



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGIA EXPERIMENTAL

**“ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD Y COMPOSICIÓN PEPTÍDICA DEL
DÍMERO Y DEL MONÓMERO DE LA F₁F₀-ATP SINTASA DE
Ustilago maydis”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIOL. EXP. MARÍA DE LAS MERCEDES ESPARZA PERUSQUÍA

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. OSCAR FLORES HERRERA
FACULTAD DE MEDICINA**

**COMITÉ TUTORAL: DRA. MARIETTA TUENA DE GÓMEZ-PUYOU
INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR**

**DR. JOSÉ DE JESÚS GARCÍA TREJO
FACULTAD DE QUIMICA**

MÉXICO, D.F. ABRIL, 2013



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 10 de diciembre de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **ESPARZA PERUSQUÍA MARÍA DE LAS MERCEDES** con número de cuenta **511021118**, con la tesis titulada **"ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD Y COMPOSICIÓN PEPTÍDICA DEL DÍMERO Y DEL MONÓMERO DE LA F1F0-ATP SINTASA DE *Ustilago maydis*"**, realizada bajo la dirección del **DR. OSCAR FLORES HERRERA**:

Presidente: DR. DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN
Vocal: DR. SALVADOR URIBE CARVAJAL
Secretario: DR. JOSÉ DE JESÚS GARCÍA TREJO
Suplente: DR. JUAN PABLO PARDO VÁZQUEZ
Suplente: DRA. EMMA BERTA GUTIÉRREZ-CIRLOS MADRID

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 06 de marzo de 2013



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por todo el apoyo brindado durante la realización del presente trabajo.

Durante el desarrollo de esta tesis recibí beca de Maestría otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de becario 254400.

Este proyecto fue financiado por el CONACyT con el proyecto 59855 y por la DGAPA y PAPIIT con el proyecto IN210311.

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio 5 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Oscar Flores Herrera.

La sección de Biología Molecular se realizó en el laboratorio del Instituto de Microbiología de la Universidad Heinrich-Heine en Düsseldorf, Alemania, bajo la asesoría del Dr. Michael Feldbrügge.

Especialmente deseo agradecer a los miembros del Comité Tutorial: Dra. Marietta Tuena de Gómez-Puyou y Dr. José de Jesús García Trejo, por las valiosas aportaciones a este trabajo.

Agradezco también a la técnico académico Biol. Exp. Sofía Olvera por la ayuda en las técnicas de Biología Molecular y Cultivo Celular.

“En los momentos de crisis, sólo la imaginación
es más importante que el conocimiento”

Albert Einstein

"En los momentos de estabilidad son igual de importantes"

A Oscar Flores, por guiarme paso a paso a lo largo de esta aventura, por confiar en mí, por soltar mi mano y por tomarla cuando tenía que levantarme, por compartir mi fatiga, por enseñarme un mundo desconocido y ayudarme a descubrirlo detrás de un papel, un lápiz y mi Texas instrument. Por transmitirme la necesidad de conocer la verdad donde sea que esta se encuentre, por mostrarme que la meta no estaba al final, si no que la estuve recorriendo todo este tiempo. A tu lado es más fácil crecer como investigador. Si en algo no estuve a tu altura, mi más sincera disculpa.

A Sofía Olvera, por transmitirme sin reserva alguna todas y cada una de las técnicas de esta área de conocimiento. Por ser mi compañera, mi amiga-forever, y por mucho la mejor técnico... gracias.

Al Dr. Federico Martínez, Juan Pablo Pardo y Juan Luis Rendón por enseñarme a valorar los experimentos con dureza y juicio crítico. Dr. Martinez, gracias por recibirnos de nuevo en su laboratorio, sin usted no existiría el fabuloso 5-Bis.

A Viridiana, por soportarme en los momentos de crisis, por aliviar mi depresión con coca-cola y cacahuates enchilados. Le doy gracias a Dios por darme a la mejor hermana y la mejor amiga en la misma persona, no tengo palabras para describir lo importante que eres para mí. Por ti deje de ver la escalera y comencé a subirla ¡ya voy a la mitad! “TE QUIERO”.

A todos los Perusquía, gracias por compartir conmigo esta etapa de mi vida y porque con sus palabras de ánimo y comprensión supieron levantarme cuando había caído y sobre todo por el cariño inmenso.

¡Pertas son la neta del planeta! Me seguiré untando VapoRub simplemente porque confío en ustedes con los ojos cerrados. Sin ustedes nunca hubiera podido ver la luz al final del túnel.

Carlitos, Christian, Lucero, Genaro, Héctor, Jessy, Alberto, Chucho, Paulina y a todos mis amigos, este camino no hubiera sido tan divertido sin ustedes. Gracias.

A mi madre, siempre...
porque sin ti sencillamente no estaría aquí.

INDICE	
INDICE	V
LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABLAS	II
ABREVIATURAS	II
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Generalidades.	5
1.2. La cadena de transporte de electrones.	7
1.3. La F ₁ F ₀ -ATP sintasa.	10
1.4. La F ₁ F ₀ -ATP sintasa como dímero.	13
1.4.1. El dímero de la F ₁ F ₀ -ATP sintasa en las algas.	15
1.4.2. El dímero de la F ₁ F ₀ -ATP sintasa en los mamíferos.	16
1.4.3. El dímero de la F ₁ F ₀ -ATP sintasa en las levaduras.	16
1.5. <i>Ustilago maydis</i> como modelo experimental.	18
2. JUSTIFICACIÓN	19
3. OBJETIVOS	20
3.1. General.	20
3.2. Particulares.	20
	vi

4.	MATERIALES Y MÉTODOS	21
5.	RESULTADOS	29
6.	DISCUSIÓN	48
7.	CONCLUSIONES	54
8.	PERSPECTIVAS	55
9.	BIBLIOGRAFIA	55

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Tomografía de una mitocondria aislada de hígado de rata.
- Figura 2.** Vías bioenergéticas mitocondriales.
- Figura 3.** Cadena de transporte de electrones.
- Figura 4.** Supercomplejos mitocondriales.
- Figura 5.** F₁F₀-ATP sintasa.
- Figura 6.** Modelo para los sitios catalíticos de la porción F₁ de la ATP sintasa durante la síntesis de ATP.
- Figura 7.** Actividad de ATPasa en gel.
- Figura 8.** Dímero de la F₁F₀-ATP sintasa.
- Figura 9.** Estructura del dímero de la F₁F₀-ATP sintasa de diferentes fuentes biológicas.
- Figura 10.** Ultraestructura mitocondrial de las células HeLA.
- Figura 11.** Diferencias estructurales en las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Figura 12.** Ciclo de vida de *Ustilago maydis*.
- Figura 13.** Determinación del peso molecular de los oligómeros de la F₁F₀-ATP sintasa.
- Figura 14.** Purificación de los oligómeros de la F₁F₀-ATP sintasa de *U. maydis*.
- Figura 15.** Alineamiento de las secuencias para la subunidad α de *S. cerevisiae* y *U. maydis*.
- Figura 16.** Alineamiento de los genes que codifican para la subunidad α de *S. cerevisiae* y *U. maydis*.
- Figura 17.** Alineamiento de las secuencias para la subunidad β de *S. cerevisiae* y *U. maydis*.
- Figura 18.** Cursos temporales de la actividad de ATPasa del V₁.
- Figura 19.** Cursos temporales de la actividad de ATPasa del V₂.
- Figura 20.** Titulación de la actividad de ATPasa del V₂ con DDM.
- Figura 21.** Cursos temporales de la actividad de ATPasa del V₂ en presencia de DDM.
- Figura 22.** Cursos temporales de la actividad de ATPasa del V₁ en presencia de DDM.
- Figura 23.** Efecto de la oligomicina en la actividad de ATPasa.
- Figura 24.** Efecto de la temperatura sobre la actividad de ATPasa del V₁ y el V₂.
- Figura 25.** Amplificación de las secuencias río arriba (UF) y río abajo (DF) del gen.
- Figura 26.** Vector de clonación Topo.
- Figura 27.** Digestión de los vectores UF y DF con Sfil y Scal.
- Figura 28.** Control de digestión con la enzima de restricción Sfil.
- Figura 29.** Transformación de *Ustilago maydis* con el DNA exógeno.

Figura 30. P1/P2 PCR. DNA genómico de las diferentes cepas aisladas de FB2 Δ sub *g*.

Figura 31. Flanking PCR.

Figura 32. Southern Blot.

Figura 33. Alineamiento de las secuencias para la subunidad α de diferentes organismos.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición de la F₁F₀-ATP sintasa de diferentes organismos.

Tabla 2. Peso molecular del monómero y dímero del complejo V de diferentes organismos.

Tabla 3. Identificación de las subunidades asociadas al dímero y monómero del complejo V en dos levaduras.

Tabla 4. Parámetros cinéticos para la actividad de ATPasa del complejo V de diferentes organismos estudiados.

ABREVIATURAS

ADP	Adenosín 5'-difosfato.
AMPc	Adenosín 3',5'- monofosfato cíclico.
ANT	Translocador de adenín nucleótidos.
AOX	Oxidasa alterna mitocondrial.
ASA	del inglés "ATP Synthase-Associated protein".
ATP	Adenosín 5'-trifosfato .
BN-PAGE	Electroforesis nativa en geles azules.
Bis-Tris	2,2-Bis(hydroxymethyl)-2,2',2"-nitrioltriethanol, 2-Bis(2-hydroxyethyl)amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol, Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methane.
BrET	Bromuro de 3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridinio.
CN-PAGE	Electroforesis nativa en geles claros.
DDM	<i>n</i> -Dodecil β -D-maltosido.
DF	secuencia río abajo (downstream flank).
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DNA	Ácido desoxirribonucleico .
dNTP's	Desoxinucleótidos trifosfato.
DOC	Ácido 3 α , 12 α -Dihidroxi-5 β -colan-24-oico.

DTT	Ditiotreitol.
dYT	Medio líquido estándar para cultivo de células bacterianas.
dYT ^{Amp}	Medio líquido estándar para cultivo de células bacterianas con ampicilina.
EDTA	Ácido 2-({2-[bis(carboximetil)amino]etil}(carboximetil)amino)acético.
FAD	Flavín adenín dinucleótido oxidado.
FADH ₂	Flavín adenín dinucleótido reducido.
FMN	Flavín mononucleótido.
GTP	Guanosín 5'-trifosfato.
HCl	Ácido clorhídrico.
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazina-etanosulfónico.
Hyg	Higromicina.
IC ₅₀	Concentración de inhibición.
kDa	KiloDaltones.
KCl	Cloruro de Potasio.
K_m	Constante de Michaelis-Menten.
KO	Knock-out.
LDH	Lactato deshidrogenasa.
M	Concentración molar.
M _{app}	Masa molecular aparente.
MgSO ₄	Sulfato de Magnesio.
mM	Concentración milimolar.
mg	Miligramos.
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado.
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido.
Nde1	NADH deshidrogenasa alterna externa mitocondrial.
OSCP	del inglés "Oligomycin - Sensitivity Conferring Protein".
Pb (NO ₃) ₂	Nitrato de plomo.
PBS	Amortiguador de fosfato salino.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PEP	Fosfoenol piruvato.
PHU	Pushion polimerasa.
Pi	Fosfato inorgánico.
PK	Piruvato cinasa.

PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
pUMA	Plásmido de <i>Ustilago maydis</i> .
RNA	Ácido ribonucleico.
SCS	Amortiguador para resuspender células de <i>U. maydis</i> .
SDS	Dodecilsulfato sódico.
STC	Amortiguador para resuspender protoplastos de <i>U. maydis</i> .
STC-PEG	Amortiguador para resuspender protoplastos de <i>U. maydis</i> con polietilenglicol.
STET	Medio para resuspender células (Obtención del DNA plasmídico).
TAE	Amortiguador para electroforesis en geles de agarosa, formada por Tris, acetato y EDTA.
TBE	Amortiguador para electroforesis en geles de agarosa, formada por Tris, borato y EDTA.
Tris	Tris(hidroximetil) aminometano.
<i>U. maydis</i>	<i>Ustilago maydis</i> .
UF	Secuencia río arriba (upstream flank).
V ₁	Monómero de la F ₁ F ₀ -ATP sintasa.
V ₂	Dímero de la F ₁ F ₀ -ATP sintasa.
V _{max}	Velocidad enzimática máxima.
YPD	Extracto de levadura, peptona y glucosa .
YPD-light	Extracto de levadura, peptona y glucosa (menor concentración).
μM	Concentración micromolar.
Δμ _H ⁺	Gradiente electroquímico de protones.

RESUMEN

La F_1F_0 -ATP sintasa o complejo V es la enzima encargada de sintetizar más del 90% del ATP celular al acoplar su actividad al gradiente electroquímico de protones ($\Delta\mu_{H^+}$). Se encuentra embebida en la membrana interna de las mitocondrias y los tilacoides de las células eucariotas y en la membrana plasmática de las bacterias. Esta enzima consiste de dos sectores, uno soluble (F_1) y uno integral de membrana (F_0). El F_1 , está constituido por las subunidades α_3 , β_3 , γ , δ y ϵ , el cual contiene tres sitios catalíticos en las interfases de las subunidades α y β . El sector F_0 está constituido por las subunidades c_{9-10} y a , y es a través de éste por donde se movilizan los protones a favor de su $\Delta\mu_{H^+}$. El tallo periférico lo forman las subunidades b , h y *OSCP*. La subunidad *OSCP* le confiere la susceptibilidad al inhibidor oligomicina.

Aunado a esto, se ha descrito en los últimos años el papel del complejo V en la forma de un homo-dímero sobre la arquitectura de las crestas mitocondriales. Se reconoce al dímero como la principal entidad en la formación de las puntas de las crestas; sin embargo, las proteínas involucradas en la dimerización del complejo V son diferentes dependiendo de la especie analizada.

Aunque se ha reportado el análisis estructural del dímero del complejo V, donde se describe la identidad de las subunidades involucradas en la dimerización y la repercusión de su mutación o su eliminación genética sobre la arquitectura mitocondrial, poco se sabe sobre el comportamiento cinético de este interesante homo-oligómero.

En el presente trabajo el dímero (V_2) y el monómero (V_1) de la F_1F_0 -ATP sintasa de las mitocondrias del basidiomiceto dimórfico *Ustilago maydis*, se solubilizaron con digitonina y los complejos respiratorios fueron purificados en un gradiente de sacarosa de 1.5 a 0.5 M. Posteriormente se definió la composición peptídica de cada oligómero y se determinó su actividad enzimática, así como su sensibilidad a la oligomicina.

El estudio se enfocó en 4 puntos específicos; 1) la purificación de los oligómeros del complejo V; 2) la identificación peptídica de todas las subunidades del dímero (V_2) y monómero (V_1); 3) la determinación de la actividad de ATPasa del V_2 y V_1 y 4) la sensibilidad a la oligomicina.

La actividad de ATPasa de los oligómeros fue determinada a pH 8.0, en presencia de un sistema regenerador del ATP y se ajustó al modelo cinético de Michaelis-Menten. El V_1 presentó un valor de $K_m = 0.308 \pm 0.11$ mM Mg-ATP y una $V_{max} = 0.142 \pm 0.008$ μ molas de ATP hidrolizado/mg/min, mientras que el V_2 tuvo muy baja actividad. Sin embargo, en

presencia de 0.005% del detergente dodecil-maltósido (DDM) la actividad de ATPasa fue estimulada, con lo que se determinó para el V_2 un valor de la $K_m = 0.24 \pm 0.014$ mM Mg-ATP y la $V_{max} = 0.99 \pm 0.8$ μ molas ATP hidrolizado /mg/min. Mientras que para el V_1 activado con DDM se obtuvo una $K_m = 0.22 \pm 0.08$ mM Mg-ATP y una $V_{max} = 0.245 \pm 0.014$ μ molas de ATP hidrolizado /mg/min. Esto permite hipotetizar que el papel fisiológico del V_2 es la síntesis del ATP y no su hidrólisis, la cual sólo se observa cuando el detergente DDM modifica su arquitectura o microambiente.

Con respecto a la inhibición de la enzima con oligomicina se obtuvo para el V_1 una $IC_{50} = 0.16$ μ g/mg proteína y para el V_2 de 0.071 μ g/mg proteína, se puede observar que el V_2 es dos veces más sensible a dicho inhibidor con respecto al V_1 . La inhibición total se alcanzó a una concentración de 5 μ g/mg de proteína, lo que sugiere que la F_1F_0 -ATPasa está ensamblada y que la hidrólisis del Mg-ATP es realizada exclusivamente por esta enzima.

ABSTRACT

The F_1F_0 -ATP synthase or complex V is a membrane enzyme which plays a key role in energetic metabolism of the cell. This enzyme synthesizes more than 90% of cellular ATP coupled to the proton electrochemical potential ($\Delta\mu_{H^+}$).

Complex V is ubiquitous in the mitochondrial inner membrane, thylakoid membrane and the plasma membrane of the bacteria. This enzyme consists of two major sectors, the membrane sector (F_0) and the soluble and catalytic sector (F_1). F_0 contains the c_{9-10} , a , b subunits, and is powered by the proton flow across the membrane driven by $\Delta\mu_{H^+}$. On the other hand, F_1 is constituted by α , β , γ , ϵ and δ subunits with a stoichiometry of 3:3:1:1:1; it contains also three catalytic sites on $\alpha\beta$ interfases. In yeast and mammalian mitochondria, F_0 contains an additional protein called OSCP, which confers susceptibility to the oligomycin inhibitor.

In the last years, it has been described that complex V, as homo-dimer (V_2), plays a role in the architecture of the mitochondrial cristae; particularly, V_2 is recognized as the main entity involved in the structure of the cristae tips. Actually, the identity of the dimerizing proteins suggests that it is linked to the species here analyzed. Although the knowledge about V_2 composition and stoichiometry and its role in the cristae architecture derived from mutation or deletion analysis has been studied, little is known about the kinetic behavior of this homo-oligomer.

In this work, the V_2 and the monomer (V_1) states of the mitochondrial F_1F_0 -ATP synthase from the dimorphic basidiomycete *Ustilago maydis* were studied. To complement this study, the work was focused on four specific issues: 1) V_1 and V_2 were solubilized with the soft detergent digitonin, and isolated using a sucrose gradient (1.5 to 0.5 M); 2) Determined of subunit composition of V_1 and V_2 ; 3) Determination of the kinetic activity of V_1 and V_2 using Mg-ATP as substrate, and 4) the sensitivity to oligomycin of each oligomer.

The ATPase activity of the oligomers was determined at pH 8.0, coupled to an ATP regenerating system and was adjusted to Michaelis-Menten kinetics model. The K_m value for V_1 was 0.308 ± 0.11 mM and for V_{max} of 0.142 ± 0.008 μ moles of ATP hydrolyzed/mg/min, while the V_2 had low activity at any substrate concentration employed. However, the presence of detergent dodecyl maltoside (DDM) during the activity determination experiments stimulates ATPase activity of both species allowing the determination of a K_m of 0.24 ± 0.014 mM and a $V_{max} = 0.99 \pm 0.8$ μ moles of ATP

hydrolyzed/mg/min for V_1 and a K_m of 0.22 ± 0.08 mM and a V_{max} of 0.245 ± 0.014 μ moles of ATP hydrolyzed/mg/min for V_2 .

This allows hypothesizing that the physiological role of V_2 is involved in the synthesis of ATP and not its hydrolysis, which is observed when the architecture or microenvironment of the V_2 is modified by DDM.

Regarding the oligomycin effect on ATPase activity, the results shows an IC_{50} value of 0.16 μ g oligomycin/mg protein for V_1 inhibition while an IC_{50} of 0.071 μ g oligomycin/mg protein for V_2 was observed. The total inhibition was achieved at a concentration of 5 μ g oligomycin/mg of protein.

This is the first analysis about the kinetics behavior of the F_1F_0 -ATP synthase dimer performed so far.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades.

Las mitocondrias son organelos cuya arquitectura es dinámica, debido a que se pueden fisionar y fusionar de manera continua para formar redes extensas. Así mismo, pueden variar de manera considerable en su tamaño (típicamente de 0.5 a 10 μm) y en su forma (ortodoxa y condensada), dependiendo de su origen y su estado metabólico. Las mitocondrias están constituidas por dos membranas: la membrana externa, relativamente porosa y permeable para la mayoría de las moléculas, y la membrana interna, que es impermeable a los iones y a diversas moléculas orgánicas. Esta última incrementa su área de superficie al proyectarse hacia el interior mitocondrial en pliegues denominados crestas, las cuales pueden presentar desde una estructura tubular de 30-40 nm de diámetro, hasta una forma lamelar plana (Hackenbrock *et al.*, 1986; Frey *et al.*, 2000). (Figura 1). Es en esta membrana donde se encuentran integrados los complejos respiratorios, los cuales son responsables de consumir oxígeno y de generar la energía para la síntesis de ATP. Ambas membranas forman tres compartimentos separados: el espacio intermembranal, el interior de la cresta y la matriz mitocondrial (Rabl *et al.*, 2009). El espacio intermembranal contiene numerosas enzimas que participan en el transporte de nutrientes y el metabolismo de los nucleótidos, mientras que la matriz mitocondrial contiene moléculas de DNA y vías metabólicas como el ciclo de Krebs y la β -oxidación, entre otros (Figura 2).

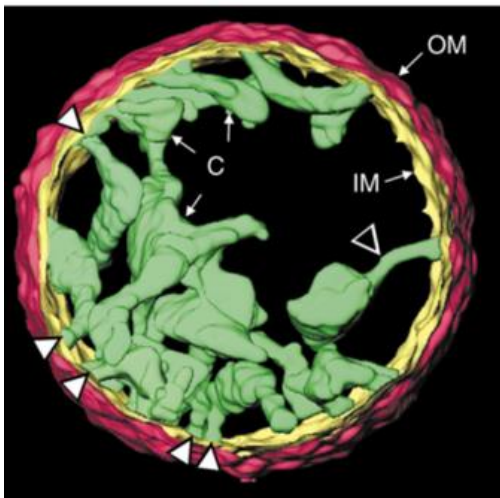


Figura1. Tomografía de una mitocondria aislada de hígado de rata. Imagen 3D de la superficie de una mitocondria de hígado de rata, en la cual se muestran los diferentes compartimentos: C (crestas), IM (membrana interna), OM (membrana externa). Las puntas de flecha apuntan a regiones tubulares que conecta una IM a otra. Las crestas son cisternas, por lo general con múltiples conexiones tubulares periféricas a la superficie de la membrana (figura modificada de Frey *et al.*, 2000).

El genoma mitocondrial es circular y codifica para el rRNA, tRNA y varios componentes proteínicos del ensamblaje respiratorio, sin embargo alrededor del 99% de los genes que codifican para las proteínas mitocondriales se localizan en los cromosomas nucleares.

En la mitocondria se encuentran diversas vías metabólicas relacionadas con la obtención de energía, entre las cuales podemos mencionar a la β -oxidación, el ciclo de Krebs, la generación del gradiente electroquímico y la síntesis de ATP. La β -oxidación, es la degradación de los ácidos grasos a nivel del carbono β , obteniéndose 1 acetil-CoA, 1 NADH y 1 FADH₂, por cada par de carbonos removidos al ácido graso. Las enzimas involucradas son la acil-CoA deshidrogenasa, la enoil CoA hidratasa, la L-3-hidroxiacil CoA deshidrogenasa y la β -cetotiolasa.

Así mismo, la conexión entre la glucólisis y el ciclo de Krebs es la descarboxilación del piruvato, la cual es realizada por la piruvato deshidrogenasa, cuyos productos son el acetil-CoA, el NADH y CO₂. El ciclo de Krebs es la única vía metabólica que puede participar tanto en el catabolismo como en el anabolismo celular, reconociéndose como una vía anfibólica. Como vía catabólica, puede ser alimentado por el acetil-CoA producido por la β -oxidación y la descarboxilación del piruvato. Este ciclo está constituido por las enzimas aconitasa, isocitrato deshidrogenasa, α -cetoglutarato deshidrogenasa, citrato sintasa, succinil CoA sintetasa, succinato deshidrogenasa, fumarasa y malato deshidrogenasa cuya actividad coordinada tiene como producto 3 NADH, 1 FADH₂, 1 GTP y 2 CO₂ (Chávez *et al.*, 2013).

El poder reductor (representado por el NADH y el FADH₂) que se genera en la β -oxidación, la descarboxilación del piruvato y el ciclo de Krebs, pueden ser utilizados por la cadena de transporte de electrones para la generación del gradiente electroquímico de protones ($\Delta\mu_{H^+}$), el cual dirige la síntesis del ATP por la F₁F₀-ATP sintasa.

En años recientes se ha demostrado también que las mitocondrias son reguladoras clave de la apoptosis, la serie de acontecimientos genéticamente programados que conducen a la muerte celular.

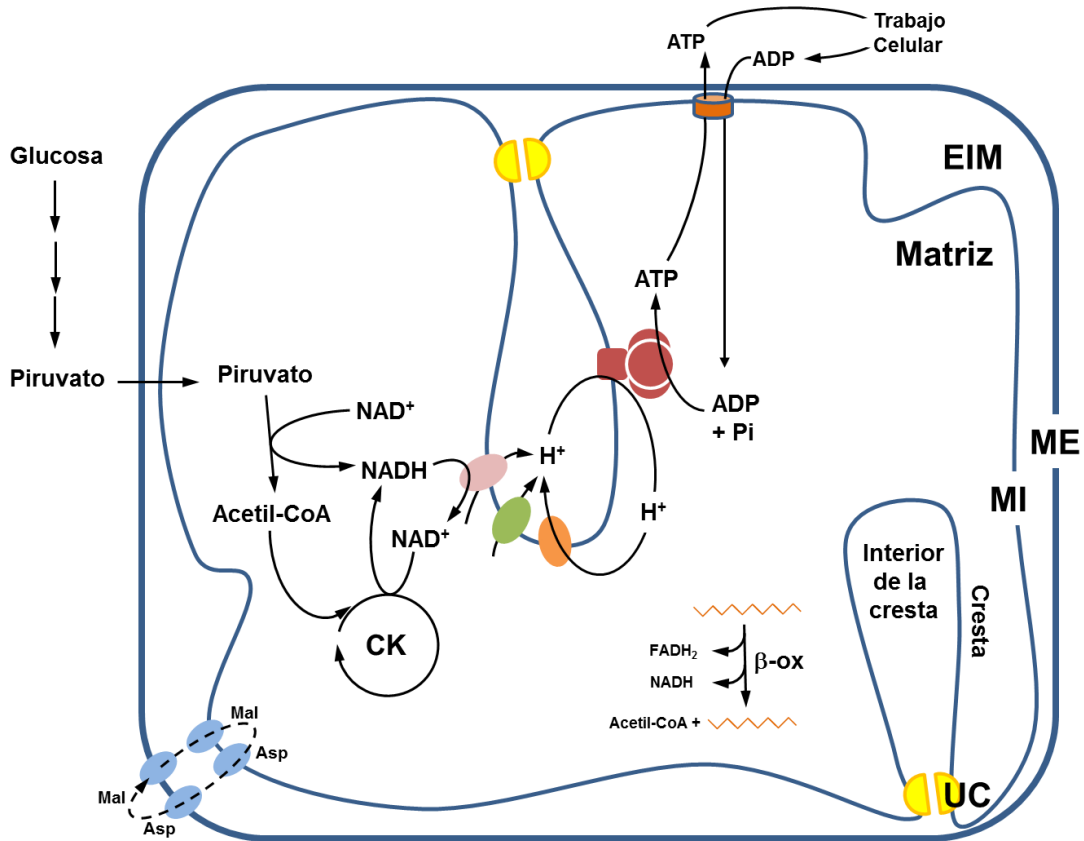


Figura 2. Vías bioenergéticas mitocondriales. Complejos respiratorios en la membrana mitocondrial interna (MI) con los componentes asociados de la transferencia de electrónica. También se observan las vías de la oxidación del piruvato asociadas a la matriz, la β -oxidación de los ácidos grasos (β -ox) y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CK). La translocasa de los nucleótidos de adenina (ANT), las lanzaderas de malato-aspartato (Mal/Asp), el transportador de piruvato, se encuentran asociados a la membrana interna (MI) y externa (ME). El interior de la cresta o espacio intermembranal (EIM) es a donde son bombeados los protones para formar el gradiente electroquímico y esta son cerradas por uniones de cresta (UC).

1.2. La cadena de transporte de electrones.

La conversión de la energía liberada por los procesos metabólicos que ocurren en la matriz mitocondrial y que será almacenada en forma de ATP, la llevan a cabo los complejos respiratorios y la F_1F_0 -ATP sintasa. Estos complejos se encuentran embebidos en las crestas de la membrana interna mitocondrial y se reconocen como las principales bombas de protones, capaces de generar un $\Delta\mu_{H^+}$ a través de la membrana interna mitocondrial. Es decir, la cadena de transporte de electrones convierte el poder reductor de las coenzimas NADH y $FADH_2$ en energía electroquímica representada por el $\Delta\mu_{H^+}$. De esta manera, se define como lado positivo (P) a la cara de la membrana interna hacia donde se bombean los protones (H^+), mientras que el lado negativo (N) es la cara de la membrana donde la concentración de H^+ disminuye. Posteriormente, el $\Delta\mu_{H^+}$ se traduce

en energía química en forma de ATP a partir de ADP y fosfato (Pi), gracias al flujo de H⁺ desde el lado P al lado N de la membrana interna mitocondrial en las células eucariotas o plasmática en las bacterias (Mitchell, 1961; Boyer, 2000) (Figura 3).

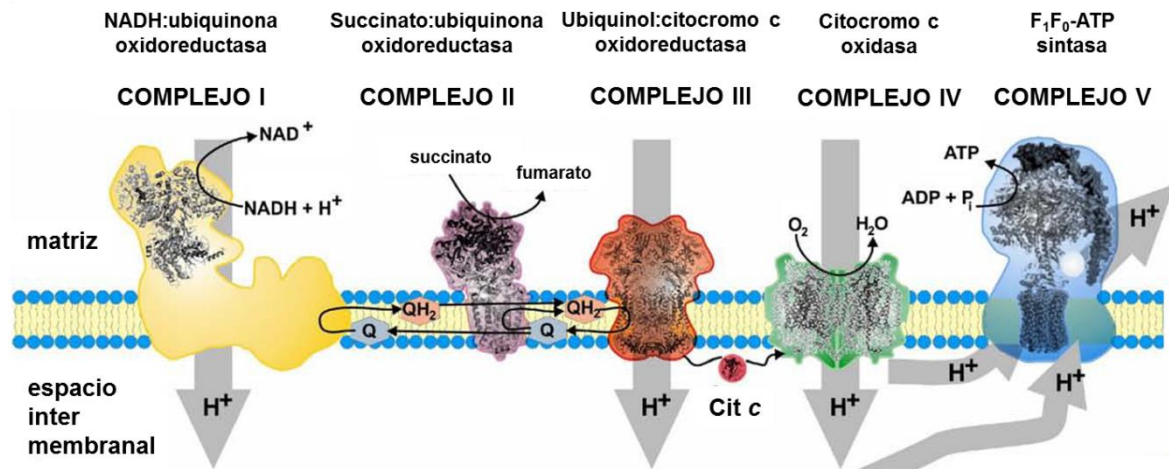


Figura 3. Cadena de transporte de electrones. Esquema general de la cadena de transporte de electrones, en el modelo de Mitchell los protones se conducen desde la matriz mitocondrial a través de la membrana interna y hacia el espacio intermembranal impulsados por el transporte electrónico para generar un gradiente, el cual es aprovechado para la síntesis de ATP por la F₁F₀-ATP sintasa (figura modificada de Chávez *et al.*, Bioquímica de Laguna, 2013) .

La cadena respiratoria o cadena de transporte de electrones está constituida por 4 complejos, denominados: complejo I (NADH: ubiquinona oxidoreductasa), complejo II (succinato: ubiquinona oxidoreductasa), complejo III (ubiquinol: citocromo c oxidoreductasa) y complejo IV (citocromo c oxidasa). Los electrones son transferidos desde el NADH al complejo I, o del succinato a través del complejo II, a la ubiquinona, reduciéndola a ubiquinol. Del ubiquinol, los electrones pasan a través del complejo III al acarreador periférico de electrones, el citocromo c, el cual reduce al complejo IV; este último cede los electrones al aceptor final, el oxígeno molecular produciendo agua. Para el flujo de los electrones los complejos I, III y IV cuentan con diferentes centros redox representados por grupos hemo, núcleos Fe-S, proteínas Rieske y átomos de cobre entre otros (Chávez *et al.*, 2013).

En los mamíferos, el complejo I está constituido por 45 subunidades diferentes que suman una masa molecular de casi 1000 kDa. La transferencia de electrones en este complejo es estimulada por K⁺ e inhibida por rotenona y amital. Para el flujo de los electrones, el complejo I contiene flavín mononucleótido (FMN), y varios centros fierro-azufre. Durante este proceso, el complejo I obtiene la energía necesaria para el bombeo de 4 H⁺ al espacio intermembranal o interior de la cresta (lado P). El sitio de oxidación del

NADH se encuentra hacia la cara interna de la membrana interna (lado N), mientras que la reducción de la quinona ocurre cerca de la cara externa de la membrana interna (lado P). Si tomamos en cuenta que la membrana interna es impermeable al NADH, el complejo I debe oxidar a los equivalentes reductores que provienen de las deshidrogenaciones de los sustratos del ciclo de Krebs, la descarboxilación oxidativa del piruvato y de la β -oxidación de los ácidos grasos, todas localizadas en la matriz mitocondrial; además de consumir el poder reductor producido en la glucólisis, empleando las lanzaderas de aspartato-malato (Figura 2).

La succinato deshidrogenasa, que forma casi la totalidad del complejo II, es un tetrámero de 140 kDa, su grupo prostético es FAD y además tiene tres centros hierro-azufre. Esta enzima forma parte del ciclo de Krebs, oxidando al succinato en fumarato. El sitio activo de la deshidrogenasa succínica se encuentra situado en el lado N de la membrana interna. Por lo tanto, en mitocondrias íntegras, el succinato debe ser generado en la matriz, o bien ser transportado hacia ese espacio para su oxidación. La deshidrogenasa succínica, que reduce a la coenzima Q, es inhibida por el oxaloacetato y malonato, y no bombea protones (Chávez *et al.*, 2013).

El complejo III se encuentra situado en un punto crucial en la cadena respiratoria, ya que recibe los electrones del ubiquinol y los cede al citocromo c; durante el flujo de los electrones se obtiene suficiente energía para el bombeo de 4 H^+ hacia el lado P. La unidad funcional de este complejo es un homodímero, cuyo monómero está formado por 10 subunidades, en donde se encuentran 3 centros de óxido-reducción formados por un centro [2Fe-2S] y los grupos hemo b_{562} , b_{566} y c_1 y tiene un peso molecular de 240 kDa. La corriente electrónica en este complejo es inhibida por el antibiótico antimicina. El poder reductor del complejo III es transferido al citocromo c, el cual es una proteína pequeña de 13 kDa, que se encuentra situada hacia el lado P de la membrana interna; este citocromo transporta los electrones del complejo III al complejo IV, y se libera de la membrana utilizando soluciones con altas concentraciones de sales como el KCl.

La coenzima Q es una benzoquinona liposoluble que contiene una cadena lateral constituida por 10 unidades de isoprenos (Q_{10}). Es reducida por los complejos I y II a ubiquinol (QH_2) y es oxidada por el complejo III. Durante su reducción en el complejo I se realiza el bombeo de H^+ al espacio intermembranal, mientras que en el complejo III se realiza el ciclo-Q, donde ocurre la oxidación de dos moléculas de QH_2 y la reducción de una Q, con la formación de una semiquinona ($HQ\bullet$); durante el ciclo-Q, el complejo III

acopla la energía libre disponible de la reacción de transferencia de electrones con el bombeo de H^+ al espacio intermembranal. Los electrones transferidos de la QH_2 al citocromo c_1 del complejo III son cedidos al citocromo c , el cual es el agente reductor del complejo IV.

El complejo IV que se reconoce como la oxidasa terminal y comprende a los citocromos a y a_3 , está formado de 6 a 13 subunidades y, además de los grupos hemo, contiene tres átomos de cobre iónico (2 CuA y 1 CuB) que son necesarios para la función redox de la enzima. El complejo IV oxida al citocromo c , bombea 4 H^+ al espacio intermembranal y reduce al oxígeno molecular (O_2). La citocromo oxidasa es inhibida por cianuro, azida de sodio o monóxido de carbono (Chávez *et al.*, 2013).

Estos complejos se pueden asociar entre sí y formar supercomplejos que pueden ser aislados de la membrana si se solubilizan con un detergente suave, como la digitonina. Gracias a esto se ha propuesto un modelo de estado sólido para la transferencia de los electrones, el bombeo de H^+ y el consumo de O_2 (Figura 4). Sin embargo, algunos estudios han demostrado que los supercomplejos no son la entidad funcional esencial de la cadena respiratoria, ya que los complejos respiratorios pueden encontrarse en su forma monomérica y llevar así la transferencia de los electrones y formar el $\Delta\mu_{H^+}$ necesario para la síntesis de ATP (Schägger *et al.*, 2000).

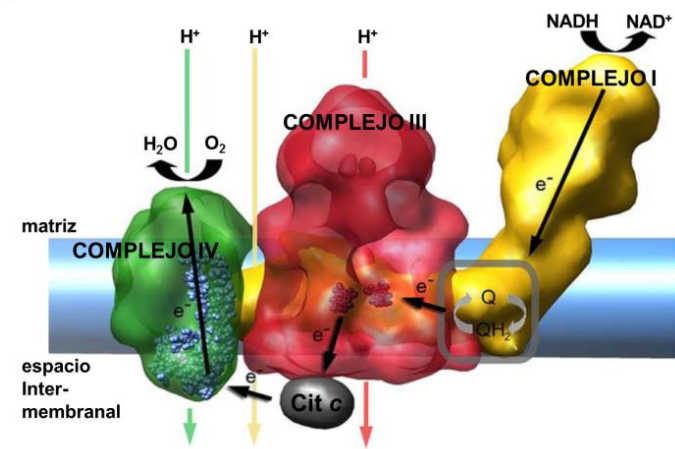


Figura 4. Supercomplejos mitocondriales. Los complejos respiratorios se ensamblan en supercomplejos, apoyando el modelo del estado sólido. Los primeros supercomplejos caracterizados bioquímicamente fueron los de *S. cerevisiae*, el cual consistía en un dímero del complejo III y una o dos copias del complejo IV, y los aislados de las mitocondrias de corazón de bovino (mostrados en la figura), los cuales están compuestos por una copia del complejo I, un dímero del complejo III, y una o más de 4 copias del complejo IV (figura modificada de Vonk *et al.*, 2009).

1.3. La F_1F_0 -ATP sintasa.

La F_1F_0 -ATP sintasa es un complejo enzimático encargado de proveer a la célula de la energía necesaria para realizar todos sus procesos vitales; esta enzima es considerada un nanomotor y la podemos describir estructuralmente por un sector

hidrofílico denominado F_1 y un sector hidrofóbico llamado F_0 ; mientras que funcionalmente la podemos dividir en un rotor y un estator (Figura 5 y Tabla 1). Sin embargo, al considerar ambas clasificaciones se ha definido que el dominio catalítico hidrofílico F_1 -estator está compuesto por las subunidades solubles α y β ; mientras que el dominio F_1 -rotor contiene las subunidades γ , δ , y ϵ , con una estequiometría general para la F_1 de 3:3:1:1:1 (α , β , γ , δ , y ϵ , respectivamente). En la interfase de cada par de las subunidades α y β se forma un sitio activo, por lo que se tiene un total de 3 sitios activos. Simultáneamente, los tres sitios alternan su estructura y función acoplados al giro del rotor; de tal modo que, cada sitio será capaz de fijar $ADP + P_i$, sintetizar ATP y liberarlo (Figura 6).

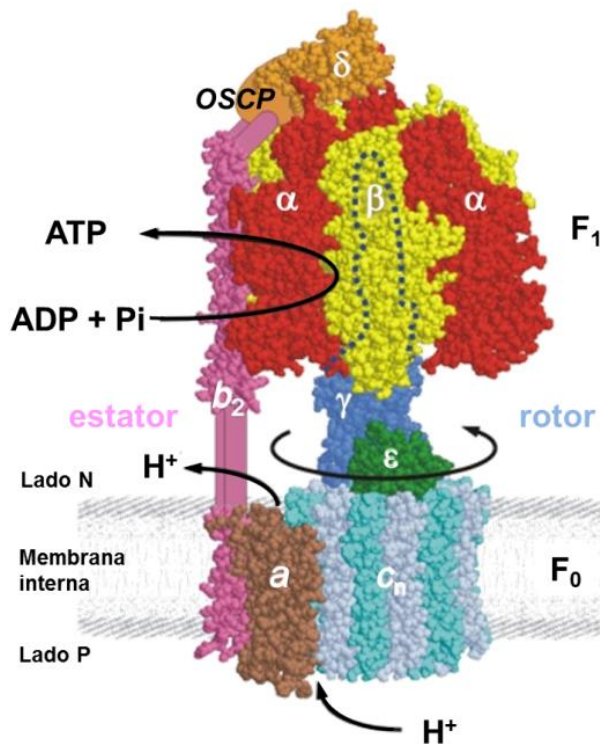


Figura 5. F_1F_0 -ATP sintasa. La síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato está acoplada por un mecanismo rotatorio, al paso de protones generados por el proceso oxidativo, desde el espacio intermembranal hacia la matriz mitocondrial, la energía almacenada en el $\Delta\mu_{H^+}$ lo que impulsa la rotación de la subunidad c del dominio F_0 y el tallo del dominio F_1 formado por las subunidades γ y ϵ ; alrededor del tallo central se encuentran localizados 3 dímeros de α/β , los cuales adoptan una distinta conformación y diferentes afinidades para los nucleótidos, impuestas por la asimetría del tallo central.

El dominio F_1 está unido por el tallo periférico al dominio hidrofóbico F_0 . Las subunidades $ATP9/c$ componen el F_0 -rotor, el F_0 -rotor-tallo periférico, está constituido por las subunidades $ATP4/b$, $OSCP$, $h(F6)$, d y f , mientras que la porción F_0 -estator-membranal contiene a las subunidades $ATP6(a)$, $ATP8(A6L)$ e i/j ; las subunidades de dimerización son las e , $ATP20$ (g) y k (Tabla 1).

Se han reportado otras proteínas que están asociadas al sector F_0 cuya función aún se desconoce, pero se sugiere que podrían estar relacionadas con mecanismos de

regulación o de estructura. Adicionalmente, existe una proteína cuyo papel es el de inhibir y/o regular la actividad de hidrólisis de ATP por parte de la F_1F_0 -ATP sintasa, la cual es denominada Inh1 en *Saccharomyces cerevisiae*, IF_1 en mamífero y en *Paracoccus denitrificans* se encontró un el inhibidor denominado subunidad ζ , presente en la familia de las α -proteobacterias (Pullman *et al.*, 1963; Ebner *et al.*, 1977; Arselin *et al.*, 1996; Bisetto *et al.*, 2007; Vonk *et al.*, 2009; Strauss *et al.*, 2008; Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2005; Morales-Ríos *et al.*, 2010).

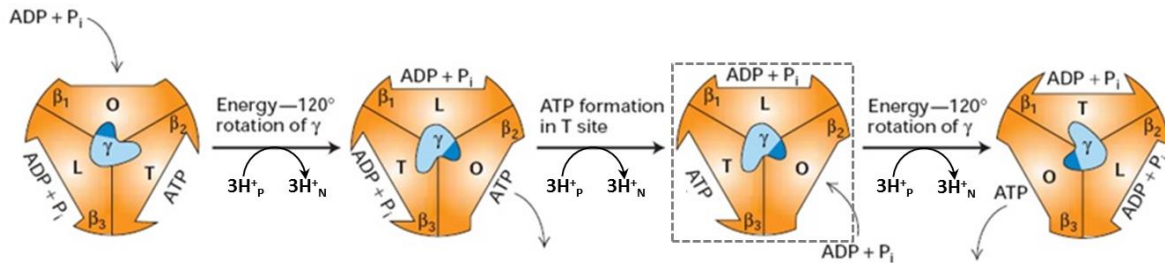


Figura 6. Modelo para los sitios catalíticos de la porción F_1 de la ATP sintasa durante la síntesis de ATP. El sector F_1 tiene tres sitios de unión de nucleótidos de adenina. El sitio catalítico se encuentra en la interfase de α/β , estos no son equivalentes. Lo que significa que, uno de estos sitios está en la conformación β_3 o sitio T (cerrado que une ATP fuertemente, ver recuadro) y es considerado el sitio catalítico activo, un segundo está en la conformación β_1 o sitio L (relajado y con el ADP y Pi unidos) y un tercero está en la conformación β_2 o sitio O (abierto-vacío unión muy débil por el ATP, pero afín por el ADP y Pi). La fuerza protón-motriz hace que el eje central rote (subunidad γ), el cual se pone en contacto con cada par de subunidades α/β de forma sucesiva. Esto produce un cambio conformacional cooperativo en el que el sitio β_3 se convierte en la conformación β_2 y el ATP se disocia; simultáneamente el sitio β_1 se convierte en la conformación β_3 , que promueve la condensación del ADP-Pi unidos para formar ATP; y el sitio β_2 se convierte en un sitio β_1 , donde se lleva a cabo la unión del ADP y Pi. La estequiometría H^+/ATP puede variar dependiendo de la fuente biológica, aquí se muestra la estequiometría $3H^+/ATP$ para la F_1F_0 -ATP sintasa de corazón de bovino. La flecha central indica la rotación de la subunidad γ impulsada por el $\Delta\mu_{H^+}$ (figura modificada de Walker, 1998).

La energía almacenada en el $\Delta\mu_{H^+}$ impulsa el flujo de los H^+ desde el interior de las cresta hacia la matriz mitocondrial, a través del sector F_0 -rotor. Cuando los protones atraviesan la membrana acoplados al dominio F_0 provocan el giro de un anillo formado por la subunidad c . Esta rotación hace girar al tallo central (subunidades δ y ϵ del rotor F_1) en movimientos de 120° , provocando cambios conformacionales consecutivos en las subunidades catalíticas (subunidades α y β del estator F_1) e induciendo la unión de sustratos (ADP + Pi), la síntesis de ATP o su liberación (Itoh *et al.*, 2004; Walker, 1998) (Figura 6).

Las subunidades γ , δ , ϵ y c están involucradas en el movimiento de la enzima durante la catálisis, mientras que el estator lo forman las subunidades del tallo periférico (Tabla 1), las cuales se mantienen estáticas durante la síntesis de ATP y a su vez mantienen fijas a las subunidades catalíticas α y β (Weber *et al.*, 2003).

La F_1F_0 -ATP sintasa es una enzima altamente conservada, sobre todo en aquellas subunidades involucradas en la catálisis y el bombeo de protones (Tabla 1) sin embargo, existen subunidades especie-específicas (Strauss *et al.*, 2008); por ejemplo las subunidades *ij* y *k* en levadura. Además en mamíferos y levaduras cuenta con la subunidad OSCP le confiere la susceptibilidad al inhibidor oligomicina (Racker, 1963)

Tabla 1. Composición de la F_1F_0 -ATP sintasa mitocondrial de *S. cerevisiae* y *B. taurus*.

Sector	Función	Subunidad	<i>S. cerevisiae</i>	<i>B. taurus</i>	% Identidad
F₁	F ₁ -estator	α	510 (545)	510 (553)	74
		β	480 (511)	480 (528)	79
	F ₀ -rotor	γ	278 (311)	273 (298)	42
		δ	138 (160)	146 (168)	36
		ϵ	61 (62)	50 (51)	33
F₀	F ₀ -rotor	ATP 9 (c)	76 (76)	75 (136)	59
	Estator- tallo periférico	OSCP	195 (212)	190 (213)	34
		ATP 4 (b)	209 (244)	214 (256)	22
		<i>h</i> (F ₆)	92 (124)	76 (108)	15
		<i>d</i>	173 (174)	160 (161)	21
		<i>f</i>	95 (101)	87 (88)	21
	Estator de membrana	ATP 6 (a)	249 (259)	226 (226)	29
		ATP 8 (A6L)	48 (48)	66 (66)	20
		<i>ij</i>	59 (59)	-	-
	Subunidades de dimerización	<i>e</i>	95 (96)	70 (71)	17
		<i>g</i>	115 (115)	102 (103)	25
		<i>k</i>	68 (68)	-	-
		(s)	-	175 (200)	-
	Regulación	IF1	63 (85)	84 (109)	26

Los números corresponden al número de aminoácidos de la proteína madura y, entre paréntesis la inmadura.

1.4. La F_1F_0 -ATP sintasa como dímero.

Además de su papel bioenergético en la síntesis de ATP, se ha descrito que la F_1F_0 -ATP sintasa también desempeña un papel importante dentro de la arquitectura mitocondrial. En este sentido, en la última década se ha descrito que el complejo V puede formar homo-oligómeros (Zick *et al.*, 2009), siendo los estados monoméricos y diméricos los más estudiados. La manera por la cual se ha estudiado a los oligómeros del complejo V es solubilizándolos con un detergente suave como la digitonina y separarlos por medio de la electroforesis en condiciones nativas en presencia de azul de Coomassie (BN-PAGE) o dodecil-maltosido y desoxicolato (CN-PAGE) y revelados con actividad de ATPasa (Figura 7). Aunque aún se desconoce el papel bioenergético de los diferentes estados oligoméricos del complejo V, se ha demostrado que el dímero tiene un papel importante en la arquitectura de las crestas de la membrana interna mitocondrial (Arnold

et al., 1998) (Figura 8). Asimismo, se ha demostrado que las proteínas involucradas en la interacción monómero-monómero y la estabilidad del dímero son diferentes en cada sistema biológico.

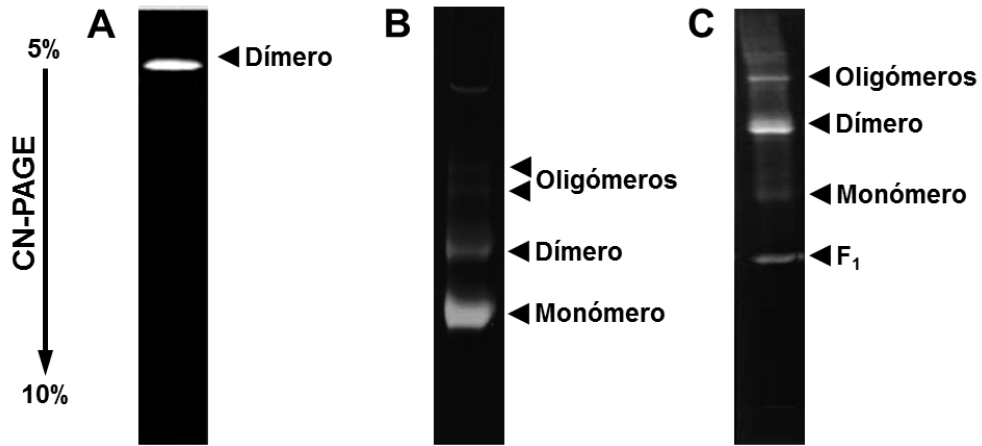


Figura 7. Actividad de ATPasa en gel. (A) Dímero de *Chamydomona reinhardtii*, (B) Oligómeros de Corazón de bovino y (C) Oligómeros de *Saccharomyces cerevisiae*. La presencia de los oligómeros del complejo V se determina por su actividad de hidrólisis de ATP en el gel de poliacrilamida. (figura modificada de Van et al., 2003; Strauss et al., 2008; Giraud et al., 2002).

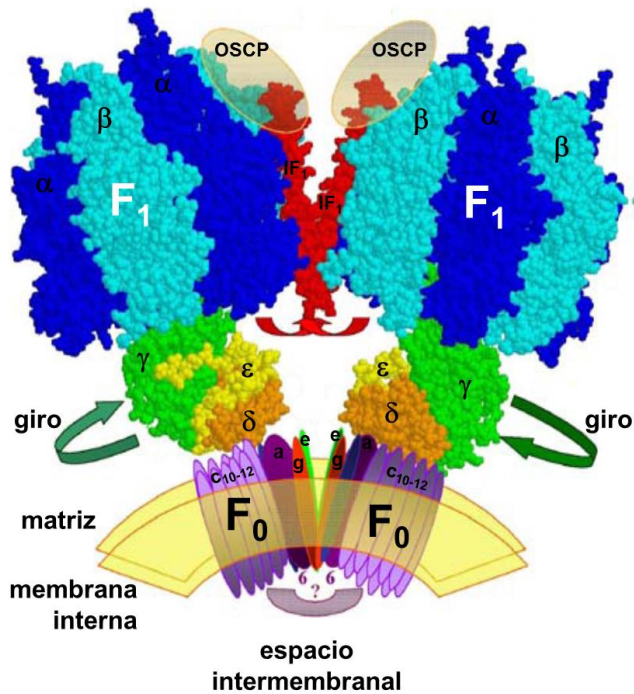


Figura 8. Dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa. Se ha identificado diferentes oligómeros del complejo V, los más abundantes y estables son los dímeros (V_2), a estos dímeros se pueden asociar en un arreglo helicoidal alrededor de la membrana interna mitocondrial, lo que ha permitido sugerir su participación en la arquitectura de la cresta (Modificado de García-Trejo et al., 2008).

1.4.1. El dímero de la F₁F₀-ATP sintasa en las algas.

Chlamydomonas reinhardtii y *Polytomella sp* son algas clorofíceas o algas verdes; en éstas la F₁F₀-ATP sintasa presenta las subunidades homólogas α , β , γ , δ , OSCP, a y c. A pesar de que las subunidades catalíticas presentan alta similitud con el resto de las ATP sintasas, éstas presentan extensiones de aminoácidos; por ejemplo, la subunidad α cuenta con aproximadamente 20 aminoácidos en el amino terminal y la subunidad β contiene 60 aminoácidos extras en el extremo carboxilo terminal; aunque aún no es clara su función se ha propuesto que podrían desempeñar un papel regulador de la actividad del complejo, ya que no se ha identificado el homólogo de la proteína inhibidora IF₁ (Villavicencio *et al.*, 2009).

Una característica estructural de este complejo es que no se identificaron homólogos de las subunidades clásicas que forman el estator de la ATP sintasa del resto de los eucariontes, ni aquellas involucradas en la dimerización del complejo; sin embargo se identificaron 9 subunidades asociadas a la dimerización, las cuales no tienen similitud con otras proteínas, y a las que se les denominó ASA (del inglés “ATP Synthase-Associated protein”) (van Lis *et al.*, 2007; Funes *et al.*, 2002; Cardol *et al.*, 2005; Vázquez-Acevedo *et al.*, 2006) (Figura 9A),

La F₁F₀-ATP sintasa de las algas se puede purificar como un dímero muy estable de aproximadamente 1600 kDa (Cano-Estrada *et al.*, 2010; van Lis *et al.*, 2003), para la obtención del monómero se han llevado a cabo cambios en la composición peptídica, lo que implica la disminución de la proporción de las subunidades que se han sugerido como dimerizadoras, la ASA6 y la ASA9 (van Lis *et al.*, 2007).

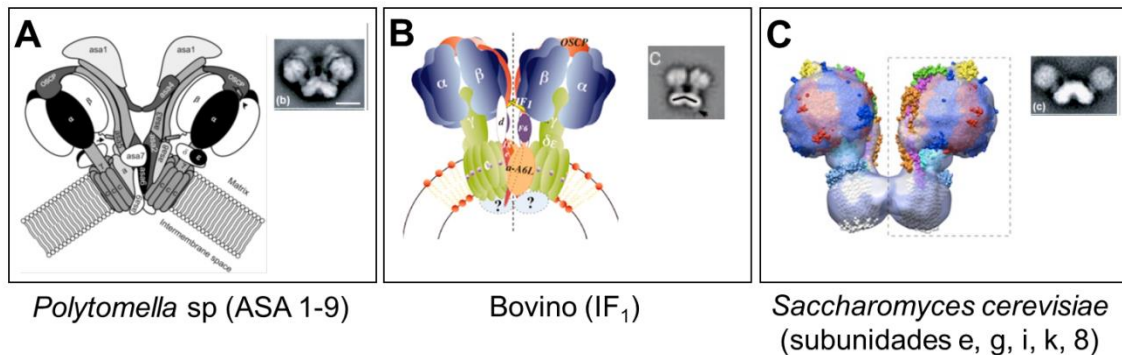


Figura 9. Estructura del dímero de la F₁F₀-ATP sintasa de diferentes fuentes biológicas. Las proteínas involucradas en la asociación entre los monómeros son diferentes para cada organismo, así como la disposición de las subunidades. Entre paréntesis se muestran las subunidades sugeridas para la dimerización del complejo. El recuadro a la derecha del dímero es una microscopía de trasmisión electrónica (figura modificada de van Lis *et al.*, 2007; Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2005; Couch-Cardel *et al.*, 2010).

1.4.2. El dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa en los mamíferos.

Con respecto a los mamíferos, el dímero más estudiado es el del corazón de bovino. La F_1F_0 -ATP sintasa presenta las subunidades catalíticas homólogas a *E.coli*, así como las subunidades que conforman el rotor de la enzima, el cual está compuesto por las subunidades *b*, *d*, F_6 , *OSCP* y como proteína reguladora a la proteína inhibidora, IF_1 . Además, cuenta con las subunidades supernumerarias membranales *e*, *g*, *A6L* y *f*.

Se ha reportado en la literatura que la subunidad IF_1 promueve la dimerización del complejo V (Cabezón *et al.*, 2000; García *et al.*, 2006; Couoh-Cardel *et al.*, 2010) (Figura 9B); estructuralmente se ha demostrado que la dimerización es esencial para la biogénesis de las crestas de la membrana interna mitocondrial. Minauro-Sanmiguel *et al.*, (2005) resolvieron la estructura de la F_1F_0 -ATP sintasa dimérica aislada de las mitocondrias de corazón de bovino. Se encontró que la interfase del dímero está formada por el contacto tanto del dominio F_1 como del F_0 y éstos a su vez conectados por la proteína IF_1 (Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2005).

Otros estudios han demostrado que al eliminar la subunidad IF_1 se pierden los dímeros y simultáneamente la arquitectura mitocondrial se ve afectada, particularmente se ha mostrado que no hay formación de crestas. Lo anterior apoya la hipótesis de la IF_1 como proteína dimerizante (Campanella *et al.*, 2008) (Figura 10).

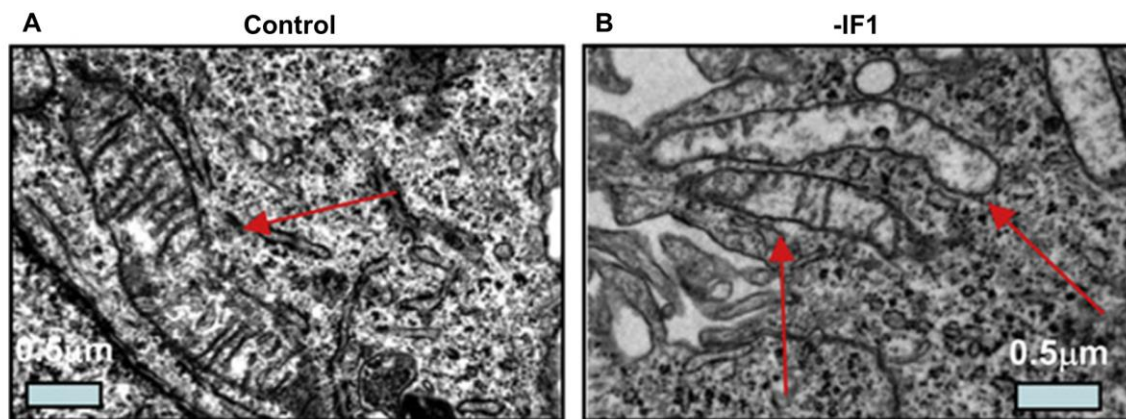


Figura 10. Ultraestructura mitocondrial de las células HeLa. (A) Mitocondrias control y (B) cepa mutante $-IF_1$, donde se puede observar que el interior de la mitocondria está desorganizado y con disminución de las crestas mitocondriales. Las flechas rojas señalan las mitocondrias por campo. Simultáneamente se reportó la pérdida de $\Delta\Psi$ y la síntesis de ATP (figura modificada de Campanella *et al.*, 2008).

1.4.3. El dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa en las levaduras.

La F_1F_0 -ATP sintasa de las levaduras presentan algunas subunidades homólogas con bacterias, algas y mamíferos, así como también pueden adoptar estructuras supramoleculares. A diferencia de los dímeros de mamífero, el dominio de interacción

entre los monómeros de *S. cerevisiae* es el sector F_0 . Se ha determinado que las subunidades dimerizantes son las subunidades *e*, *g*, *k*, *i* y *8*, gracias a experimentos que demuestran que una alteración en estos componentes desestabiliza las estructuras oligoméricas, lo que conduce a la aparición de especies monoméricas y morfologías anómalas en las crestas mitocondriales, a las que describen como aros de cebolla (Velours *et al.*, 2009) (Figura 11).

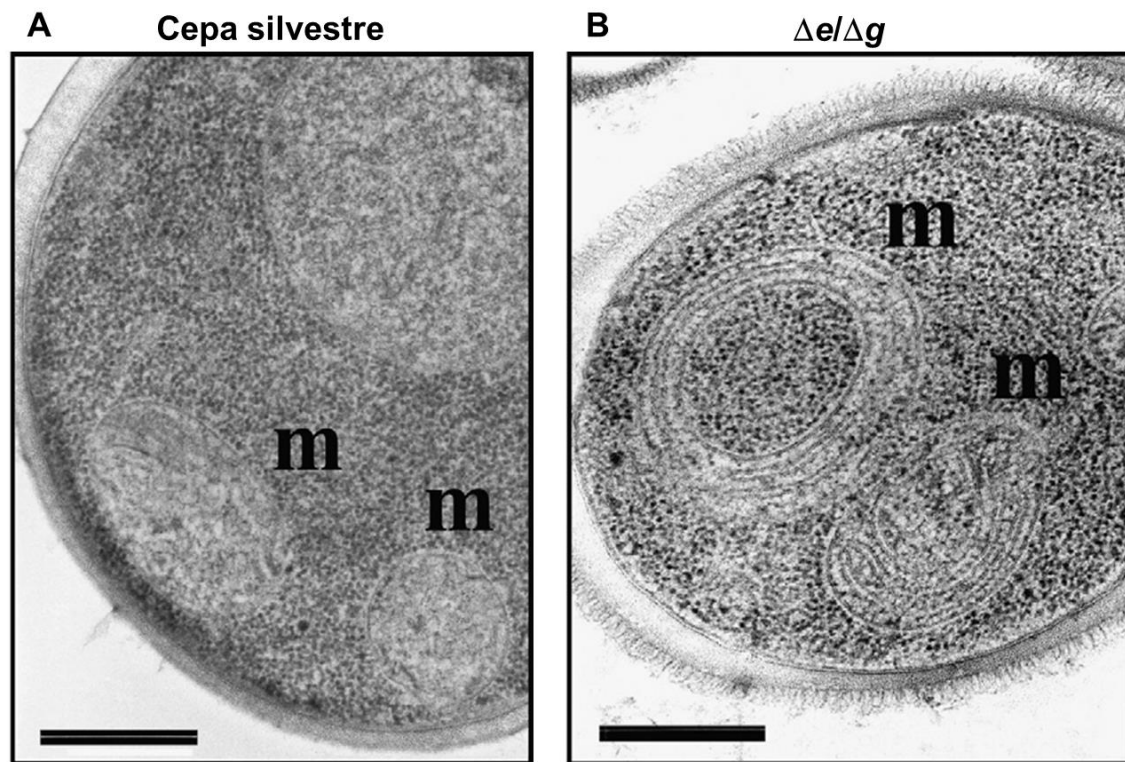


Figura 11. Diferencias estructurales en las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*. Micrografía de las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae* (A) cepa silvestre y (B) cepa mutante $\Delta e/\Delta g$, en la cual se observan las estructuras anómalas de las mitocondrias, crestas en forma de aros de cebolla. m=mitocondria. La barra indica 500nm (figura modificada de Velours *et al.*, 2009).

En la literatura se muestra que al crear mutantes de las subunidades *e*, *g* y *k* no se eliminan del todo las crestas mitocondriales, pero hacen sensible al dímero, lo cual sugiere que no son esenciales para la dimerización pero sí para su estabilidad. Aunado a esto, se ha podido demostrar que la subunidad *Inh1* (proteína inhibidora de la F_1F_0 -ATP sintasa) no es necesaria para la oligomerización (Wittig *et al.*, 2008; Wagner *et al.*, 2010; Arnold *et al.*, 1998; Dienhart *et al.*, 2002) (Figura 8C).

Como se puede observar, cada reino biológico ha desarrollado una estrategia para formar y/o estabilizar los dímeros del complejo V y plegar así la membrana interna mitocondrial en crestas. Por lo tanto, es importante ampliar el conocimiento sobre la

composición del dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa en otros organismos y determinar las subunidades dimerizantes. No obstante, el desarrollo que ha tenido el análisis estructural y de la composición de los dímeros, es importante hacer notar que poco se ha hecho sobre el efecto que tiene la dimerización en la actividad de ATPasa del complejo V.

1.5. *Ustilago maydis* como modelo experimental.

U. maydis se ha utilizado como modelo para estudiar las interacciones planta-patógeno (Martínez-Espinoza *et al.*, 2002; Bölker, 2001; Steinberg *et al.*, 2008), la recombinación del DNA (Holliday, 1965; Holloman *et al.*, 2008), la transición dimórfica y el papel de varias vías de transducción de señales en algunos de estos procesos (Vollmeister *et al.*, 2011; Feldbrügge *et al.*, 2004; Lengeler, 2000). *Ustilago maydis* es un hongo basidiomiceto que infecta a las plantas de maíz y teocintle, induciendo grandes tumores llenos de teliosporas. En contraste con otros hongos fitopatógenos que producen la muerte de la planta, *U. maydis* es un organismo biotrófico, y sólo en etapas avanzadas de la infección la planta muere (McCann *et al.*, 2008).

Durante su ciclo de vida transita por tres diferentes etapas morfológicas: la levadura de forma haploide no patógena, el micelio dicariótico, que es la forma infecciosa del organismo, y la teliospora, con dos células dicarióticas, la cual es resistente a condiciones ambientales adversas (Figura 12) (Herrera *et al.*, 1990; Feldbrugge *et al.*, 2004). Los cambios patológicos, morfológicos y la invasión a la planta son efectos regulados por las vías MAPK y AMPc, (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009; Kahmann *et al.*, 1999; Doehlemann *et al.*, 2008; Feldbrugge *et al.*, 2004; Lengeler *et al.*, 2000; Reifschneider *et al.*, 2005; Rexroth *et al.*, 2004; Marques *et al.*, 2007). Aunque *U. maydis* requiere a la planta para completar su ciclo de vida, en el laboratorio es posible obtener células como levadura o micelio en función de las condiciones de crecimiento. *U. maydis* es un organismo aerobio que depende totalmente de la fosforilación oxidativa para el suministro de ATP, apuntando a la mitocondria como un organelo clave en la fisiología de este organismo.

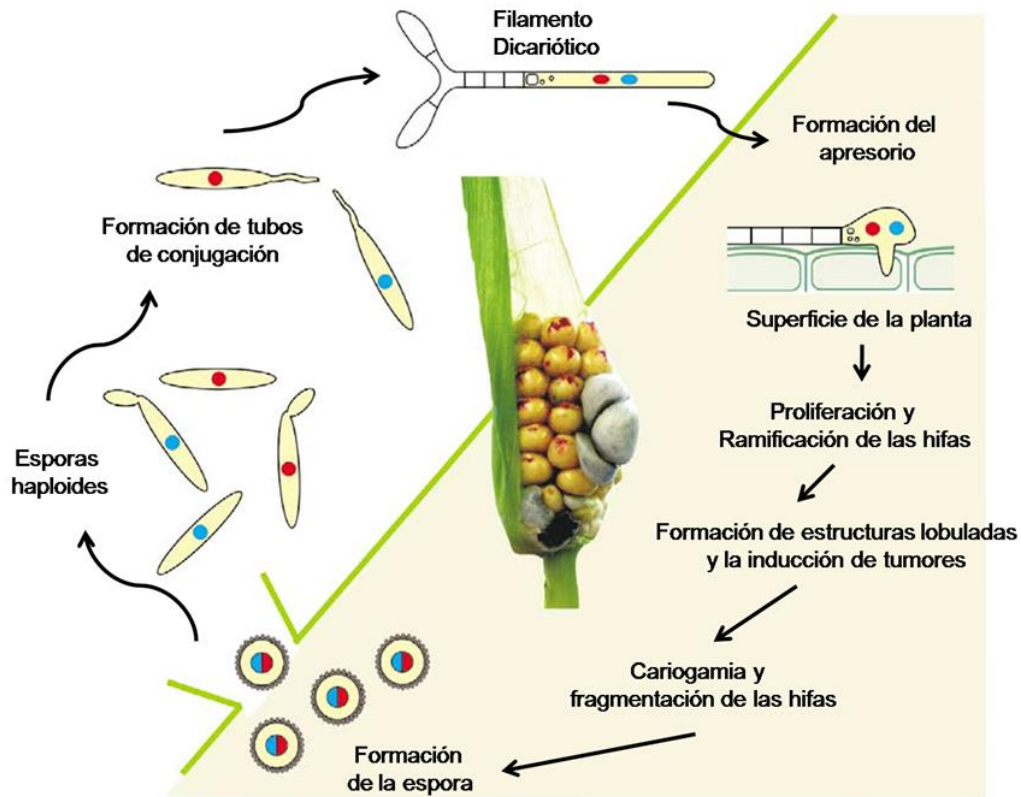


Figura 12. Ciclo de vida de *Ustilago maydis*. El área sombreada en verde claro indica los procesos que son absolutamente dependientes de la presencia de la planta. Los núcleos azules y rojos indican los diferentes tipos de apareamiento en el locus A y B y se utiliza para visualizar las fases haploide y diploide dicarióticas durante el ciclo de vida. En el centro del diagrama se muestra una mazorca de maíz infectada con síntomas de la enfermedad típica. En la parte inferior, el tumor se rompe y revela cantidades masivas de teliosporas negras. Cuando las esporas diploides germinan sufren meiosis y producen esporidios haploides. En este trabajo se emplearon a las levaduras haploides (figura modificada de Feldbrügge *et al.*, 2004).

Las mitocondrias contienen los cuatro complejos respiratorios clásicos. Además de dos componentes adicionales en su cadena respiratoria, una NADH deshidrogenasa alterna externa (Nde1) que transfiere electrones desde el NADH citosólico a la poza de la ubiquinona en la membrana mitocondrial interna, y la oxidasa alterna (AOX), que cataliza la transferencia de electrones desde ubiquinol al oxígeno molecular (Juárez *et al.*, 2004). En el laboratorio se ha determinado que los complejos respiratorios en las mitocondrias de *U. maydis* son ensamblados en estructuras supramoleculares o supercomplejos (Flores-Herrera en preparación).

2. JUSTIFICACIÓN

En el laboratorio se estudia a *U. maydis*, un hongo basidiomicete que es parásito del maíz y que provoca grandes pérdidas económicas a nivel mundial, por ello es importante incrementar el conocimiento científico de este hongo, a fin de contar con más

herramientas que pudieran ayudar a su control biológico. El análisis de los complejos respiratorios de las mitocondrias de las levaduras de este hongo, muestra que el monómero (V_1) y el dímero (V_2) del complejo V tienen un peso molecular de 600 kDa y 1200 kDa respectivamente. El peso determinado para el V_1 y el V_2 de *U. maydis* es similar para el reportado en otras levaduras, sin embargo se observó que este complejo es relativamente más pequeño con respecto al complejo V de las mitocondrias de corazón de bovino (Tabla 2). Esto abre varias posibilidades: i) que la estequiometría en las subunidades en *U. maydis* sea diferente a lo reportado, ii) que *U. maydis* presente diferentes tipos de subunidades con otra estequiometría, y iii) que las subunidades sean de un tamaño menor al descrito. Con base a esto, en este proyecto se pretende aislar al V_2 y V_1 de *U. maydis*, caracterizar su actividad de ATPasa, y determinar la identidad, el tamaño y la estequiometría de las diferentes subunidades que componen a cada uno de estos oligómeros.

Tabla 2. Peso molecular del monómero y dímero del complejo V de diferentes organismos.

	V_1 M_{app} (kDa)	V_2 M_{app} (kDa)
Corazón de bovino	750	1500
Diferentes órganos de Rata	750	1500
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	600	1250
<i>Neurospora crassa</i>	600	1250
<i>Yarrowia lipolytica</i>	543	1230
<i>Ustilago maydis</i>	660	1200
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	750	1550
<i>Paracoccus denitrificans</i>	530	

M_{app} = peso molecular aparente, determinado con BN-PAGE y por el análisis de su composición peptídica.

3. OBJETIVOS

3.1. General.

Determinar la actividad y composición proteica del dímero y del monómero de la F_1F_0 -ATP sintasa de *Ustilago maydis*.

3.2. Particulares.

- Aislar el dímero y el monómero del complejo V en su forma soluble.
- Determinar la composición proteica del dímero y del monómero del complejo V.

- Determinar la actividad de hidrólisis de ATP del dímero y del monómero del complejo V aislados.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular. La cepa FB2 de *U. maydis* fue sembrada en un medio sólido de YPD (1% glucosa, 1% de extracto de levadura, 0.25% bactopectona, 2% de agar), cultivada a 28°C por 18 horas. A partir de este cultivo se preparó un inóculo para crecer las células en 100 ml de YPD (0.5% de extracto de levadura, 0.25% bactopectona, 0.5% de glucosa) durante 24 h a 28°C y 180 rpm. Se transfirieron de 20 a 40 unidades de absorbencia (600 nm) de esta suspensión a un litro de YPD y las levaduras fueron cultivadas durante 18 h a 28°C y 200 rpm.

Aislamiento de las mitocondrias. Las mitocondrias fueron aisladas como lo describió Juárez *et al.*, (2006). Las células fueron cosechadas por centrifugación a 5,500 *g* durante 10 min a 4°C; se resuspendieron y se lavaron dos veces con agua destilada. En general se obtienen 8 g de células por litro de medio de cultivo. Posteriormente las levaduras se resuspendieron en 0.6 M de sulfato de amonio; para degradar la pared celular se adicionaron las enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (0.016 g/g de peso húmedo de células) y se incubaron durante 60 min a 30°C. Para eliminar las enzimas líticas, los protoplastos fueron centrifugados a 5,500 *g* durante 10 min a 4°C; se resuspendieron y lavaron con una solución compuesta por 0.8 M sacarosa, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.0 y se recuperaron por centrifugación a 5,500 *g* durante 10 min a 4°C.

Los protoplastos se resuspendieron en 40 ml de una solución de 0.4 M sacarosa, 10 mM Tris y 1 mM EDTA, pH 7.0 y se homogenizaron de 15 a 30 veces con un homogenizador Potter, en presencia de 1 mM PMSF y 20 µl del coctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich P-8215). Al finalizar, el homogenado se llevó a un volumen final de 130 ml y se centrifugó a 5,500 *g* durante 10 min a 4°C.

Para recuperar a las mitocondrias, el sobrenadante se centrifugó a 17,300 *g* durante 10 min a 4°C; finalmente las mitocondrias se resuspendieron en 0.4 M sacarosa, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.0, con el menor volumen posible. Se almacenaron a -70°C.

Solubilización de los supercomplejos y complejos mitocondriales. Las mitocondrias se incubaron en presencia del detergente digitonina (2 g/g proteína), en una solución de 50 mM Bis-Tris y 500 mM de ácido aminocaproico, pH 7.0; el detergente se añade mientras la solución se agita lentamente. La solución se incubó durante 30 min a 4°C,

posteriormente se ultracentrifugó a 100,000 g durante 35 min a 4°C. Los complejos y supercomplejos respiratorios se recuperaron en el sobrenadante.

Purificación del dímero y del monómero del complejo V. Los supercomplejos y complejos respiratorios se aislaron por medio de un gradiente continuo de sacarosa de 0.5 - 1.5 M, en presencia de 20 mM KCl, 15 mM Tris-Base, pH 7.4 y 0.2% de digitonina; se añadieron aproximadamente 48 mg de proteína (3 ml del solubilizado) en 24 ml de gradiente y se centrifugaron a 131,000 g durante 20 h a 4°C. Se colectaron fracciones de 500 µl; la densidad de cada fracción fue determinada por medio de un densitómetro ATAGO N1 (Brix 0~32%). La proteína en las fracciones de interés fue concentrada en filtros Amicon de 10 K. Las muestras fueron equilibradas con 30 mM HEPES, 5% glicerol, pH 8.0 y almacenadas a -70°C.

Electroforesis en condiciones nativas (BN-PAGE y CN-PAGE). Los complejos respiratorios de las mitocondrias de *U. maydis* se resolvieron por medio de la electroforesis azul en condiciones nativas (BN-PAGE) y la electroforesis clara en condiciones nativas (CN-PAGE) en geles de gradiente de poliacrilamida (5 – 10%). Para la BN-PAGE el amortiguador del ánodo contenía 50 mM Bis-Tris/HCl, pH 7.0; el amortiguador del cátodo contenía 50 mM tricina, 15 mM Bis-Tris, pH 7.0 y el colorante aniónico Coomassie G250 (0.02%). Para la CN-PAGE el amortiguador del ánodo contenía 25 mM imidazol-HCl, pH 7.0; el amortiguador del cátodo contenía 50 mM tricina, 7.5 mM Imidazol, pH 7.0, 0.05% desoxicolato de sodio (DOC) y 0.01% DDM (Wittig *et al.*, 2007). Se utilizó como marcador del frente de corrida al colorante rojo de Ponceau. Se aplicaron 100 µg de proteína por carril y las condiciones de la corrida electroforética fueron 30 V durante 16 horas a 4°C. El peso molecular de los complejos respiratorios y supercomplejos fue determinado por su movilidad electroforética y la localización de su actividad catalítica en gel, utilizando como estándares de peso molecular y actividad a los complejos de corazón de bovino, los cuales fueron solubilizados con digitonina en las mismas condiciones que los complejos de *U. maydis*.

Actividad en gel de los oligómeros del complejo V. La ubicación en el gel de los oligómeros del complejo V fue determinada por medio de su actividad de hidrólisis de ATP. El gel se incubó a 37°C en una solución de 50 mM de glicina, pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 0.2% Pb(NO₃)₂ y 5 mM ATP; ajustando el pH con trietanolamina. La actividad de hidrólisis de ATP se observó como un depósito blanco del fosfato de plomo, sobre un fondo oscuro (Jung *et al.*, 2000).

Electroforesis en 2D. La 2D-tricina-SDS PAGE se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito por Schägger (2006). La banda de proteína del dímero y del monómero de la F₁F₀-ATP sintasa fue cortada de un gel BN-PAGE; para extraer las subunidades del oligómero, la banda fue incubada en la mezcla de carga (0.125 M Tris-HCl, 5% SDS, 25% Glicerol, 0.05% β-mercaptoetanol y 0.02% azul de bromofenol). Las proteínas fueron separadas en condiciones desnaturalizantes por medio de un gel de 2D-tricina-SDS-PAGE al 16%, el cual tiene una alta capacidad de resolución en el intervalo de 10 a 70 kDa, especialmente en proteínas pequeñas. Para la 2D-tricina-SDS-PAGE el amortiguador del ánodo contenía 100 mM de Tris, 20 mM de HCl, pH 8.9; el cátodo contenía 100 mM Tris, 100 mM Tricina, pH 8.25 y 0.1% SDS. Las condiciones de la corrida fueron 120V durante 2 horas a 4°C.

Espectrometría de Masas. Las bandas de proteínas teñidas con Coomassie © azul brillante R-125 provenientes de la 2D-tricina-SDS-PAGE, se extrajeron, se destiñeron, fueron reducidas con DTT, y carbamidometiladas. Posteriormente fueron digeridas con tripsina porcina modificada (Promega, Madison, WI). El análisis de la espectrometría de masas de los péptidos se realizó como lo reportó González-Zamorano (2009) usando un espectrómetro de masas modelo 3200 Q TRAP (Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, ON, Canadá), equipado con una fuente iónica nanoelectrospray (NanoSpray II) y un MicrolonSpray II. Debido a que las proteínas hidrofóbicas son poco teñidas por el azul de coomassie, se realizaron cortes de 3 mm a lo largo del gel para identificar todas las proteínas presentes.

La búsqueda en la base de datos y la identificación de los péptidos fue realizada con un conjunto de espectros usando el algoritmo de búsqueda MASCOT (versión 1.6b9, Matrix Science, London, U.K., available at <http://www.matrixscience.com>). La tolerancia en la masa fue de 0.5 Da para los precursores y de 0.3 Da para la masa de los fragmentos usados. Las cisteínas carbamidometiladas fue la única modificación que se empleó y se permitió la pérdida de un sitio de corte de la tripsina. Las búsquedas fueron hechas usando el subconjunto de Hongos del Banco de datos NCBI nr (<http://www.ncbi.nih.gov>). La identificación de las proteínas fue aceptada cuando al menos dos espectros MS/MS coincidieron con el 95% del nivel de confianza ($p < 0.05$).

Determinación de la concentración de proteína. La cuantificación de la concentración de proteína se realizó por medio del método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) con algunas modificaciones. Las muestras fueron tratadas con 0.4% DOC y se continuó

con el método tradicional. La absorbencia de las muestras se determinó a 660 nm usando albúmina sérica de bovino (BSA) como estándar.

Ensayo enzimático. Para determinar la actividad de ATPasa del complejo V se realizaron ensayos en presencia de un sistema regenerador de ATP acoplado a la oxidación del NADH, el cual estaba compuesto por 30 mM HEPES pH 8.0, 5 mM fosfoenolpiruvato (PEP), 1 mM MgSO₄, 5 unidades de la piruvato cinasa (PK), 30 unidades de la lactato deshidrogenasa (LDH) y 100 µg de muestra; se empleó una solución equimolar de Mg-ATP para iniciar la reacción de hidrólisis de ATP. En esta reacción, el ATP es regenerado a partir del ADP liberado durante su hidrólisis a través de una fosforilación a nivel de sustrato realizada por la piruvato cinasa (PK), que usa como donador del fosfato al PEP, dando como producto el piruvato, el cual es transformado a lactato por la lactato deshidrogenasa (LDH), oxidando a su vez una molécula de NADH a NAD⁺. Resultando así la producción de una molécula de ATP por una molécula de NAD⁺.

La reacción se inició agregando la proteína, la cual se encuentra en un medio que contiene 30 mM HEPES y 5 % glicerol pH 8.0, a una celda de cuarzo mediante agitación y se realizaron lecturas cada 0.5 seg por 15 min a 340 nm. Los resultados se analizaron tomando en cuenta el coeficiente de extinción del NADH ($\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y el estado estacionario de la reacción (Andrianaivomananjaona *et al.*, 2011; Penefsky *et al.*, 1960).

Dentro de los ensayos enzimáticos se determinó la resistencia del complejo V a la oligomicina. Debido a que la oligomicina es un inhibidor fuertemente unido pero de unión lenta, los oligómeros de la F₁F₀-ATP sintasa fueron incubados en el medio de reacción durante 5 min en presencia de diferentes concentraciones del inhibidor (0.1, 0.25, 0.5, 1, 5, 10, 20 µg/mg proteína). Al término de este tiempo la reacción fue iniciada como se describió arriba. El ajuste de los datos para determinar los parámetros cinéticos se realizó en el programa Sigma Plot versión 10.0.

Estabilidad Térmica. Para determinar la termoestabilidad de la F₁F₀-ATP sintasa se realizaron ensayos incubando la enzima por 15 min a diferentes temperaturas, al término de este tiempo la reacción de hidrólisis de Mg-ATP se realizó como se describió en el *Ensayo enzimático*. El ajuste de los datos para determinar los parámetros cinéticos se realizó en el programa Sigma Plot versión 10.0.

Cultivo celular para biología molecular. La cepa FB2 de *U. maydis* fue sembrada en un medio sólido (1% extracto de levadura, 0.25% bactopectona, 2% de agar),

cultivadas a 28°C por 18 horas. Las células fueron crecidas en 3 ml de YPD Light (1% extracto de levadura, 0.4% bactopectona, 0.4% glucosa) durante 24 h a 30°C a 180 rpm.

Obtención del DNA de la cepa FB2 silvestre de U. maydis. El cultivo se centrifugó a 15,700 g durante 2 min para recuperar las células. Posteriormente, para la lisis se utilizaron perlas de vidrio en 500 µl de amortiguador de lisis (10 mM Tris-Cl pH 8.0, 10 mM NaCl, 1% SDS, 2% Tritón X100, 1 mM EDTA) y 500 µl de la solución de fenol/cloroformo en una relación 1:1, en agitación constante durante 10 min. Las muestras fueron centrifugadas a 15,700 g durante 15 min, 400 µl de la fase soluble se transfirió a 1 ml de EtOH al 100%, dicho volumen fue centrifugado y se recuperó el paquete celular. Finalmente se incubaron con 50 µl de TE/Rnase (1.31 mM Tris-Base, 8.69 mM Tris-HCl, 10 mM Na₂-EDTA y 10 mg/ml de Rnase-A) a 400 rpm durante 10 min a 50°C.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para la construcción de los cebadores (oligonucleótidos) se utilizó el programa Clone Manager y fueron sintetizados por Metabion International AG (Alemania). El medio de reacción contenía 1 µl DNA genómico, 0.5 µl dNTP's, 5 µl del amortiguador 10x para la polimerasa Taq y 10 µl del amortiguador 5x para la polimerasa Phusion y, 5% DMSO para la polimerasa Phusion.

El PCR se realizó en un termociclador MJ Research modelo PTC-200 siguiendo los protocolos de temperatura variable y tamaño del producto. Las construcciones obtenidos corresponden a secuencias de aproximadamente 100 pb río arriba (UF) y río abajo (DF) del gen.

Formación del vector Topo. En caso usamos la polimerasa Phusion en el PCR, para formar las proyecciones de adenina y que sea reconocido el vector Topo para formar el plásmido, añadimos 1 µl de Taq polimerasa, 0.5 µl dNTP's y 5 µl del amortiguador 10x y se incubaron por 15 min a 72°C. Una vez finalizada la proyección se forma el vector utilizando un Topo TA Cloning Kit, del cual tomamos 3.5 µl del PCR modificado, 1 µl de solución salina (incluida en el Topo-kit), 0.2 µl del Topo-vector y se ajustó a un volumen final de 5 µl con H₂O.

Clonación en Escherichia coli. Para la transformación se utilizó la cepa TOP10 a la cual se añadió el DNA de la mezcla de ligación y se incubó por 30 min a 4°C, seguido de un choque térmico durante 45 seg a 42°C para provocar la entrada del plásmido a las células, posteriormente éstas fueron incubadas por 2 min a 4°C y se les adicionó 5 volúmenes (250 µl) de medio dYT (1.6% bacto-triptona, 1% extracto de levadura y 0.5%

NaCl) incubándolas durante 30 min a 37°C. Las células fueron sembradas en medio dYT^{Amp} sólido e incubadas 24 h a 37°C.

Obtención del DNA plasmídico. Se sembró una colonia independiente de la TOP10 transformada en 3 ml de dYT^{Amp} (1.6% bacto-triptona, 1% extracto de levadura, 0.5% NaCl y 0.1 µg ampicilina/ml) y se incubó por 12 h a 37°C con agitación constante. Para obtener el DNA plasmídico, 1 ml de la muestra fue centrifugado a 15,700 g durante 2 min, el sobrenadante fue descartado y las células fueron resuspendidas en 200 µl del amortiguador STET (100 mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 5% Tritón X100) y 20 µl de lisozima; se incubaron por 60 seg a 95°C y fueron centrifugados a 15,700 g durante 10 min. El sobrenadante, que contiene al RNA y al DNA plasmídico, es suplementado con 20 µl de solución Mini III (3 M NaOAc) y 500 µl de 2-propanol para precipitar a los ácidos nucleicos y formar la nube de DNA. Las muestras se centrifugaron a 15,700 g durante 10 min, el precipitado que contiene los ácido nucleicos, fue lavado con 200 µl de 70% de EtOH. Finalmente, se centrifugó a 15,700 g durante 2 min y se eliminó el sobrenadante, al precipitado se le agregaron 100 µl TE-RNase para obtener una muestra libre de RNA.

Purificación del DNA. El DNA se purificó por medio de un kit JET Quick Spin Column Technique de Genomed. El DNA plasmídico fue tratado adicionando 400 µl del amortiguador M1 (hidroxicloruro de guanidina e isopropanol), mezclándolas por inversión y fueron transferidas a una columna de sílica de purificación, la cual fue centrifugada a 15,700 g por 1 min, descartando el filtrado; la columna se lavó dos veces con 400 µl del amortiguador M2 (etanol, NaCl, EDTA y Tris/HCl) y se centrifugó a 15,700 por 1 min eliminando el filtrado. Para eluir el plásmido de la columna se le adicionó 50 µl de TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0) y se centrifugó a 15,700 g por 2 min. La concentración de DNA se determinó en un espectrofotómetro NanoDrop peqlab modelo 2000c.

Secuenciación del DNA. La mezcla de reacción está compuesta por: 250 ng de la muestra, 3.2 pmoles del cebador MF963/MF964 y 10 mM Tris/HCl, pH 8.0, en un volumen final de 7 µl; la secuenciación fue realizada en LMU Munich y registrada en <http://www.gi.bio.lmu.de/sequencing/index.html>; la verificación de las secuencias obtenidas y los sitios de corte se realizó alineándolos con la secuencia original.

Construcción de vectores knockout. La digestión de los plásmidos UF y DF para la construcción de los vectores se realizó utilizando las enzimas de restricción *Sfi*I y *Scal* respectivamente, el plásmido (pUMA198) que contiene el cassette de higromicina (Hyg)

fue digerido con *Sfi*I. Las muestras se resolvieron en un gel de agarosa al 0.8%, en el amortiguador TAE (2 mM Tris-Base, 2 mM ácido acético, 10% EDTA pH 8.0) por 60 min a 100V, las bandas correspondientes a los cortes por las enzimas de restricción fueron extraídas del gel mediante un Zymoclean Gel DNA Recovery kit de Zymo Research (USA). Una vez obtenida la muestra pura se determinó la concentración de DNA en un espectrofotómetro NanoDrop peqlab modelo 2000c. El plásmido KO se obtuvo a partir de la ligación de los fragmentos de DNA empleando una relación 1:1:3 de UF:DF:Hyg, durante 3 h a temperatura ambiente en presencia de una DNA ligasa.

Protoplastos de U. maydis. Se inocularon 3 ml de medio YPD light con la cepa FB2 y se incubaron toda la noche a 28°C. Posteriormente, el preinóculo se diluyó hasta 0.4 unidades de D.O. continuándose el crecimiento hasta alcanzar las 0.8 unidades de D.O. lo que asegura un adecuado crecimiento celular. Una vez descartada la contaminación por microscopía, se centrifugó un volumen de 50 ml de las células a 1,700 g durante 5 min; el paquete celular se resuspendió con 25 ml del amortiguador SCS (20 mM de citrato trisódico) y centrifugado a 1,700 g durante 5 min. El precipitado se recuperó y resuspendió con una solución de Novozyme (7 mg novozyme/2 ml SCS); fue incubado durante 5 min a temperatura ambiente verificando con el microscopio, que entre el 30 – 40 % de las células presenten burbujas en el ápice; esta transformación permite continuar el procedimiento de modificación genética de *U. maydis*. Se añadieron 10 ml de SCS, y se centrifugó a 1,100 g durante 5 min a 4°C, el precipitado se resuspendió con 10 ml de SCS para eliminar el compuesto novozyme, y nuevamente fue centrifugado a 1,100 g durante 5 min, el precipitado se resuspendió en 10 ml del amortiguador STC (50% (v/v) 2 M sorbitol, 1% (v/v) 1 M Tris-HCl (1 M), 10% (v/v) 1 M CaCl₂) y se centrifugó a 1,100 g durante 5 min (este paso se repitió dos veces); posteriormente se desechó el sobrenadante y en 1 ml de STC se resuspendió el precipitado. Finalmente la muestra fue almacenada a -80°C en alícuotas de 100 µl.

Transformación de U. maydis. Para la transformación de la levadura se utilizaron cajas de Petri con agar Reg-light (1% extracto de levadura, 0.4% bactopectona, 0.4% sacarosa, 18.22% sorbitol, 1.5% agar) e higromicina (50 mg higromicina B/ml de PBS). Se adicionaron 10 ml de Reg-light agar con 80 µl de higromicina (aproximadamente 4 mg) y finalmente a los 15 min se agregaron 10 ml de Reg-light agar. A los protoplastos se le añadieron 15 µg de heparina (15 mg/ml) y 5 µl del DNA (producto de la ligación), y se incubaron por 10 min a 4°C, posteriormente se añadieron 500 µl del amortiguador

STC/PEG (60% STC-amortiguador, 40% polietilenglicol Sigma P-3640) y fueron incubados por 15 min a 4°C. Finalmente se dispersaron las células transformadas en la placa de agar muy suavemente y fueron incubadas por 7 días a 28°C.

P1/P2 PCR. Se sembró una azada de la cepa transformada en medio CM-Hyg agar (0.25% cazaminoácidos, 0.1% extracto de levadura, 1% solución Holliday de vitaminas, 6.25% solución Holliday de sales, 0.05% DNA (sigma D-3159) 0.15% NH₄NO₃, 18.22% sorbitol, 1.5% bacto-agar, 5 µg/ml Hyg, pH 7.0) en forma de estría para obtener colonias separadas y se incubaron por 24 h a 30°C. Una vez multiplicadas las células, se toma una colonia independiente y fue sembrada en medio YPD light e incubadas por 24 h a 30°C en agitación constante; posteriormente se tomaron 5 µl del cultivo y se sembró en una caja con CM-Agar para mantener la línea celular, el cultivo restante se empleó para aislar al DNA y se realizaron PCR con los oligonucleótidos P1 (aproximadamente 20 pb al inicio del UF) y el P2 (aproximadamente 20 pb dentro del gen original). Las muestras se resolvieron en un gel de agarosa al 0.8%, 0.5x-TBE, bromuro de etidio (EtBr), y se incluyeron como control negativo la cepa WT; las muestras que contienen un fragmento del mismo tamaño que la WT son eliminadas.

Flanking PCR. Se utilizaron las muestras obtenidas del paso anterior, usando los oligonucleótidos U1 (aproximadamente 20 pb antes del UF) y el MF167 para el UF y MF168 y D3 para el DF. MF167/MF168 contienen aproximadamente 20 pb dentro el cassette de resistencia a Hyg, usando como control negativo la cepa WT. Una vez finalizado el PCR las muestras se resolvieron en un gel al 0.8% de agarosa, 0.5%-TBE, EtBr.

Southern Blot. El DNA para el southern blot proviene de una digestión por las enzimas de restricción específicas, cuidando de que dichas enzimas no tuvieran sitio de corte dentro del gen. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 0.8% con BrEt en 1% de TAE, a 90V/2 h (Rybicki *et al.*, 1996), al finalizar la corrida, el gel se lavó con 250 mM HCl durante 20 min, posteriormente se lavó 2 veces con dH₂O por 5 min y se incubó en la solución DENAT (1.5 M NaCl, 0.4 M NaOH) por 20 min; se lavó con dH₂O y se incubó con la solución RENAT (1.5M NaCl, 282 mM Tris-HCl, 218 mM Tris-Base) por 20 min. El gel se colocó sobre papel filtro Whatman en una base plana, y se humedeció con una solución 20x de SSC (3 M NaCl, 0.3 M citrato de sodio) cuidando que el papel siempre estuviera en contacto con la solución. Se colocó la membrana Hybond-N+Nylon (GE Healthcare) sobre el gel y se sellaron los bordes con parafilm. Se colocaron papeles

Whatman sobre la membrana, luego una pila de 5 cm de altura de papel absorbente y encima un objeto de aproximadamente 500 gr para producir presión contra el gel y la membrana y permitir que el DNA se movilice del gel a la membrana por capilaridad. Al finalizar la transferencia, la membrana se humectó con 2x de SSC y se dejó secar por 15 min; el DNA se fijó a la membrana con la radiación UV-Strato-Crosslinker o UV-crosslinker directamente, cuidando siempre de no exponer la cara de la membrana que estuvo en contacto directo con el gel para no dañar el DNA.

Se prehibridizó la membrana en un tubo para Southern con el amortiguador de hibridación 26% SSPE (3 M NaCl, 200 mM fosfato de sodio, 20 mM EDTA, pH 7.4), 20% solución Denhardt (1% ficoll, 1% polivinilpirrolidona, 1% BSA, 5% SDS) durante 15 min/65°C (Southern, 1975).

Para la detección del fragmento de interés, la membrana se incubó toda la noche con una sonda de DNA fue diseñada con nucleótidos marcados que sean complementarios al sector de DNA buscado y marcada con digonexina por el método de cebadores al azar (Feinberg *et al.*, 1983), el marcaje, la hibridación y el revelado se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se retiró la sonda y la membrana se lavó con diferentes concentraciones de la solución SSPE. Se realizó un primer lavado con 10 ml del amortiguador DIG1 (100 mM ácido málico, 150 mM NaCl, pH 7.5) 5 minutos; y el segundo con 10 ml del amortiguador DIG2 (DIG1, 10% leche desgrasada en polvo) durante 30 min para bloquear la membrana, posteriormente se incubó en 10 ml de DIG2 que contenía el anticuerpo anti-DIG-AB en una relación 1:10000, por 3 h/60°C. La membrana se lavó dos veces por 15 min con el amortiguador DIG-wash (DIG1, 0.3% Tween-20); se incubó la membrana con 20 ml del amortiguador DIG3 (100 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl), y finalmente se incubó en presencia de la solución CDP-Star® Reagent de NEB labs (CDP-Star 1:100 en DIG3) por 5 min. Se retiró la solución y se detectó la señal de quimioluminiscencia con una cámara ImageQuant LAS4000, GE Healthcare.

5. RESULTADOS

Solubilización de los supercomplejos y complejos mitocondriales de U. maydis. Los complejos respiratorios fueron solubilizados con digitonina en una relación 2:1 detergente-proteína (g/g), y se resolvieron en una electroforesis nativa usando como estándares los complejos respiratorios de corazón de bovino aparente (Figura 13A). Con

base en su movilidad electroforética, se estimó un peso molecular para el V_2 de 1200 kDa y para el V_1 de 660 kDa (Figura 13B).

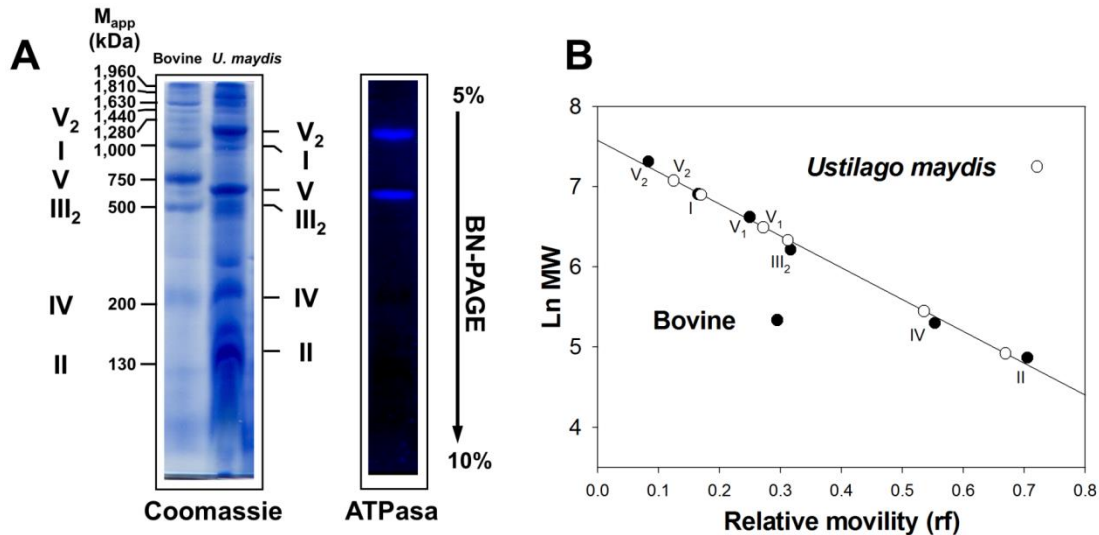


Figura 13. Determinación del peso molecular de los oligómeros de la F_1F_0 -ATP sintasa. Los complejos respiratorios solubilizados con digitonina se resolvieron en una electroforesis nativa (A) usando como estándares los complejos respiratorios de corazón de bovino y se determinó su peso molecular siendo el V_2 de 1200 kDa y el V_1 de 660 kDa (B).

Aislamiento del dímero y del monómero de la F_1F_0 -ATP sintasa. Los oligómeros del complejo V fueron aislados en un gradiente continuo de sacarosa y se analizaron en una CN-PAGE (Figura 14A).

El análisis de la actividad en gel de ATPasa del complejo V mostró que el V_2 se localiza en las fracciones del gradiente de sacarosa que tienen una densidad entre 1.1383 y 0.9877 g/ml, mientras que el V_1 se ubica entre 0.8416 y 0.7706 g/ml; la mezcla de ambos oligómeros se encontró entre 0.9877 y 0.8416 g/ml (Figura 14A). Las diferentes fracciones se reúnen en tres lotes independientes, el V_2 , el V_1 , y la mezcla de ambos (V_2/V_1), se determinó su concentración de proteína y se almacenaron a -70°C . Por medio de una CN-PAGE se realizó el análisis de las muestras concentradas (Figura 14B), con lo que se pudo determinar que los oligómeros mantienen su estructura y actividad de ATPasa y que estos oligómeros son las únicas enzimas, en esta preparación, que llevan a cabo la hidrólisis del Mg-ATP.

Identificación de las subunidades del dímero y monómero de la F_1F_0 -ATP sintasa. Las subunidades del V_2 y del V_1 de la F_1F_0 -ATP sintasa se resolvieron mediante su movilidad en una electroforesis 2D-Tricina-PAGE (Figura 14C). Las proteínas se tiñeron con Coomassie © Brilliant Blue R-125 y se identificaron mediante espectrometría de masas.

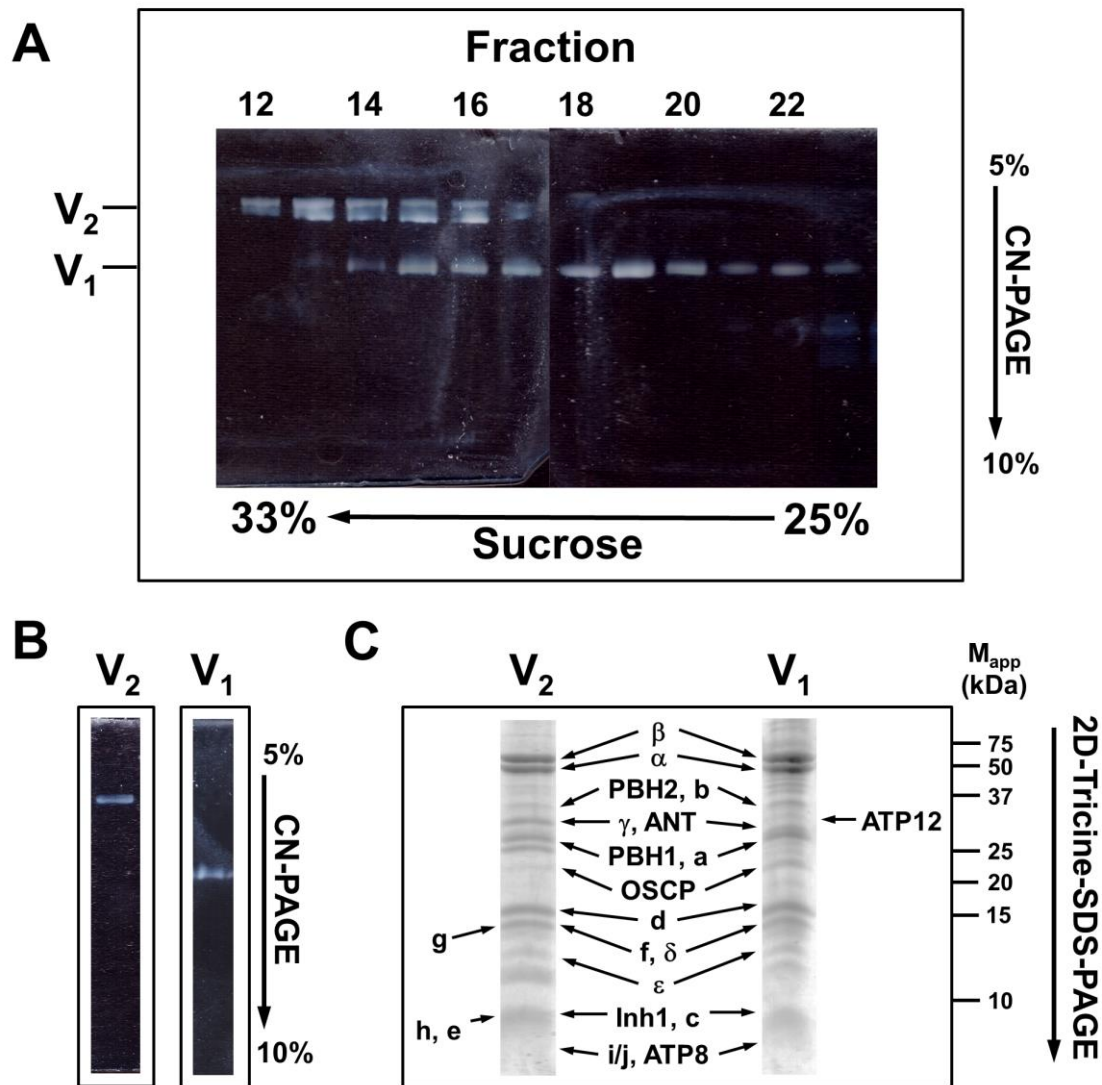


Figura 14. Purificación de los oligómeros de la F_1F_0 -ATP sintasa de *U. maydis*. La presencia del dímero y monómero del complejo V dentro del gradiente de sacarosa se determinó en gels CN-PAGE **(A)** La actividad de ATPasa en gel muestra las formas dimérica y monomérica de la ATP sintasa de *U. maydis*. **(B)** Los oligómeros de la F_1F_0 -ATP sintasa se reunieron y concentraron en filtros de Amicon, el corte de la membrana fue de 10K. El análisis de las muestras concentradas se realizó mediante CN-PAGE con lo que se determinó que los oligómeros mantienen su estructura y actividad de ATPasa aún después de almacenarlos a -70°C . **(C)** La identidad de las subunidades del complejo V se realizó por espectrometría de masas a partir de una electroforesis 2D-Tricina-SDS en gels al 16 % de poliacrilamida. Los oligómeros del complejo V se obtuvieron de una electroforesis BN-PAGE y sus subunidades se resolvieron en una 2D-PAGE. Se muestra la identidad y la masa molecular de cada una de las bandas. PHB1, PHB2 y ANT corresponden a las prohibitinas 1 y 2 y al translocador de adenín nucleótidos respectivamente (En el gradiente de sacarosa 33%=1.1383 g/ml y 25%=0.7706 g/ml)

Se identificaron 17 subunidades asociadas al dímero y monómero de la F_1F_0 -ATP sintasa. Así mismo, se puede observar que el dímero muestra a las subunidades *e*, *g*, y *h*, las cuales han sido asociadas a la formación del dímero en *S. cerevisiae* (Arnold *et al.*, 1998; Couch-Cardel *et al.*, 2010). Dentro de este análisis se encontró a la subunidad

ATP12, la cual es una chaperona que ha sido reportada como la responsable del ensamblaje de la enzima. También se identificaron a las prohibitinas (PBH1 y PBH2) que han sido relacionadas con la formación de las crestas mitocondriales. También se identificó al translocador de adenín nucleótidos (ANT), acarreador importante para la síntesis de ATP. El encontrar el ANT asociado a la ATP sintasa sugiere la presencia del sintasoma, lo cual abre la posibilidad de estudiar dicho supercomplejo en este organismo.

Tabla 3. Identificación de las subunidades asociadas al dímero y monómero del complejo V en dos levaduras.

Sector	Función	<i>S. cerevisiae</i> ^a	<i>U. maydis</i> ^a	M _{app} kDa ^b	Número de acceso ^c
F ₁	Estator	α (ATP 1)	α (ATP 1)	47.6	um10213
		β (ATP 2)	β (ATP 2)	55.6	um10397
	Rotor	γ (ATP 3)	γ (ATP 3)	33.13	um05090
		δ	δ	17.7	um01103
		ϵ	ϵ	13.0	um10754
F ₀	Rotor	<i>c</i> (ATP 9)	<i>c</i> (ATP 9)	7.4	Q0H8W9
	Estator- tallo periférico	OSCP (ATP 5)	OSCP (ATP 5)	22.9	um06324
		<i>b</i> (ATP 4)	<i>b</i> (ATP 4)	34.25	um10548
		<i>h-F₆</i> (ATP 14)	<i>h-F₆</i> (ATP 14)	13.81	um02360
		<i>d</i> (ATP 7)	<i>d</i> (ATP 7)	18.7	um12050
		<i>f</i> (ATP 17)	<i>f</i> (ATP 17)	18.02	um10180
	Estator de membrana	<i>a</i> (ATP 6)	<i>a</i> (ATP 6)	27.72	Q0H8Y6
		A6L (ATP 8)	A6L (ATP 8)	5.7	Q0H8Y5
		<i>ilj</i> (ATP 18)	<i>ilj</i> (ATP 18)	6.5	um11576
	Subunidades de dimerización	<i>e</i>	<i>e</i>	9.01	um10374
		<i>g</i> (ATP 20)	<i>g</i> (ATP 20)	17.3	um00975
	Regulación	<i>k</i>	-	-	-
		Inh1	Inh1	10.19	um02361

a) entre paréntesis se muestra el nombre del gen, b y c) corresponden a la masa molecular aparente en kDa y el número de acceso en el MIPS DataBase para *U. maydis* respectivamente.

La Tabla 3 muestra las subunidades identificadas, el peso molecular y su número de acceso dentro del MIPS *Ustilago maydis* DataBase (Munich information center for protein sequence <http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago>). Cabe señalar que debido a que algunas proteínas no fijan bien el Coomassie, la espectrometría de masas se realizó haciendo cortes de 3 mm a lo largo del gel, con lo que se consiguió obtener el total de las subunidades pertenecientes al dímero y monómero del complejo V.

Respecto a la subunidad α , ésta presenta un peso molecular de 47.6 kDa y se ha reportado que su homólogo en *S. cerevisiae* tiene un peso molecular de 59 kDa. Para

explicar este cambio de peso molecular, se realizó un alineamiento entre ambas proteínas mediante el programa Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). El análisis del alineamiento de las secuencias mostró que *U. maydis* tiene alrededor de 84 aminoácidos (11 kDa) menos en el extremo amino terminal y 22 aminoácidos menos en el extremo carboxilo terminal (2.4 kDa) (Figura 15). Estas modificaciones eliminan aproximadamente 13 kDa de la proteína, lo que equivale a la diferencia observada entre la subunidad α de *U. maydis* y su homólogo de *S. cerevisiae*. En un intento para definir el origen en la modificación de la subunidad α , se realizó un alineamiento entre la secuencias de ambos genes (Figura 16), en el cual se observó que el gen que codifica para la subunidad α en *U. maydis* es más pequeño que el de *S. cerevisiae*; este podría ser el motivo por el cual la subunidad es más pequeña. La secuencia obtenida para la subunidad β también fue alineada con su homólogo de *S. cerevisiae* y la proteína resulto tener el mismo peso molecular (Figura 17).

Determinación de los parámetros cinéticos de la F_1F_0 -ATP sintasa. La caracterización de la actividad de ATPasa del V_1 y V_2 del complejo V, se realizó empleando un sistema regenerador de ATP acoplado a la oxidación del NADH (ver materiales y métodos). Este protocolo permite eliminar al ADP, ya que éste es un potente inhibidor de la actividad de ATPasa de la enzima (Fiske *et al.*, 1925; Penefsky, 1974). Las constantes cinéticas se determinaron realizando cursos temporales, los cuales muestran que la actividad del V_1 es lineal con respecto al tiempo y que aumenta conforme se incrementa la concentración de Mg-ATP (Figura 18A).

```

Ustilago
Saccharomyces  -----
MLARTAAIRSLRSLINSTKAARPAALASTRRLASTKAQPTFVSSILEERIKGVSD 60

Ustilago
Saccharomyces  -----MAEEMVEFSSGVRGMALNLEADNVGVSI FGSDDLIR 36
NLNETGRVLAVGDGIARVFLNNIQAEEELVEFSSGVKGMALNLEPGQVGIVLFGSDRLVK 120
***:*****:*****:..*: :*****:

Ustilago
Saccharomyces  EGDTVKRTGQIVDVPVGP KLLGRVVDALGNPIDGKGP I EAAERRRSLKAPGILPRKSVN 96
EGELVKRTGNIVDVPVGPGLLGRVVDALGNPIDGKGP IDAAGRSRAQVKAPGILPRRSVH 180
** : *****:***** *****:*****:*** * ** :*****:***:

Ustilago
Saccharomyces  QPMQTGIKPIDAMVPIGRGQRELIIGDRQTGKTAVAI DTILNQKRWN DGQDES KKLKLYCVY 156
EPVQTGLKAVDALVPIGRGQRELIIGDRQTGKTAVALD TILNQKRWNNGSDES KKLKLYCVY 240
:*.***:*.*.***:*****:*****:*****:*****:*.*****:

Ustilago
Saccharomyces  VAVGQKRSTVAQLVKLEENDAMKYTIIVAATASEAAPLQYLAPFSGCAIGEWFRDNGKH 216
VAVGQKRSTVAQLVQTLQHDAMKYSIIVAATASEAAPLQYLAPFTAASIGEWFRDNGKH 300
*****:..*:..*****:*****:*****:..*:..*****

Ustilago
Saccharomyces  ALIIYDDLKQAVAYRQMSLLRRPPGREAYPGDVFYLSRLLERAAKMNDSYGGGSLTA 276
ALIVYDDLKQAVAYRQLSLLRRPPGREAYPGDVFYLSRLLERAAKLSKEKSGGSLTA 360
**.*:*****:*****:*****:*****:..*:..*.*.***

Ustilago
Saccharomyces  LPVIETQGGDVSAFIPTNVISITDQVYLESELFYKIRPAINVGLSVSRVGSAAQSKLY 336
LPVIETQGGDVSAFIPTNVISITDQVIFLEELFYKIRPAINVGLSVSRVGSAAQVKAL 420
*****:*****:..*:..***:*****:*****:***** *

Ustilago
Saccharomyces  KSVSGSLKLSLAQYRELAFAQFGSDLDAA TRATLNRGVRVLELLKQPQFVPMATEIPA- 395
KQVAGSLKLFQAQYREVAFAQFGSDLDASTKQTLV RGERLTQLLKQNYSPATEEQVP 480
*.*.***** *****:*****:***: ** * ** :*** * :*:***

Ustilago
Saccharomyces  -----DRIVEWENSFREKLST-EDALLSEIA-KAEDEMALLCAVDLLRY- 437
LIYAGVNGHLDGIELSRIGEFESSFLSKSNHNELLTEIREKGELSKELLASLKSATES 540
..** *.*.*** .*. :. : **.* ** *.* . **.:.

Ustilago
Saccharomyces  -----
FVATF 545

```

Figura 15. Alineamiento de las secuencias para la subunidad α de *S. cerevisiae* y *U. maydis*. Las secuencias alineadas mostraron que *U. maydis* tiene alrededor de 84 aminoácidos menos en amino terminal y 22 aminoácidos menos en el carboxilo terminal, con respecto a la secuencia de *S. cerevisiae* (las secuencias se obtuvieron de la base de datos NCBI para *S. cerevisiae* con el número de acceso EDN64524 y en el MIPS para *U. maydis* con número de acceso um10213, los alineamientos se realizaron en el programa ClustalW2).


```

S.cerevisiae  ATGTTGGCTCGTACTGCTGCTATTCGTCTCTATCGAGAACTCTAATTAACCTCTACCAAG 60
U.maydis      -----

S.cerevisiae  GCCGC AAGACCTGCCGCTGCTGCTTTGGCTTCCACCAAGAAGATTGGCTTCCACCAAGGCA 120
U.maydis      -----

S.cerevisiae  CAACCCACAGAAGTTTCTCTCACTTAGAGGAAAGAATTAAAGGTGTGTCCGACGAGGCC 180
U.maydis      -----

S.cerevisiae  AATTTGAACGAACTGGTAGAGTTCTTGCAGTCGGTGATGGTATTGCTCGTGTTTTGGT 240
U.maydis      -----

S.cerevisiae  TTGAACAACATTCAGGCTGAAGAATTGGTCGAGTTCTCTCTGGTGTAAAGGTATGGCT 300
U.maydis      -----ATGGCCGAGGAGATGGTTGAGTTCTCGTCCGGTGTCCGCGCATGGCC 48
                .:*** ** .:*** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
                .:*** ** .:*** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

S.cerevisiae  TTGAACTGGAGCCTGGTCAAGTCGGTATCGTCTTTTCGGTTCGGATAGACTGGTTAA 360
U.maydis      CTTAACCTTGAGGCCGACCAACGTCGGTGTCTCGATTTTCGGTTCGGACCGTCTCATCCGT 108
                * ** * * ** * * * . . * . * ** * ** * ** * . * ** * ** * * . . :
                * ** * * ** * * * . . * . * ** * ** * ** * . * ** * ** * * . . :

S.cerevisiae  GAAGGTGAATTGGTCAAGAGAACCGGTAATATTGTTGATGTCCAGTCGGTCCAGGCCT 420
U.maydis      GAAGGTGACACTGTCAAGCGTACCGGCCAGATTGTGACGCTTCTGTGCGCCCAAGCTG 168
                * ** * ** * . : * ** * ** * . : * ** * ** * . * ** * ** * ** * ** * . * ** * ** *

S.cerevisiae  TTGGGTAGAGTTGTGACGCTTTAGGTAACCCATTGATGGTAAAGGTCCATTGACGCT 480
U.maydis      CTCGGCCGTGTTGTGACGCTTTGGTAACCCATTGACGCAAGGGCCCATCGAGGCC 228
                * ** . : * ** * ** * ** * . : * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

S.cerevisiae  GCCGGTCGTTCAAGAGCTCAAGTCAAAAGCACAGGTAATTTGCCAAGAAGATCTGTCCAT 540
U.maydis      GCCGAGCGTCCCGTGCCTCGCTCAAGGCTCCTGGTATTCTGCCGCGTAAGTCGGTGAAC 288
                * ** * . * ** * . : * ** * . . * ** * . * ** * . * ** * . * ** * . *

S.cerevisiae  GAACCAAGTTCAAACCGGTTTGAAGCCGTTGACGCTTGGTCCCTATCGGTAGAGGTCAA 600
U.maydis      CAGCCATGCAGACTGGTATCAAGCCATTGACGCTATGGTCCCATCGGCCGTGGTCAG 348
                * . * . * * * . * ** * ** * . * ** * . * ** * . * ** * . * ** * . * ** * .

S.cerevisiae  AGAGAGTTGATTATTGGTATCGTCAAAAGGTAAGACTGCTGTGCGCTTAGACACCATC 660
U.maydis      CGTGAGCTCATCATTGGTACCGTCAAGCCATTGACGCTATGGTCCCATCGGCCATCGACACCATC 408
                . : * ** * * ** * ** * ** * . * ** * ** * ** * ** * . * ** * ** * ** *

S.cerevisiae  TTGAATCAAAAGAGATGGAATAACGGTAGTGACGAATCCAAAGAACTTTACTGTGTTAC 720
U.maydis      CTCACCAGAGCGATGGAACGACGCGCCAGGATGAGAGCAAGAAGCTCTACTGTGTCTAC 468
                * ** * * . * ** * . * ** * . * ** * . * ** * . * ** * . * ** * . * ** *

S.cerevisiae  GTTGGCCTTGGACAAAAAGATCTACCGTTGCTCAAATGGTCCAACTTTGGAACAACAT 780
U.maydis      GTCGCCGTTGGCCAGAACGTTCCACCGTAGCCAGCTCGTCAAGGTGCTCGAGGAGAAC 528
                * ** * ** * ** * . * ** * . * ** * . * ** * . * ** * . * ** * . * ** *

S.cerevisiae  GACGCCATGAAGTACTCTATATTGTTGACGCTACTGCATCTGAAGCCGCTCCTCTACAA 840
U.maydis      GACGCCATGAAGTACACCATCATTTGTCGCCGCTACCGCTCGAGGCCGCTCCGCTTCAG 588
                * ** * ** * ** * . * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * . * ** *

S.cerevisiae  TACTTGGCTCCATTTACTGCCGATCCATTGGTGAATGGTTCAGAGATAATGGAAGCAC 900
U.maydis      TACCTTGCTCCCTTCTCGGGATGCGCCATCGGCGAGTGGTCCGTGACAACGGCAAGCAC 648
                * ** * * ** * ** * . : * * . . * ** * ** * . * ** * . * ** * . * ** *

S.cerevisiae  GCTTTGATCGTCTATGACGATTGTCCAAGCAAGCCGTTGGCATACCGTCAATTAATCTTTG 960
U.maydis      GCGCTGATCATCTACGATGACTTGTCCAAGCAGGCCGTCGCTACCGTCAAGTGTGCTG 708
                * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * . * ** * ** * . : * ** * ** *

S.cerevisiae  TTGTTGAGACGTCCTCCTGGTGTGAGGCCTACCCGTTGATGTCTTTACTTGCATTCA 1020
U.maydis      CTTCTGCGTGTCCCGCCGTCGTAAGGCCTACCCGTTGATGTCTTTACTTGCATTCA 768
                * ** * . : * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * :

```

Figura 16. Alineamiento de los genes que codifican para la subunidad α de *S. cerevisiae* y *U. maydis* (las secuencias se obtuvieron de la base de datos NCBI para *S. cerevisiae* con el número de acceso ID852177 y en el MIPS para *U. maydis* con número de acceso um10213, los alineamientos se realizaron en el programa ClustalW2).

S.cerevisiae AGATTGCTAGAAAGGCCGCTAAGCTTCTGAAAAGGAGGTTCTGGTTCTTTAACTGCT 1080
 U.maydis CGTCTGCTCGAGCGTGCTGCCAAGATGAACGACAGCTACGGTGGTGGATCGCTCACTGCG 828
 .*: ***.**..*:** ** ***. * :. *.*. *.** ***:** *.**.*

S.cerevisiae TTGCCTGTTATTGAAACCAAGGTGGTGTGTCTCCGCTTATATTCCAACCAATGTTATT 1140
 U.maydis CTGCCCGTGATTGAGACGCAGGGTGGTGTGTCTGCTTTCATTCCCAACCAATGTGATT 888
 **** ** ***.** * **.* **

S.cerevisiae TCCATTACCGATGGTCAAAATTTCTGGAAGCTGAATTATTTCTACAGGGTATCAGACCT 1200
 U.maydis TCGATTACCGACGGCCAGGTGTACCTCGAGTCGGAGCTCTTCTTCAAGGGTATCCGACCT 948
 **

S.cerevisiae GCCATTAACGTTGGTTTGTCCGTTTCTCGTGTCCGTTCCGCTGCTCAAGTTAAGGCTTTG 1260
 U.maydis GCCATCAACGTCGGTCTCTCGGTCTCGCGTGTCCGTTCCGCCGCGCAGTCGAAGCTGTAC 1008
 **** ** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

S.cerevisiae AAGCAAGTCGCTGGTTCCTTGAATTTGTTTTGGTCAATACAGAGAAGTCGCTGCTTTT 1320
 U.maydis AAGTCGGTCTCGGTTTCGCTCAAGCTCTCGCTCGCCAGTACCGTAGCTGGCGGCTTTC 1068
 ** . ** * ** ** * ** . * * * * * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

S.cerevisiae GCTCAATTTCGGTTCGGATTTAGATGCCTCCACCAAGCAAATTTGGTTAGAGGTAAAGA 1380
 U.maydis GCGCAGTTCGGTTCGGATTTGGACGCTGTACGCGCGCCACGTTGAACCGTGGTGTCCGT 1128
 * * . ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** * * * * . . * ** * : . * : ** * : . . :

S.cerevisiae TTGACTCAATTGTTGAAGCAAACCAATATTTCTCCTTTGGCTACAGAAGAACAGGTTCCA 1440
 U.maydis CTGGTCGAGCTGCTCAAGCAGCCTCAGTTTGTGCCATGGCCACCGAG----- 1176
 * . * . * * * ** ** . . * . : * * * : ** * * * * .

S.cerevisiae TTGATTTATGCCGGTGTAAAGGTCATTTGGATGGTATTGAACTATCAAGAATTGGTGAA 1500
 U.maydis -----ATCCCG-----CTGACCG-CATTGTGAG 1200
 *

S.cerevisiae TTTGAGTCCTCCTTTTTGTCCTATCTAAAATCCAATCACAAATGAGCTTTTGACCGAAATT 1560
 U.maydis TGGGAGAAGTTCGTTCCGTGAGAAGCTCTCGACCGAGGACGCTCTGCTTT---CGGAGATT 1257
 * ** * : . ** * * . : * * * : . . : ** * * * * * * * . * : ** * * * *

S.cerevisiae AGAGAAAAGGTTGAATTGTCTAAAGAATTGTTGGCATCTCTAAAGAGTGCTACTGAATCA 1620
 U.maydis G---CCAAGG-----CTGAAGACGAGATGGCG-CTCCTCTGTGCGGTAG---ACCT 1301
 . . . ** * * * * . * . ** * . : * : ** * . * * * : . : * : * * * * * *

S.cerevisiae TTTGTTGCCACTTTTTAA 1638
 U.maydis ACTG---CGCTACTAA- 1314

Figura 16. Continuación.

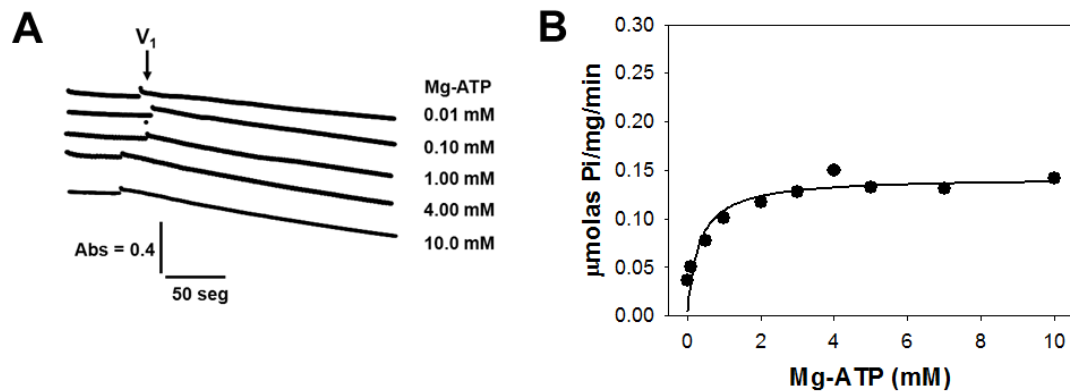


Figura 18. Cursos temporales de la actividad de ATPasa del V_1 . La actividad del V_1 se determinó como se describe en la sección de materiales y métodos. Donde se indica, se realizó la adición de 100 μg de V_1 aislado (A). A partir de la velocidad inicial a diferentes $[\text{Mg-ATP}]$, se obtuvo la cinética de saturación la cual muestra un valor para la $K_m = 0.308 \pm 0.11$ mM de Mg-ATP y la $V_{\text{max}} = 0.142 \pm 0.008$ $\mu\text{molas ATP hidrolizado/mg/min}$ (B).

La actividad de ATPasa del V_1 presenta un comportamiento cinético que se ajusta al modelo de Michaelis-Menten, con una K_m de 0.308 ± 0.11 mM para el Mg-ATP y V_{max} de 0.142 ± 0.008 $\mu\text{molas ATP hidrolizado/mg/min}$ (Figura 18B). Por otra parte, el V_2 aislado mostró muy poca actividad de ATPasa, sin importar la concentración del Mg-ATP empleada (Figura 19).

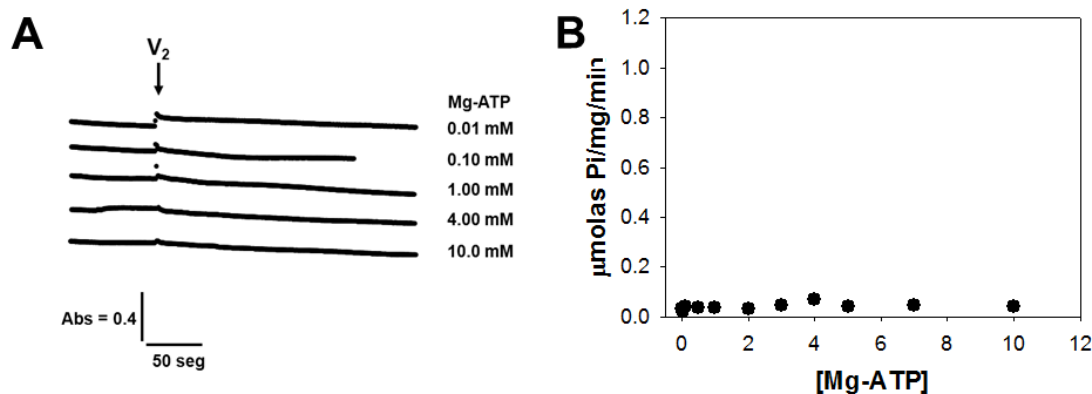


Figura 19. Cursos temporales de la actividad de ATPasa del V_2 . La actividad del V_2 se realizó como se describe en la sección de materiales y métodos. Donde se indica, se realizó la adición 100 μg de V_2 aislado (A). A partir de la velocidad inicial a diferentes $[\text{Mg-ATP}]$, se obtuvo la cinética de saturación la cual muestra que la actividad de ATPasa del V_2 es cercana a cero (B).

Sin embargo, se ha reportado que la actividad de ATPasa del complejo V se estimula por el detergente dodecil-maltósido (DDM) (Villavicencio-Queijeiro A, et al. 2009). Por tal motivo, se realizó la titulación de la actividad de ATPasa del V_2 de *U. maydis* con el DDM (Figura 20A). Como se puede observar, la actividad de ATPasa del V_2 incrementó

en presencia del DDM mostrando una AC_{50} de 4×10^{-4} %, la máxima estimulación del V_2 de *U. maydis* se alcanza a una concentración del detergente de 5×10^{-3} % (Figura 20B).

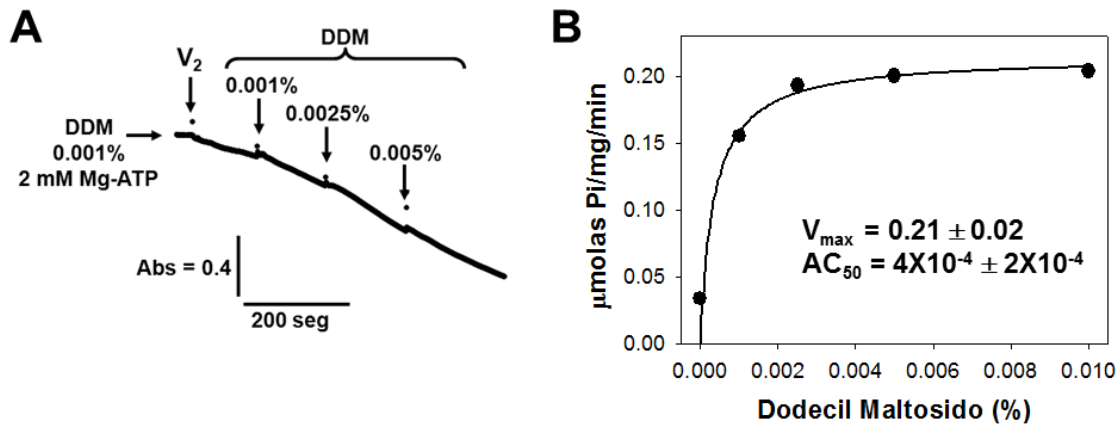


Figura 20. Titulación de la actividad de ATPasa del V_2 con DDM. La actividad de ATPasa del V_2 aislado se estimuló por el DDM (A). A partir de los cursos temporales se calculó una $AC_{50} = 4 \times 10^{-4}$. La máxima activación se alcanzó con 0.005% de DDM (B).

Con esta información, se determinó la actividad de ATPasa del V_2 a partir de los cursos temporales en presencia de 0.005 % de DDM (Figura 21A). Como se puede observar, la actividad de ATPasa se ajustó al modelo de Michaelis-Menten, con lo que se determinó una K_m de 0.24 ± 0.014 mM para el Mg-ATP y la V_{max} de 0.99 ± 0.8 μ molas ATP hidrolizado/mg/min (Figura 21B). Cabe recordar que en estos experimentos se emplea un sistema regenerador del ATP, lo que previene la acumulación del ADP y su efecto inhibitorio (Figura 21B).

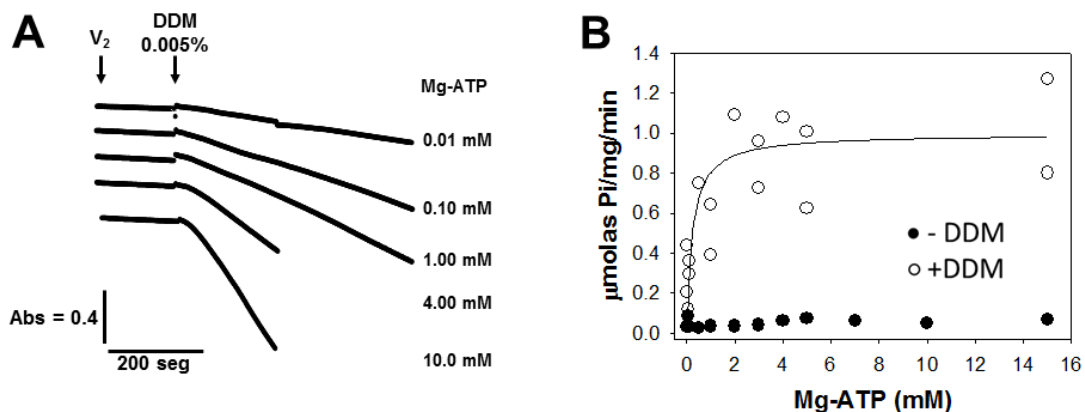


Figura 21. Cursos temporales de la actividad de ATPasa del V_2 en presencia de DDM. La actividad del V_2 se realizó en presencia de 0.005% de DDM (A). Donde se indica, se realizó la adición 100 μ g de V_2 aislado y del DDM (B). A partir de la velocidad inicial a diferentes [Mg-ATP], se obtuvo la cinética de saturación que mostró una $K_m = 0.24 \pm 0.014$ mM de Mg-ATP y la $V_{max} = 0.99 \pm 0.8$ μ molas ATP hidrolizado /mg/min para el V_2 activado con DDM (\circ). Para fines comparativos se incluye la actividad del V_2 en ausencia del DDM (\bullet).

De manera similar, se determinó el efecto que tiene el DDM sobre la actividad del V_1 y se calcularon los parámetros cinéticos (Figura 22A). Como se puede observar, la actividad de ATPasa incrementó 1.4 veces en presencia del DDM, presentando una $K_m = 0.22 \pm 0.08$ mM para el Mg-ATP y una $V_{max} = 0.245 \pm 0.014$ μ molas de ATP hidrolizado/mg/min (Figura 22B).

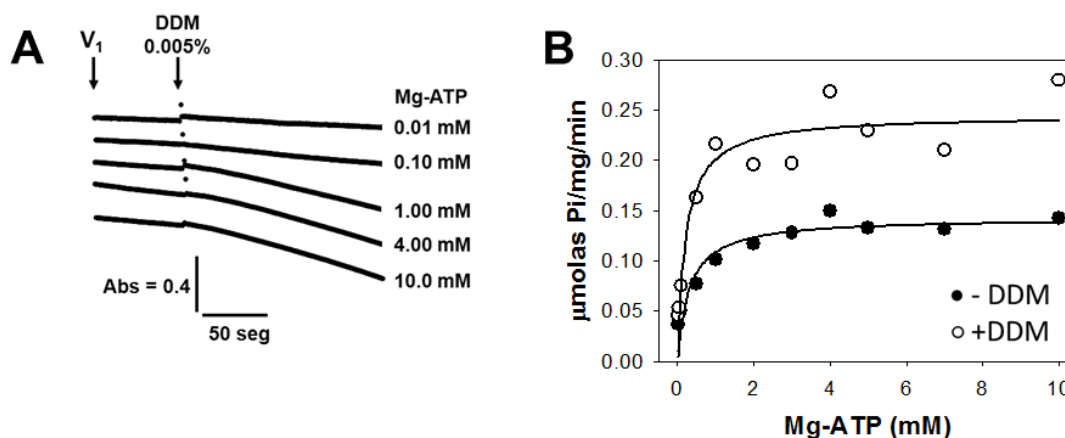


Figura 22. Cursos temporales de la actividad de ATPasa del V_1 en presencia de DDM. La actividad del V_1 se realizó en presencia de 0.005% de DDM. Donde se indica, se realizó la adición del V_1 aislado y del DDM (A). La gráfica muestra la actividad del V_1 activado por el DDM (○) y se calculó un valor para la $K_m = 0.22 \pm 0.08$ mM de Mg-ATP y la $V_{max} = 0.245 \pm 0.014$ μ molas ATP hidrolizado/mg/min (B). Para fines comparativos se incluye la actividad del V_1 en ausencia del DDM (●).

Una característica interesante del complejo V es su sensibilidad al inhibidor oligomicina. En este sentido, la oligomicina es un inhibidor específico de la actividad de ATPasa del complejo V, que sólo actúa cuando se mantiene la interacción del sector F_0 con el F_1 . Debido a que la oligomicina es un inhibidor lento y fuertemente unido, se decidió explorar la velocidad de inhibición de los oligómeros activados por DDM. Se puede observar que el tiempo de inhibición del V_2 , al parecer, es menor que para el V_1 (Figura 23A-B), lo que va acompañado de una mayor sensibilidad del V_2 a la oligomicina. La inhibición de la enzima sigue una curva monótonica, lo que permite obtener para el V_1 una $IC_{50} = 0.16$ μ g/mg proteína y para el V_2 de 0.071 μ g/mg proteína (Figura 23C), mientras que la inhibición total se alcanzó a una concentración de 5 μ g/mg de proteína. Lo anterior sugiere que en estas condiciones no hay enzimas contaminantes con actividad de ATPasa. Por lo tanto, la hidrólisis del Mg-ATP observada se lleva a cabo exclusivamente por la F_1F_0 -ATPasa, y que se mantiene la interacción entre el sector F_0 y el F_1 .

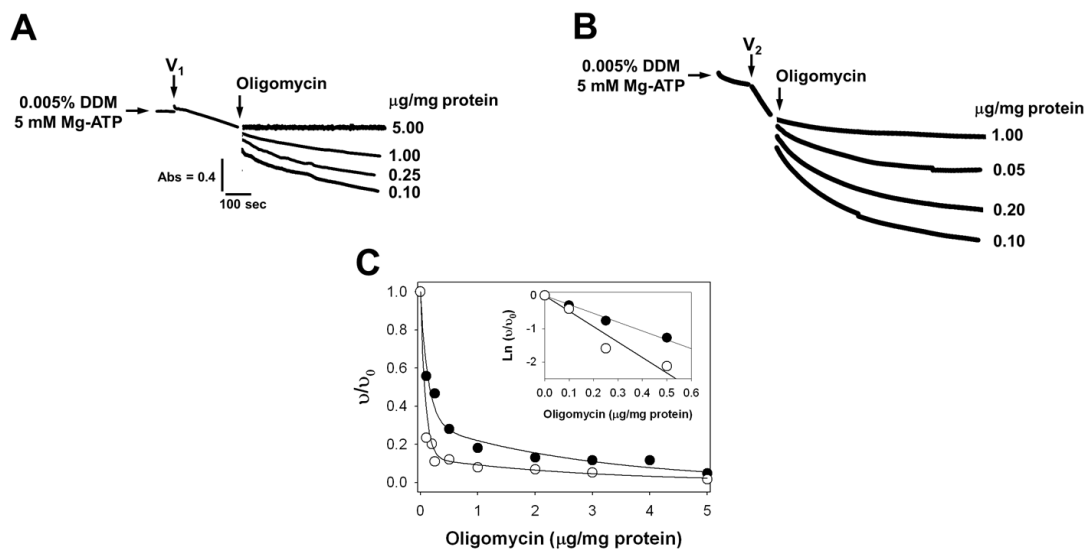


Figura 23. Efecto de la oligomicina en la actividad de ATPasa. La actividad del complejo V se determinó en presencia de 0.005% de DDM y 5 mM ATP-Mg²⁺. Donde se indica, se realizó la adición del V₁ y V₂ aislado y la oligomicina (A y B). El gráfico de la actividad residual (v/v_0) muestra una curva monotónica para la inhibición de la actividad de ATPasa del V₁ (●) con una IC₅₀ = 0.16 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína y V₂ (○) con una IC₅₀ = 0.071 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína (C). El recuadro muestra el Ln (v/v_0) en el intervalo de menor concentración de la oligomicina, para mostrar la sensibilidad diferencial de los oligómeros. IC₅₀= concentración del inhibidor que produce el 50% de la inhibición.

Termoestabilidad del V₂ y V₁ de la F₁F₀-ATP sintasa. La caracterización de la termoestabilidad del V₁ y V₂ se realizó incubando a la enzima durante 15 min a diferentes temperaturas en un medio que contenía 30 mM de HEPES, 5% glicerol, pH 8.0. Al término de la incubación se determinó la actividad a 25°C empleando el sistema regenerador de ATP acoplado a la oxidación del NADH (ver materiales y métodos). En la fig. 24 se puede observar que la actividad residual (v/v_0) del V₁ y V₂ se mantiene constante entre los 20 y los 40°C, con un ligero incremento a los 45°C; posteriormente se inicia el descenso en la actividad con respecto a la temperatura. En el intervalo de 46 a 59°C ocurre la inactivación de la enzima con un comportamiento que se ajusta a una curva monotónica, de la cual se puede calcular una temperatura de transición aparente (T_m) de aproximadamente 52°C. Esto sugiere que la inactivación del V₁ y V₂ ocurre en un solo paso. Para verificar que funcionalmente el V₁ y V₂ mantienen la interacción entre los sectores F₁ y F₀ se determinó la inhibición de la actividad de ATPasa por la oligomicina (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$); con esto se demostró que a cualquier temperatura ensayada, la F₁F₀-ATP sintasa permanece ensamblada.

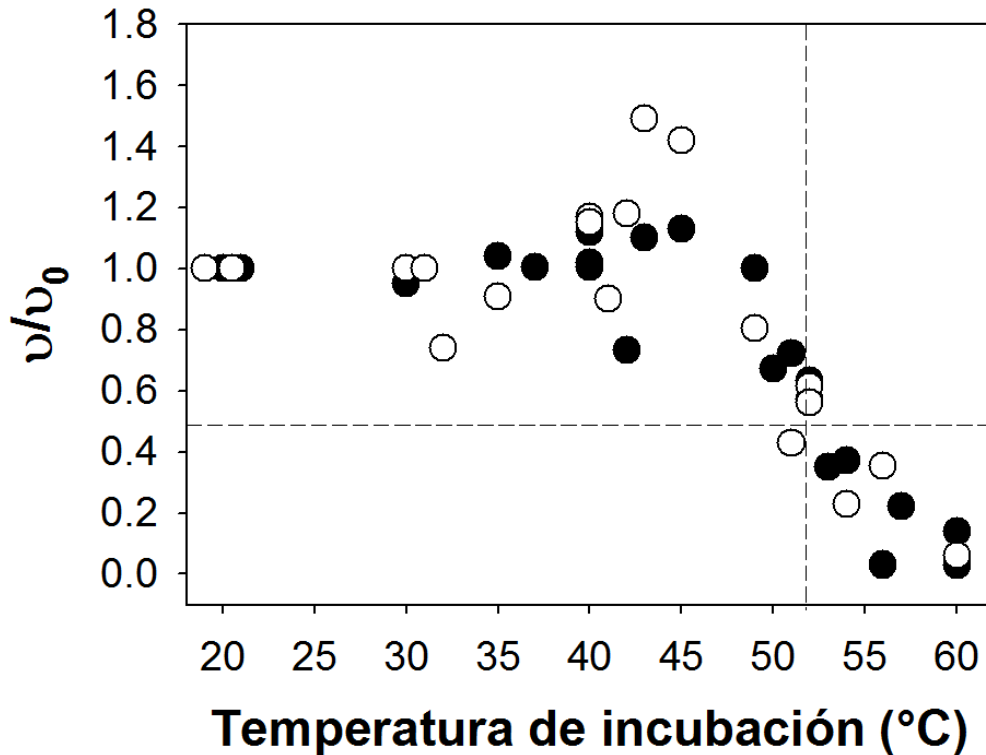


Figura 24. Efecto de la temperatura sobre la actividad de ATPasa del V₁ y el V₂. La actividad residual se determinó al finalizar la incubación (15 min) a diferentes temperaturas. El gráfico de la actividad residual (v/v_0) muestra una curva para el comportamiento cinético del V₁ (●) y V₂ (○) del cual se calculó una temperatura de transición aparente (T_m) de 52°C (Se muestran las líneas punteadas como referencia).

Otra parte del trabajo fue la construcción de mutantes de *U. maydis* a las cuáles se les eliminó el gen de interés mediante un knock-out, con la finalidad de corroborar que las subunidades propuestas como dimerizadoras, realmente se encuentran involucradas en esta acción y son esenciales. Por otro lado, al aislarse los oligómeros del complejo V de las cepas mutantes se puede determinar su actividad de ATPasa y así obtener los parámetros cinéticos para cada una y compararlas con la cepa silvestre, observando si hay algún cambio al haber sido modificadas genéticamente.

Construcción de los cebadores (oligonucleótidos) y plásmidos en Clone Manager. Se sintetizaron los oligonucleótidos para las secuencias río arriba (UF) y río abajo (DF) de cada gen, tomando como molde al DNA de la cepa FB2 para cada uno de los genes a modificar. Una vez que se obtuvieron las secuencias UF y DF mediante un PCR acoplado a la polimerasa Phusion (PHU) (Figura 25), dichas secuencias fueron insertadas en un vector (pCR-Topo vector) usando un Topo TA Cloning Kit, y así obtener el DNA circular (Figura 26-A). Las células de *E.coli* fueron transformadas con dicho vector; una vez dentro de la bacteria el plásmido se replica con ella, así se consigue que el trozo de DNA

además de estar aislado, sea amplificado y se obtienen rápidamente muchas copias idénticas. El DNA plasmídico fue extraído de la bacteria y mediante una digestión controlada empleando enzimas de restricción, se verificó el estado del plásmido y la orientación de la secuencia.

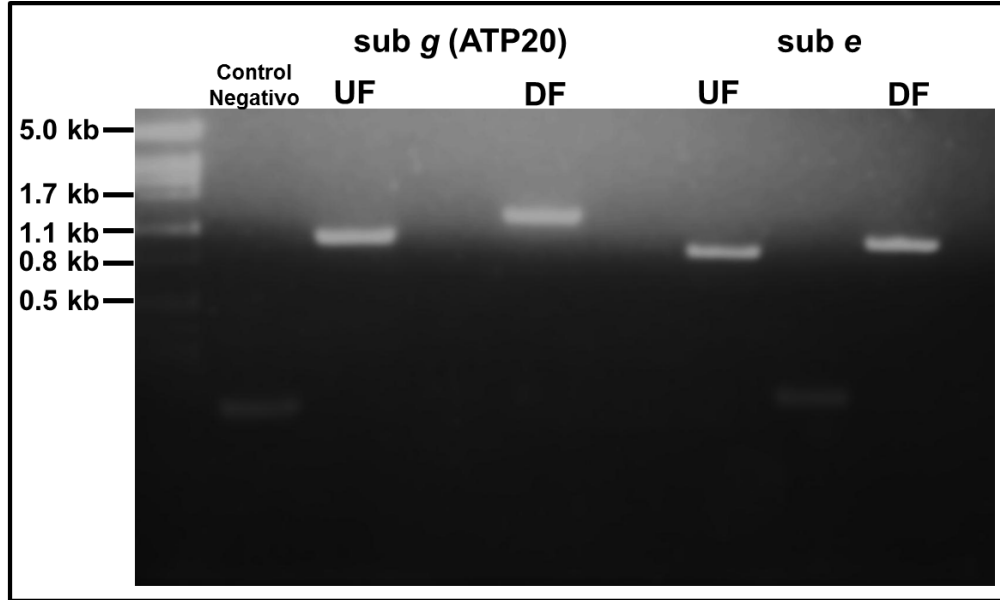


Figura 25. Amplificación de las secuencias río arriba (UF) y río abajo (DF) del gen. Segmento de DNA de *Ustilago maydis* para la construcción de los plásmidos forward y reverse del gen, para sub *g* los productos son de 1.02 kb para el UF y 1.3 kb para el DF. Para la sub *e* el producto es de 0.8 kb para el UF y 1.0 kb para el DF. El control negativo no contiene los oligonucleótidos para construir el segmento UF y DF.

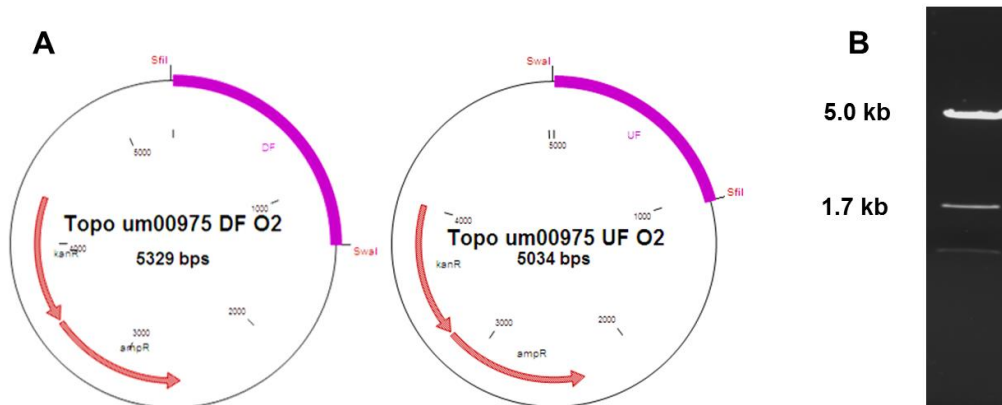


Figura 26. Vector de clonación Topo. Los vectores para UF y DF con orientación a la izquierda, ambos vectores deben de coincidir en la orientación para la construcción del knock-out (A). Productos de la digestión del vector en presencia de *EcoRI*-HF (B).

Digestión del plásmido. Para comprobar el estado de los plásmidos se llevó a cabo su digestión mediante el uso de la enzima de restricción, *EcoRI*. El producto de la digestión completa son dos fragmentos, uno de 4.8 kpb que corresponde al vector y otro de 1.5 Kpb que corresponde al inserto (Figura 26-B).

Las muestras son sometidas a una nueva digestión para verificar la orientación del vector, ya que ambos flancos (UF y DF) deben tener la misma dirección; finalmente, el DNA se secuenció para comprobar que no tenía mutaciones inespecíficas y posteriormente se continuó con el proceso de ligación.

Construcción del Knock-out (KO). Las mutaciones se realizaron como lo describió Brachmann (Brachmann *et al.*, 2004), ligando el UF y DF al cassette de resistencia a higromicina (Hyg), para lo cual fue necesario cortar el plásmido mediante enzimas de restricción. Esto significa que los sitios para cortar el cassette completo de Hyg son reconocidos por la enzima *SfiI*, así que los flancos fueron cortados con *SfiI* (para que al ligar sea reconocido por el cassette de resistencia a Hyg) y una enzima que cortara el vector, en este caso se usó *Scal* (Figura 27).

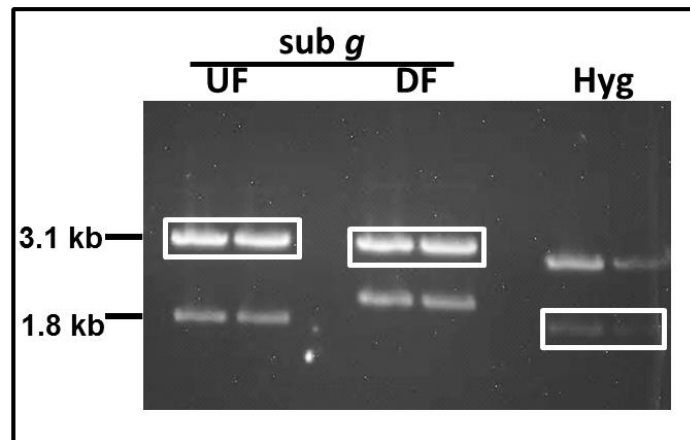


Figura 27. Digestión de los vectores UF y DF con *SfiI* y *Scal*. Los productos de 3.1 y 3.0 kb corresponden a UF y DF, respectivamente. El plásmido que contiene el cassette de resistencia a Hyg fue digerido con *SfiI* dando como producto un fragmento de 1.8 kb.

Al finalizar la digestión se identificaron las bandas por su tamaño y fueron cortadas; y se purificó el DNA correspondiente al UF, DF e Hyg. La DNA ligasa debe reconocer el sitio para *SfiI* en el cassette de resistencia a Hyg y en los flancos, así como el sitio de *Scal* en el extremo del vector para UF y DF. Al finalizar la ligación se llevó a cabo la transformación en *E.coli* (ver materiales y métodos).

Controles de ligación y orientación de los plásmidos. Para verificar la correcta ligación, el DNA bacteriano es extraído y fue digerido con las enzimas de restricción *SfiI* y *SwaI* (Figura 28). La digestión con *SfiI* produce dos bandas, las cuales corresponden al cassette de resistencia a Hyg con un tamaño de 1.88 kb y el resto del vector con un tamaño de 6.37 kb.

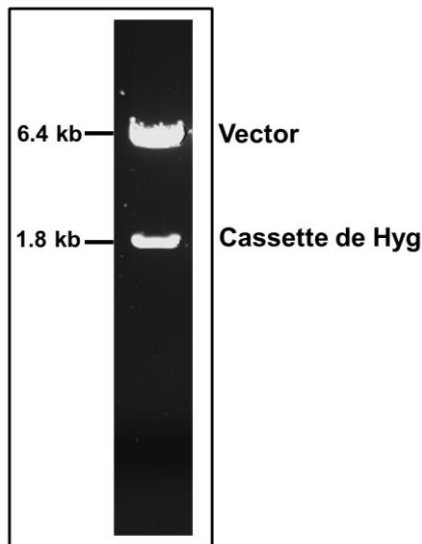


Figura 28. Control de digestión con la enzima de restricción *SfiI*. Las muestras pasaron por un control de digestión con *SfiI* y dependiendo del corte de la enzima se puede verificar que el tamaño del vector era el adecuado y fue correctamente secuenciado incluyendo los sitios de corte específicos para esta enzima.

*Knock-outs en *Ustilago maydis*.* Una vez que se verificó que el KO era el correcto es posible transformar la levadura con el DNA exógeno. En este caso el DNA endógeno se intercambia por recombinación homóloga con el DNA exógeno, este DNA conserva las regiones UF y DF del gen original, por consiguiente el gen no se sintetiza. Para linearizar el DNA se hace una digestión en presencia de la enzima de restricción *SwaI*. Una vez finalizada la digestión se lleva a cabo la transformación (ver materiales y métodos) (Figura 29).

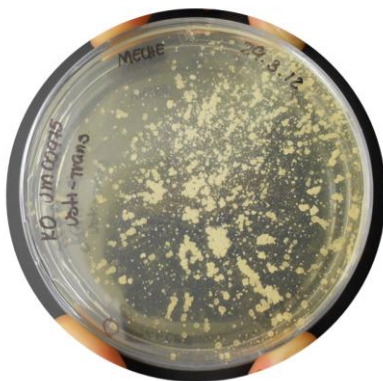


Figura 29. Transformación de *Ustilago maydis* con el DNA exógeno. Crecimiento de la cepa mutante en medio sólido Reg-light e Higromicina. Las células se incubaron a 37° C por 6 días; el crecimiento sugiere la incorporación del gen de resistencia a higromicina y la pérdida de la subunidad *g*.

Δ sub *g*

PCR. Para comprobar que la cepa seleccionada contiene el cassette de resistencia a Hyg y que el gen de interés fue eliminado, se aisló el DNA y con éste se realizó un PCR usando los oligonucleótidos P1 Y P2 y como control negativo el DNA de la cepa WT. Se corrió un gel de agarosa al 0.8%, 0.5% TBE, EtBr. Las bandas del mismo peso molecular que la cepa silvestre fueron descartadas ya que los oligonucleótidos se unen solamente a su cadena complementaria y el P2 está hecho directamente en el gen, lo que demuestra que en esa muestra de DNA el gen no fue sustituido por el cassette de resistencia a Hyg (Figura 30).

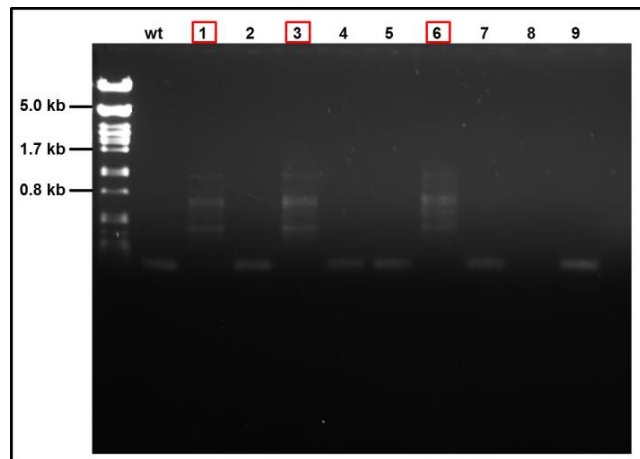


Figura 30. P1/P2 PCR de las diferentes cepas aisladas de FB2 Δ sub g. En el primer carril se muestra el DNA de la cepa WT y la colección de DNA genómico que se obtuvo de la transformación. Se usan las muestras 1, 3 y 6 que presentan diferencias a la cepa WT que cuentan con el cassette de resistencia a Hyg.

Las muestras 1, 3 y 6 fueron colectadas ya que no presentaron un tamaño similar a la cepa silvestre, y se realizó otro ciclo de PCR usando en este caso los oligonucleótidos U1 y D3 (ambos cuentan con aproximadamente 20 pb fuera de las construcciones UF y DF, respectivamente), así como los oligonucleótidos MF167 y MF168 (con aproximadamente 20 pb dentro del cassette de Hyg), los cuales deben formar una construcción de aproximadamente 1.5 kb para el UF y 1.7 kb para el DF. Las muestras se resolvieron en un gel de agarosa al 8% (Figura 31), para demostrar que el gen fue sustituido por el cassette de resistencia a Hyg.

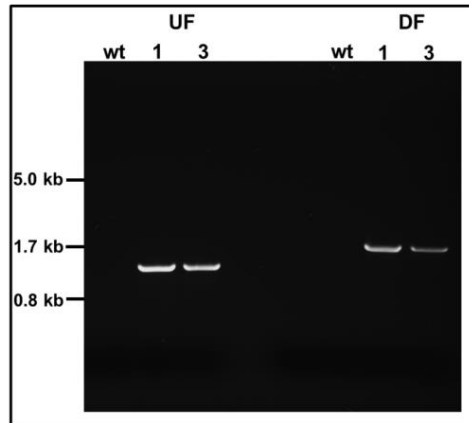


Figura 31. Flanking PCR. El DNA genómico de las cepas mutantes se empleó para realizar un PCR uniendo el primer U1-MF167 y D3-MF167 y MF168 los cuales deben formar una construcción de aproximadamente 1.5 kb para el UF y 1.7 kb para el DF.

Southern Blot. Con el análisis por Southern Blot, se identificaron bandas correspondientes a 8.3 kpb para la cepa WT, 5.07 y 4.1 kpb para la cepa mutante Δg (Figura 32). Se obtuvieron 5 muestras positivas para la mutante Δg . Las cuales fueron crecidas nuevamente en medio YPD y conservadas en glicerol (50% glicerol estéril) y se congelaron a -70°C . Finalmente despues de 24 horas se sembraron en un medio sólido y se dejaron crecer a 28°C ; las sepas seleccionadas no mostraron un fenotipo diferente de la cepa WT.

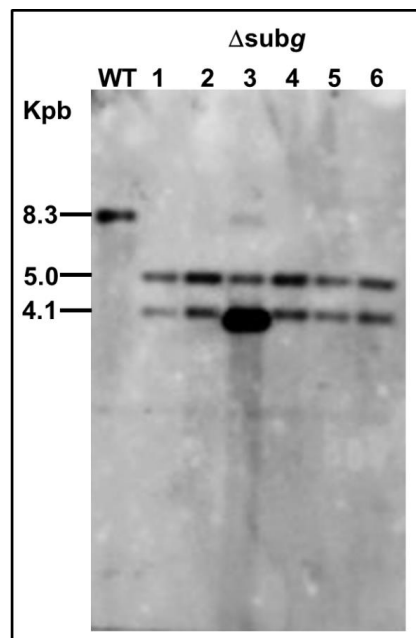


Figura 32. Southern Blot. Detección de los fragmentos de 5.07 Kpb y 4.1 Kpb para la cepa mutante y 8.3 Kpb para la cepa WT. Se utilizó como control ADN genómico de la cepa WT. En el primer carril se encuentra la cepa WT y 5 positivas para la Δg .

6. DISCUSIÓN

El objetivo principal de este trabajo fue aislar los oligómeros del complejo V e identificar las proteínas involucradas en la formación del dímero y del monómero. La estrategia principal fue el uso de mitocondrias aisladas de la levadura de *Ustilago maydis*, la solubilización de los complejos respiratorios y el aislamiento del complejo V en su forma dimérica y monomérica mediante un gradiente de sacarosa. Dichos oligómeros fueron utilizados para determinar los parámetros cinéticos de dicha enzima, así como identificar su composición polipeptídica.

A diferencia de la F_1F_0 -ATP sintasa de las bacterias, el complejo enzimático de los eucariontes presenta una estructura más elaborada; sin embargo, conserva homólogos de las subunidades bacterianas, principalmente aquellas involucradas en la síntesis de ATP (Tabla 1). De entre los complejos respiratorios de eucariontes, el de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y el de corazón de bovino han sido de los más estudiados. Aunque se desconoce el origen del aumento en el número de subunidades del complejo V en los eucariontes, se ha propuesto que repercuten en su superestructura, es decir, en la formación de oligómeros, de los cuales el dímero es el más estudiado. En este sentido la F_1F_0 -ATP sintasa mitocondrial de *Ustilago maydis* cuenta con 17 subunidades asociadas al dímero y 14 subunidades al monómero; las subunidades α , β , δ , presentan alta similitud con las de *S. cerevisiae*, así como aquellas que interactúan con parte del tallo central (rotor) de la enzima (γ , ϵ y c); sin embargo la función que desempeñan estas subunidades dentro del complejo no es del todo clara. El tallo periférico de la ATP sintasa mitocondrial está compuesto de las subunidades OSCP, b , d , F_6 , y a ; además presenta las subunidades membranales e , f , g , k , i/j y 8 , las cuales se ha demostrado están involucradas en la dimerización de la enzima.

Aunque las diferentes subunidades del complejo V de *U. maydis* y *S. cerevisiae* muestran alta similitud, encontramos un caso interesante en la subunidad α . Como se mostró en la figura 14C, la subunidad α de *U. maydis* tiene un peso molecular menor a lo esperado. El análisis detallado de sus secuencias muestra que esta tiene alrededor de 84 aminoácidos menos en su extremo amino terminal y 22 aminoácidos menos en el extremo carboxilo terminal (Figura 15 y 33). El análisis de las secuencias de los genes de *U. maydis* y *S. cerevisiae* (Figura 16) muestra que el gen de *U. maydis* tiene 52 bases menos que el gen de *S. cerevisiae*. Cabe señalar que estas dos especies no están directamente emparentadas.

No obstante, esta modificación en la subunidad α no tiene una repercusión significativa en la síntesis del ATP, ya que la levadura de *U. maydis* muestra un fenotipo principalmente respiratorio (no-fermentativo), lo que significa que es dependiente de la participación de la mitocondria en la obtención de energía.

Con respecto a la actividad de ATPasa, algunos grupos de investigación han cuantificado la actividad en gel del V_1 y V_2 a partir de la BN-PAGE o CN-PAGE, y reportan que la actividad específica de ambos oligómeros es similar, con un valor de 0.96 y 1.05 de densidad óptica del depósito de fosfato de calcio/mg/min, respectivamente (Bisetto *et al.*, 2007); no obstante, no se reportan valores de K_m . Estos mismos realizaron la solubilización de los oligómeros del complejo V a partir mitocondrias intactas, mitoplastos o partículas submitocondriales de corazón de bovino (Bisetto *et al.*, 2007) y los resolvieron por BN-PAGE o CN-PAGE. Sin embargo, es reconocido por diferentes grupos, que la actividad de ATPasa en gel del complejo V puede verse afectada por el azul brillante de Coomassie; o por la concentración de DDM (0.01%) y DOC (0.05%) empleados en la CN-PAGE. Aunado a esto, la cuantificación de la formación del precipitado de fosfato, depende de la sensibilidad del sistema de adquisición de la imagen, limitándose a tiempos largos de actividad de ATPasa (5 - 120 min), donde el ADP producido puede inhibir a la enzima, dando como resultado parámetros cinéticos subvalorados. Así mismo, la detección del depósito de fosfato no tiene correlación con la cantidad de sustrato catalizado. Así pues, en este trabajo se emplearon los monómeros y dímeros aislados y en solución, lo que permite cuantificar espectrofotométricamente la actividad de ATPasa de la F_1F_0 -ATP sintasa. En estas condiciones se puede registrar y cuantificar la actividad de ATPasa cada 0.5 seg; incluir un sistema regenerador del ATP y remover al ADP del medio, para evitar su participación como inhibidor de la enzima; determinar la IC_{50} de la oligomicina y la termoestabilidad para cada oligómero.

En este sentido, se definió que el V_1 presenta un comportamiento cinético que se ajusta al modelo de Michaelis-Menten, con una K_m de 0.308 ± 0.11 mM y V_{max} de 0.142 ± 0.008 μ molas de ATP hidrolizado/mg/min (Figura 18). Por otra parte, V_2 muestra escasa actividad de ATPasa, sin importar la concentración del Mg-ATP empleada (Figura 19). Lo anterior sugiere que V_2 aislado está diseñado, en condiciones naturales, para generar ATP y no para hidrolizarlo. Esta es la primera evidencia experimental que sugiere que bioenergéticamente el V_2 funciona para la síntesis de ATP y no para la hidrólisis, además de participar en la arquitectura de las crestas mitocondriales.

```

Saccharomyces    ---MLARTAAIRSLRSTLINSTKAARAAAAALASTRRLASTKAQPT---EVSSILEERIK 54
Ustilago
Bos              MLSVRFVAAAVARALPRRAGLVSKNALGSSFIAARNLHASNSRLQKTGTAEVSSILEERIL 60
Chlamydomonas   --MRSQALSARAGLLQLSSQTGASLEGGFALS kraEQALIRASRAFASDAKALDELKRP 58
Bacillus        -----MSIRPE-----EISALIKKQIE 17

Saccharomyces   GVSDEANLNET-----GRVLAVGDGIARVFGLNNIQAEEELVEF 92
Ustilago
Bos              GADTSVDLEET-----GRVLSIGDGIARVHGLRNVQAEMVEF 98
Chlamydomonas   KFTSKYLINHVSEKLIIPAVKEWEKQYQPPVIHLGRVLSVGDGIARVYGLKSVQAGELVCF 118
Bacillus        NYEADLEVVVEV-----GTVIQVGDGIARVHGLEKVMAGELLEF 55
* * * * *

Saccharomyces   SSGVKGMALNLEPGQVGVIVLFGSDRLVKEGELVKRTGNIVDVPVPGPLLGRVVDALGNPI 152
Ustilago
Bos              SSGVRFGMALNLEADNVGVSLFGSDRLIREGDTVKRTGQIVDVPVPGKLLGRVVDALGNPI 68
Chlamydomonas   DSGVKGMALNLQADHVGVVFGNDSLIIHQDLYVRTGQIVNVPVPGPTLGRVVDALGQPI 178
Bacillus        ENGVMGMAQNLEEDNVGVVILGPYTEIREGTQVKRTGRIMEVVPVGEALLGRVNVPLGQPL 115
..*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

Saccharomyces   DGKGPIDAAGRSRAQVKAPGILPRRSVHEPVQGTGLKAVDALVPIGRGQRELIIGDRQTGK 212
Ustilago
Bos              DGKGPIDAAERRRSLKAPGILPRKSVNQPMQTGIKPIDAMVPIGRGQRELIIGDRQTGK 128
Chlamydomonas   DGKGPISKARRRVLKAPGIIPRISVREPMQTGIKAVDSLVPPIGRGQRELIIGDRQTGK 218
Bacillus        DGKGPLTNVRSLLVEIKAPGI IARQSVREPLYTGKAVDALVPIGRGQRELIIGDRQTGK 238
DGRGPITAEYRPIESPAPGVMDRKSVEHPLQTGIKAIDSMIPPIGRGQRELIIGDRQTGK 175
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

Saccharomyces   TAVALDTILNQKRWNGSDESKKLYCVYVAVGQKRSTVAQLVQTLQHDAMKYSIIVAAT 272
Ustilago
Bos              TAVADTILNQKRWNDGQDES KKKLYCVYVAVGQKRSTVAQLVKLEENDAMKYTIIVAAT 188
Chlamydomonas   TSIADTILNQKRFNDGTDEKKKLYCYVAIGQKRSTVAQLVKRLTDADAMKYTIIVSAT 278
Bacillus        TTIADTILNQK-----GQDVICIVVAIGQKQSTVAGVETLQHDALDYTIIVVTAS 227
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

Saccharomyces   ASEAAPLQYLAPFTAASIGEFWRDNGKHALIVYDLSKQAVAYRQLSLLLRPPGREAYP 332
Ustilago
Bos              ASEAAPLQYLAPFSGCAIGEFWRDNGKHALIYDLSKQAVAYRQMSLLLRPPGREAYP 248
Chlamydomonas   ASDAAPLQYLAPYSGCSMEYFRDNGKHALIYDLSKQAVAYRQMSLLLRPPGREAYP 338
Bacillus        ASEPAPLYLAPYAGCAMGEYFMYGKHALVVYDLSKQAAAYRELSLLLRPPGREAYP 287
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

Saccharomyces   GDFVYLHSRLLERAALKSEKGGGSLTALPVIETQGGDVSAYIPTNVISITDQGIFLEAE 392
Ustilago
Bos              GDFVYLHSRLLERAAMNDYGGGSLTALPVIETQGGDVSAFIPTNVISITDQGVYLESE 308
Chlamydomonas   GDFVYLHSRLLERAALKSAAMGGGSLTALPVIETQAGDVSAYIATNVISITDQGFLETE 398
Bacillus        GDFVYLHSRLLERAALKSDEKGGGSLTALPFIETQAGDVSAYIPTNVISITDQGIFLESD 347
*****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

Saccharomyces   LFFKGI RPAINVGLSVSRVGSAAQVKALKQVAGSLKFLAQYREVAFAQFGSDLDAATK 452
Ustilago
Bos              LFFKGI RPAINVGLSVSRVGSAAQTRAMKQVAGTMKLELAQYREVAFAQFGSDLDAATQ 458
Chlamydomonas   LFFKGI RPAINVGLSVSRVGSAAQFPGMKQVAGTLKLELAQYREVAFAQFGSDLDAATQ 478
Bacillus        LFFSGVRPAVNVGISVSRVGGAAQIKAMKKVAGTLRLDLAQYRELQFAQFGSDLDKATQ 407
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

Saccharomyces   QTLVGRGLTQLLKQNYSPATEEQVPLIYAGVNGHLDGIELSRIGEFESSFLSYLKN 512
Ustilago
Bos              ATLNRGVRLVELLKQFVPMATEIPA-----DRIVEWENSFREKLST- 411
Chlamydomonas   QLLSRGVRLTELLKQGYSPMAIEEQVAVIYAGVRYGLDKLEPSKITKFENAFLSHVISQ 518
Bacillus        YVLERGARLTVLQKQFVPMPIEQQTIVVYAATKGYLDKVPVNIITACEDVILKHVDP- 537
AKLNRGERTVEILKQDEHKMPVVEQVISIYAVTNGFMDDIPVEDVRRFEELLSFMRAN 467
* * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

Saccharomyces   HNELLTEIREKGELSK--ELLASLKATESFVATF- 545
Ustilago
Bos              EDALLSEIA-KAEDEM--ALLCAVDLLRY----- 437
Chlamydomonas   HQALLSKIRTDGKISE--ESDAKL----- 540
Bacillus        --RLFKILKAKGKITP--EINAHLAQQMSNLPVMTK 569
KDSLLDHIRQTGELPDTKELDAAIIEFFKKGFTPSA- 502
* : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

```

Figura 33. Alineamiento de las secuencias para la subunidad α de diferentes organismos. Las secuencias alineadas mostraron que *U. maydis* tiene alrededor de 84 aminoácidos menos en amino terminal y 22 aminoácidos menos en el carboxilo terminal, con respecto a la secuencia de *S. cerevisiae* y Corazón de bovino.

Dado que V_2 es poco activo para la hidrólisis del ATP y que moléculas como el DDM y DOC pueden activarlo, se realizó la titulación de la actividad de ATPasa en

presencia de DDM. Como se mostró, la actividad de ATPasa del V_2 incrementó en presencia de 0.005% de DDM (Figura 20), lo que sugiere que el detergente modificó el microambiente o interaccionó con la enzima, favoreciendo su actividad de ATPasa. En estas condiciones, la actividad de ATPasa incrementó y fue posible determinar una K_m de 0.24 ± 0.014 mM y una $V_{max} = 0.99 \pm 0.8$ μ molas de ATP hidrolizado/mg/min (Figura 21). Con respecto al V_1 se observó que la actividad de ATPasa incrementó en presencia del DDM en 1.4 veces, presentando una $K_m = 0.22 \pm 0.08$ mM y una $V_{max} = 0.245 \pm 0.014$ μ molas de ATP hidrolizado/mg/min (Figura 22) (Tabla 4). En algunos casos se ha reportado la actividad del monómero o la porción F_1 , y si comparamos las K_m de *Saccharomyces cerevisiae* (K_m de 0.25 mM) y el V_1 activado con DDM de *U. maydis* (K_m de 0.22 mM) observamos que los parámetros entre ambas levaduras son similares (Tabla 4) aunque no se reportó como fue obtenido dicho parámetro en *S. cerevisiae*. Por otra parte, no existe reporte alguno sobre la actividad específica ni residual de la enzima como dímero, por lo que es imposible comparar los valores obtenidos en este trabajo con la literatura.

Con respecto a la sensibilidad a la oligomicina, se puede observar que la inhibición de la enzima sigue una curva monotónica para ambos oligómeros, así pues a partir de ésta se calculó para el V_1 una $IC_{50} = 0.16$ μ g/mg proteína y para el V_2 una $IC_{50} = 0.071$ μ g/mg, mientras que la inhibición total se alcanzó a una concentración de 5 μ g/mg de proteína. Como se puede observar, el V_2 tiene una mayor sensibilidad a la oligomicina que V_1 aun siendo activado con DDM. De estos resultados se puede desprender una hipótesis interesante. Debido a que se requiere casi un 50% menos de oligomicina para inhibir la misma cantidad de V_2 que del V_1 , se puede hipotetizar que existe una intercomunicación funcional entre los complejos V del dímero, y que basta con inhibir a uno de ellos para inhibir a todo el V_2 . El efecto de la oligomicina sobre la actividad de ATPasa de V_1 y V_2 sugiere que la enzima se mantiene ensamblada y que la interacción entre el sector F_1 y F_0 es similar a lo que se puede encontrar en la mitocondria.

Con respecto a la termoestabilidad, nuestros resultados muestran consistentemente que la capacidad de hidrólisis de ATP de V_1 y V_2 es sensible a la temperatura. La actividad de ATPasa entre los 20 y los 40°C se mantiene constante y posteriormente, en el intervalo de 46 a 59°C, ocurre la inactivación de la enzima en una transición sencilla; la temperatura de transición (T_m) se encuentra alrededor de los 52°C para ambos oligómeros. Nuevamente se comprobó que no hubiera disociación térmica de

la enzima durante el análisis térmico verificando su inhibición por la oligomicina. Con este estudio podemos sugerir que el V_2 y V_1 , además de desempeñar un diferente papel en la arquitectura mitocondrial, presentan características cinéticas **particulares**: aunque el V_2 muestra una baja actividad, éste puede ser activado por el DDM en más de XXX veces; mientras que el V_1 siempre fue activo a cualquier concentración de sustrato y poco sensible al DDM; además, la sensibilidad a la oligomicina sugiere la intercomunicación entre los complejos V del dímero, lo que muestra otra repercusión, no solo estructural, si no funcional, del contacto entre los monómeros. Esta interacción funcional entre los monómeros en el dímero podría estar relacionada con la regulación cooperativa de la enzima en la mitocondria; es decir, sería necesario regular una sola unidad del dímero para controlar su actividad total. Sin embargo esta posibilidad debe ser abordada experimentalmente para su comprobación.

Un punto interesante es la termoestabilidad de la enzima en sus dos estados. Una visión sobre este punto sugiere que la asociación proteica aumenta la estabilidad de las enzimas; sin embargo para el caso del V_2 y V_1 de *U. maydis*, la interacción no produce mayor estabilidad. Esto sugiere que la interacción de los monómeros en el dímero tiene principalmente un papel funcional y no de incrementar su estabilidad.

Tabla 4. Parámetros cinéticos para la actividad de ATPasa del complejo V de diferentes organismos estudiados.

Organismo	Km [mM]	Condiciones
<i>Bacillus sp</i>	0.48	F ₁ -wt
	0.7	F ₁ - Δδ
<i>Clostridium paradoxum</i>	0.5	Enzima purificada estimulada con Na ⁺ a pH 7-9
	0.55	Enzima purificada (Mg ²⁺ /ATP relación 2:1)
<i>Escherichia coli</i>	0.6	
<i>Bacillus megaterium</i>	0.9	cepa NRLL B939
<i>Bacillus megaterium</i>	1	cepa KM
<i>Clostridium paradoxum</i>	1	
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	1.8	F ₁ pH 8.5 at 40°C
<i>Streptococcus faecalis</i>	2.5	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.25	
<i>Ustilago maydis</i>	0.308	V ₁ enzima purificada, pH 8, sistema regenerador de ATP
	0.22	V ₁ enzima purificada estimulada con DDM, pH 8, sistema regenerador de ATP
	0.9	V ₂ e enzima purificada estimulada con DDM, pH 8, sistema regenerador de ATP
<i>Phycomyces blakesleeianus</i>	0.15	
<i>Euglena gracilis</i>	0.097	
<i>Spinaca oleracea</i>	0.11	MES
<i>Acetabularia acetabulum</i>	0.2	
<i>Bos taurus</i>	0.79	pH 8 enzima soluble
	0.315	pH 8 enzima unida a membrana
<i>Gallus gallus</i>	1	
<i>Rattus norvegicus</i>	0.78	

Los valores para la K_m se obtuvieron del banco de datos BRENDA (http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.6.3.14).

Por otra parte, se crearon knock-outs (KO) de las subunidades dimerizadoras *e* y *g*, así como de la subunidad *h*, y la proteína reguladora *Inh1*. Las mutantes Δ_{sub g} y Δ_{Inh1}, se cultivaron en medio YPD y medio sólido y se encontró que fenotípicamente son similares a la cepa silvestre, lo que sugiere que la modificación no afectó drásticamente las funciones mitocondriales.

En el caso de la subunidad *h* se construyó un cKO (knock-out condicional) el cual contiene dentro de su secuencia al promotor *nar*; que controla la expresión de la nitrato reductasa, que es un elemento clave para el crecimiento bajo condiciones anaeróbicas. Este cKO se construyó debido a que al eliminar el gen *ATP14* que codifica para la sub *h*, la cepa transformada no sobrevive. Esto indicó que la subunidad *h* podría estar involucrada en el proceso de la obtención de ATP (tal vez en la estructura o estabilidad de V₂ y la

conformación de las crestas). Cabe recordar que al ser un organismo no fermentativo, *U. maydis* obtiene energía principalmente de la mitocondria.

Las mutantes se contruyeron con el fin de corroborar que las subunidades propuestas como dimerizantes, realmente se encuentran involucradas dentro de esta acción y que son esenciales para este proceso. Por otro lado, al aislarse los oligómeros del complejo V podemos determinar su actividad de ATPasa y así obtener los parámetros cinéticos para cada una y compararlas con la cepa silvestre, observando si hay algún cambio al haber sido modificadas genéticamente.

7. CONCLUSIONES

Se solubilizaron los oligómeros del complejo V de las mitocondrias de *U. maydis* con digitonina (2 g/g proteína), conservando la estructura dimérica y monomérica, así como su actividad de ATPasa. Se han aislado al dímero y monómero del complejo V solubilizados con digitonina sin obtener ningún otro contaminante que lleve a cabo actividad e ATPasa, una vez solubles, aislados y puros se identificaron las subunidades relacionadas con el dímero y el monómero del complejo V, encontrando particularmente a las subunidades *e*, *g* y *h*, las cuales han sido relacionadas con la dimerización del complejo V en *S. cerevisiae*.

La actividad de ATPasa de V_1 aislado presentó comportamiento cinético que se ajusta al modelo de Michaelis-Menten, con una K_m de 0.308 ± 0.11 mM para el Mg-ATP y V_{max} de 0.142 ± 0.008 μ molas de ATP hidrolizado/mg/min. Por el contrario V_2 aislado presentó una baja actividad de ATPasa, por tal motivo fue activado con 0.005% de DDM. El comportamiento cinético se ajustó al modelo de Michaelis-Menten, con una K_m de 0.24 ± 0.014 mM para el Mg-ATP y V_{max} de 0.9 ± 0.8 μ molas de ATP hidrolizado/mg/min. Bajo estas mismas condiciones se activó V_1 el cual presentó actividad de ATPasa con una K_m de 0.22 ± 0.8 mM de ATP-Mg²⁺ y V_{max} de 0.245 ± 0.14 μ molas de ATP hidrolizado/mg/min.

La actividad de ATPasa del complejo V es sensible a la oligomicina. Se obtuvo para V_1 una $IC_{50} = 0.16$ μ g/mg proteína y para V_2 una de 0.071 μ g/mg proteína. El 100% de inhibición se alcanza a una concentración de 5 μ g/mg proteína.

Una vez identificadas las subunidades reportadas para la dimerización de la F_1F_0 -ATP sintasa, se construyeron knock-outs para transformar cepas mutantes de las subunidades *e* y *g*, además de la subunidad *h*, la proteína reguladora *Inh1* y las prohibitinas.

Cada uno de los genes que codifican para las subunidades antes mencionadas fueron sustituidos por un cassette resistente a higromicina. Hasta el momento tenemos las mutantes para la subunidad *g* y la proteína reguladora *Inh1*; dichas sepas se preservaron en gliceroles.

8. PERSPECTIVAS

- Determinar el efecto del ADP y AMP-PNP sobre la actividad enzimática.
- Iniciar los estudios de dependencia de pH.
- Aislar los oligómeros de la F_1F_0 -ATP sintasa de las mutantes obtenidas.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Andrianaivomananjaona, T., Moune-Dimala, M., Herga, S., David, V. and Haraux, F. (2011) How the N-terminal extremity of *Saccharomyces cerevisiae* IF_1 interacts with ATP synthase: a kinetic approach. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1807(2):197-204.
2. Arnold, S., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R.A. and Schagger, H. (1998) Yeast mitochondrial F_1F_0 -ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *The EMBO Journal*, 17:7170-7178.
3. Arselin, G., Vaillier, J., Graves, P.V. and Velours, J. (1996) ATP synthase of yeast mitochondria. Isolation of the subunit h and disruption of the ATP14 gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 271:20284-20290.
4. Bisetto, E., Di Pancrazio, F., Simula, M.P., Mavelli, I. and Lippe, G. (2007) Mammalian ATP synthase monomer versus dimer profiled by blue native PAGE and activity stain. *Electrophoresis*, 28:3178-3185.
5. Bölker, M. (2001) *Ustilago maydis* –a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology*, 147:1395-1401.
6. Boyer, P.D. (2000) Catalytic site forms and controls in ATP synthase catalysis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1458:252-262.
7. Brachmann, A., König, J., Julius, C. and Feldbrügge, M. (2004) A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Molecular Genetics and Genomics*, 272:261-226.
8. Cabezón, E., Arechaga, I., Jonathan, P., Butler, G. and Walker, J.E. (2000) Dimerization of bovine F_1 -ATPase by binding the inhibitor protein, IF_1 . *The Journal of Biological Chemistry*, 275:28353-28355.

9. Campanella, M., Casswell, E., Chong, S., Farah, Z., Wieckowski, M.R., Abramov, A.Y., Tinker, A. and Duchon, M.R. (2008) Regulation of Mitochondrial Structure and Function by the F_1F_0 -ATPase Inhibitor Protein, IF₁. *Cell Metabolism*, 8(1):13-25.
10. Cano-Estrada, A., Vázquez-Acevedo, M., Villavicencio-Queijeiro, A., Figueroa-Martínez, F., Miranda-Astudillo, H., Cordeiro, Y., Mignaco, J.A., Foguel, D., Cardol, P., Lapaille, M., Remacle, C., Wilkens, S. and González-Halphen, D. (2010) Subunit-subunit interactions and overall topology of the dimeric mitochondrial ATP synthase of *Polytomella* sp. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1797:1439-1448.
11. Cardol, P., González-Halphen, D., Reyes-Prieto, A., Baurain, D., Matagne, R.F. and Remacle, C. (2005) The mitochondrial oxidative phosphorylation proteome of *Chlamydomonas reinhardtii* deduced from the Genome Sequencing Project. *Plant Physiology*, 137:447-489.
12. Chávez, E., Flores-Herrera, O. y Martínez, F. Capítulo 22, Ciclo de los ácidos tricarboxílicos, Bioquímica de Laguna, 7ª edición, Laguna, J., Piña, E., Martínez, F., Pardo, J.P. y Riveros, H. (Editores), Manual Moderno, 2013.
13. Chávez, E., Flores-Herrera, O. y Martínez, F. Capítulo 23, Oxidaciones Biológicas y Bioenergética, Bioquímica de Laguna, 7ª edición, Laguna, J., Piña, E., Martínez, F., Pardo, J.P. y Riveros, H. (Editores), Manual Moderno, 2013.
14. Couoh-Cardel, S., Uribe-Carvajal, S., Wilkens, S. and García-Trejo, J.J. (2010) Structure of dimeric F_1F_0 -ATP synthase. *The Journal of biological chemistry*, 285(47):36447-36455.
15. Dienhart, M., Pfeiffer, K., Schagger, H. and Stuart, R.A. (2002) Formation of the yeast F_1F_0 -ATP synthase dimeric complex does not require the ATPase inhibitor protein, Inh1. *The Journal of Biological Chemistry*, 277:39289-39295.
16. Doehlemann, G., Wahl, R., Horst, R.J., Voll, L.M., Usadel, B., Poree, F., Stitt, M., Pons-Kühnemann, J., Sonnewald, U., Kahmann, R. and Kämper, J. (2008) Reprogramming a maize plant: transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 56(2):181-195.
17. Ebner, E. and Maier, K.L. (1977) A protein inhibitor of mitochondrial adenosine triphosphatase (F₁) from *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 252(2):671-76.

18. Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical biochemistry*, 132(1):6-13.
19. Feldbrügge, M., Kämper, J., Steinberg, G. and Kahmann, R. (2004) Regulation of mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Current opinion in microbiology*, 7(6):666-672.
20. Fiske, C.H. and Subbarow, Y. (1925) The Colorimetric Determination Of Phosphorus. *The Journal of Biological Chemistry*, 66:375-400.
21. Flores-Herrera O, et al. En preparación.
22. Funes, S., Davidson, E., Claros, M.G., van Lis, R., Pérez-Martínez, X., Vázquez-Acevedo, M., King, M.P. and González-Halphen, D. (2002) The typically mitochondrial DNA-encoded ATP6 subunit of F_1F_0 -ATPase is encoded by a nuclear gene in *Chlamydomonas reinhaedtii*. *The Journal of Biological Chemistry*. 277:6051-6058.
23. Frey, T. and Mannella, C.A. (2000) The internal structure of mitochondria. *Trends in biochemical sciences*, 1762.140-147
24. García, J.J., Morales-Ríos, E., Cortés-Hernandez, P. and Rodríguez-Zavala, J.S. (2006) The inhibitor protein (IF_1) promotes dimerization of the mitochondrial F_1F_0 -ATP synthase. *Biochemistry*, 45:12695-12703.
25. García-Trejo, J.J. and Morales-Ríos, E. (2008) Regulation of the F_1F_0 -ATP Synthase Rotary Nanomotor in its Monomeric-Bacterial and Dimeric-Mitochondrial Forms. *Journal of biological physics*, 34:197-212.
26. Giraud, M.F., Paumard, P., Soubannier, V., Vaillier, J., Arselin, G., Salin, B., Schaeffer, J., Brèthes, D., di Rago, J.P. and Velours, J. (2002) Is there a relationship between the supramolecular organization of the mitochondrial ATP synthase and the formation of cristae?. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1555:174-180.
27. Gonzalez-Zamorano, M., Mendoza-Hernández, G., Xolalpa, W., Parada, C., Vallecillo, A.J., Bigi, F. and Espitia, C. (2009) Mycobacterium tuberculosis glycoproteomics based on ConA-lectin affinity capture of mannosylated proteins. *Journal of Proteome Research*, 8:721-733.
28. Hackenbrock, C.R., Chazotte, B. and Gupte, S.S. (1986) The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 18:331–368.

29. Herrera, T., Ulloa, M. and Ruiz-Oronoz, M. (1990) El reino de los hongos. Micología básica y aplicada. Fondo de la Cultura Económica/IBT-UNAM, Mexico, D.F. pp294-301.
30. Holliday R, (1965) Radiation sensitive mutants of *Ustilago maydis*. *Mutation Research*, 2(6):557-559.
31. Holloman, W.K., Schirawski, J. and Holliday, R. (2008) The homologous recombination system of *Ustilago maydis*. *Fungal genetics and biology*, 45(1):S31-39.
32. Itoh, H., Takahashi, A., Adachi, K., Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M. and Kinoshita, K. (2004) Mechanically driven ATP synthesis by F₁-ATPase. *Nature*, 427:465-468.
33. Juárez, O., Guerra, G., Velázquez, I., Flores-Herrera, O., Rivera-Pérez, R.E. and Pardo, J.P. (2006) The physiologic role of alternative oxidase in *Ustilago maydis*. *The FEBS Journal*, 273:4603-4615.
34. Jung, C., Higgins, C.M. and Xu, Z. (2000) Measuring the quantity and activity of mitochondrial electron transport chain complexes in tissues of central nervous system using blue native polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 286:214-223.
35. Kahmann, R., Basse, C. and Feldbrügge, M. (1999) Fungal-plant signalling in the *Ustilago maydis*-maize pathosystem. *Current opinion in microbiology*, 2(6):647-650.
36. Lengeler, J.W. (2000) Metabolic networks: a signal-oriented approach to cellular models. *Biological Chemistry*, 381(9-10):911-920.
37. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, 193:265-275.
38. Marques, I., Dencher, N.A., Videira, A. and Krause, F. (2007) Supramolecular organization of the respiratory chain in *Neurospora crassa* mitochondria. *American Society for Microbiology*, 6:2391-2405.
39. Martínez-Espinoza, A.D., García-Pedrajas, M.D. and Gold, S.E. (2002) The Ustilaginales as a Plant Pests and Model Systems. *Fungal Genetics and biology*, 35:1-20.
40. McCann, M.P. and Snetselaar, K.M. (2008) A genome-based analysis of amino acid metabolism in the biotrophic plant pathogen *Ustilago maydis*. *Fungal Genetics and Biology*, 45(1): S77–S87.

41. Mendoza-Mendoza, A., Berndt, P., Djamei, A., Weise, C., Linne, U., Marahiel, M., Vranes, M., Kämper, J. and Kahmann, R. (2009) Physical-chemical plant-derived signals induce differentiation in *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology*, 71(4):895-911.
42. Minauro-Sanmiguel, F., Wilkens, S. and García, J.J. (2005) Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: novel F₀ bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis. *PNAS*, 102:12356-12358.
43. Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 191:155-148.
44. Morales-Ríos, E., de la Rosa-Morales, F., Mendoza-Hernández, G., Rodríguez-Zavala, J.S., Celis, H., Zarco-Zavala, M. and García-Trejo, J.J. (2010) A novel 11-kDa inhibitory subunit in the F₁F₀ ATP synthase of *Paracoccus denitrificans* and related alpha-proteobacteria. *FASEB journal*, 24(2):599-608.
45. Penefsky, H.S. (1974) Mitochondrial and chloroplast ATPases. *The Enzymes*, 10:375-429.
46. Penefsky, H.S., Pullman, M.E., Datta, A. and Racker, E. (1960) Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. II. Purification and properties of soluble dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase. *The Journal of Biological Chemistry*, 235:3322–3329.
47. Pullman, M.E. and Monroy, G.C. (1963) A naturally occurring inhibitor of mitochondrial adenosine triphosphate. *The Journal of Biological Chemistry*, 238:3762-9.
48. Rabl, R., Soubannier, V., Scholz, R., Vogel, F., Mendl, N., Vasiljev-Neumeyer, A., Körner, C., Jagasia, R., Keil, T., Baumeister, W., Cyrklaff, M., Neupert, W. and Reichert, A.S. (2009) Formation of cristae and crista junction in mitochondria depends on antagonism between Fc_j and su *e/g*. *The Journal of cell biology*, 185:1047-1063.
49. Racker, E. (1963) A mitochondrial factor conferring oligomycin sensitivity on soluble mitochondrial ATPase. *Biochemical and biophysical research communications*, 10:435-439.
50. Reifschneider, N., Goto, S., Nakamoto, H., Takahashi, R., Sugawa, M., Dencher, N.A. and Krause, F. (2005) Defining the mitochondrial proteomes from five rat organs in a physiologically significant context using 2D blue-native/SDS-PAGE. *Journal of proteome research*, 5:1117-1132.

51. Rexroth, S., Meyer Zu Tittingdorf, J.M., Schwassmann, H.J., Krause, F., Seelert, H. and Dencher, N.A. (2004) Dimeric H⁺-ATP synthase in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1658:202-211.
52. Rybicki, E.P. and Purves, M. (1996) Western or enzyme-assisted immunoelectroblotting (IEB).
53. Schagger, H. (2002) Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1555:154-159.
54. Schagger, H. (2006) Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*, 1:16-22.
55. Schagger, H. and Pfeiffer, K. (2000) Supercomplexes in the respiratory chain of yeast and mammalian mitochondria. *The EMBO Journal*, 19:1777-1783.
56. Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of molecular biology*, 98(3):503-17.
57. Steinberg, G. and Perez-Martin, J. (2008) *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. *Trends in cell biology*, 18(2):61-67.
58. Strauss, M., Hofhaus, G., Schröder, R.R. and Kühlbrandt, W. (2008) Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *The EMBO Journal*, 27:1154-1160.
59. van Lis, R., Atteia, A., Mendoza-Hernández, G. and González-Halphen, D. (2003) Identification of novel mitochondrial protein components of *Chlamydomonas reinhardtii*. A proteomic approach. *Plant Physiology*, 132:318-330.
60. van Lis, R., Mendoza-Hernández, G., Groth, G. and Atteia, A. (2007) New insights into the unique structure of the F₀F₁-ATP synthase from the chlamydomonad algae *Polytomella* sp. and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 144:1190-1199.
61. Vázquez-Acevedo, M., Cardol, P., Cano-Estrada, A., Lapaille, M., Remacle, C. and 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. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 38:271-282.
62. Velours, J., Dautant, A., Salin, B., Sagot, I. and Brèthes, D. (2009) Mitochondrial F₁F₀-ATP synthase and organellar internal architecture. *The Internal Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 41:1783-1789.
63. Villavicencio-Queijeiro, A., Vázquez-Acevedo, M., Cano-Estrada, A., Zarco-Zavala, M., Tuena de Gómez, M., Mignaco, J.A., Freire, M.M., Scofano, H.M., Foguel, D., Cardol,

- P., Remacle, C. and González-Halphen, D. (2009) The fully-active and structurally-stable form of the mitochondrial ATP synthase of *Polytomella* sp. is dimeric. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 41:1–13.
64. Vollmeister, E., Schipper, K., Baumann, S., Haag, C., Pohlmann, T., Stock, J. and Feldbrügge, M. (2011) *Fungal Development of the plant pathogen Ustilago maydis*. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(1):59-77.
65. Vonk, J. and Schäfer, E. (2009) Supramolecular organization of protein complexes in the mitochondrial inner membrane. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1793:117-124.
66. Wagner, K., Perschil, I., Fichter, C.D. and van der Laan, M. (2010) Stepwise assembly of dimeric F_1F_0 -ATP synthase in mitochondria involves the small F_0 -subunits k and i. *Molecular biology of the cell*, 9:1494-1504.
67. Walker, J.E. (1998) ATP Synthesis by Rotary Catalysis (Nobel lecture). *Angewandte Chemie International Edition*, 37:2308-2319.
68. Weber, J. and Senior, A.E. (2003) ATP synthesis driven by proton transport in F_1F_0 -ATP synthase. *FEBS Letters*, 545:61-70.
69. Wittig, I., Karas, M. and Schägger, H. (2007) High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Molecular & cellular proteomics*, 6:1215-1225.
70. Wittig, I., Velours, J., Stuart, R. and Schägger, H. (2008) Characterization of domain interfases in monomeric and dimeric ATP synthase. *Molecular & cellular proteomics*, 5:995-1004.
71. Zick, M., Rabl, R. and Reichert, A.S. (2009) Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1793:5-19.