): 131-138.
- Bernroither, M., Tangl, D., Lucini, C., Furtmuller, P. G., Peschek, G. A. y Obinger, C. (2009). Cyanobacterial cytochrome c(M): probing its role as electron donor for Cu(A) of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta* **1787**(3): 135-143.
- Bianchet, M. A., Hullihen, J., Pedersen, P. L. y Amzel, L. M. (1998). The 2.8-Å structure of rat liver F1-ATPase: configuration of a critical intermediate in ATP synthesis/hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(19): 11065-11070.
- Bianchi, C., Genova, M. L., Parenti Castelli, G. y Lenaz, G. (2004). The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly: kinetic evidence using flux control analysis. *J Biol Chem* **279**(35): 36562-36569.
- Bjellqvist, B., Hughes, G. J., Pasquali, C., Paquet, N., Ravier, F., Sanchez, J. C., Frutiger, S. y Hochstrasser, D. (1993). The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis* **14**(10): 1023-1031.
- Bjorklof, K., Zickermann, V. y Finel, M. (2000). Purification of the 45 kDa, membrane bound NADH dehydrogenase of *Escherichia coli* (NDH-2) and analysis of its interaction with ubiquinone analogues. *FEBS Lett* **467**(1): 105-110.
- Boumans, H., Grivell, L. A. y Berden, J. A. (1998). The respiratory chain in yeast behaves as a single functional unit. *J Biol Chem* **273**(9): 4872-4877.
- Brandt, U. (2006). Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I). *Annu Rev Biochem* **75**: 69-92.
- Brandt, U. (2011). A two-state stabilization-change mechanism for proton-pumping complex I. *Biochim Biophys Acta* **1807**(10): 1364-1369.
- Bridges, H. R., Birrell, J. A. y Hirst, J. (2011). The mitochondrial-encoded subunits of respiratory complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase): identifying residues important in mechanism and disease. *Biochem Soc Trans* **39**(3): 799-806.

- Brunner, S., Everard-Gigot, V. y Stuart, R. A. (2002). Structure of the yeast F1Fo-ATP synthase forms homodimers. *J Biol Chem* **277**(50): 48484-48489.
- Cabrera-Orefice, A., Guerrero-Castillo, S., Luevano-Martinez, L. A., Pena, A. y Uribe-Carvajal, S. (2010). Mitochondria from the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* (halophilic organelles?). *J Bioenerg Biomembr* **42**(1): 11-19.
- Cano-Estrada, A., Vazquez-Acevedo, M., Villavicencio-Queijeiro, A., Figueroa-Martinez, F., Miranda-Astudillo, H., Cordeiro, Y., Mignaco, J. A., Foguel, D., Cardol, P., Lapaille, M., Remacle, C., Wilkens, S. y Gonzalez-Halphen, D. (2010). Subunit-subunit interactions and overall topology of the dimeric mitochondrial ATP synthase of *Polytomella* sp. *Biochim Biophys Acta* **1797**(8): 1439-1448.
- Carre, J. E., Affourtit, C. y Moore, A. L. (2010). Interaction of purified alternative oxidase from thermogenic *Arum maculatum* with pyruvate. *FEBS Lett*.
- Casaregola, S., Feynerol, C., Diez, M., Fournier, P. y Gaillardin, C. (1997). Genomic organization of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Chromosoma* **106**(6): 380-390.
- Cavalheiro, R. A., Fortes, F., Borecky, J., Faustini, V. C., Schreiber, A. Z. y Vercesi, A. E. (2004). Respiration, oxidative phosphorylation, and uncoupling protein in *Candida albicans*. *Braz J Med Biol Res* **37**(10): 1455-1461.
- Clifton, R., Lister, R., Parker, K. L., Sappl, P. G., Elhafez, D., Millar, A. H., Day, D. A. y Whelan, J. (2005). Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **58**(2): 193-212.
- Couoh-Cardel, S. J., Uribe-Carvajal, S., Wilkens, S. y Garcia-Trejo, J. J. (2010). Structure of dimeric F1F0-ATP synthase. *J Biol Chem* **285**(47): 36447-36455.
- Covian, R. y Trumpower, B. L. (2005). Rapid electron transfer between monomers when the cytochrome bc1 complex dimer is reduced through center N. *J Biol Chem* **280**(24): 22732-22740.
- Crompton, M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* **341** ( Pt 2): 233-249.
- Crompton, M., Virji, S., Doyle, V., Johnson, N. y Ward, J. M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore. *Biochem Soc Symp* **66**: 167-179.
- Czarna, M. y Jarmuszkiewicz, W. (2005). Activation of alternative oxidase and uncoupling protein lowers hydrogen peroxide formation in amoeba *Acanthamoeba castellanii* mitochondria. *FEBS Lett* **579**(14): 3136-3140.
- Chen, Q., Vazquez, E. J., Moghaddas, S., Hoppel, C. L. y Lesnefsky, E. J. (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* **278**(38): 36027-36031.
- Chen, Y. C., Taylor, E. B., Dephore, N., Heo, J. M., Tonhato, A., Papandreou, I., Nath, N., Denko, N. C., Gygi, S. P. y Rutter, J. (2012). Identification of a protein mediating respiratory supercomplex stability. *Cell Metab* **15**(3): 348-360.
- Cheng, S., Clancy, C. J., Zhang, Z., Hao, B., Wang, W., Iczkowski, K. A., Pfaller, M. A. y Nguyen, M. H. (2007). Uncoupling of oxidative phosphorylation enables *Candida albicans* to resist killing by phagocytes and persist in tissue. *Cell Microbiol* **9**(2): 492-501.
- Chernyavskaya, O. G., Shishkanova, N. V., Il'chenko, A. P. y Finogenova, T. V. (2000). Synthesis of alpha-ketoglutaric acid by *Yarrowia lipolytica* yeast grown on ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol* **53**(2): 152-158.

- Davidow, L. S., Kaczmarek, F. S., DeZeeuw, J. R., Conlon, S. W., Lauth, M. R., Pereira, D. A. y Franke, A. E. (1987a). The *Yarrowia lipolytica* LEU2 gene. *Curr Genet* **11**(5): 377-383.
- Davidow, L. S., O'Donnell, M. M., Kaczmarek, F. S., Pereira, D. A., DeZeeuw, J. R. y Franke, A. E. (1987b). Cloning and sequencing of the alkaline extracellular protease gene of *Yarrowia lipolytica*. *J Bacteriol* **169**(10): 4621-4629.
- Day, D. A., Krab, K., Lambers, H., Moore, A. L., Siedow, J. N., Wagner, A. M. y Wiskich, J. T. (1996). The Cyanide-Resistant Oxidase: To Inhibit or Not to Inhibit, That Is the Question. *Plant Physiol* **110**(1): 1-2.
- Day, D. A., Millar, A. H., Wiskich, J. T. y Whelan, J. (1994). Regulation of Alternative Oxidase Activity by Pyruvate in Soybean Mitochondria. *Plant Physiol* **106**(4): 1421-1427.
- Day, D. A. y Wiskich, J. T. (1995). Regulation of alternative oxidase activity in higher plants. *J Bioenerg Biomembr* **27**(4): 379-385.
- de Vries, S. y Grivell, L. A. (1988). Purification and characterization of a rotenone-insensitive NADH:Q6 oxidoreductase from mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **176**(2): 377-384.
- de Vries, S. y Marres, C. A. (1987). The mitochondrial respiratory chain of yeast. Structure and biosynthesis and the role in cellular metabolism. *Biochim Biophys Acta* **895**(3): 205-239.
- De Vries, S., Van Witzenburg, R., Grivell, L. A. y Marres, C. A. (1992). Primary structure and import pathway of the rotenone-insensitive NADH-ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **203**(3): 587-592.
- Djajanegara, I., Holtzapffel, R., Finnegan, P. M., Hoefnagel, M. H., Berthold, D. A., Wiskich, J. T. y Day, D. A. (1999). A single amino acid change in the plant alternative oxidase alters the specificity of organic acid activation. *FEBS Lett* **454**(3): 220-224.
- Dröse, S. y Brandt, U. (2008). The mechanism of mitochondrial superoxide production by the cytochrome bc1 complex. *J Biol Chem* **283**(31): 21649-21654.
- Dröse, S. y Brandt, U. (2012). Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Adv Exp Med Biol* **748**: 145-169.
- Dröse, S., Galkin, A. y Brandt, U. (2009). Chapter 26 Measurement of superoxide formation by mitochondrial complex I of *Yarrowia lipolytica*. *Methods Enzymol* **456**: 475-490.
- Dröse, S., Krack, S., Sokolova, L., Zwicker, K., Barth, H. D., Morgner, N., Heide, H., Steger, M., Nubel, E., Zickermann, V., Kerscher, S., Brutschy, B., Radermacher, M. y Brandt, U. (2011). Functional dissection of the proton pumping modules of mitochondrial complex I. *PLoS Biol* **9**(8): e1001128.
- Duarte, M., Peters, M., Schulte, U. y Videira, A. (2003). The internal alternative NADH dehydrogenase of *Neurospora crassa* mitochondria. *Biochem J* **371**(Pt 3): 1005-1011.
- Dudkina, N. V., Eubel, H., Keegstra, W., Boekema, E. J. y Braun, H. P. (2005). Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(9): 3225-3229.
- Dudkina, N. V., Heinemeyer, J., Sunderhaus, S., Boekema, E. J. y Braun, H. P. (2006). Respiratory chain supercomplexes in the plant mitochondrial membrane. *Trends Plant Sci* **11**(5): 232-240.

- Dudkina, N. V., Kouril, R., Peters, K., Braun, H. P. y Boekema, E. J. (2010). Structure and function of mitochondrial supercomplexes. *Biochim Biophys Acta* **1797**(6-7): 664-670.
- Echtay, K. S., Roussel, D., St-Pierre, J., Jekabsons, M. B., Cadenas, S., Stuart, J. A., Harper, J. A., Roebuck, S. J., Morrison, A., Pickering, S., Clapham, J. C. y Brand, M. D. (2002). Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* **415**(6867): 96-99.
- Efremov, R. G., Baradaran, R. y Sazanov, L. A. (2010). The architecture of respiratory complex I. *Nature* **465**(7297): 441-445.
- Efremov, R. G. y Sazanov, L. A. (2011a). Respiratory complex I: 'steam engine' of the cell? *Curr Opin Struct Biol* **21**(4): 532-540.
- Efremov, R. G. y Sazanov, L. A. (2011b). Structure of the membrane domain of respiratory complex I. *Nature* **476**(7361): 414-420.
- Eschemann, A., Galkin, A., Oettmeier, W., Brandt, U. y Kerscher, S. (2005). 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* **280**(5): 3138-3142.
- Estabrook, R. W. (1967). Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP : O ratios. *Methods in Enzymology* **10**: 41-47.
- Eubel, H., Jansch, L. y Braun, H. P. (2003). New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II. *Plant Physiol* **133**(1): 274-286.
- Fisher, N., Bray, P. G., Ward, S. A. y Biagini, G. A. (2007). The malaria parasite type II NADH:quinone oxidoreductase: an alternative enzyme for an alternative lifestyle. *Trends Parasitol* **23**(7): 305-310.
- Fisher, N., Warman, A. J., Ward, S. A. y Biagini, G. A. (2009). Chapter 17 Type II NADH:quinone oxidoreductases of *Plasmodium falciparum* and *Mycobacterium tuberculosis* kinetic and high-throughput assays. *Methods Enzymol* **456**: 303-320.
- Forman, H. J., Maiorino, M. y Ursini, F. (2010). Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry* **49**(5): 835-842.
- Frank, V. y Kadenbach, B. (1996). Regulation of the H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> stoichiometry of cytochrome c oxidase from bovine heart by intramitochondrial ATP/ADP ratios. *FEBS Lett* **382**(1-2): 121-124.
- Gaillardin, C. y Ribet, A. M. (1987). LEU2 directed expression of beta-galactosidase activity and phleomycin resistance in *Yarrowia lipolytica*. *Curr Genet* **11**(5): 369-375.
- Galkin, A. y Brandt, U. (2005). Superoxide radical formation by pure complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) from *Yarrowia lipolytica*. *J Biol Chem* **280**(34): 30129-30135.
- Gardner, P. R., Nguyen, D. D. y White, C. W. (1994). Aconitase is a sensitive and critical target of oxygen poisoning in cultured mammalian cells and in rat lungs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(25): 12248-12252.
- Garofano, A., Eschemann, A., Brandt, U. y Kerscher, S. (2006). Substrate-inducible versions of internal alternative NADH: ubiquinone oxidoreductase from *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* **23**(16): 1129-1136.
- Gelhay, E., Rouhier, N., Gerard, J., Jolivet, Y., Gualberto, J., Navrot, N., Ohlsson, P. I., Wingsle, G., Hirasawa, M., Knaff, D. B., Wang, H., Dizengremel, P., Meyer, Y. y

- Jacquot, J. P. (2004). A specific form of thioredoxin h occurs in plant mitochondria and regulates the alternative oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(40): 14545-14550.
- Gincel, D., Zaid, H. y Shoshan-Barmatz, V. (2001). Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. *Biochem J* **358**(Pt 1): 147-155.
- Goglia, F. y Skulachev, V. P. (2003). A function for novel uncoupling proteins: antioxidant defense of mitochondrial matrix by translocating fatty acid peroxides from the inner to the outer membrane leaflet. *FASEB J* **17**(12): 1585-1591.
- González-Halphen, D., Ghelli, A., Iommarini, L., Carelli, V. y Esposti, M. D. (2011). Mitochondrial complex I and cell death: a semi-automatic shotgun model. *Cell Death Dis* **2**: e222.
- Gornall, A. G., Bardawill, C. J. y David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* **177**(2): 751-766.
- Gresser, M. J., Myers, J. A. y Boyer, P. D. (1982). Catalytic site cooperativity of beef heart mitochondrial F1 adenosine triphosphatase. Correlations of initial velocity, bound intermediate, and oxygen exchange measurements with an alternating three-site model. *J Biol Chem* **257**(20): 12030-12038.
- Guerin, B., Bunoust, O., Rouqueys, V. y Rigoulet, M. (1994). ATP-induced unspecific channel in yeast mitochondria. *J Biol Chem* **269**(41): 25406-25410.
- Guerin, B., Labbe, P. y Somlo, M. (1979). Preparation of yeast mitochondria (*Saccharomyces cerevisiae*) with good P/O and respiratory control ratios. *Methods Enzymol* **55**: 149-159.
- Guerrero-Castillo, S., Araiza-Olivera, D., Cabrera-Orefice, A., Espinasa-Jaramillo, J., Gutiérrez-Aguilar, M., Luévano-Martínez, L. A., Zepeda-Bastida, A. y Uribe-Carvajal, S. (2011). Physiological uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation. Studies in different yeast species. *J Bioenerg Biomembr*.
- Guerrero-Castillo, S., Vázquez-Acevedo, M., González-Halphen, D. y Uribe-Carvajal, S. (2009). In *Yarrowia lipolytica* mitochondria, the alternative NADH dehydrogenase interacts specifically with the cytochrome complexes of the classic respiratory pathway. *Biochim Biophys Acta* **1787**(2): 75-85.
- Guo, J. y Lemire, B. D. (2003). The ubiquinone-binding site of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate-ubiquinone oxidoreductase is a source of superoxide. *J Biol Chem* **278**(48): 47629-47635.
- Gutiérrez-Aguilar, M., Pérez-Martínez, X., Chávez, E. y Uribe-Carvajal, S. (2010). In *Saccharomyces cerevisiae*, the phosphate carrier is a component of the mitochondrial unselective channel. *Arch Biochem Biophys* **494**(2): 184-191.
- Gutiérrez-Aguilar, M., Pérez-Vázquez, V., Bunoust, O., Manon, S., Rigoulet, M. y Uribe, S. (2007). In yeast, Ca<sup>2+</sup> and octylguanidine interact with porin (VDAC) preventing the mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* **1767**(10): 1245-1251.
- Hackenbrock, C. R., Chazotte, B. y Gupte, S. S. (1986). The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J Bioenerg Biomembr* **18**(5): 331-368.
- Halliwell, B. y Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* **142**(2): 231-255.

- Hanqing, F., Kun, S., Mingquan, L., Hongyu, L., Xin, L., Yan, L. y Yifeng, W. (2010). The expression, function and regulation of mitochondrial alternative oxidase under biotic stresses. *Mol Plant Pathol* **11**(3): 429-440.
- Hatefi, Y. (1985). The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem* **54**: 1015-1069.
- Hatefi, Y., Haavik, A. G., Fowler, L. R. y Griffiths, D. E. (1962a). Studies on the electron transfer system. XLII. Reconstitution of the electron transfer system. *J Biol Chem* **237**: 2661-2669.
- Hatefi, Y., Haavik, A. G. y Griffiths, D. E. (1962b). Studies on the electron transfer system. XLI. Reduced coenzyme Q (QH<sub>2</sub>)-cytochrome c reductase. *J Biol Chem* **237**: 1681-1685.
- Hederstedt, L., Maguire, J. J., Waring, A. J. y Ohnishi, T. (1985). Characterization by electron paramagnetic resonance and studies on subunit location and assembly of the iron-sulfur clusters of *Bacillus subtilis* succinate dehydrogenase. *J Biol Chem* **260**(9): 5554-5562.
- Heinemeyer, J., Braun, H. P., Boekema, E. J. y Kouril, R. (2007). A structural model of the cytochrome C reductase/oxidase supercomplex from yeast mitochondria. *J Biol Chem* **282**(16): 12240-12248.
- Hinchliffe, P. y Sazanov, L. A. (2005). Organization of iron-sulfur clusters in respiratory complex I. *Science* **309**(5735): 771-774.
- Hiramatsu, T., Kodama, K., Kuroda, T., Mizushima, T. y Tsuchiya, T. (1998). A putative multisubunit Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **180**(24): 6642-6648.
- Hirosawa, M., Hoshida, M., Ishikawa, M. y Toya, T. (1993). MASCOT: multiple alignment system for protein sequences based on three-way dynamic programming. *Comput Appl Biosci* **9**(2): 161-167.
- Hoefnagel, M. H., Millar, A. H., Wiskich, J. T. y Day, D. A. (1995). Cytochrome and alternative respiratory pathways compete for electrons in the presence of pyruvate in soybean mitochondria. *Arch Biochem Biophys* **318**(2): 394-400.
- Hoefnagel, M. H. y Wiskich, J. T. (1998). Activation of the plant alternative oxidase by high reduction levels of the Q-pool and pyruvate. *Arch Biochem Biophys* **355**(2): 262-270.
- Hong, S. P., Seip, J., Walters-Pollak, D., Rupert, R., Jackson, R., Xue, Z. y Zhu, Q. (2011). Engineering *Yarrowia lipolytica* to express secretory invertase with strong FBA1(IN) promoter. *Yeast*.
- Hunte, C., Zickermann, V. y Brandt, U. (2010). Functional modules and structural basis of conformational coupling in mitochondrial complex I. *Science* **329**(5990): 448-451.
- Ito, K. y Seymour, R. S. (2005). Expression of uncoupling protein and alternative oxidase depends on lipid or carbohydrate substrates in thermogenic plants. *Biol Lett* **1**(4): 427-430.
- Itoh, H., Takahashi, A., Adachi, K., Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M. y Kinoshita, K. (2004). Mechanically driven ATP synthesis by F<sub>1</sub>-ATPase. *Nature* **427**(6973): 465-468.
- Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B. y Michel, H. (1995). Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature* **376**(6542): 660-669.

- Jarmuszkiewicz, W., Antos, N., Swida, A., Czarna, M. y Sluse, F. E. (2004). The effect of growth at low temperature on the activity and expression of the uncoupling protein in *Acanthamoeba castellanii* mitochondria. *FEBS Lett* **569**(1-3): 178-184.
- Jarmuszkiewicz, W., Sluse-Goffart, C. M., Vercesi, A. E. y Sluse, F. E. (2001). Alternative oxidase and uncoupling protein: thermogenesis versus cell energy balance. *Biosci Rep* **21**(2): 213-222.
- Jarmuszkiewicz, W., Sluse, F. E., Hryniewiecka, L. y Sluse-Goffart, C. M. (2002). Interactions between the cytochrome pathway and the alternative oxidase in isolated *Acanthamoeba castellanii* mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* **34**(1): 31-40.
- Joseph-Horne, T., Babij, J., Wood, P. M., Hollomon, D. y Sessions, R. B. (2000). New sequence data enable modelling of the fungal alternative oxidase and explain an absence of regulation by pyruvate. *FEBS Lett* **481**(2): 141-146.
- Joseph-Horne, T., Hollomon, D. W. y Wood, P. M. (2001). Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochim Biophys Acta* **1504**(2-3): 179-195.
- Juarez, O., Guerra, G., Martinez, F. y Pardo, J. P. (2004). The mitochondrial respiratory chain of *Ustilago maydis*. *Biochim Biophys Acta* **1658**(3): 244-251.
- Kashani-Poor, N., Kerscher, S., Zickermann, V. y Brandt, U. (2001). Efficient large scale purification of his-tagged proton translocating NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from the strictly aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochim Biophys Acta* **1504**(2-3): 363-370.
- Kerscher, S., Droese, S., Zwicker, K., Zickermann, V. y Brandt, U. (2002). *Yarrowia lipolytica*, a yeast genetic system to study mitochondrial complex I. *Biochim Biophys Acta* **1555**(1-3): 83-91.
- Kerscher, S., Durstewitz, G., Casaregola, S., Gaillardin, C. y Brandt, U. (2001a). The complete mitochondrial genome of *Yarrowia lipolytica*. *Comp Funct Genomics* **2**(2): 80-90.
- Kerscher, S. J., Eschemann, A., Okun, P. M. y Brandt, U. (2001b). External alternative NADH:ubiquinone oxidoreductase redirected to the internal face of the mitochondrial inner membrane rescues complex I deficiency in *Yarrowia lipolytica*. *J Cell Sci* **114**(Pt 21): 3915-3921.
- Kerscher, S. J., Okun, J. G. y Brandt, U. (1999). A single external enzyme confers alternative NADH:ubiquinone oxidoreductase activity in *Yarrowia lipolytica*. *J Cell Sci* **112** ( Pt 14): 2347-2354.
- Korshunov, S. S., Skulachev, V. P. y Starkov, A. A. (1997). High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* **416**(1): 15-18.
- Koshkin, V., Wang, X., Scherer, P. E., Chan, C. B. y Wheeler, M. B. (2003). Mitochondrial functional state in clonal pancreatic beta-cells exposed to free fatty acids. *J Biol Chem* **278**(22): 19709-19715.
- Kowaltowski, A. J., Costa, A. D. y Vercesi, A. E. (1998). Activation of the potato plant uncoupling mitochondrial protein inhibits reactive oxygen species generation by the respiratory chain. *FEBS Lett* **425**(2): 213-216.
- Krause, F., Reifschneider, N. H., Vocke, D., Seelert, H., Rexroth, S. y Dencher, N. A. (2004a). "Respirasome"-like supercomplexes in green leaf mitochondria of spinach. *J Biol Chem* **279**(46): 48369-48375.
- Krause, F., Scheckhuber, C. Q., Werner, A., Rexroth, S., Reifschneider, N. H., Dencher, N. A. y Osiewacz, H. D. (2004b). Supramolecular organization of cytochrome c

- oxidase- and alternative oxidase-dependent respiratory chains in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *J Biol Chem* **279**(25): 26453-26461.
- Krause, F., Scheckhuber, C. Q., Werner, A., Rexroth, S., Reifschneider, N. H., Dencher, N. A. y Osiewacz, H. D. (2006). OXPHOS Supercomplexes: respiration and life-span control in the aging model *Podospora anserina*. *Ann N Y Acad Sci* **1067**: 106-115.
- Krauss, S., Zhang, C. Y. y Lowell, B. B. (2005). The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(3): 248-261.
- Kurtzman, C. P. (1994). Molecular taxonomy of the yeasts. *Yeast* **10**(13): 1727-1740.
- Kushnareva, Y., Murphy, A. N. y Andreyev, A. (2002). Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)<sup>+</sup> oxidation-reduction state. *Biochem J* **368**(Pt 2): 545-553.
- Lambers, H. (1980). The physiological significance of cyanide-resistant respiration in higher plants. *Plant, Cell and Environment* **3**(5): 293-302.
- Lambers, H. (1982). Cyanide-resistant respiration: a nonphosphorylating electron transport pathway acting as an energy flow. *Physiologia Plantarum* **55**(4): 478-485.
- Larsson, C., Pahlman, I. L., Ansell, R., Rigoulet, M., Adler, L. y Gustafsson, L. (1998). The importance of the glycerol 3-phosphate shuttle during aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**(4): 347-357.
- Ledesma, A., de Lacoba, M. G. y Rial, E. (2002). The mitochondrial uncoupling proteins. *Genome Biol* **3**(12): REVIEWS3015.
- Lemire, B. D. y Oyedotun, K. S. (2002). The *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial succinate:ubiquinone oxidoreductase. *Biochim Biophys Acta* **1553**(1-2): 102-116.
- Lenaz, G. (1998). Quinone specificity of complex I. *Biochim Biophys Acta* **1364**(2): 207-221.
- Leung, A. W., Varanyuwatana, P. y Halestrap, A. P. (2008). The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition. *J Biol Chem* **283**(39): 26312-26323.
- Ljungdahl, P. O., Pennoyer, J. D., Robertson, D. E. y Trumpower, B. L. (1987). Purification of highly active cytochrome bc<sub>1</sub> complexes from phylogenetically diverse species by a single chromatographic procedure. *Biochim Biophys Acta* **891**(3): 227-241.
- Ljungdahl, P. O., Pennoyer, J. D. y Trumpower, B. L. (1986). Purification of cytochrome bc<sub>1</sub> complexes from phylogenically diverse species by a single method. *Methods Enzymol* **126**: 181-191.
- Luévano-Martínez, L. A., Barba-Ostria, C., Araiza-Olivera, D., Chiquete-Felix, N., Guerrero-Castillo, S., Rial, E., Georgellis, D. y Uribe-Carvajal, S. (2012). A critical tyrosine residue determines the uncoupling protein-like activity of the yeast mitochondrial oxaloacetate carrier. *Biochem J* **443**(1): 317-325.
- Luévano-Martínez, L. A., Moyano, E., de Lacoba, M. G., Rial, E. y Uribe-Carvajal, S. (2010). Identification of the mitochondrial carrier that provides *Yarrowia lipolytica* with a fatty acid-induced and nucleotide-sensitive uncoupling protein-like activity. *Biochim Biophys Acta* **1797**(1): 81-88.
- Luttik, M. A., Overkamp, K. M., Kotter, P., de Vries, S., van Dijken, J. P. y Pronk, J. T. (1998). The *Saccharomyces cerevisiae* NDE1 and NDE2 genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH. *J Biol Chem* **273**(38): 24529-24534.

- Manfredi, G., Yang, L., Gajewski, C. D. y Mattiazzi, M. (2002). Measurements of ATP in mammalian cells. *Methods* **26**(4): 317-326.
- Manon, S., Roucou, X., Guerin, M., Rigoulet, M. y Guerin, B. (1998). Characterization of the yeast mitochondria unselective channel: a counterpart to the mammalian permeability transition pore? *J Bioenerg Biomembr* **30**(5): 419-429.
- Mariano, A. B., Valente, C., Cadena, S. M., Rocha, M. E., de Oliveira, M. B. y Carnieri, E. G. (2005). Sensitivities of the alternative respiratory components of potato tuber mitochondria to thiol reagents and Ca<sup>2+</sup>. *Plant Physiol Biochem* **43**(1): 61-67.
- Marques, I., Dencher, N. A., Videira, A. y Krause, F. (2007). Supramolecular organization of the respiratory chain in *Neurospora crassa* mitochondria. *Eukaryot Cell* **6**(12): 2391-2405.
- Marques, I., Duarte, M., Assuncao, J., Ushakova, A. V. y Videira, A. (2005). Composition of complex I from *Neurospora crassa* and disruption of two "accessory" subunits. *Biochim Biophys Acta* **1707**(2-3): 211-220.
- Marres, C. A., de Vries, S. y Grivell, L. A. (1991). Isolation and inactivation of the nuclear gene encoding the rotenone-insensitive internal NADH: ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **195**(3): 857-862.
- Matsushita, K., Ohnishi, T. y Kaback, H. R. (1987). NADH-ubiquinone oxidoreductases of the *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. *Biochemistry* **26**(24): 7732-7737.
- Mattevi, A., Obmolova, G., Sokatch, J. R., Betzel, C. y Hol, W. G. (1992). The refined crystal structure of *Pseudomonas putida* lipoamide dehydrogenase complexed with NAD<sup>+</sup> at 2.45 Å resolution. *Proteins* **13**(4): 336-351.
- Mattevi, A., Schierbeek, A. J. y Hol, W. G. (1991). Refined crystal structure of lipoamide dehydrogenase from *Azotobacter vinelandii* at 2.2 Å resolution. A comparison with the structure of glutathione reductase. *J Mol Biol* **220**(4): 975-994.
- Maxwell, D. P., Wang, Y. y McIntosh, L. (1999). The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(14): 8271-8276.
- Medentsev, A. G. y Akimenko, V. K. (1999). Development and activation of cyanide-resistant respiration in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochemistry (Mosc)* **64**(8): 945-951.
- Medentsev, A. G., Arinbasarova, A. Y. y Akimenko, V. K. (1999). Regulation and physiological role of cyanide-resistant oxidases in fungi and plants. *Biochemistry (Mosc)* **64**(11): 1230-1243.
- Medentsev, A. G., Arinbasarova, A. Y. y Akimenko, V. K. (2004). Reactivation of the alternative oxidase of *Yarrowia lipolytica* by nucleoside monophosphates. *FEMS Yeast Res* **5**(3): 231-236.
- Medentsev, A. G., Arinbasarova, A. Y., Golovchenko, N. P. y Akimenko, V. K. (2002). Involvement of the alternative oxidase in respiration of *Yarrowia lipolytica* mitochondria is controlled by the activity of the cytochrome pathway. *FEMS Yeast Res* **2**(4): 519-524.
- Megehee, J. A. y Lundrigan, M. D. (2007). Temporal expression of *Mycobacterium smegmatis* respiratory terminal oxidases. *Can J Microbiol* **53**(3): 459-463.
- Millar, A. H., Hoefnagel, M., Day, D. A. y Wiskich, J. T. (1996). Specificity of the Organic Acid Activation of Alternative Oxidase in Plant Mitochondria. *Plant Physiol* **111**(2): 613-618.

- Millar, A. H., Wiskich, J. T., Whelan, J. y Day, D. A. (1993). Organic acid activation of the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Lett* **329**(3): 259-262.
- Millenaar, F. F., Benschop, J. J., Wagner, A. M. y Lambers, H. (1998). The role of the alternative oxidase in stabilizing the in vivo reduction state of the ubiquinone pool and the activation state of the alternative oxidase. *Plant Physiol* **118**(2): 599-607.
- Minauro-Sanmiguel, F., Wilkens, S. y Garcia, J. J. (2005). Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: novel F<sub>0</sub> bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(35): 12356-12358.
- Miroux, B., Frossard, V., Raimbault, S., Ricquier, D. y Bouillaud, F. (1993). The topology of the brown adipose tissue mitochondrial uncoupling protein determined with antibodies against its antigenic sites revealed by a library of fusion proteins. *EMBO J* **12**(10): 3739-3745.
- Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* **191**: 144-148.
- Mitchell, P. y Moyle, J. (1967). Respiration-driven proton translocation in rat liver mitochondria. *Biochem J* **105**(3): 1147-1162.
- Moore, A. L. y Siedow, J. N. (1991). The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1059**(2): 121-140.
- Moore, A. L. y Siedow, J. N. (1992). The nature and regulation of the alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochem Soc Trans* **20**(2): 361-363.
- Morales, G., Ugidos, A. y Rojo, F. (2006). Inactivation of the *Pseudomonas putida* cytochrome o ubiquinol oxidase leads to a significant change in the transcriptome and to increased expression of the CIO and cbb3-1 terminal oxidases. *Environ Microbiol* **8**(10): 1764-1774.
- Mowery, P. C., Steenkamp, D. J., Ackrell, A. C., Singer, T. P. y White, G. A. (1977). Inhibition of mammalian succinate dehydrogenase by carboxins. *Arch Biochem Biophys* **178**(2): 495-506.
- Muramoto, K., Ohta, K., Shinzawa-Itoh, K., Kanda, K., Taniguchi, M., Nabekura, H., Yamashita, E., Tsukihara, T. y Yoshikawa, S. (2010). Bovine cytochrome c oxidase structures enable O<sub>2</sub> reduction with minimization of reactive oxygens and provide a proton-pumping gate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(17): 7740-7745.
- Navet, R., Douette, P., Puttine-Marique, F., Sluse-Goffart, C. M., Jarmuszkiewicz, W. y Sluse, F. E. (2005). Regulation of uncoupling protein activity in phosphorylating potato tuber mitochondria. *FEBS Lett* **579**(20): 4437-4442.
- Neijssel, O. M., Buurman, E. T. y Teixeira de Mattos, M. J. (1990). The role of futile cycles in the energetics of bacterial growth. *Biochim Biophys Acta* **1018**(2-3): 252-255.
- Nicholls, D. G. y Locke, R. M. (1984). Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev* **64**(1): 1-64.
- Nijtmans, L. G., Taanman, J. W., Muijsers, A. O., Speijer, D. y Van den Bogert, C. (1998). Assembly of cytochrome-c oxidase in cultured human cells. *Eur J Biochem* **254**(2): 389-394.
- Nubel, E., Wittig, I., Kerscher, S., Brandt, U. y Schagger, H. (2009). Two-dimensional native electrophoretic analysis of respiratory supercomplexes from *Yarrowia lipolytica*. *Proteomics* **9**(9): 2408-2418.
- Odds, F. C. (1985). Morphogenesis in *Candida albicans*. *Crit Rev Microbiol* **12**(1): 45-93.
- Ohnishi, T. y King, T. E. (1978). EPR and other properties of succinate dehydrogenase. *Methods Enzymol* **53**: 483-495.

- Ohnishi, T., Sled, V. D., Yano, T., Yagi, T., Burbaev, D. S. y Vinogradov, A. D. (1998). Structure-function studies of iron-sulfur clusters and semiquinones in the NADH-Q oxidoreductase segment of the respiratory chain. *Biochim Biophys Acta* **1365**(1-2): 301-308.
- Osyczka, A., Moser, C. C. y Dutton, P. L. (2005). Fixing the Q cycle. *Trends Biochem Sci* **30**(4): 176-182.
- Paumard, P., Vaillier, J., Coulary, B., Schaeffer, J., Soubannier, V., Mueller, D. M., Brethes, D., di Rago, J. P. y Velours, J. (2002). The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J* **21**(3): 221-230.
- Peña, A., Piña, M. Z., Escamilla, E. y Piña, E. (1977). A novel method for the rapid preparation of coupled yeast mitochondria. *FEBS Lett* **80**(1): 209-213.
- Perales-Clemente, E., Bayona-Bafaluy, M. P., Perez-Martos, A., Barrientos, A., Fernandez-Silva, P. y Enriquez, J. A. (2008). Restoration of electron transport without proton pumping in mammalian mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(48): 18735-18739.
- Perez-Campo, F. M. y Dominguez, A. (2001). Factors affecting the morphogenetic switch in *Yarrowia lipolytica*. *Curr Microbiol* **43**(6): 429-433.
- Perrone, G. G., Tan, S. X. y Dawes, I. W. (2008). Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *Biochim Biophys Acta* **1783**(7): 1354-1368.
- Pfützner, U., Hoffmeier, K., Harrenga, A., Kannt, A., Michel, H., Bamberg, E., Richter, O. M. y Ludwig, B. (2000). Tracing the D-pathway in reconstituted site-directed mutants of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Biochemistry* **39**(23): 6756-6762.
- Pietrobon, D., Zoratti, M. y Azzone, G. F. (1983). Molecular slipping in redox and ATPase H<sup>+</sup> pumps. *Biochim Biophys Acta* **723**(2): 317-321.
- Popov, V. N., Simonian, R. A., Skulachev, V. P. y Starkov, A. A. (1997). Inhibition of the alternative oxidase stimulates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in plant mitochondria. *FEBS Lett* **415**(1): 87-90.
- Prieto, S., Bouillaud, F. y Rial, E. (1995). The mechanism for the ATP-induced uncoupling of respiration in mitochondria of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* **307** ( Pt 3): 657-661.
- Prieto, S., Bouillaud, F., Ricquier, D. y Rial, E. (1992). Activation by ATP of a proton-conducting pathway in yeast mitochondria. *Eur J Biochem* **208**(2): 487-491.
- Rabilloud, T., Brodard, V., Peltre, G., Righetti, P. G. y Ettore, C. (1992). Modified silver staining for immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **13**(4): 264-266.
- Ramsay, R. R., Ackrell, B. A., Coles, C. J., Singer, T. P., White, G. A. y Thorn, G. D. (1981). Reaction site of carboxanilides and of thenoyltrifluoroacetone in complex II. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(2): 825-828.
- Ransac, S. y Mazat, J. P. (2010). How does antimycin inhibit the bc1 complex? A part-time twin. *Biochim Biophys Acta* **1797**(12): 1849-1857.
- Rasmusson, A. G., Soole, K. L. y Elthon, T. E. (2004). Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 23-39.
- Ravel, P., Tissut, M. y Douce, R. (1986). Platanetin: A Potent Natural Uncoupler and Inhibitor of the Exogenous NADH Dehydrogenase in Intact Plant Mitochondria. *Plant Physiol* **80**(2): 500-504.

- Ribas-Carbo, M., Berry, J. A., Yakir, D., Giles, L., Robinson, S. A., Lennon, A. M. y Siedow, J. N. (1995). Electron Partitioning between the Cytochrome and Alternative Pathways in Plant Mitochondria. *Plant Physiol* **109**(3): 829-837.
- Ricquier, D. (2005). Respiration uncoupling and metabolism in the control of energy expenditure. *Proc Nutr Soc* **64**(1): 47-52.
- Ricquier, D. y Kader, J. C. (1976). Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. *Biochem Biophys Res Commun* **73**(3): 577-583.
- Rottenberg, H., Covian, R. y Trumppower, B. L. (2009). Membrane potential greatly enhances superoxide generation by the cytochrome bc<sub>1</sub> complex reconstituted into phospholipid vesicles. *J Biol Chem* **284**(29): 19203-19210.
- Ruiz-Herrera, J., Iranzo, M., Elorza, M. V., Sentandreu, R. y Mormeneo, S. (1995). Involvement of transglutaminase in the formation of covalent cross-links in the cell wall of *Candida albicans*. *Arch Microbiol* **164**(3): 186-193.
- Ruiz-Herrera, J. y Sentandreu, R. (2002). Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. *Arch Microbiol* **178**(6): 477-483.
- Schafer, E., Dencher, N. A., Vonck, J. y Parcej, D. N. (2007). Three-dimensional structure of the respiratory chain supercomplex I<sub>III</sub>II<sub>IV</sub>1 from bovine heart mitochondria. *Biochemistry* **46**(44): 12579-12585.
- Schägger, H. (2001a). Blue-native gels to isolate protein complexes from mitochondria. *Methods Cell Biol* **65**: 231-244.
- Schägger, H. (2001b). Respiratory chain supercomplexes. *IUBMB Life* **52**(3-5): 119-128.
- Schägger, H. (2002). Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1555**(1-3): 154-159.
- Schägger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc* **1**(1): 16-22.
- Schägger, H., Cramer, W. A. y von Jagow, G. (1994). Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal Biochem* **217**(2): 220-230.
- Schägger, H., de Coo, R., Bauer, M. F., Hofmann, S., Godinot, C. y Brandt, U. (2004). Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I. *J Biol Chem* **279**(35): 36349-36353.
- Schagger, H., Link, T. A., Engel, W. D. y von Jagow, G. (1986). Isolation of the eleven protein subunits of the bc<sub>1</sub> complex from beef heart. *Methods Enzymol* **126**: 224-237.
- Schägger, H. y Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J* **19**(8): 1777-1783.
- Schägger, H. y Pfeiffer, K. (2001). The ratio of oxidative phosphorylation complexes I-V in bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem* **276**(41): 37861-37867.
- Schägger, H. y von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**(2): 368-379.
- Schägger, H. y von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* **199**(2): 223-231.

- Schmid, R. y Gerloff, D. L. (2004). Functional properties of the alternative NADH:ubiquinone oxidoreductase from *E. coli* through comparative 3-D modelling. *FEBS Lett* **578**(1-2): 163-168.
- Schonbaum, G. R., Bonner, W. D., Jr., Storey, B. T. y Bahr, J. T. (1971). Specific inhibition of the cyanide-insensitive respiratory pathway in plant mitochondria by hydroxamic acids. *Plant Physiol* **47**(1): 124-128.
- Schwitzgubel, J. P. y Palmer, J. M. (1982). Properties of mitochondria as a function of the growth stages of *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* **149**(2): 612-619.
- Shirakihara, Y., Leslie, A. G., Abrahams, J. P., Walker, J. E., Ueda, T., Sekimoto, Y., Kambara, M., Saika, K., Kagawa, Y. y Yoshida, M. (1997). The crystal structure of the nucleotide-free alpha 3 beta 3 subcomplex of F1-ATPase from the thermophilic *Bacillus PS3* is a symmetric trimer. *Structure* **5**(6): 825-836.
- Siedow, J. N. y Umbach, A. L. (1995). Plant Mitochondrial Electron Transfer and Molecular Biology. *Plant Cell* **7**(7): 821-831.
- Siedow, J. N. y Umbach, A. L. (2000). The mitochondrial cyanide-resistant oxidase: structural conservation amid regulatory diversity. *Biochim Biophys Acta* **1459**(2-3): 432-439.
- Skubatz, H., Nelson, T. A., Meeuse, B. J. y Bendich, A. J. (1991). Heat Production in the Voodoo Lily (*Sauromatum guttatum*) as Monitored by Infrared Thermography. *Plant Physiol* **95**(4): 1084-1088.
- Smejkal, G. B., Robinson, M. H. y Lazarev, A. (2004). Comparison of fluorescent stains: relative photostability and differential staining of proteins in two-dimensional gels. *Electrophoresis* **25**(15): 2511-2519.
- Smet, J., De Paepe, B., Seneca, S., Lissens, W., Kotarsky, H., De Meirleir, L., Fellman, V. y Van Coster, R. (2011). Complex III staining in blue native polyacrylamide gels. *J Inherit Metab Dis* **34**(3): 741-747.
- Storey, B. T. (1976). Respiratory Chain of Plant Mitochondria: XVIII. Point of Interaction of the Alternate Oxidase with the Respiratory Chain. *Plant Physiol* **58**(4): 521-525.
- Strauss, M., Hofhaus, G., Schroder, R. R. y Kuhlbrandt, W. (2008). Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *EMBO J* **27**(7): 1154-1160.
- Strecker, V., Wumaier, Z., Wittig, I. y Schagger, H. (2010). Large pore gels to separate mega protein complexes larger than 10 MDa by blue native electrophoresis: isolation of putative respiratory strings or patches. *Proteomics* **10**(18): 3379-3387.
- Strogolova, V., Furness, A., Robb-McGrath, M., Garlich, J. y Stuart, R. A. (2012). Rcf1 and Rcf2, members of the hypoxia-induced gene 1 protein family, are critical components of the mitochondrial cytochrome bc1-cytochrome c oxidase supercomplex. *Mol Cell Biol* **32**(8): 1363-1373.
- Stroh, A., Anderka, O., Pfeiffer, K., Yagi, T., Finel, M., Ludwig, B. y Schagger, H. (2004). Assembly of respiratory complexes I, III, and IV into NADH oxidase supercomplex stabilizes complex I in *Paracoccus denitrificans*. *J Biol Chem* **279**(6): 5000-5007.
- Sunderhaus, S., Eubel, H. y Braun, H. P. (2007). Two-dimensional blue native/blue native polyacrylamide gel electrophoresis for the characterization of mitochondrial protein complexes and supercomplexes. *Methods Mol Biol* **372**: 315-324.
- Szabo, R. y Stofanikova, V. (2002). Presence of organic sources of nitrogen is critical for filament formation and pH-dependent morphogenesis in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol Lett* **206**(1): 45-50.

- Tocilescu, M. A., Fendel, U., Zwicker, K., Drose, S., Kerscher, S. y Brandt, U. (2010). The role of a conserved tyrosine in the 49-kDa subunit of complex I for ubiquinone binding and reduction. *Biochim Biophys Acta* **1797**(6-7): 625-632.
- Tocilescu, M. A., Fendel, U., Zwicker, K., Kerscher, S. y Brandt, U. (2007). Exploring the ubiquinone binding cavity of respiratory complex I. *J Biol Chem* **282**(40): 29514-29520.
- Trautschold, I., Lamprecht, W. y Schweitzer, G. (1995). UV method with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Methods of enzymatic analysis*. Bergmeyer. **7**: 346-357.
- Trumpower, B. L. (1990a). Cytochrome bc1 complexes of microorganisms. *Microbiol Rev* **54**(2): 101-129.
- Trumpower, B. L. (1990b). The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc1 complex. *J Biol Chem* **265**(20): 11409-11412.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. y Yoshikawa, S. (1995). Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* **269**(5227): 1069-1074.
- Tudella, V. G., Curti, C., Soriani, F. M., Santos, A. C. y Uyemura, S. A. (2004). In situ evidence of an alternative oxidase and an uncoupling protein in the respiratory chain of *Aspergillus fumigatus*. *Int J Biochem Cell Biol* **36**(1): 162-172.
- Umbach, A. L., Gonzalez-Meler, M. A., Sweet, C. R. y Siedow, J. N. (2002). Activation of the plant mitochondrial alternative oxidase: insights from site-directed mutagenesis. *Biochim Biophys Acta* **1554**(1-2): 118-128.
- Umbach, A. L., Ng, V. S. y Siedow, J. N. (2006). Regulation of plant alternative oxidase activity: a tale of two cysteines. *Biochim Biophys Acta* **1757**(2): 135-142.
- Umbach, A. L. y Siedow, J. N. (1993). Covalent and Noncovalent Dimers of the Cyanide-Resistant Alternative Oxidase Protein in Higher Plant Mitochondria and Their Relationship to Enzyme Activity. *Plant Physiol* **103**(3): 845-854.
- Umbach, A. L. y Siedow, J. N. (2000). The cyanide-resistant alternative oxidases from the fungi *Pichia stipitis* and *Neurospora crassa* are monomeric and lack regulatory features of the plant enzyme. *Arch Biochem Biophys* **378**(2): 234-245.
- Umbach, A. L., Wiskich, J. T. y Siedow, J. N. (1994). Regulation of alternative oxidase kinetics by pyruvate and intermolecular disulfide bond redox status in soybean seedling mitochondria. *FEBS Lett* **348**(2): 181-184.
- Uribe-Carvajal, S., Guerrero-Castillo, S., King-Diaz, B. y Henssen, B. L. (2008). Allelochemicals targeting the phospholipid bilayer and the proteins of biological membranes. *Allelopathy Journal* **21**(1): 1-23.
- Uribe-Carvajal, S., Luevano-Martinez, L. A., Guerrero-Castillo, S., Cabrera-Orefice, A., Corona-de-la-Pena, N. A. y Gutierrez-Aguilar, M. (2011). Mitochondrial Unselective Channels throughout the eukaryotic domain. *Mitochondrion* **11**(3): 382-390.
- Uribe, S., Ramirez, J. y Pena, A. (1985). Effects of beta-pinene on yeast membrane functions. *J Bacteriol* **161**(3): 1195-1200.
- Van Urk, H., Mak, P. R., Scheffers, W. A. y van Dijken, J. P. (1988). Metabolic responses of *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066 and *Candida utilis* CBS 621 upon transition from glucose limitation to glucose excess. *Yeast* **4**(4): 283-291.

- Vanlerberghe, G. C. y McIntosh, L. (1992). Lower growth temperature increases alternative pathway capacity and alternative oxidase protein in tobacco. *Plant Physiol* **100**(1): 115-119.
- Vázquez-Acevedo, M., Cardol, P., Cano-Estrada, A., Lapaille, M., Remacle, C. y González-Halphen, D. (2006). The mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae contains eight subunits of unknown origin involved in the formation of an atypical stator-stalk and in the dimerization of the complex. *J Bioenerg Biomembr* **38**(5-6): 271-282.
- Veiga, A., Arrabaca, J. D. y Loureiro-Dias, M. C. (2000). Cyanide-resistant respiration is frequent, but confined to yeasts incapable of aerobic fermentation. *FEMS Microbiol Lett* **190**(1): 93-97.
- Veiga, A., Arrabaca, J. D., Sansonetty, F., Ludovico, P., Corte-Real, M. y Loureiro-Dias, M. C. (2003). Energy conversion coupled to cyanide-resistant respiration in the yeasts *Pichia membranifaciens* and *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res* **3**(2): 141-148.
- Velázquez, I. y Pardo, J. P. (2001). Kinetic characterization of the rotenone-insensitive internal NADH: ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys* **389**(1): 7-14.
- von Jagow, G. y Klingenberg, M. (1970). Pathways of hydrogen in mitochondria of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Eur J Biochem* **12**(3): 583-592.
- Vukotic, M., Oeljeklaus, S., Wiese, S., Vogtle, F. N., Meisinger, C., Meyer, H. E., Zieseniss, A., Katschinski, D. M., Jans, D. C., Jakobs, S., Warscheid, B., Rehling, P. y Deckers, M. (2012). Rcf1 mediates cytochrome oxidase assembly and respirasome formation, revealing heterogeneity of the enzyme complex. *Cell Metab* **15**(3): 336-347.
- Walker, J. E. (1992). The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) of respiratory chains. *Q Rev Biophys* **25**(3): 253-324.
- Wallace, P. G., Pedler, S. M., Wallace, J. C. y Berry, M. N. (1994). A method for the determination of the cellular phosphorylation potential and glycolytic intermediates in yeast. *Anal Biochem* **222**(2): 404-408.
- Wedding, R. T., McCreedy, C. C. y Harley, J. L. (1973). Cyanide sensitivity of respiration during ageing of *Arum spadix* slices. *New Phytologist* **72**(1): 15-26.
- Werner-Washburne, M., Braun, E., Johnston, G. C. y Singer, R. A. (1993). Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **57**(2): 383-401.
- Wickerham, L. J., Kurtzman, C. P. y Herman, A. I. (1970). Sexual reproduction in *Candida lipolytica*. *Science* **167**(3921): 1141.
- Wittig, I., Braun, H. P. y Schagger, H. (2006a). Blue native PAGE. *Nat Protoc* **1**(1): 418-428.
- Wittig, I., Carrozzo, R., Santorelli, F. M. y Schagger, H. (2006b). Supercomplexes and subcomplexes of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* **1757**(9-10): 1066-1072.
- Wittig, I., Karas, M. y Schagger, H. (2007). High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Mol Cell Proteomics* **6**(7): 1215-1225.
- Wittig, I. y Schagger, H. (2005). Advantages and limitations of clear-native PAGE. *Proteomics* **5**(17): 4338-4346.

- Wulff, K. y Döppen, W. (1985). Luminometric method: method B. Methods of enzymatic analysis. H. U. Bergmeyer. Weinheim, Germany. **7**: 361-364.
- Xia, D., Yu, C. A., Kim, H., Xia, J. Z., Kachurin, A. M., Zhang, L., Yu, L. y Deisenhofer, J. (1997). Crystal structure of the cytochrome bc<sub>1</sub> complex from bovine heart mitochondria. *Science* **277**(5322): 60-66.
- Yankovskaya, V., Horsefield, R., Tornroth, S., Luna-Chavez, C., Miyoshi, H., Leger, C., Byrne, B., Cecchini, G. y Iwata, S. (2003). Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science* **299**(5607): 700-704.
- Yano, T., Yagi, T., Sled, V. D. y Ohnishi, T. (1995). Expression and characterization of the 66-kilodalton (NQO3) iron-sulfur subunit of the proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase of *Paracoccus denitrificans*. *J Biol Chem* **270**(31): 18264-18270.
- Yarrow, D. (1972). Four new combinations in yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek* **38**(3): 357-360.
- Yonetani, T. (1960). Studies on cytochrome oxidase. I. Absolute and difference absorption spectra. *J Biol Chem* **235**: 845-852.
- Yoshikawa, S. y Caughey, W. S. (1990). Infrared evidence of cyanide binding to iron and copper sites in bovine heart cytochrome c oxidase. Implications regarding oxygen reduction. *J Biol Chem* **265**(14): 7945-7958.
- Yoshikawa, S., Muramoto, K. y Shinzawa-Itoh, K. (2011a). The O(2) reduction and proton pumping gate mechanism of bovine heart cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta* **1807**(10): 1279-1286.
- Yoshikawa, S., Muramoto, K. y Shinzawa-Itoh, K. (2011b). Proton-pumping mechanism of cytochrome C oxidase. *Annu Rev Biophys* **40**: 205-223.
- Yoshikawa, S., Muramoto, K., Shinzawa-Itoh, K. y Mochizuki, M. (2012). Structural studies on bovine heart cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta* **1817**(4): 579-589.
- Zamzami, N. y Kroemer, G. (2001). The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(1): 67-71.
- Zerbetto, E., Vergani, L. y Dabbeni-Sala, F. (1997). Quantification of muscle mitochondrial oxidative phosphorylation enzymes via histochemical staining of blue native polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **18**(11): 2059-2064.
- Zharova, T. V. y Vinogradov, A. D. (1997). A competitive inhibition of the mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) by ADP-ribose. *Biochim Biophys Acta* **1320**(3): 256-264.
- Zhou, M., Diwu, Z., Panchuk-Voloshina, N. y Haugland, R. P. (1997). A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Anal Biochem* **253**(2): 162-168.
- Zhu, Y., Lu, J., Wang, J., Chen, F., Leng, F. y Li, H. (2010). Regulation of Thermogenesis in Plants: The Interaction of Alternative Oxidase and Plant Uncoupling Mitochondrial Protein. *J Integr Plant Biol*.

## 12. APÉNDICE

### 12.1 Abreviaturas

ADP	adenosin difosfato
ANT	translocador de adenin nucleótidos
AOX	oxidasa alterna
ATP	adenosin trifosfato
BCIP	sal p-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato
BN-PAGE	electroforesis azul nativa en geles de poliacrilamida
CCCP	carbonilcianuro m-clorofenilhidrazona
CN-PAGE	electroforesis clara nativa en geles de poliacrilamida
CN <sup>-</sup>	cianuro
COX	citocromo <i>c</i> oxidasa (E.C. 1.9.3.1.)
CR	control respiratorio
$\Delta\Psi$	potencial transmembranal
DAB	3,3'-diaminobencidina
DCF	2,7-diclorofluoresceína
DCPIP	2,6-diclorofenolindofenol
DEAE	dietilaminoetilo
Dig	digitonina
DOC	desoxicolato de sodio
FAD	flavin adenin dinucleótido
FCCP	carbonil <i>p</i> -(triflurometoxi) fenilhidrazona
FMN	mononucleótido de flavina
H <sub>2</sub> DCF-DA	diacetato de 2'-7'-dihidro-diclorofluoresceína
hrCN-PAGE	electroforesis clara nativa de alta resolución en geles de poliacrilamida
HEPES	ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico
LM	n-dodecil $\beta$ -D-maltósido
MES	ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
MUC	canal inespecífico mitocondrial
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	radical superóxido
NBT	bromuro de nitro-azul de tetrazolio
NDH	NADH deshidrogenasa
NDH2	NADH deshidrogenasa de tipo II (alterna)

NDH2e	NADH deshidrogenasa externa
NDH2i	NADH deshidrogenasa interna (alterna)
nPG	n-propilgalato
Pi	fosfato inorgánico
PTP	poro de transición de la permeabilidad
ROS	especies reactivas de oxígeno
SHAM	ácido salicilhidroxámico
TEA	trietanolamina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbencidina
TMPD	tetrametilfenilendiamina
UQ	ubiquinona
UQH <sub>2</sub>	ubiquinol
UQ <sup>•-</sup>	ubisemiquinona
UCP	proteína desacoplante
VDAC	canal de aniones dependiente de voltaje
YD	extracto de levadura/dextrosa
YPD	extracto de levadura/peptona/dextrosa

## 12.2 Artículos publicados

- **Guerrero-Castillo S**, Cabrera-Orefice A, Vázquez-Acevedo M, González-Halphen D, Uribe-Carvajal S. (2012). During the stationary growth phase, *Yarrowia lipolytica* prevents the overproduction of reactive oxygen species by activating an uncoupled mitochondrial respiratory pathway. *Biochimica et Biophysica Acta* **1817**, 353-62
- Luévano-Martínez LA, Barba-Ostria C, Araiza-Olivera D, Chiquete-Félix N, **Guerrero-Castillo S**, Rial E, Georgellis D, Uribe-Carvajal S. (2012). The uncoupling protein-like activity of the yeast mitochondrial oxaloacetate carrier is determined by a critical tyrosine residue. *Biochemical Journal* **443**, 317-325
- Cano-Ramírez D, Torres-Vargas C, **Guerrero-Castillo S**, Uribe-Carvajal S, Hernández-Pando R, Pedraza-Chaverri J, Orozco-Ibarra M. (2012). Effect of glycolysis inhibition on mitochondrial function in rat brain. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* **26**, 206-211
- **Guerrero-Castillo S**, Araiza-Olivera D, Cabrera-Orefice A, Espinasa-Jaramillo J, Gutiérrez-Aguilar M, Luévano-Martínez LA, Zepeda-Bastida A, Uribe-Carvajal S. (2011). Physiological uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation. Studies in different yeast species. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **43**, 323-31
- Uribe-Carvajal S, Luévano-Martínez LA, **Guerrero-Castillo S**, Cabrera-Orefice A, Corona-de-la-Peña NA, Gutiérrez-Aguilar M. (2011). Mitochondrial Unselective Channels throughout the eukaryotic domain. *Mitochondrion* **11**, 382-90
- Cabrera-Orefice A, **Guerrero-Castillo S**, Luévano-Martínez LA, Peña A, Uribe-Carvajal S. (2010). Mitochondria from the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* (halophilic organelles?). *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **42**, 11-9
- **Guerrero-Castillo S**, Vázquez-Acevedo M, González-Halphen D, Uribe-Carvajal S. (2009). In *Yarrowia lipolytica* mitochondria, the alternative NADH dehydrogenase interacts specifically with the cytochrome complexes of the classic respiratory pathway. *Biochimica et Biophysica Acta* **1787**, 75-85
- Uribe-Carvajal S, **Guerrero-Castillo S**, King-Díaz B, Lotina-Hennsen B. (2008). Allelochemicals targeting the phospholipid bilayer and the proteins of biological membranes. *Allelopathy Journal* **21**, 1-24

## 12.3 Artículos en preparación

- Cabrera-Orefice A, **Guerrero-Castillo S**, Espinasa-Jaramillo J, Peña A, Uribe-Carvajal S, (2012). The branched mitochondrial respiratory chain from *Debaryomyces hansenii*: Components and supramolecular organization. *Biochimica et Biophysica Acta* (sometido)