



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Caracterización de la fosforilación oxidativa y el  
megacanal mitocondrial inespecífico de la cepa de  
*Saccharomyces cerevisiae* carente de Shy1

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

ISARELI CRUZ CRUZ



Tutor:  
DR. SALVADOR URIBE CARVAJAL

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2016



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.

## HOJA DE DATOS DEL JURADO

### 1. Datos del alumno

Cruz

Cruz

Isareli

58444596

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

308339051

### 2. Datos del tutor

Dr.

Salvador

Uribe

Carvajal

### 3. Datos del sinodal 1

Dr.

Horacio

Reyes

Vivas

### 4. Datos del sinodal 2

Dra.

Laura

Kawasaki

Watanabe

### 5. Datos del sinodal 3

M. en C. B.

Vanessa

Vega

García

### 6. Datos del sinodal 4

Biól.

Rolando

Gasca

Licea

### 7. Datos del trabajo escrito

Caracterización de la fosforilación oxidativa y el megacanal mitocondrial inespecífico de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* carente de Shy1

53 p.

2016

## Agradecimientos

A mis padres Candido y Margarita porque gracias a ellos he podido llegar hasta aquí. A mis hermanas Angelica y Liliana por ser mis guías y compañeras durante este recorrido. Ange gracias por escucharme siempre y ser más que una hermana. Gracias por todo su apoyo y cariño.

A mi tutor Salvador Uribe Carvajal por abrirme las puertas de su laboratorio, por sus consejos, sus enseñanzas, su apoyo y por la confianza que me ha brindado.

A la Universidad Nacional Autónoma de México porque en ella he crecido tanto académica como personalmente. A la Facultad de Ciencias y sus profesores porque allí aprendí lo hermoso que es estudiar Biología. Al Instituto de Fisiología Celular, que se ha convertido en mi casa. Al CELE por darme la oportunidad de estudiar en sus aulas y de cumplir uno de mis sueños.

A mis compañeros del laboratorio 305 oriente del IFC por dejarme ser parte del lab y por ayudarme una y otra vez. Especialmente a Lili y Cris por haberme guiado y ayudado tanto en la realización de este trabajo.

A mis sinodales Dr. Horacio Reyes, Dra. Laura Kawasaki, M. en C. Vanessa Vega y Biól. Rolando Gasca por la revisión de esta tesis.

A aquellos con los que he compartido la gran aventura de estudiar Biología y que me han brindado su amistad: Ana, Paul, Fanny, Lalo, Giovanni, Angelito, Andrea, Eloy, Luisa y muchos más. Especialmente a Ana por su apoyo y ánimo en muchos de las decisiones que he tomado, confiar en mí y ser mi compañerita del IFC y, a Paul-chan por ser no sólo un amigo de la carrera sino de la aventura de estudiar japonés.

A Vanessa Vega por haberme enseñado tanto, por ser paciente conmigo y, aún ahora, tomarse el tiempo para revisar esta tesis. A Tere por escuchar mis historias y contarme tantas otras. A Tadeous por hablarme, convertirme en su amiga y animarme siempre.

A la Dra. Corina Solís Rosales por permitirme realizar el servicio social en el LEMA, por sus consejos y apoyo para realizar la tesis. También a Gaby, Lalo, María, Dulce, Fanny y Daniel por hacer esa estancia tan amena, por dejarme entrar en su mundo “físico” y por todos los ánimos que me han dado.

A esos amigos de años: Irving e Isaías, porque aunque hemos tomado caminos tan diferentes podemos tener pláticas divertidas e interminables. A Mariana por ser una gran compañera de aventuras y reír conmigo por cosas tan simples.

A esas personitas con las que he coincidido en el mundo, que me han brindado su amistad y con las que compartí aventuras y sueños: Familia gato: Gretchen, Juan y mamá Edu; a Camelia House: Sairam y Andrea; y a tantos gajins y parces que espero volver a ver.

A todas esas personas que han estado a mi lado y que me han apoyado de una manera o de otra para llegar hasta aquí.

# CONTENIDO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	3
RESUMEN .....	4
ABSTRACT .....	5
INTRODUCCIÓN.....	6
<b>La mitocondria</b> .....	6
<b>La cadena transportadora de electrones</b> .....	7
<b>Complejo I o NADH-ubiquinona oxidorreductasa</b> .....	7
<b>Complejo II o Succinato-ubiquinona oxidorreductasa</b> .....	8
<b>Complejo III o Ubiquinol-citocromo c oxido-reductasa</b> .....	8
<b>Complejo IV o Citocromo c oxidasa</b> .....	9
<b>El transporte vectorial de protones</b> .....	10
<b>Complejo V o ATP-sintasa</b> .....	11
<b>La cadena respiratoria de <i>S. cerevisiae</i></b> .....	11
<b>Especies reactivas de oxígeno (ROS)</b> .....	12
<b>Desacoplamiento fisiológico</b> .....	13
<b>Transición de la permeabilidad</b> .....	15
<b>Poros de transición de la permeabilidad (PTP) en mamíferos</b> .....	15
<b>Canal inespecífico mitocondrial de <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b> .....	17
<b>Shy1p</b> .....	18
JUSTIFICACIÓN.....	19
HIPÓTESIS.....	20
OBJETIVOS .....	20
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	20
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	20
METODOLOGÍA .....	21
<b>Material biológico</b> .....	21
<b>Curvas de crecimiento</b> .....	21
<b>Cultivo de levaduras</b> .....	21
<b>Aislamiento de mitocondrias</b> .....	22
<b>Cuantificación de proteína</b> .....	23

<b>Oximetría</b> .....	23
<b>Determinación del potencial transmembranal (<math>\Delta\Psi</math>)</b> .....	23
<b>Hinchamiento mitocondrial</b> .....	24
<b>Espectros diferenciales</b> .....	24
<b>Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS)</b> .....	25
<b>Ensayo de sensibilidad a peróxido de hidrógeno (<math>H_2O_2</math>)</b> .....	26
<b>RESULTADOS</b> .....	27
<b>Curva de crecimiento</b> .....	27
<b>Consumo de oxígeno</b> .....	28
<b>Potencial transmembranal <math>\Delta\Psi</math></b> .....	31
<b>Hinchamiento mitocondrial</b> .....	33
<b>Espectros diferenciales</b> .....	34
<b>Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)</b> .....	36
<b>Sensibilidad a <math>H_2O_2</math></b> .....	38
<b>DISCUSIÓN</b> .....	40
<b>CONCLUSIONES</b> .....	44
<b>REFERENCIAS</b> .....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANC	Acarreador de adenín nucleótidos
AOX	Oxidasa alterna
CCCP	<i>p</i> -clorocarbonilcianuro fenilhidrazona
COX	Citocromo <i>c</i> oxidasa
CR	Control respiratorio
CsA	Ciclosporina A
Cyp-D	Ciclofilina D
DhMUC	Canal inespecífico mitocondrial de <i>D. hansenii</i>
DOC	Desoxicolato de sodio
MES	Ácido 2-( <i>N</i> -morfolino) etanol-sulfónico
MIM	Membrana interna mitocondrial
MOM	Mebrana externa mitocondrial
MUC	Canal inespecífico mitocondrial
Nd2e	NADH deshidrogenasa alterna externa
Nd2i	NADH deshidrogenasa alterna interna
Pi	Fosfato inorgánico
PiC	Acarreador de fosfato
PIM	Maquinaria de importación de proteínas
PTP	Poros de transición de la permeabilidad
Q	Ubiquinona
QH2	Ubiquinol
ROS	Especies reactivas de oxígeno
ScMUC	Canal inespecífico mitocondrial de <i>S. cerevisiae</i>
Shy1p	Proteína de la membrana interna mitocondrial
SOD	Superóxido dismutasa
TEA	Trietanolamina
UCP	Proteína desacoplante
VDAC	Canal aniónico dependiente de voltaje
$\Delta\Psi$	Potencial transmembranal

## RESUMEN

La fosforilación oxidativa está acoplada a la producción de ATP, proceso que acelera el flujo de electrones en la cadena respiratoria. Existen sistemas desacoplantes que disipan el gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial y aceleran el consumo de oxígeno independientemente de la síntesis de ATP. Entre estos sistemas se encuentra el canal inespecífico mitocondrial ( $s_cMUC$ ) de *Saccharomyces cerevisiae*. Los mecanismos de modulación de apertura y cierre del  $s_cMUC$  han sido descritos, pero su estructura no se conoce. Shy1p es una proteína de la membrana interna mitocondrial que se encuentra codificada en el genoma nuclear de diversas levaduras. Shy1p participa en el ensamblaje del complejo IV de la cadena respiratoria y podría presentar una función adicional en la mitocondria.

En este trabajo se realizaron diferentes ensayos con la cepa  $\Delta shy1$  de *S. cerevisiae* para determinar si la proteína participa en la modulación de la apertura del  $s_cMUC$ ; para comprobar las características de la cadena respiratoria de la cepa  $\Delta shy1$ ; así como la posible relación entre el  $s_cMUC$  y el estrés oxidante. Se observó que la respiración mitocondrial de la cepa  $\Delta shy1$  se encuentra disminuida, pero puede crecer a una velocidad comparable a la de la cepa silvestre en medio fermentable. El complejo IV se encuentra disminuido, como indican las concentraciones de citocromo  $a+a_3$ . Los resultados de hinchamiento y de potencial transmembranal indican que el  $s_cMUC$  en la cepa  $\Delta shy1$  permanece activo, aunque no responde de igual manera al de la cepa silvestre. La producción de ROS es menor cuando el canal se encuentra abierto, es decir, cuando hay un potencial transmembranal bajo; la cepa  $\Delta shy1$  parece producir más ROS. Adicionalmente,  $\Delta shy1$  es más resistente que la WT al estrés oxidante externo. Se concluye que es poco probable que Shy1p participe en la estructura o la modulación del  $s_cMUC$ . Los efectos observados aquí probablemente se deban solamente a la disfunción de la cadena respiratoria causada por la ausencia de Shy1p.



## ABSTRACT

Oxidative phosphorylation is coupled to ATP production, accelerating electron flux in the respiratory chain. Uncoupling systems dissipate the mitochondrial transmembrane potential and accelerate the rate of oxygen consumption regardless of ATP synthesis. The mitochondrial unspecific channel from *Saccharomyces cerevisiae* (*scMUC*) is among these systems. MUC opening and closing mechanisms have been described but the structure is not yet known. Shy1p resides in the inner mitochondrial membrane; it is encoded in the nucleus. Shy1p participates in assembly of respiratory Complex IV and might have additional function in mitochondria.

Here, the  $\Delta$ *shy1* strain of *S. cerevisiae* was studied to determinate whether it participates in opening and closing of *scMUC*, to confirm the relationship with the respiratory chain and to evaluate a possible relation between *scMUC* and oxidative stress. We observed that in fermentable medium the  $\Delta$ *shy1* strain grows as well as the wild type. Complex IV activity and concentrations decreased. Swelling and transmembrane potential results suggest that *scMUC* in  $\Delta$ *shy1* is still present even though it doesn't respond in the same way as the wild type. When MUC is open, ROS production decreases; however,  $\Delta$ *shy1* seems to produce more ROS. Additionally,  $\Delta$ *shy1* is more resistant than the WT to external oxidative stress. We conclude that it is not likely that Shy1p is part of the structure of *scMUC*. The phenotype is probably due to dysfunction of the respiratory chain caused by the absence of Shy1p.

# INTRODUCCIÓN

## La mitocondria

Las mitocondrias son organelos plásticos y dinámicos que constantemente cambian su forma y que generan la mayoría del ATP requerido por las células. Las mitocondrias están delimitadas por dos membranas: la externa y la interna, que están separadas por el espacio intermembranal. El espacio rodeado por la membrana interna se denomina matriz mitocondrial.

La membrana externa mitocondrial (MOM, por sus siglas en inglés) está constituida de aproximadamente 50% de lípidos y 50% de proteínas y es altamente permeable a moléculas pequeñas e iones. La proteína denominada porina, o canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), que forma canales a través de la membrana, permite el paso de moléculas citosólicas de hasta 10 kDa (Lodish et al. 2008).

La membrana interna mitocondrial (MIM, por sus siglas en inglés) está constituida por aproximadamente 20% de lípidos y 80% de proteínas. Forma pliegues o crestas que se proyectan hacia la matriz mitocondrial aumentando su superficie. Es mucho menos permeable que la MOM y contiene una variedad de proteínas transportadoras que la hacen selectivamente permeable a moléculas que son metabolizadas o requeridas por enzimas de la matriz mitocondrial. Las enzimas de la matriz mitocondrial incluyen a aquellas que catabolizan piruvato y ácidos grasos para producir acetil CoA y aquellas que oxidan acetil CoA en el ciclo de Krebs. Los principales productos de esta oxidación son CO<sub>2</sub>, que es desechado y NADH que es la fuente principal de electrones que son transportados a lo largo de la cadena respiratoria. Las enzimas de la cadena respiratoria se encuentran embebidas en la MIM y son esenciales para la fosforilación oxidativa (Alberts et al. 2008).

## **La cadena transportadora de electrones**

La óxido-reducción secuencial de los citocromos ubicados en la MIM dio lugar a la idea de una cadena respiratoria. Los principales componentes de la cadena de transporte de electrones son cuatro complejos multiproteicos: Complejo I o NADH-ubiquinona oxidorreductasa, Complejo II o Succinato-ubiquinona oxidorreductasa, Complejo III o Ubiquinol-citocromo c oxidorreductasa y Complejo IV o Citocromo c oxidasa. Además hay acarreadores móviles de electrones en la cadena respiratoria que incluyen a las quinonas y al citocromo c (Figura 1) (Berg et al., 2006).

### **Complejo I o NADH-ubiquinona oxidorreductasa**

En eucariontes, este complejo respiratorio está formado por 15 subunidades centrales y hasta 32 accesorias, con una masa molecular de hasta 1000 kDa, siendo el más grande de los complejos de la cadena respiratoria. Las subunidades centrales forman una estructura en L, con un brazo horizontal reclinado en la membrana y uno vertical proyectado hacia la matriz, formado por los dominios de membrana e hidrofílicos, que contiene todos los motivos de enlace para los grupos redox prostéticos y el substrato NADH (Brandt 2006). Los genes que codifican para la síntesis de esta enzima se encuentran tanto en el núcleo como en la mitocondria (Berg et al., 2006).

En el complejo I, los electrones del NADH y/o FADH<sub>2</sub> generados durante la glucólisis, la oxidación de ácidos grasos y el ciclo de Krebs son transferidos al grupo prostético FMN (flavina mononucleótido) de la NADH-ubiquinona oxidorreductasa, resultando en su forma reducida FMNH<sub>2</sub>. Los electrones son transferidos del FMNH<sub>2</sub> a una serie de centros hierro-azufre (Fe-S) del complejo multiproteico y finalmente a la ubiquinona (Q) que se reduce formando ubiquinol (QH<sub>2</sub>). Esta reacción está acoplada a la traslocación de cuatro protones a través de la membrana hacia el espacio intermembranal (Lodish et al. 2008). Las características de la estructura – una cámara de reacción Q única sellada, un doblez tipo antiporte y una canalización entre el sitio Q

y el canal E – sugieren que los cambios conformacionales derivados de las reacciones redox se propagan a cuatro canales de protones vía el eje central hidrofílico único, con la ayuda de elementos acoplados y resultando en la translocación de cuatro protones por ciclo (Baradaran et al. 2013).

### **Complejo II o Succinato-ubiquinona oxidorreductasa**

La succinato deshidrogenasa se localiza en la membrana interna mitocondrial y es un componente fundamental del Complejo II. Contiene cinco grupos prostéticos y cuatro diferentes subunidades: las subunidades C y D son proteínas integrales de membrana y contienen el grupo hemo b y el sitio de unión para la ubiquinona; las subunidades A y B se extienden hacia la matriz y contienen tres centros 2Fe-2S, FAD unido y un sitio de unión a sustrato (Nelson & Cox 2013). La succinato deshidrogenasa oxida una molécula de succinato a fumarato. Los dos electrones liberados en la conversión de succinato a fumarato en forma de FADH<sub>2</sub> son transferidos a la ubiquinona para formar ubiquinol (Berg et al. 2006). Este complejo no trasloca protones al espacio intermembranal y por lo tanto no ayuda a la generación de la fuerza protón-motriz. Consecuentemente, menos ATP es formado por la oxidación de FADH<sub>2</sub> que de NADH (Lodish et al. 2008).

### **Complejo III o Ubiquinol-citocromo c oxido-reductasa**

El ubiquinol, generado por la oxidación de NADH o de succinato, dona dos electrones al complejo Ubiquinol-citocromo c oxidorreductasa (complejo III o complejo *bc1*) regenerando a la ubiquinona. Este complejo es un dímero formado por monómeros de 11 subunidades. Contiene un total de tres hemos: dos hemos tipo b, llamados *bL* (L por su baja afinidad) y *bH* (H por su alta afinidad) y un hemo tipo *c* dentro del citocromo *c1* (Xia et al. 1997). Debido a la presencia de estos grupos hemos a la enzima también se le conoce como citocromo *bc1* (Trumpower 1990). La enzima presenta una proteína hierro-azufre con un centro 2Fe-2S y contiene dos sitios

de unión distintos para la ubiquinona llamados Qo y Qi, con el sitio Qi localizado cerca del interior de la matriz (Covian & Trumpower 2005).

Dentro de este complejo los electrones son transferidos a la proteína hierro-azufre, luego a dos citocromos tipo *b* y después al citocromo *c*1. Finalmente, los dos electrones son transferidos a dos moléculas de citocromo *c* oxidado (proteína periférica del espacio intermembranal soluble en agua), formando citocromo *c* reducido (Trumpower 1990). Este complejo trasloca cuatro protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembranal por cada par de electrones transferidos (Lodish et al. 2008).

### **Complejo IV o Citocromo *c* oxidasa**

La etapa final de la cadena transportadora de electrones es la oxidación del citocromo *c* reducido acoplada a la reducción de O<sub>2</sub> para formar dos moléculas de H<sub>2</sub>O. Esta reacción es catalizada por la citocromo *c* oxidasa o complejo IV. En mamíferos, su estructura consiste de 13 subunidades (Tsukihara et al. 1996), de las cuales 3 (subunidades I, II y III) son codificadas por el genoma mitocondrial. Estas subunidades exhiben un alto grado de conservación entre especies (Herrmann & Funes 2005; Fontanesi, Soto, et al. 2008).

Esta enzima contiene dos grupos hemo tipo A y tres iones de cobre, arreglados en dos centros de cobre, designados A y B. Un centro (*Cu A/Cu A*) acepta electrones de la forma reducida del citocromo *c*. Los dos hemos A, llamados *hemo a* y *hemo a<sub>3</sub>*, tienen propiedades diferentes debido a su localización dentro de la enzima. El hemo *a* acarrea electrones del centro *CuA /CuA* y el hemo *a<sub>3</sub>* pasa electrones a *CuB*, que está directamente adyacente. Juntos, el hemo *a<sub>3</sub>* y *CuB* forman el centro activo en el cual el oxígeno es reducido a agua. Los protones requeridos para formar H<sub>2</sub>O provienen de la matriz mitocondrial, mientras que el complejo enzimático trasloca dos protones al espacio intermembranal (Berg et al. 2006).

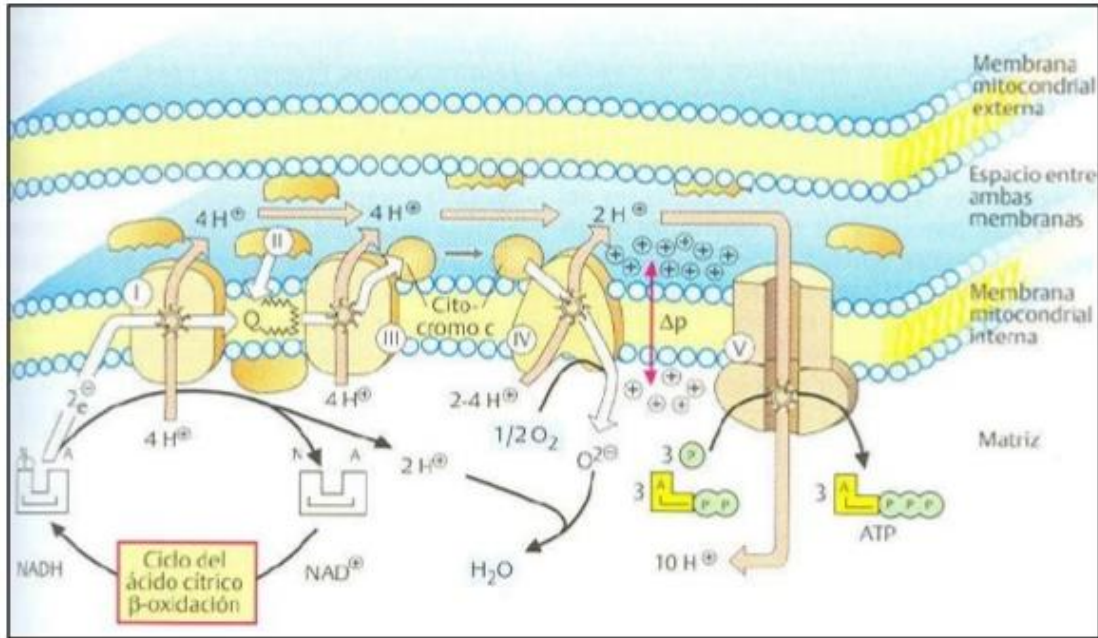


Figura 1. Fosforilación oxidativa. Vía del transporte de electrones (flechas blancas) y del transporte de protones (flechas rosas) en la membrana interna mitocondrial (Lodish et al. 2008).

## El transporte vectorial de protones

La fosforilación oxidativa genera un gradiente electroquímico de protones que se usa para sintetizar ATP. Los electrones provenientes de intermediarios reducidos del metabolismo (NADH, FADH<sub>2</sub>) son transportados a lo largo de la cadena respiratoria. Este flujo de electrones está acoplado al bombeo de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal. El transporte activo de protones genera un gradiente de pH y luego un potencial eléctrico transmembranal que se suman para dar como resultado la fuerza protón motriz. Cuando los protones regresan a la matriz mitocondrial a través de un complejo enzimático (ATP sintasa) el ATP es sintetizado. Los complejos I, III y IV sirven como bombas de protones transfiriendo 4, 4 y 2 protones respectivamente. Así, la oxidación de los sustratos se encuentra acoplada mediante la generación de un gradiente protón-motriz

transmembranal a la formación de ATP por el complejo V o  $F_1F_0$ -ATP-sintasa (Anraku et al. 1989; Mitchell 2011; Nicholls & Ferguson 2013).

### **Complejo V o ATP-sintasa**

La fuerza protón-motriz generada por la translocación de protones durante el transporte de electrones en la cadena respiratoria es utilizada para sintetizar ATP. Esto es posible gracias a la enzima transmembranal  $F_1F_0$ -ATP sintasa o complejo V (Alberts et al. 2008). La  $F_1F_0$ -ATP sintasa tiene dos componentes principales,  $F_0$  y  $F_1$ , ambos formados por proteínas oligoméricas.  $F_0$  está localizado dentro de la membrana y contiene un canal transmembranal a través del cual los protones fluyen hacia  $F_1$ , la cual se extiende hacia la matriz mitocondrial (Lodish et al. 2008). Esta enzima crea una vía hidrofílica a través de la membrana que permite el flujo de protones hacia abajo de su gradiente electroquímico. Conforme los protones pasan a través de la ATP-sintasa, hacia la matriz mitocondrial, generan un cambio conformacional que favorece la reacción entre ADP y  $P_i$  para generar ATP (Alberts et al. 2008). La porción  $F_1$  de la ATP sintasa funciona como un motor molecular rotatorio, in vitro su subunidad  $\gamma$  rota contra las subunidades  $\alpha_3\beta_3$ , hidrolizando ATP en tres sitios catalíticos separados en las subunidades  $\beta$ . La rotación reversa de la subunidad  $\gamma$ , causada por el flujo de protones a través de la porción  $F_0$  asociada, conduce a la síntesis de ATP (Itoh et al. 2004).

### **La cadena respiratoria de *S. cerevisiae***

La cadena respiratoria de *S. cerevisiae* difiere de la de mamíferos y otras especies de levadura en que no tiene complejo I (Joseph-Horne et al. 2001). Presenta tres NADH deshidrogenasas alternas: una interna Ndi1p, que permite la entrada del NADH desde la matriz mitocondrial (De Vries et al. 1992); y dos externas, Nde1p y Nde2p (Luttik et al. 1998) que permiten la entrada de electrones a la cadena

respiratoria desde el espacio intermembranal (Overkamp et al. 2000). Este tipo de deshidrogenasa no bombea protones al espacio intermembranal.

## **Especies reactivas de oxígeno (ROS)**

La cadena respiratoria es una fuente importante y continua de ROS (Kowaltowski & Vercesi 1999). La oxidación de NADH y FADH<sub>2</sub> sólo se lleva a cabo si el ADP es fosforilado a ATP simultáneamente. Cuando el ATP es consumido, los niveles de ADP aumentan, por lo que es necesario regenerar el ATP y se activa la cadena transportadora de electrones. Cuando la concentración de ADP disminuye, la tasa de flujo de electrones a través de la cadena transportadora disminuye (estado IV de la respiración) y la mitocondria se convierte en una importante fuente de ROS (Chen et al. 2003; Barros et al. 2003).

A pesar de que la citocromo *c* oxidasa y otras proteínas de la cadena respiratoria son muy eficientes para evitar liberar intermediarios, pequeñas cantidades de especies reactivas de oxígeno (ROS) se forman constantemente (Murphy 2009). Las ROS están asociadas a daño celular, estrés oxidativo y muerte celular programada (Farrugia & Balzan 2012). La fuga de electrones en pasos intermedios de la cadena respiratoria promueve la reducción monoelectrónica de oxígeno, el cual genera el radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) (Turrens 1997). En la mitocondria el complejo III y el complejo I son los principales sitios de generación de ROS (Chen et al. 2003; Goncalves et al. 2014). También se ha reportado que una fuerza protón motriz alta en estado 4 incrementa la probabilidad de formación de superóxido (Korshunov et al. 1997).

Para protegerse contra el estrés oxidante existen enzimas que eliminan a las ROS. Entre éstas se encuentra la superóxido dismutasa (SOD), que cataliza la conversión de dos radicales superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) a peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y oxígeno (O<sub>2</sub>). El peróxido de hidrógeno es removido por la catalasa y otras peroxidasas, que lo convierten en H<sub>2</sub>O (Berg et al. 2006). Un posible componente



antioxidante de la mitocondria es el citocromo *c* (Barros et al. 2003). También existen sistemas que pueden prevenir la formación de ROS mediante procesos de desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (Guerrero-Castillo et al. 2011).

## **Desacoplamiento fisiológico**

El transporte de electrones se encuentra acoplado a la fosforilación del ADP, sin embargo, existen mecanismos que pueden alterar este acoplamiento disipando el gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial y acelerando la tasa de consumo de oxígeno independientemente de la síntesis de ATP (Figura 2). Dichos mecanismos pueden provocar la pérdida del gradiente de pH transmembranal (sumideros de protones) o pueden reducir el oxígeno a agua sin contribuir al potencial transmembranal (enzimas redox que no bombean protones) (Kadenbach 2003; Guerrero-Castillo et al. 2011). Los sumideros de protones (Figura 3) pueden ser canales o transportadores, entre ellos encontramos: al canal inespecífico mitocondrial (MUC) de levaduras como *S. cerevisiae* (*sc*MUC) (Manon et al. 1998) y *Debaryomyces hansenii* (*Dh*MUC) (Cabrera-Orefice et al. 2010), cuyo equivalente en mamíferos es el poro de transición de la permeabilidad (PTP) (Haworth & Hunter 1979). Las proteínas desacoplantes (UCPs), que disipan gradientes de protones, como la encontrada en *Yarrowia lipolytica* (Luévano-Martínez et al. 2010). Las oxido-reductasas alternas, que son enzimas de la cadena respiratoria que no bombean protones, como por ejemplo, las encontradas en *D. hansenii* y *Y. lipolytica* (Veiga et al. 2003; Kerscher et al. 2002). Y, el deslizamiento, que incluye variaciones en la estequiometría en  $H^+/e^-$  observado en *S. cerevisiae* (Manon et al. 1998) (Figura 2).

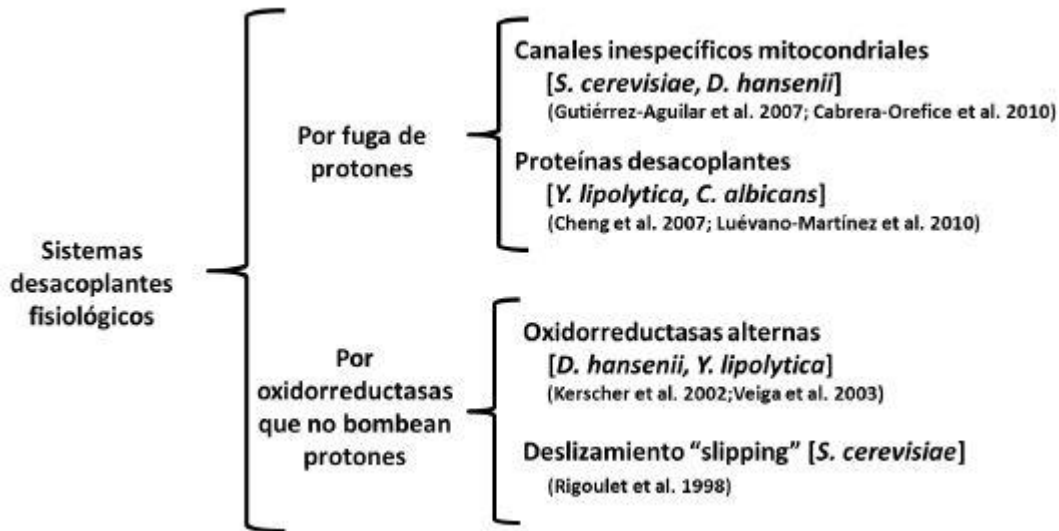


Figura 2. Sistemas de desacoplamiento fisiológico en mitocondrias de levaduras. La tasa de consumo de oxígeno puede ser acelerada independientemente de la síntesis de ATP ya sea por la disipación del gradiente de pH transmembranal o por la reducción del oxígeno sin contribuir al gradiente de protones. Estos mecanismos se encuentran presentes en diferentes especies de levaduras (Guerrero-Castillo et al. 2011).

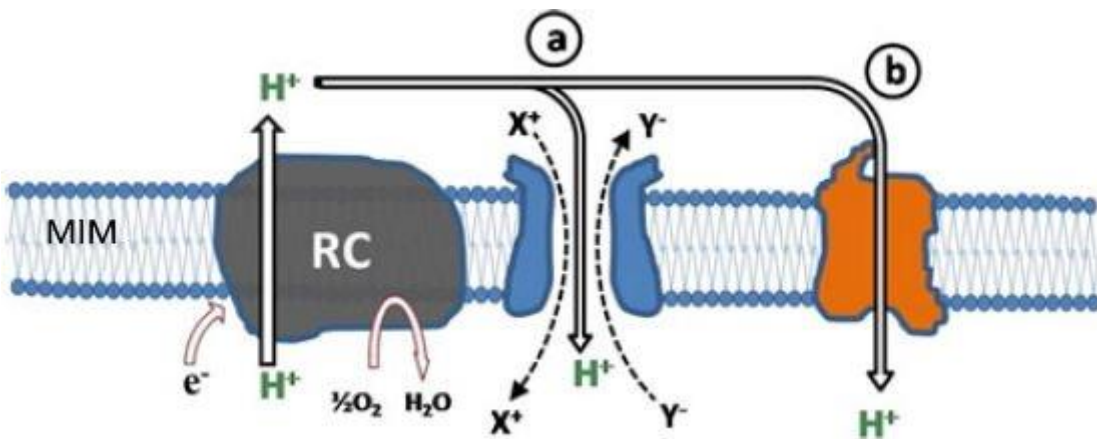


Figura 3. Sumideros de protones. Una vez que la cadena respiratoria ha establecido un gradiente de protones, los protones pueden ser devueltos a la matriz a través de canales inespecíficos (a) o a través de proteínas desacoplantes que son protonóforos específicos (b) (Guerrero-Castillo et al. 2011).

## **Transición de la permeabilidad**

Las mitocondrias de diversas especies pueden experimentar un incremento masivo en la permeabilidad conocido como transición de la permeabilidad (Uribe-Carvajal et al. 2011). La transición de la permeabilidad mitocondrial es el incremento en el transporte no selectivo de iones y metabolitos con masas moleculares de hasta 1.5 kDa a través de la membrana interna mitocondrial (Haworth & Hunter 1979) (Jung et al. 1997). Este incremento es mediado por la apertura de un poro o canal cuya función ha sido ampliamente caracterizada pero cuya estructura molecular permanece incierta (Gutiérrez-Aguilar & Uribe-Carvajal 2015; Azzolin et al. 2011). La presencia de este tipo de canales en mitocondrias de diferentes especies está relacionada con el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa; sin embargo, los mecanismos de modulación observados en el canal son diferentes entre especies (Uribe-Carvajal et al. 2011).

### **Poro de transición de la permeabilidad (PTP) en mamíferos**

En mamíferos, la apertura del poro de transición de la permeabilidad (PTP) acelera el comienzo de la transición de la permeabilidad (Haworth & Hunter 1979). Bajo ciertas condiciones de sobrecarga de calcio, especialmente cuando es acompañada de estrés oxidativo, concentraciones elevadas de fosfato y desaparición de adenín nucleótidos, el poro inespecífico se abre (Halestrap 2009). Durante la apertura la conductancia de la membrana aumenta, lo cual abate los gradientes químicos y eléctricos (Azzolin et al. 2011). La apertura del poro se ha relacionado con la muerte celular (apoptosis) y patogénesis de enfermedades (Rasola & Bernardi 2007).

Aunque se sabe mucho sobre la función del poro la estructura molecular del mismo es aún desconocida (Halestrap 2009; Gutiérrez-Aguilar & Uribe-Carvajal 2015; Rasola & Bernardi 2007). Diversas proteínas y moléculas que podrían constituir o regular el poro han sido reportadas previamente (Figura 4): la adenín nucleótido

translocasa (ANT) (Halestrap et al. 1997); el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) (Crompton et al. 1998); la ciclofilina A (CsA) (Jung et al. 1997); el acarreador de fosfato (PiC) (Leung et al. 2008), componentes de la maquinaria de importación de proteínas (PIM), el complejo I de la cadena respiratoria y la ciclofilina D (CypD) (Tanveer et al. 1996), entre otras. Sin embargo, cuando se han eliminado la mayoría de estas proteínas la actividad del poro no es totalmente suprimida (Uribe-Carvajal et al. 2011). Por otro lado, también se ha propuesto que el poro está formado por agregados de proteínas mal plegadas relacionadas al estrés oxidativo (He & Lemasters 2002). Adicionalmente se ha propuesto la participación de la ATP-sintasa en la formación del poro (Giorgio et al. 2013) y un modelo de la transición del complejo para formar el poro (Bernardi 2013).

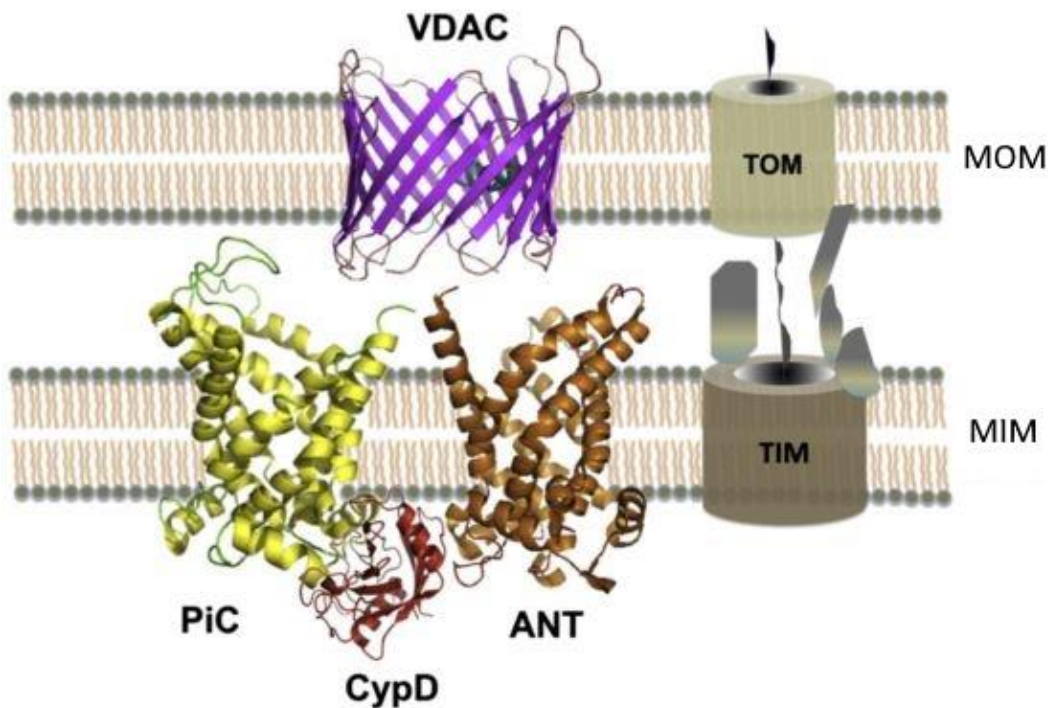


Figura 4. Componentes propuestos del PTP (MUC de mamíferos) (Uribe-Carvajal et al. 2011). La ciclofilina (CypD) es, hasta el momento, el único componente cierto (aunque regulatorio). Otras proteínas que han sido propuestas al menos como reguladores de la estructura son: VDAC (canal aniónico dependiente de voltaje); PiC (acarreador de fosfato); ANT (translocador

de adenin nucleótidos) y; TIM/TOM (componentes del poro de la maquinaria de importación de proteínas).

### **Canal inespecífico mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae***

El canal inespecífico mitocondrial en *S. cerevisiae* ( $scMUC$ ) que es considerado el equivalente del PTP de mamíferos (Manon et al. 1998) ha sido estudiado con detalle. El  $scMUC$  cierra en respuesta a bajas concentraciones de ATP, a altas concentraciones de Pi o ADP y a altas concentraciones de  $Mg^{2+}$  al igual que el  $dhMUC$  (canal inespecífico mitocondrial de *D. hansenii*) (Cabrera-Orefice et al. 2010; Pérez-Vázquez et al. 2003); y abre cuando hay exceso de ATP (Prieto et al. 1995). A diferencia de mamíferos, el papel del  $Ca^{2+}$  en la transición de la permeabilidad en *S. cerevisiae* no es clara; aparentemente carece de efecto (Jung et al. 1997), pero bajo ciertas condiciones experimentales induce la transición de la permeabilidad (Yamada et al. 2009).

La apertura del canal disipa el potencial transmembranal despolarizando a la mitocondria (Manon et al. 1998) e induciendo un arresto inmediato en la síntesis de ATP (Bernardi 1999). La apertura del MUC es regulada por la concentración de fosfato: la disminución de [Pi] resulta en la apertura del canal (Manon et al. 1998). Esto sugiere que el potencial de fosforilación o la carga energética controlan la apertura del canal (Wallace et al. 1994). Como consecuencia, se incrementa la tasa de consumo de oxígeno y disminuye la producción de ROS, ya que un bajo potencial transmembranal disminuye las probabilidades de formación de superóxido (Korshunov et al. 1997).

La estructura del  $scMUC$  se desconoce aunque se han propuesto diversos modelos (Gutiérrez-Aguilar & Uribe-Carvajal 2015). Entre las proteínas propuestas está el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) (Gutiérrez-Aguilar et al. 2007); el acarreador de adenin nucleótidos (ANT) (Roucou et al. 1997); y el acarreador de fosfato (PiC) (Gutiérrez-Aguilar et al. 2010).

## Shy1p

Shy1p es una proteína localizada en la membrana interna mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae*, codificada por el gen YGR112w del cromosoma VII. Su homólogo en humanos es el gen SURF-1 (de donde deriva el nombre SHY1: Surf Homologue of Yeast), que codifica a la proteína Surf. Su peso molecular es de 45 kDa y contiene en su estructura dos segmentos transmembranales que parecen pertenecer a dos dominios funcionalmente independientes (Mashkevich et al. 1997).

Participa en la regulación de la expresión de la subunidad Cox1 de la citocromo *c* oxidasa (Barrientos et al. 2002) y forma complejos con otros componentes mitocondriales (Mick et al. 2007; Nijtmans et al. 2001). Shy1p promueve la biogénesis del complejo IV a través de su asociación con diferentes reguladores de la traducción de Cox1 y otros factores de ensamblaje del complejo IV (Mick et al. 2007). Después de participar en el ensamblaje del complejo respiratorio, Shy1p permanece anclada en la membrana, sin embargo se desconoce alguna función adicional. Su ausencia disminuye hasta en un 80% la respiración mitocondrial y la levadura mutada pierde la capacidad de crecer en sustratos respiratorios (Barrientos et al. 2002).

Los defectos en el proceso de ensamblaje del complejo IV en humanos (los más frecuentes relacionados con mutaciones en SURF-1) conducen a desórdenes severos, como el Síndrome de Leigh (Bestwick et al. 2010). La mutante  $\Delta shy1$  de *S. cerevisiae* ha sido usada como modelo para comprender el proceso de ensamblaje de la citocromo *c* oxidasa en mutantes de la proteína SURF-1 relacionadas al síndrome de Leigh (Bestwick et al. 2010).

## JUSTIFICACIÓN

Shy1p es una proteína asociada al ensamblaje del complejo IV de la cadena respiratoria en mitocondrias. Después de participar en el ensamblaje del complejo IV permanece anclada en la membrana, ya que presenta dominios transmembranales (Mashkevich et al. 1997) y forma complejos con otras proteínas no relacionadas al complejo IV (Nijtmans et al. 2001) sin conocerse una función adicional.

En el laboratorio se hizo un análisis del genoma mitocondrial de tres levaduras con el fin de identificar posibles proteínas formadoras del *sc*MUC. Esta proteína se encuentra codificada en el genoma de *Saccharomyces cerevisiae* y *Debaromyces hansenii*, dos levaduras que presentan canal mitocondrial inespecífico y no se encuentra en el genoma de *Yarrowia lipolytica*, levadura que no presenta canal mitocondrial inespecífico. Estos datos en conjunto hacen posible proponer que Shy1p sea parte de la estructura del *sc*MUC. A pesar de que el canal mitocondrial de *S. cerevisiae* ha sido intensamente estudiado su estructura no ha sido elucidada. Se han propuesto diversas proteínas que podrían formar el canal, sin embargo, no se tiene un modelo definitivo. Se propone que Shy1p pueda formar parte del canal.

## HIPÓTESIS

Si la proteína Shy1p de *S. cerevisiae* forma parte de la estructura del canal mitocondrial inespecífico (MUC), una cepa carente de dicha proteína no responderá a reguladores de apertura y cierre de este canal.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Determinar la participación de la proteína Shy1p en la respuesta a moduladores del MUC de *Saccharomyces cerevisiae*.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el coeficiente respiratorio en las cepas WT y  $\Delta shy1$  a diferentes concentraciones de fosfato (Pi).
- Medir el potencial transmembranal en ambas cepas a diferentes concentraciones de Pi.
- Medir el hinchamiento de las mitocondrias a diferentes concentraciones de Pi.
- Cuantificar los citocromos de las cepas WT y  $\Delta shy1$  por espectroscopía.
- Medir la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en condición de poro abierto y poro cerrado.
- Evaluar la sensibilidad a peróxido de la cepa WT y  $\Delta shy1$ .



# METODOLOGÍA

## Material biológico

Cepa WT→ NB40-36A: *MAT $\alpha$* ; *lys2*; *arg8::hisG*; *ura3-52*; *leu2-3,112*; [*rho+*]; *D273-10B* (Perez-Martinez et al. 2003).

Cepa  $\Delta$ *shy1*→ XPM60: *MAT $\alpha$* ; *lys2*; *arg8::hisG*; *ura3-52*; *leu2-3,112*; [*rho+*]; *D273-10B*; *shy1-delta::URA3*.

Ambas cepas fueron donadas por la doctora Xóchitl Pérez Martínez, IFC, UNAM.

Para comprobar que la cepa  $\Delta$ *shy1* tuviera el gen eliminado se realizó una PCR con oligonucleótidos específicos para la amplificación del gen *Shy1* y se tomó como control la amplificación del gen en la cepa silvestre (Datos no mostrados).

## Curvas de crecimiento

La velocidad de crecimiento de ambas cepas se midió en un lector de placas automatizado Bioscreen. A partir de los precultivos se tomaron 30  $\mu$ l y se inocularon en pozos con 270  $\mu$ l de medio YPGal en placas de 100 pozos. Como blanco se utilizaron pozos con 300  $\mu$ l de medio YPGal. Las lecturas se hicieron cada hora, durante 48 horas, a 30°C, con agitación constante. Se utilizó un filtro de 600 nm.

## Cultivo de levaduras

Ambas cepas se estriaron en medio sólido YPD (extracto de levadura 1%, peptona de gelatina 2%, dextrosa 2%, agar 2%) y después de 24 horas a 30°C se guardaron a 4°C para su uso posterior. Los precultivos se realizaron tomando una colonia de la cepa deseada e inoculándola en 125 ml de medio YPGal (extracto de levadura 1%, peptona de gelatina 2%, galactosa 2%). Se incubaron a 30°C por 24

horas con agitación constante. El volumen total del precultivo se inoculaba en 850 ml de medio YPGal y se dejaba crecer a 30°C por 24 horas con agitación constante.

### **Aislamiento de mitocondrias**

Se cosecharon los cultivos de 24 horas en agitación centrifugando a 5000 rpm por 5 min en una centrifuga Beckman con el rotor JA-14. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón en agua bidestilada. Se juntaron las levaduras obtenidas en 2 frascos de 250 ml y se centrifugaron a 4000 rpm por 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón en amortiguador de extracción (Manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH 6.8 ajustado con TEA) con albúmina al 1%.

Se rompieron las células empleando un homogeneizador (Bead-Beater Biospec Products, USA) con perlas de vidrio (0.45 mm) previamente lavado con el amortiguador de extracción y luego con el amortiguador de extracción con albúmina al 1%. Las levaduras se colocaron en la cámara con perlas y se colocó una camisa de hielo para mantenerla fría. Se aplicaron tres pulsos de 20 segundos con 40 segundos de reposo entre cada pulso para homogeneizar (Uribe et al. 1985). Se vertió el homogenizado en tubos de 50 ml. Las mitocondrias se aislaron por centrifugación diferencial (Peña et al. 1977): Se centrifugaron los tubos a 3000 rpm por 5 min. Se recuperaron los sobrenadantes en tubos limpios. Se centrifugaron los sobrenadantes a 9500 rpm por 10 min. Se desecharon los sobrenadantes y con ayuda de una toalla de papel se eliminaron los residuos de grasa adheridos a la pared del tubo. Se resuspendieron los botones rojos con un pincel y un poco de amortiguador de extracción. Se concentraron todos los volúmenes en un solo tubo y se agregó amortiguador de extracción para completar 40 ml (aprox.). Se centrifugaron a 5500 rpm por 5 min. Se recuperó el sobrenadante en un tubo limpio. Se centrifugó a 12 000 rpm por 15 min. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón que contiene las mitocondrias con unas gotas de amortiguador de extracción. Todo el proceso se lleva a cabo en frío. Las centrifugaciones se realizaron en una centrífuga Beckman con el rotor JA25.5.

## **Cuantificación de proteína**

La concentración de proteína se determinó utilizando el método de Biuret en un espectrofotómetro Beckman DU-50 a una longitud de onda de 540 nm (Gornall et al. 1949). La interacción del ión  $\text{Cu}^{2+}$  del reactivo de Biuret con los enlaces peptídicos genera una coloración violeta proporcional a la concentración de proteína de la muestra que se traduce en un cambio en la absorbancia. A 2 ml de reactivo Biuret se le añadieron 125  $\mu\text{l}$  de desoxicolato de sodio (DOC) al 1%, 350  $\mu\text{l}$  de agua destilada y 25  $\mu\text{l}$  de la suspensión de mitocondrias; se dejó incubando durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se utilizó un blanco sin mitocondrias para calibrar el equipo.

## **Oximetría**

Se utilizó un oxímetro Strathkelvin modelo 782 (Warner/Strathkelvin Instruments) con un electrodo tipo Clark inmerso en una cámara de 1 ml con agitación y temperatura constante de 30°C controlada por un baño HAAKE-FE-2 (Thermo Electron, Karlsruhe). Las reacciones se llevaron a cabo en medio de respiración (Manitol 0.6 M, MES 5 mM, KCL 20 mM, pH 6.8 ajustado con TEA). Se obtuvo una basal con el medio de respiración y se adicionaron las mitocondrias a una concentración de 0.5 mg/ml. Se hicieron mediciones con diferentes concentraciones de fosfato (4 mM, 2 mM, 1 mM, 0.4 mM, 0.2 mM, 0 mM). Para evaluar el estado 4, se adicionó etanol 4  $\mu\text{l}/\text{ml}$  como sustrato respiratorio y para inducir el estado 3 se añadió ADP 400  $\mu\text{M}$ .

## **Determinación del potencial transmembranal ( $\Delta\Psi$ )**

Para determinar el potencial transmembranal se utilizó naranja de safranina (Akerman & Wikstrom 1976), que es un colorante catiónico que es atraído hacia la

matriz mitocondrial negativa; cuando se abre el ScMUC se abate el  $\Delta\Psi$ , la atracción del colorante hacia la mitocondria disminuye o se pierde. Estos cambios se pueden medir espectrofotométricamente. En el laboratorio se utilizó un espectrofotómetro de doble haz (SLM AMINCO DW2000) en modo dual, utilizando las longitudes de onda de 511 y 533 nm en el monocromador 1 y 2 respectivamente. La absorbancia a 511 nm aumenta cuando hay un incremento en el  $\Delta\Psi$ . Se utilizaron celdas de vidrio de 1 cm de paso de luz, con 2 ml de la mezcla de reacción: Manitol 0.6 M, MES 5mM, pH 6.8 (ajustado con TEA); KCL 20 mM; etanol 4  $\mu$ l/ml y; safranina 10  $\mu$ M. Se hicieron experimentos con diferentes concentraciones de fosfato (4 mM, 2 mM, 1 mM, 0.4 mM, 0.1 mM, 0 mM). A los 20 segundos se adicionaron las mitocondrias a una concentración final de 0.5 mg/ml y a los 90 segundos se adicionó 1  $\mu$ l de CCCP como desacoplante, para promover un colapso en el potencial transmembranal. Los experimentos se realizaron durante 150 segundos a temperatura ambiente y con agitación constante.

### **Hinchamiento mitocondrial**

Las variaciones del volumen mitocondrial se determinaron por los cambios en la absorbancia de la muestra: al abrir el scMUC, aumenta el volumen mitocondrial y disminuye la absorbancia de la muestra. Esto se monitoreó utilizando un espectrofotómetro AMINCO DW2000 en modo Split a 540 nm. La mezcla de reacción fue Manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH 6.8 (ajustado con TEA); etanol 4  $\mu$ l/ml, KCl 20mM y diferentes concentraciones de fosfato (4 mM, 2 mM, 1 mM, 0.4 mM, 0.1 mM, 0 mM). Las mitocondrias se colocaron a una concentración final de 0.5 mg/ml en un volumen final de 2 ml. A los 30 segundos se adicionaron 20  $\mu$ l de KCl. Se registró durante 300 segundos el cambio en la absorbancia.

### **Espectros diferenciales**

El contenido de citocromos en mitocondrias aisladas se determinó mediante la obtención de espectros diferenciales. Se realizó un barrido de 500 nm a 680 nm en un espectrofotómetro AMINCO DW2000 (Olis Inc. Bogart, GA, EUA). Especificaciones del espectrofotómetro: modo Split; número de incrementos: 600; lecturas por dato: 15; Slits: 2 nm; cambio de lámpara a 300; ancho de banda: 8nm. Los espectros basales se obtuvieron de la siguiente manera: se colocaron 2.5 mg/ml de mitocondrias en amortiguador de extracción (Manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH 6.8 ajustado con TEA) y se agitaron en un vórtex durante un 1 minuto; se colocaron 2 celdas iguales, una como muestra (S) y otra como referencia (R). El espectro oxidado se obtuvo al adicionar 5  $\mu$ l de  $K_3[Fe(CN)_6]$  en la celda de referencia y agitar suavemente. El espectro reducido se obtuvo después de adicionar hidrosulfito de sodio (ditionita de sodio) con una espátula pequeña en la celda de muestra. Al espectro reducido se le resta el espectro oxidado para obtener el espectro diferencial (Nicholls & Ferguson 2013). El contenido de citocromos por mg de proteína se calculó utilizando los siguientes coeficientes de extinción molar: citocromos  $a+a_3$ ,  $\Delta\epsilon_{604-630nm} = 24mM^{-1} cm^{-1}$  (Steffens et al. 1987); citocromo  $b$ ,  $\Delta\epsilon_{563-577nm} = 28 mM^{-1} cm^{-1}$  (Berden & Slater 1970); citocromo  $c+c_1$   $\Delta\epsilon_{553-539nm} = 19.1 mM^{-1} cm^{-1}$  (Green & Tisdale 1959).

### **Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS)**

La velocidad de producción de ROS se determinó mediante el método de Amplex® Red peróxido de hidrógeno/peroxidasa (Zhou et al. 1997). El superóxido generado en las mitocondrias se dismuta a peróxido de hidrógeno por las superóxido dismutasas, tanto la endógena como la que se añade en el ensayo. El peróxido de hidrógeno difunde al exterior de las mitocondrias, en donde funciona como sustrato de la peroxidasa que a su vez oxida al Amplex Red generando resorufina ( $\epsilon_{571nm} = 54 mM^{-1} cm^{-1}$ ). Para los ensayos se utilizó un lector de placas POLARStar Omega, BMG LABTECH) con longitudes de onda de excitación y emisión de 540 y 600 nm, respectivamente (Dröse & Brandt 2008). La mezcla de reacción contenía: Amortiguador Manitol 0.6 M, MES 5 mM [pH 6.8], fosfato (Pi 4 mM o Pi 0.4 mM),

Amplex Red 10  $\mu\text{M}$ , peroxidasa de rábano 0.1 U/ml, superóxido dismutasa 100 U/ml. Como sustrato se utilizó etanol 4 $\mu\text{l}$ /ml. Las mitocondrias aisladas se agregaron a una concentración de 1.2 mg/ml.

Se colocó en cada pozo la concentración de fosfato requerida para abrir o cerrar el poro (Pi 4 mM o 0.4 mM, respectivamente), la mezcla de reacción y finalmente las mitocondrias. Como blanco se utilizaron pozos sin mitocondrias. Se introdujo la placa en el lector y se tomó la lectura durante 10 min.

La velocidad de producción de ROS se determinó por el cambio en la fluorescencia de la resorufina en función del tiempo. Este cambio es lineal en un intervalo de 0 a 10 minutos aproximadamente. Para cambiar de unidades de fluorescencia a nmol de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por unidad de tiempo se realizó una curva estándar de peróxido de hidrógeno de 0 a 1  $\mu\text{M}$ . Se obtuvo la diferencial del minuto 0 al minuto 5 para determinar la cantidad de ROS producida.

### **Ensayo de sensibilidad a peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )**

Se cultivaron las células en medio YPD a una D.O.(600 nm) de 0.6. Los cultivos se mantuvieron en agitación constante a 30°C. Los tiempos de cultivo variaron de acuerdo a la velocidad de crecimiento de cada cepa. Se tomó 1 ml de cada cultivo y se hicieron diluciones seriales (1:10, 1:100, 1:1000) en medio YPD. A un volumen final de 1ml de estas diluciones se le agregaron diferentes concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0, 10, 100 y 1000 mM) y se dejaron incubando una hora en agitación constante a 30°C. Al terminar el tiempo de incubación, se tomaron 5 $\mu\text{l}$  de cada una de las diluciones y se sembraron por goteo en YPD sólido. Se dejaron incubando a 30° por 48 h. Se registró el crecimiento a las 24 y 48 horas.

# RESULTADOS

## Curva de crecimiento

Para comparar la velocidad de crecimiento de ambas cepas en YPGal se midió el aumento de densidad óptica a 600 nm durante 48 horas. Las mediciones se realizaron automáticamente cada hora. En las curvas de crecimiento se observa que la cepa  $\Delta shy1$  tiene un crecimiento más lento que la cepa silvestre. Cuando la cepa silvestre se encuentra a la mitad de la etapa exponencial (11 horas) la cepa mutante apenas comienza la fase exponencial. Así mismo, cuando la cepa silvestre entra en la etapa estacionaria (18 horas), la cepa mutante apenas ha rebasado la mitad de la etapa exponencial. Finalmente, al alcanzar la fase estacionaria, ambas cepas alcanzan una densidad óptica similar, aunque  $\Delta shy1$  fue ligeramente menor (Figura 5).

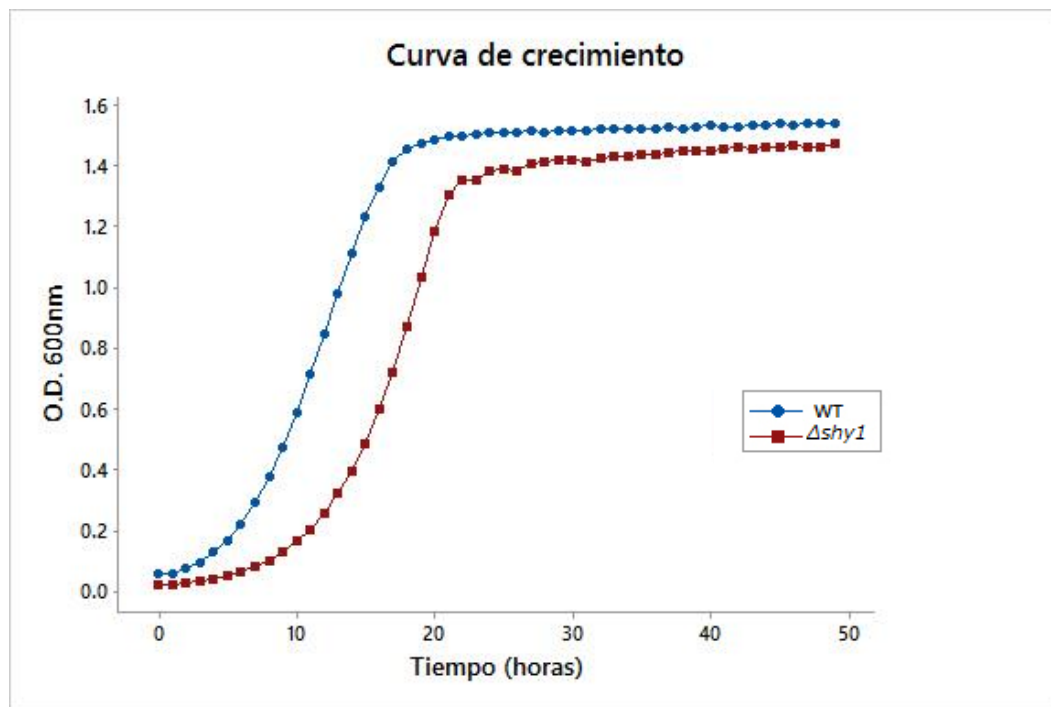


Figura 5. Curva de crecimiento de las cepas WT y  $\Delta shy1$  de *S. cerevisiae*. Se inocularon 30  $\mu$ l de precultivo en 270  $\mu$ l de medio YPGal. Se midió el aumento de densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm en un lector de placas automatizado Bioscreen. Se tomaron medidas cada hora durante 48 horas.

## Consumo de oxígeno

Para determinar la capacidad respiratoria de las mitocondrias de la cepa *Δshy1* con respecto a la cepa silvestre se midió la velocidad de consumo de oxígeno en el Estado IV (estado estacionario) y el Estado III (estado fosforilante). La concentración de fosfatos agregados al medio se varió de 4 mM a 0 mM para observar los efectos ocasionados por el cierre y la apertura del MUC.

El consumo de oxígeno está regulado principalmente por el potencial transmembranal. Cuando el potencial transmembranal es elevado, el consumo de oxígeno es lento. Éste es el estado de reposo de la cadena respiratoria (Estado IV). Cuando se abate el potencial transmembranal, la cadena respiratoria aumenta su actividad y se acelera el consumo de oxígeno. Un mecanismo de abatimiento del potencial transmembranal es la fuga controlada de H<sup>+</sup> hacia el interior de la matriz a través de la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP sintasa, hecho que ocurre durante la síntesis de ATP (Estado III) (Nicholls & Ferguson 2013).

En la Tabla 1 se presentan las tasas de consumo de oxígeno en el Estado III y el Estado IV de las mitocondrias aisladas de ambas cepas con diferentes concentraciones de fosfato. Se observa una tendencia al aumento en el consumo de oxígeno en ambas cepas durante el Estado IV conforme se disminuye la concentración de fosfato y el *sc*MUC se abre. Contrario a esto, en el Estado III se observa un aumento en el consumo de oxígeno conforme la concentración de fosfato aumenta y el *sc*MUC se cierra.

En la cepa *Δshy1*, el consumo de oxígeno durante cualquier condición (Estado III, IV, alto y bajo fosfato) disminuyó a aproximadamente un 70% del consumo de oxígeno en la cepa silvestre.

En ambas cepas, a una concentración alta de fosfatos, en dónde el *sc*MUC se encuentra cerrado, se observa que el estado IV es menor que el estado III. Al tener el *sc*MUC cerrado, la levadura es capaz de generar un potencial transmembranal por lo que al inducir el estado fosforilante con ADP, la cadena respiratoria se acelera consumiendo el oxígeno del medio y generando ATP. Conforme bajamos las



concentraciones de fosfato, el  $s_c$ MUC se abre y se invierten los valores: el estado IV pasa a ser mayor que el estado III. Al tener el  $s_c$ MUC abierto el consumo de oxígeno en estado estacionario aumenta sin embargo, la mitocondria no es capaz de sostener un potencial transmembranal, por lo que el inducir el estado fosforilante no acelera la cadena de transporte de electrones.

Tabla 1. Consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas de las cepas WT y  $\Delta shy1$  durante los Estados IV y III.

	<b>Tasa de consumo de oxígeno (natgO • (min•mg prot)<sup>-1</sup>)</b>			
	<b>Estado IV</b>		<b>Estado III</b>	
<b>[Pi]</b>	<b>WT</b>	<b><math>\Delta shy1</math></b>	<b>WT</b>	<b><math>\Delta shy1</math></b>
<b>4 mM</b>	161 ± 8	43 ± 11	332 ± 20	71 ± 14
<b>2 mM</b>	182 ± 22	44 ± 9	305 ± 54	63 ± 7
<b>1 mM</b>	184 ± 28	56 ± 14	262 ± 31	58 ± 12
<b>0.4 mM</b>	234 ± 44	60 ± 10	214 ± 48	60 ± 6
<b>0.1 mM</b>	225 ± 40	74 ± 22	173 ± 27	57 ± 12

El control respiratorio es un parámetro adimensional que permite comprobar la integridad de una preparación de mitocondrias. Indica que la mitocondria es capaz de sostener un potencial transmembranal adecuado y de reaccionar a la pérdida de ese potencial. Con los datos de la tabla 1 se determinó el control respiratorio de ambas cepas, dividiendo el consumo de O<sub>2</sub> del Estado III entre el consumo de oxígeno del Estado IV (Figura 6) (Nicholls & Ferguson 2013).

A altas concentraciones de fosfatos, el CR de la cepa  $\Delta shy1$  resultó menor al de la cepa silvestre. Conforme el  $s_c$ MUC se abre, el CR disminuye en ambas cepas como consecuencia del aumento de respiración en el Estado IV.

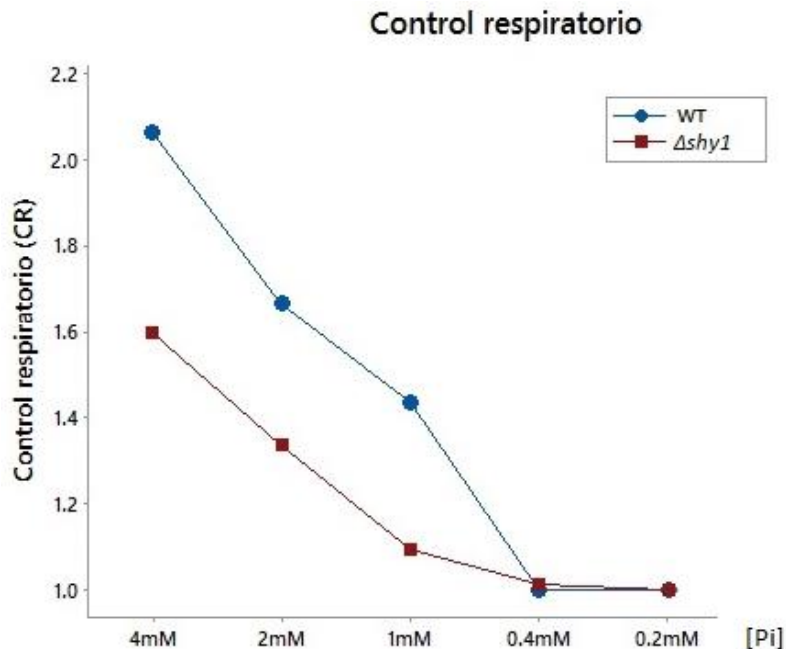


Figura 6. Efecto de la concentración de fosfato [Pi] en el control respiratorio (CR) de mitocondrias aisladas en las cepas WT y  $\Delta shy1$  de *S. cerevisiae*. Medio de reacción: Manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH 6.8 ajustado con TEA; KCl 20 mM; Pi [4-0 mM]. Concentración de mitocondrias: 0.5 mg/ml. Sustrato: etanol 4  $\mu$ l/ml. El estado III fue inducido al añadir ADP 400  $\mu$ M. (●)WT *S. cerevisiae*; (■) $\Delta shy1$  *S. cerevisiae*. Los datos usados para calcular el control respiratorio fueron tomados de la Tabla 1.

Cuando el CR tiene valores cercanos a dos se dice que existe un acoplamiento entre el consumo de oxígeno y la formación de un potencial transmembranal; un CR cercano a 1 indica que no se está estableciendo un potencial transmebranal, esto puede deberse a daños en la membrana interna durante el aislamiento o a que el MUC se encuentra abierto (Pérez-Vázquez et al. 2003). En la cepa silvestre se observa un CR de 2 cuando la concentración de fosfato es alta [Pi 4 mM], es decir, el canal está cerrado. En el caso de  $\Delta shy1$  con el  $sc$ MUC cerrado el CR es de 1.6, que puede ser debido a que no se puede establecer un potencial transmembranal adecuado debido al mal ensamblaje de la citocromo *c* oxidasa o a una deficiencia en la estructura del  $sc$ MUC. A una concentración de fosfato de 0.4 mM se observa que el valor de CR para

ambas cepas es de 1, consecuencia de un aumento de consumo de oxígeno en el estado IV probablemente relacionado con la apertura del canal (Figura 6).

## **Potencial transmembranal $\Delta\Psi$**

El potencial transmembranal es un indicador de la capacidad de la mitocondria para generar y mantener una diferencia de iones entre ambos lados de la membrana interna y un marcador de funcionalidad de la cadena respiratoria (Szabo et al. 1992). En nuestro trabajo se exploraron los efectos de diferentes concentraciones de fosfato en el potencial transmembranal mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ) de la cepa WT y de la cepa  $\Delta shy1$ .

Se observó que tanto en la cepa WT como en la cepa  $\Delta shy1$  el potencial transmembranal disminuye al abrirse el canal con bajas concentraciones de fosfato y aumenta al cerrar el canal con altas concentraciones de fosfatos. Sin embargo, el potencial transmembranal en la cepa  $\Delta shy1$  tarda más tiempo en generarse mientras que en la cepa WT el aumento del  $\Delta\Psi$  es inmediato (Figura 7).

En la cepa silvestre se observa que al disminuir la concentración de fosfato los valores de potencial transmembranal también disminuyen. No obstante, el potencial transmembranal es constante a través del tiempo. Este potencial es constante hasta que se le adiciona el desacoplante CCCP, el cual provoca su caída. A altas concentraciones de fosfato (4-1 mM), se observa fácilmente la caída de este potencial. A bajas concentraciones de fosfato (0.4-0.1 mM), el  $\Delta\Psi$  generado es muy bajo y no presenta una disminución significativa al adicionar CCCP. Al no adicionar fosfato no se genera potencial transmembranal por lo que al adicionar CCCP no existe cambio en el.

En la cepa  $\Delta shy1$  también se observa una disminución en los valores de  $\Delta\Psi$  conforme se disminuye la concentración de fosfato. Sin embargo, en todas las concentraciones el potencial transmembranal no es estable; incrementa gradualmente conforme pasa el tiempo, lo que nos indica que la  $\Delta shy1$  es capaz de establecer un potencial transmembranal a concentraciones de fosfatos altas ( $s_c$ MUC cerrado), pero es un proceso más lento que en la WT (Figura 7). A diferencia de la cepa silvestre, a

concentración de fosfato de 0.4 mM se observa un incremento gradual del potencial transmembranal; mientras que a 0.1 mM se comporta de manera similar que la silvestre. Por otro lado, al adicionar CCCP se observa una caída en el potencial transmembranal, pero no es tan rápida como en la silvestre.

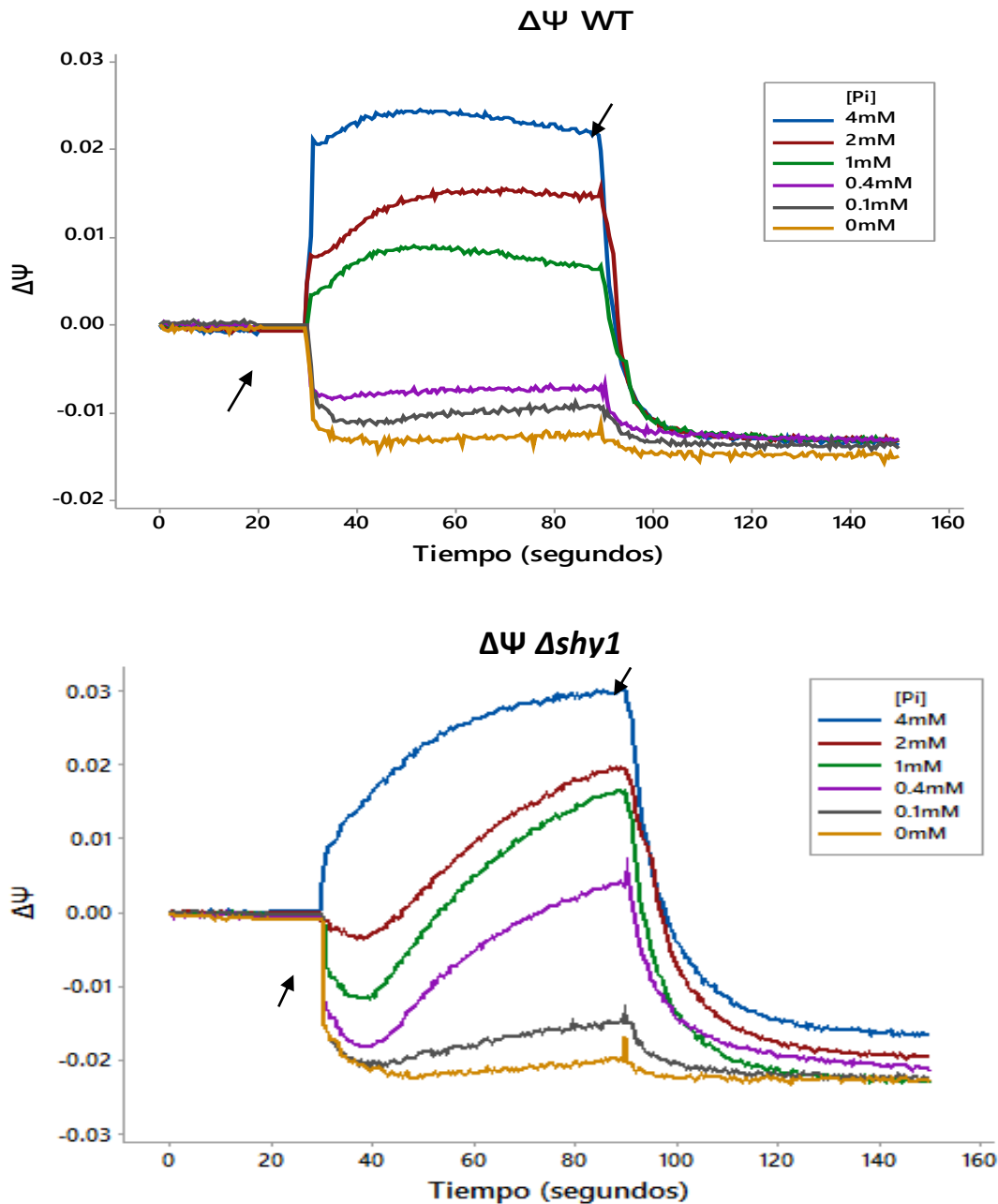


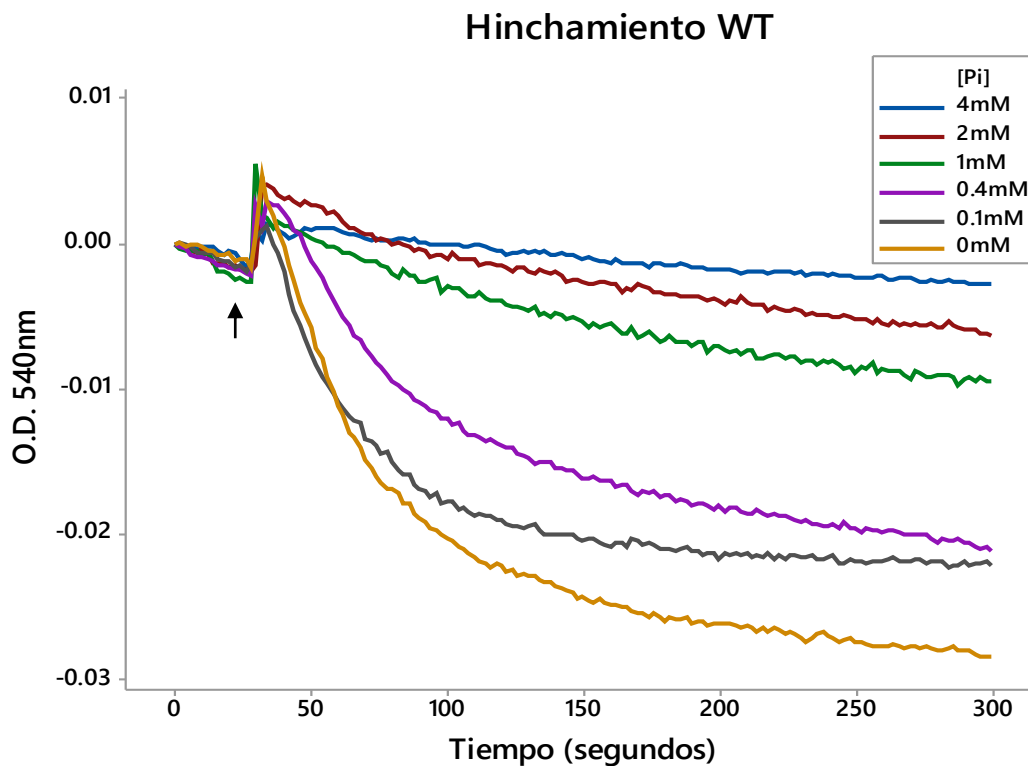
Figura 7. Efecto del fosfato (Pi) en el potencial transmembranal de mitocondrias aisladas de las cepas WT y  $\Delta shy1$  de *S. cerevisiae*. Condiciones experimentales: Manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH 6.8 ajustado con TEA; KCL 20 mM; Pi [4-0 mM], safranina 10  $\mu$ m. Sustrato: etanol 4  $\mu$ l/ml.

Las mitocondrias (0.5 mg/ml) fueron colocadas a los 20 segundos (↗). En el segundo 90 se adicionó 1  $\mu$ l de CCCP (↘).

## Hinchamiento mitocondrial

Para evaluar el efecto de la apertura del  $\text{scMUC}$  en la permeabilidad de la membrana medimos el hinchamiento de las mitocondrias en presencia de diferentes concentraciones de fosfato.

A altas concentraciones de fosfato el canal está cerrado y el hinchamiento se ve inhibido. Conforme la concentración de fosfato se disminuyó, el canal mitocondrial se abrió y el hinchamiento aumentó proporcionalmente. Esta tendencia se observó en ambas cepas, pero la tasa de hinchamiento de la cepa silvestre fue casi dos veces mayor a la de la  $\Delta\text{shy1}$  en concentraciones bajas de fosfato. En el caso de  $\Delta\text{shy1}$  no se observa diferencia en la concentración de 0 mM y 0.1 mM (Figura 8).



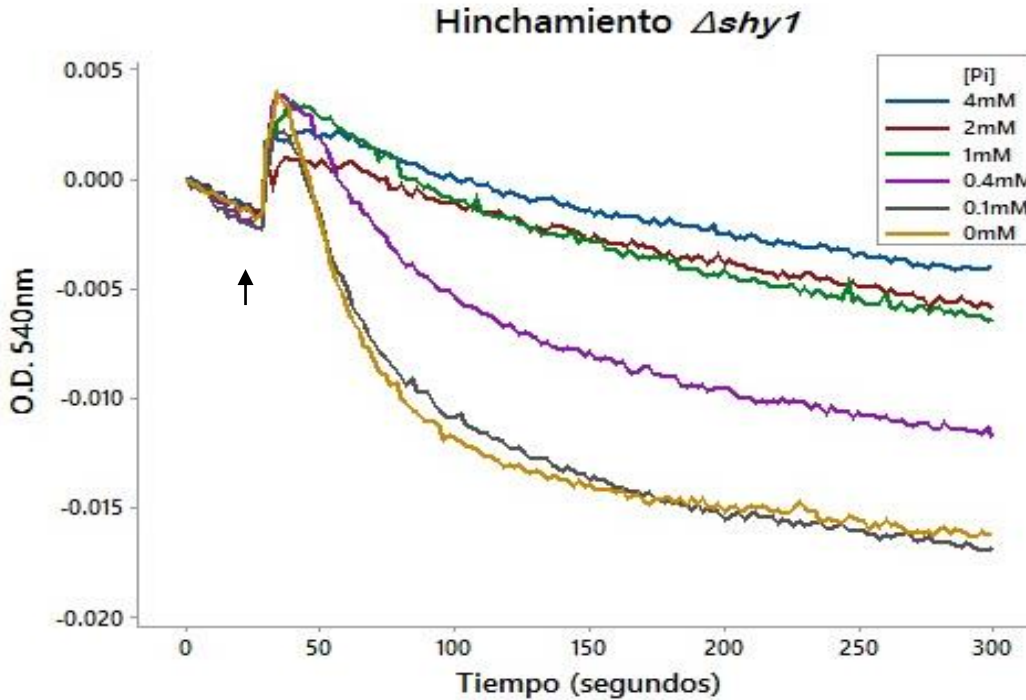


Figura 8. Efecto del fosfato [Pi] en el hinchamiento de mitocondrias aisladas de la cepa WT y de la cepa  $\Delta shy1$  de *S. cerevisiae*. Condiciones experimentales: Manitol 0.3 M, MES 5 mM, pH 6.8 ajustado con TEA; KCL 20 mM; Pi [4-0 mM]. Sustrato: etanol 4  $\mu$ l/ml. El KCL fue a\u00f1adido a la celda a los 30 segundos ( $\uparrow$ ).

## Espectros diferenciales

Los hemos  $a$  y  $a_3$  son los grupos prost\u00e9ticos de la citocromo  $c$  oxidasa (complejo IV). Para comprobar que la cepa  $\Delta shy1$  se ve afectada en la expresi\u00f3n del complejo IV se realiz\u00f3 un espectro diferencial de 500 nm a 650 nm de las mitocondrias de ambas cepas. Las bandas de absorci\u00f3n m\u00e1xima de los citocromo son: 550 nm para el citocromo  $c$  y  $c_1$ , 560 nm para el citocromo  $b$  y 603 nm para el  $a$  y  $a_3$ .

Los picos correspondientes a los diferentes citocromos son identificables en los espectros diferenciales obtenidos de ambas cepas (Figura 9). Se observa que en la cepa  $\Delta shy1$  el pico que corresponde al citocromo  $a+a_3$  se ve disminuido, lo que indica

una menor expresión de la citocromo *c* oxidasa. Los picos de los citocromos *b* y *c+c<sub>1</sub>* no presentan diferencias significativas con respecto a la cepa silvestre.

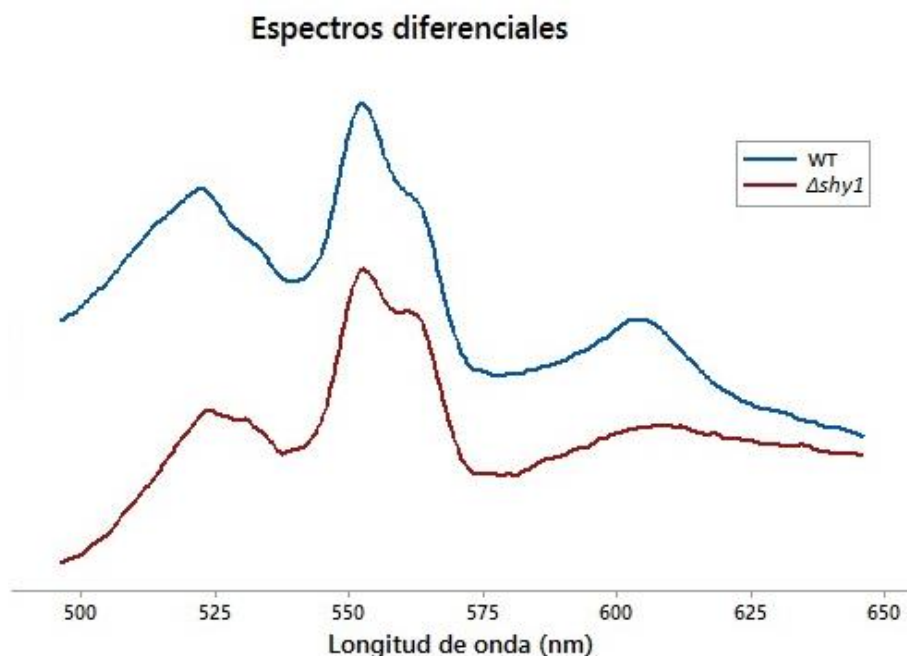


Figura 9. Espectro diferencial de los citocromos de las mitocondrias aisladas de las cepas WT y  $\Delta shy1$  de *S. cerevisiae*. El espectro se realizó con una concentración de mitocondrias de 2.5 mg/ml. Los espectros diferenciales se obtuvieron de la resta del espectro reducido con ditionita menos el espectro oxidado con ferricianuro de potasio. El barrido se realizó de 500 nm a 650 nm. Las bandas de absorción máxima de los citocromos son: citocromo *a*,  $a_3=603$  nm, citocromo *b* = 560 nm y, citocromo *c*+ *c<sub>1</sub>*= 550 nm.

En la tabla 2 se presentan las concentraciones de citocromos obtenidas a partir de los espectros diferenciales (Figura 9). Para calcular las concentraciones de citocromos en nmol/mg de proteína, se utilizaron los siguientes coeficientes de extinción molar: citocromos *a+a<sub>3</sub>*,  $\Delta\epsilon_{604-630\text{ nm}} = 24\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ; citocromo *b*,  $\Delta\epsilon_{563-577\text{ nm}} = 28\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ; citocromo *c+c<sub>1</sub>*  $\Delta\epsilon_{553-539\text{ nm}} = 19.1\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ . Se observa que la concentración de citocromo *a+a<sub>3</sub>* en la cepa  $\Delta shy1$  disminuye a casi un tercio de la concentración de citocromo presente en la cepa silvestre. Los citocromos *b* y *c+c<sub>1</sub>* mantienen una concentración similar en ambas cepas.

Tabla 2. Concentración de citocromos en mitocondrias aisladas de la cepa WT y  $\Delta shy1$ .

Cepa	Concentración de citocromos (nmol/mg de proteína)		
	Citocromo <i>c+ c1</i>	Citocromo <i>b</i>	Citocromo <i>a+ a3</i>
WT	0.179 ± 0.055	0.127 ± 0.045	0.083 ± 0.025
$\Delta shy1$	0.171 ± 0.043	0.101 ± 0.009	0.028 ± 0.013

### Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)

La producción de especies reactivas de oxígeno se ha relacionado con la presencia de un alto potencial transmembranal (Korshunov et al. 1997). Se ha propuesto que los mecanismos de desacoplamiento de la fosforilación oxidativa previenen la formación de ROS (Guerrero-Castillo et al. 2011). Estos mecanismos disipan el potencial transmembranal y aceleran la tasa de consumo de oxígeno. La apertura del megacanal mitocondrial es uno de estos mecanismos (Manon et al. 1998). Para observar si existe una diferencia en la producción de ROS en la cepa  $\Delta shy1$  con respecto a la WT en condiciones de poro cerrado (Pi 4mM) y poro abierto (Pi 0.4mM) se midió la producción de ROS en ambas cepas por el método de Amplex Red de fluorescencia de resorufina.

En la figura 10 se presenta la cantidad de peróxido de hidrógeno generado en un intervalo de 5 minutos, en condiciones de poro abierto y poro cerrado. Se observa que ambas cepas presentan una alta producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en condiciones de poro cerrado. Sin embargo, la cepa mutante presenta una mayor producción con respecto a la silvestre. En condiciones de poro abierto, la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido es significativamente menor con respecto a la condición de poro cerrado. En esta condición la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la cepa mutante es menor a la de la silvestre. Se



observa que hay una mayor diferencia en la producción de ROS entre la condición de poro cerrado y la de poro abierto en la cepa mutante.

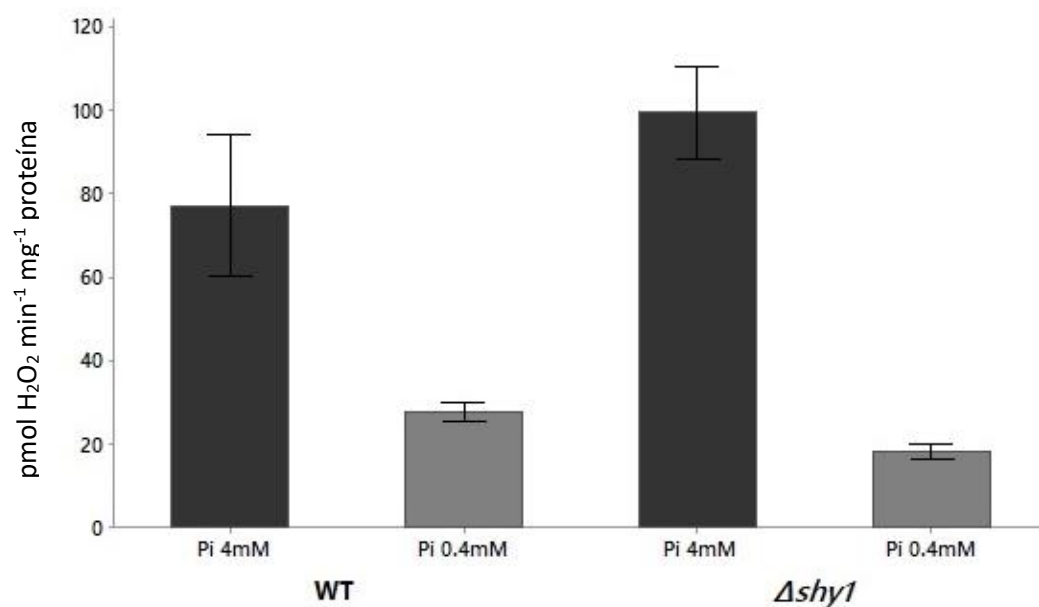


Figura 10. Producción de especies reactivas de oxígeno en mitocondrias. La producción de peróxido de hidrógeno fue medida en un lector de placas multimodal monitoreando la fluorescencia de la resorufina durante 5 minutos. El valor en unidades de fluorescencia se transformó a pmol de peróxido utilizando una curva estándar de 0 a 1000 nmol/ml. Condiciones experimentales: Manitol 0.6M, MES 5mM [pH 6.8], fosfato (Pi 4mM o Pi 0.4mM), Amplex Red 10 $\mu$ M, peroxidasa de rábano 0.1 unidades/ml, superóxido dismutasa 100 unidades/ml; etanol 4 $\mu$ l/ml. Las mitocondrias aisladas se agregaron a una concentración de 1.2mg/ml.

## Sensibilidad a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

En el experimento anterior observamos que la cepa *Δshy1* parece produce más ROS que la WT por lo que decidimos evaluar la sensibilidad al estrés oxidante de ambas cepas mediante un ensayo de sensibilidad a peróxido de hidrógeno. Esperábamos que la *Δshy1* tuviera una mayor resistencia a condiciones de estrés oxidante debido a una mayor exposición a ROS que la WT (Figura 10).

Para comparar el crecimiento de la cepa *Δshy1* y de la WT en condiciones de estrés oxidante, se realizaron ensayos de sensibilidad a peróxido de hidrógeno por goteo. Se realizaron 4 diluciones seriales de células en fase exponencial (D.O. <sub>600</sub> = 0.6) en medio YPD y se incubaron durante 1 hora con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno (0 M, 0.01 M, 0.1 M y 1 M). Se sembraron en YPD sólido y se observó la tasa de crecimiento a las 24 y 48 horas.

La cepa mutante parece ser más resistente a condiciones de estrés oxidante. A las 24 horas se observa que la cepa *Δshy1* ha crecido más que la WT, pero a las 48 horas la diferencia es más evidente. En concentraciones letales de peróxido de hidrógeno (1M), ninguna de las dos cepas crece (Figura 11).

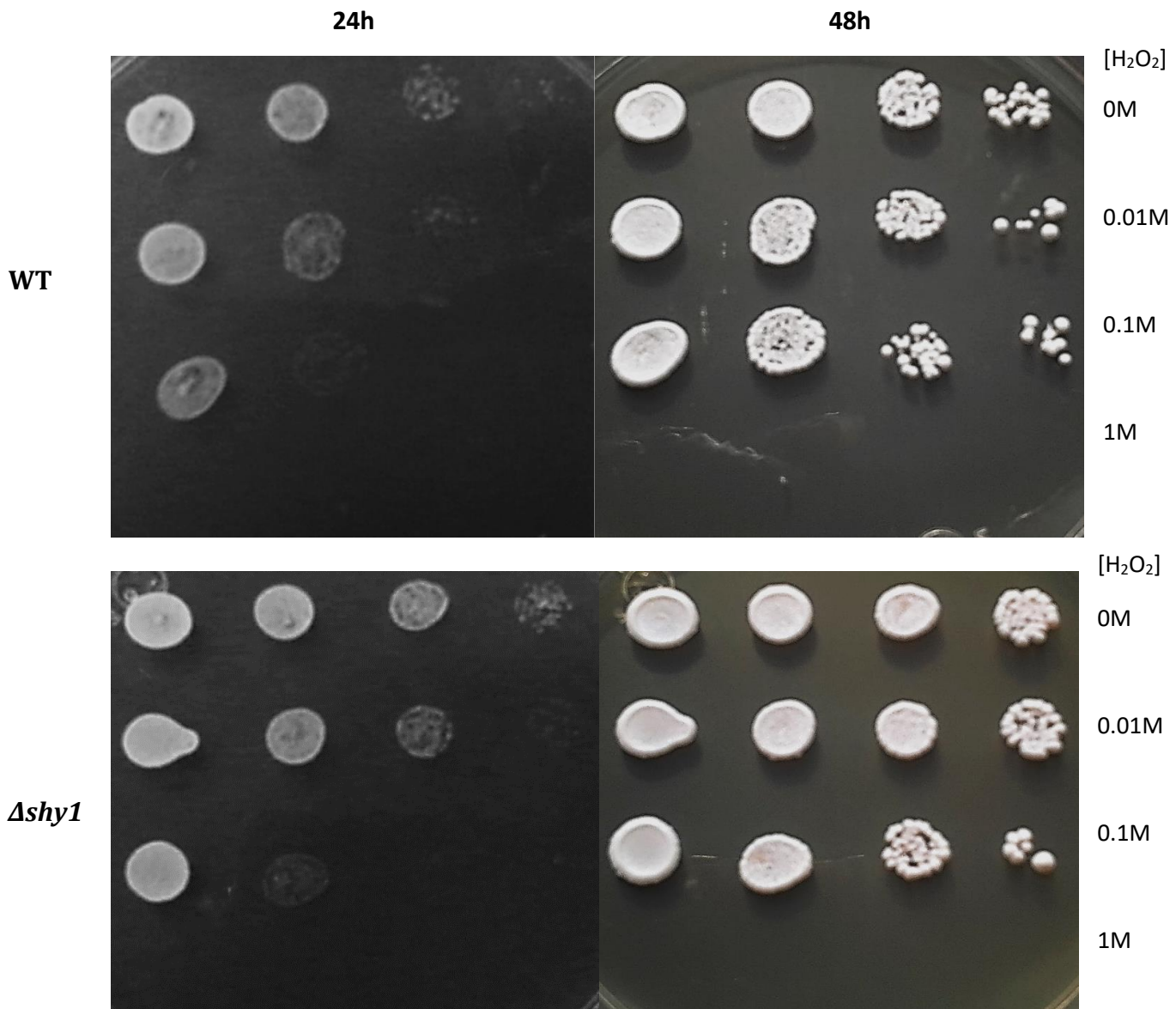


Figura 11. Efecto del peróxido de hidrógeno en el crecimiento de la cepa WT y *Δshy1*. Se realizaron diluciones seriales (de izquierda a derecha) de cultivos en fase exponencial, se incubaron durante 1 hora con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se sembraron por goteo para observar su crecimiento a las 24 y 48 horas.

## DISCUSIÓN

Estudios anteriores demuestran que el canal inespecífico mitocondrial se encuentra presente en *Saccharomyces cerevisiae* y *Debaromyces hansenii* pero no se encuentra en *Yarrowia lipolytica* (Manon et al. 1998; Cabrera-Orefice et al. 2010; Luévano-Martínez et al. 2010). Al restar el genoma mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae* y *Debaromyces hansenii* menos el de *Yarrowia lipolytica* nos indicó posibles proteínas estructurales del MUC. Una de estas fue Shy1p.

La citocromo *c* oxidasa o complejo IV de la cadena respiratoria cataliza la última reacción del transporte de electrones reduciendo O<sub>2</sub> a agua. En *S. cerevisiae* su estructura comprende 11 subunidades de las cuáles Cox1, Cox2 y Cox3 son codificadas por el genoma mitocondrial (Fontanesi, Soto, et al. 2008). Shy1p es una proteína involucrada en el ensamblaje de Cox1 (Fontanesi, Jin, et al. 2008). Sin embargo, se ha reportado que en una cepa  $\Delta shy1$ , COX puede ensamblarse y es funcional, por lo que se propone que simplemente mejora la eficiencia del ensamblaje (Nijtmans et al. 2001). Además de su participación en el ensamblaje del complejo IV no se conoce otra función de dicha proteína que queda anclada a la membrana (Mashkevich et al. 1997). La cepa  $\Delta shy1$  no crece en sustratos respiratorios pero presenta respiración mitocondrial (Mashkevich et al. 1997), lo que la hace destacar entre otras mutantes del complejo IV (Barros et al. 2003).

La estructura del MUC continúa siendo incierta (Gutiérrez-Aguilar & Uribe-Carvajal 2015), y al ser Shy1p una proteína de la MIM con una posible función adicional ausente en el genoma de *Yarrowia lipolytica* nos pareció una buena candidata estructural del MUC.

En estudios previos con la cepa  $\Delta shy1$  se han realizado ensayos de respiración comprobando que aún con un defecto en el ensamblaje del complejo IV puede respirar (Mashkevich et al. 1997; Barrientos et al. 2002). Se midieron las tasas respiratorias mitocondriales en ambas cepas para comprobar que la cepa  $\Delta shy1$  tiene una tasa respiratoria menor con respecto a la cepa silvestre. Los datos obtenidos indican que la

cepa *Δshy1* presenta una tasa respiratoria baja (Figura 6). El porcentaje de consumo de oxígeno a nivel mitocondrial con respecto a la silvestre es del 25% (Tabla 1). Esto es similar a lo reportado anteriormente para la respiración en células completas, donde se observó una respiración residual de 20% (Barrientos et al. 2002). Por otro lado, los espectros diferenciales de los citocromos mostraron que en efecto la cantidad de citocromo *a,a<sub>3</sub>* es mucho menor que la encontrada en la silvestre (Figura 9). La menor concentración de complejo IV, característica de la cepa *Δshy1*, coincide con lo reportado en la literatura (Mashkevich et al. 1997).

La tasa de consumo de oxígeno en Estado IV de ambas cepas se incrementó conforme la concentración de fosfato disminuía, indicando la apertura del MUC (Tabla 1)(Prieto et al. 1992). Sin embargo, la cepa *Δshy1* tiene una tasa respiratoria más baja, lo cual es debido probablemente a la deficiencia en el ensamblaje de dicho complejo y por tanto de su actividad (Barrientos et al. 2002).

En el Estado III, la tasa de consumo de oxígeno se redujo al disminuir la concentración de fosfato. Se sabe que con el canal cerrado al adicionar ADP se abate el potencial transmembranal y se acelera el consumo de oxígeno (Nicholls & Ferguson 2013). Por otro lado, el MUC se abre a bajas concentraciones de Pi o de ADP y por lo tanto el potencial transmembranal disminuye (Prieto et al. 1992). Al adicionar ADP a mitocondrias que presentan el MUC abierto la tasa de consumo de oxígeno disminuyó (tabla 1).

El potencial transmembranal disminuye conforme se reduce la concentración de fosfato (Prieto et al. 1992). La apertura del MUC abate el potencial transmembranal (Gutiérrez-Aguilar et al. 2010). Observamos que la cepa WT presenta un potencial transmembranal estable y sensible al desacoplante. Por otro lado, la cepa mutante muestra una inestabilidad en el potencial transmembranal, incrementa conforme pasa tiempo, y parece ser menos sensible al desacoplante (Figura 7).

Los ensayos de hinchamiento inducido por fosfato parecen indicar que el MUC en la cepa *Δshy1* está presente y activo (Prieto et al. 1995). Sin embargo, la tasa de hinchamiento de la cepa mutante en ausencia de fosfato es menor que la de la cepa

silvestre. A pesar de tener una respuesta similar a la WT, la sensibilidad de la  $\Delta shy1$  al fosfato difiere (figura 8), similar a lo que ocurre con otras mutantes de proteínas que han sido propuestas como formadoras del canal (Gutiérrez-Aguilar et al. 2007; Gutiérrez-Aguilar et al. 2010).

Los datos de respiración, potencial transmembranal e hinchamiento indican que el MUC se encuentra presente en las mitocondrias carentes de la proteína Shy1p, aunque la respuesta del canal difiere de la encontrada en la cepa silvestre. Es probable que Shy1p forme parte de la estructura del poro, ya que su eliminación modifica la respuesta del canal, pero no es esencial en él. Sin embargo, hay que considerar que si es parte de la estructura del canal podría interactuar con otras proteínas que han sido propuestas como parte de la estructura del poro como VDAC, PiC y ANT (Uribe-Carvajal et al. 2011), y de hecho, se ha reportado su interacción con la ANT (adenín nucleótido translocasa) (Mick et al. 2007). No obstante, al repetir la resta de genomas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaromyces hansenii* y *Yarrowia lipolytica* (datos no mostrados), se obtuvo un resultado diferente, indicando que *Yarrowia lipolytica* si tiene el análogo de Shy1. Por lo tanto es muy probable que los resultados que se observan no estén tan relacionados a una alteración del MUC, sino a fallas en la cadena respiratoria.

Un alto potencial transmembranal induce la producción de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria (Korshunov et al. 1997). La transición de la permeabilidad provocada por la apertura del MUC ha sido propuesta como mecanismo de prevención de acumulación de ROS (Guerrero-Castillo et al. 2011). En condiciones de poro cerrado observamos que la tasa de producción de ROS es alta en ambas cepas, contrario a lo que sucede con el poro abierto (Figura 10). Esto permite comprobar la importancia de la apertura del canal en la prevención de producción de ROS. La cepa  $\Delta shy1$  presenta una mayor diferencia en la cantidad de especies reactivas entre la condición de poro abierto a la de poro cerrado, lo cual se podría explicar por las alteraciones de la cadena respiratoria (Mashkevich et al. 1997; Barrientos et al. 2002).

Se ha reportado un incremento en la actividad de catalasa y de peroxidasa en esta mutante (Barros et al. 2003) lo que podría estar influyendo en la cantidad de ROS que observamos. Además, una alta cantidad de citocromo c (Mashkevich et al. 1997) ha sido asociada a la prevención de producción de ROS por la cadena respiratoria (Barros et al. 2003). Ambos mecanismos podrían explicar la similitud en cantidad de especies reactivas de oxígeno producidas por ambas cepas en concentración de fosfato alta y baja, mientras que la apertura del poro explica la diferencia entre una condición y otra.

Al analizar el efecto del estrés oxidante en el crecimiento de ambas cepas observamos que la cepa mutante es más resistente a peróxido de hidrógeno que la silvestre. Esto se podría explicar por el incremento en la expresión en las enzimas antioxidantes (Barros et al. 2003) más que por el funcionamiento del canal. *Δshy1* ha mostrado ser una cepa que aún con defectos en el complejo IV, es resistente a peróxido y tiene un crecimiento lento pero estable (Figura 5), comparable al de la silvestre en medios fermentables (Mick et al. 2007; Barrientos et al. 2002). Cabe mencionar que las cepas con defectos en el ensamblaje o estructura del complejo IV son cepas que no crecen en medios respiratorios y que no presentan respiración mitocondrial, sin embargo, la cepa nula de *SHY1*, a pesar de no crecer en medios respiratorios, presenta respiración mitocondrial (Barros et al. 2003). Además, la sobreexpresión del citocromo c (Mashkevich et al. 1997) puede estar funcionando también como mecanismo contra la producción de ROS.

## CONCLUSIONES

- La disminución en la expresión del complejo IV resulta en disminución de la tasa respiratoria de la cepa *Δshy1*.
- La apertura del canal, mediada por fosfato, aumenta el consumo de oxígeno y disminuye la producción de especies reactivas de oxígeno.
- La cepa *Δshy1* parece ser más resistente al estrés oxidativo.
- La medición del potencial transmembranal indica la apertura del *scMUC* en ambas cepas, aunque no responde de igual manera. Por otro lado, el hinchamiento de las mitocondrias indica que la reactividad del *scMUC* en la cepa *Δshy1* es menor.
- Los efectos observados en la cepa *Δshy1* relacionados al funcionamiento del *scMUC* parecen indicar que el *scMUC* es funcional y por lo tanto es poco probable que Shy1p forme parte de la estructura del canal.



## REFERENCIAS

- Akerman, K.O. & Wikstrom, M.K.F., 1976. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Letters*, 68(2), pp.191-197.
- Alberts, B. et al., 2008. *Molecular Biology of the Cell*, Available at: <http://discovery.ucl.ac.uk/109973/>.
- Anraku, Y. et al., 1989. Structure and function of the yeast vacuolar membrane proton ATPase. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 21(5), pp.589-603.
- Azzolin, L. et al., 2011. The mitochondrial permeability transition from yeast to mammals. *FEBS Lett.*, 584(12), pp.2504-2509.
- Baradaran, R. et al., 2013. Europe PMC Funders Group Crystal structure of the entire respiratory complex I. , 494(7438), pp.443-448.
- Barrientos, A., Korr, D. & Tzagoloff, A., 2002. Shy1p is necessary for full expression of mitochondrial COX1 in the yeast model of Leigh's syndrome. *EMBO Journal*, 21(1-2), pp.43-52.
- Barros, M.H., Netto, L.E.S. & Kowaltowski, A.J., 2003. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in *Saccharomyces cerevisiae* respiratory pet mutants: Effect of cytochrome c. *Free Radical Biology and Medicine*, 35(2), pp.179-188.
- Berden, J. a & Slater, E.C., 1970. The reaction of antimycin with a cytochrome b preparation active in reconstitution of the respiratory chain. *Biochimica et biophysica acta*, 216(2), pp.237-249.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L. & Stryer, L., 2006. Biochemistry. 5th edition. In *Biochemistry textbook*. p. 1120.
- Bernardi, P., 1999. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiological reviews*, 79(4), pp.1127-1155.
- Bernardi, P., 2013. The mitochondrial permeability transition pore : a mystery solved ? , 4(May), pp.1-12.
- Bestwick, M. et al., 2010. Analysis of Leigh syndrome mutations in the yeast SURF1 homolog reveals a new member of the cytochrome oxidase assembly factor family. *Molecular and cellular biology*, 30(18), pp.4480-4491.
- Brandt, U., 2006. Energy Converting NADH : Quinone Oxidoreductase ( Complex I ). , (Complex I).
- Cabrera-Orefice, A. et al., 2010. Mitochondria from the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* (halophilic organelles?). *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 42(1), pp.11-19.

- Chen, Q. et al., 2003. Production of reactive oxygen species by mitochondria: Central role of complex III. *Journal of Biological Chemistry*, 278(38), pp.36027–36031.
- Covian, R. & Trumpower, B.L., 2005. Rapid electron transfer between monomers when the cytochrome bc<sub>1</sub> complex dimer is reduced through center N. *Journal of Biological Chemistry*, 280(24), pp.22732–22740.
- Crompton, M., Virji, S. & Ward, J.M., 1998. Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *European journal of biochemistry / FEBS*, 258(2), pp.729–735.
- Dröse, S. & Brandt, U., 2008. The mechanism of mitochondrial superoxide production by the cytochrome bc<sub>1</sub> Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 283(31), pp.21649–21654.
- Farrugia, G. & Balzan, R., 2012. Oxidative stress and programmed cell death in yeast. , 2(June), pp.1–21.
- Fontanesi, F., Jin, C., et al., 2008. Transcriptional activators HAP/NF-Y rescue a cytochrome c oxidase defect in yeast and human cells. *Human Molecular Genetics*, 17(6), pp.775–788.
- Fontanesi, F., Soto, I.C. & Barrientos, A., 2008. Cytochrome c oxidase biogenesis: New levels of regulation. *IUBMB Life*, 60(9), pp.557–568.
- Giorgio, V. et al., 2013. Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(15), pp.5887–92. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3625323&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Goncalves, R.L.S. et al., 2014. Sources of superoxide/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during mitochondrial proline oxidation. *Redox biology*, 2, pp.901–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4143814&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 16, 2014].
- Gornall, A.G., Bardawill, C.J. & David, M.M., 1949. DETERMINATION OF SERUM PROTEINS BY MEANS OF THE BIURET REACTION. *The Journal of Biological Chemistry*, 177, pp.751–766.
- Green, D.E. & Tisdale, H.D., 1959. Studies on the electron transport system XIV. The isolation and properties of soluble cytochrome c<sub>1</sub>. *Biochimica et biophysica acta*, 31, pp.34–46.
- Guerrero-Castillo, S. et al., 2011. Physiological uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation. Studies in different yeast species. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 43(3), pp.323–331.
- Gutiérrez-Aguilar, M. et al., 2010. In *Saccharomyces cerevisiae*, the phosphate carrier is a component of the mitochondrial unselective channel. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 494(2), pp.184–191. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2009.12.002>.

- Gutiérrez-Aguilar, M. et al., 2007. In yeast, Ca<sup>2+</sup> and octylguanidine interact with porin (VDAC) preventing the mitochondrial permeability transition. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1767(10), pp.1245–1251.
- Gutiérrez-Aguilar, M. & Uribe-Carvajal, S., 2015. The mitochondrial unselective channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mitochondrion*, 22, pp.85–90. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567724915000458>.
- Halestrap, A.P., 2009. What is the mitochondrial permeability transition pore? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 46(6), pp.821–831. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.02.021>.
- Halestrap, A.P., Woodfield, K.Y. & Connern, C.P., 1997. Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. *Journal of Biological Chemistry*, 272(6), pp.3346–3354.
- Haworth, R. a & Hunter, D.R., 1979. The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca<sup>2+</sup> trigger site. *Archives of biochemistry and biophysics*, 195(2), pp.460–467.
- He, L. & Lemasters, J.J., 2002. Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: A new paradigm of pore structure and function? *FEBS Letters*, 512(1-3), pp.1–7.
- Herrmann, J.M. & Funes, S., 2005. Biogenesis of cytochrome oxidase - Sophisticated assembly lines in the mitochondrial inner membrane. *Gene*, 354(1-2 SPEC. ISS.), pp.43–52.
- Itoh, H. et al., 2004. Mechanically driven ATP synthesis by F<sub>1</sub>-ATPase. *Nature*, 427, pp.465–468.
- Joseph-Horne, T., Hollomon, D.W. & Wood, P.M., 2001. Fungal respiration: A fusion of standard and alternative components. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1504(2-3), pp.179–195.
- Jung, D.W., Bradshaw, P.C. & Pfeiffer, D.R., 1997. Properties of a cyclosporin-insensitive permeability transition pore in yeast mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 272(34), pp.21104–21112.
- Kadenbach, B., 2003. Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1604(2), pp.77–94.
- Kerscher, S. et al., 2002. *Yarrowia lipolytica*, a yeast genetic system to study mitochondrial complex I. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1555(1-3), pp.83–91.
- Korshunov, S.S., Skulachev, V.P. & Starkov, A. a., 1997. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Letters*, 416(1), pp.15–18. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01159-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01159-9).

- Kowaltowski, A.J. & Vercesi, A.E., 1999. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(3-4), pp.463-471.
- Leung, a. W.C., Varanyuwatana, P. & Halestrap, A.P., 2008. The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition. *Journal of Biological Chemistry*, 283(39), pp.26312-26323.
- Lodish, H.F. et al., 2008. *Molecular Cell Biology*, Available at: <http://www.amazon.com/Molecular-Cell-Biology-Harvey-Lodish/dp/0716743663>.
- Luévano-Martínez, L. a. et al., 2010. Identification of the mitochondrial carrier that provides *Yarrowia lipolytica* with a fatty acid-induced and nucleotide-sensitive uncoupling protein-like activity. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1797(1), pp.81-88. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.09.003>.
- Luttik, M. a H. et al., 1998. The *Saccharomyces cerevisiae* NDE1 and NDE2 genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH. *Journal of Biological Chemistry*, 273(38), pp.24529-24534.
- Manon, S. et al., 1998. Minireview: Characterization of the yeast mitochondria unselective channel: A counterpart to the mammalian permeability transition pore? *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 30(5), pp.419-429.
- Mashkevich, G. et al., 1997. SHY1, the yeast homolog of the mammalian SURF-1 gene, encodes a mitochondrial protein required for respiration. *Journal of Biological Chemistry*, 272(22), pp.14356-14364.
- Mick, D.U. et al., 2007. Shy1 couples Cox1 translational regulation to cytochrome c oxidase assembly. *The EMBO journal*, 26(20), pp.4347-4358.
- Mitchell, P., 2011. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1807(12), pp.1507-1538. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.09.018>.
- Murphy, M.P., 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. , 13, pp.1-13.
- Nelson, D.L. & Cox, M.M., 2013. *Lehninger Principles of Biochemistry 6th ed.*,
- Nicholls, D.G. & Ferguson, S.J., 2013. *Bioenergetics*, Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123884251000075>.
- Nijtmans, L.G.J. et al., 2001. Shy1p occurs in a high molecular weight complex and is required for efficient assembly of cytochrome c oxidase yeast. *FEBS Lett.*, 498, pp.46-51.
- Overkamp, K.M. et al., 2000. In Vivo Analysis of the Mechanisms for Oxidation of Cytosolic NADH by *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondria In Vivo Analysis of the Mechanisms for Oxidation of Cytosolic NADH by *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondria. , 182(10), pp.2823-2830.
- Peña, A. et al., 1977. A novel method for the rapid preparation of coupled yeast mitochondria.

*FEBS Letters*, 80(1), pp.209–213.

- Perez-Martinez, X., Broadley, S. a. & Fox, T.D., 2003. Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p. *EMBO Journal*, 22(21), pp.5951–5961.
- Pérez-Vázquez, V., Saavedra-Molina, A. & Uribe, S., 2003. In *Saccharomyces cerevisiae*, Cations Control the Fate of the Energy Derived from Oxidative Metabolism Through the Opening and Closing of the Yeast Mitochondrial Unselective Channel. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 35(3), pp.231–241.
- Prieto, S. et al., 1992. Activation by ATP of a proton-conducting pathway in yeast mitochondria. *European journal of biochemistry / FEBS*, 208, pp.487–491.
- Prieto, S., Bouillaud, F. & Rial, E., 1995. The mechanism for the ATP-induced uncoupling of respiration in mitochondria of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Biochemical journal*, 307 ( Pt 3, pp.657–661.
- Rasola, A. & Bernardi, P., 2007. The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis*, 12(5), pp.815–833.
- Roucou, X., Manon, S. & Guérin, M., 1997. Conditions allowing different states of ATP- and GDP-induced permeability in mitochondria from different strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1324(1), pp.120–132.
- Steffens, G.C., Biewald, R. & Buse, G., 1987. Cytochrome c oxidase is a three-copper, two-heme-A protein. *European journal of biochemistry / FEBS*, 164(2), pp.295–300.
- Szabo, I., Bernardi, P. & Zoratti, M., 1992. Modulation of the Mitochondrial Megachannel by Divalent-Cations and Protons. *Journal of Biological Chemistry*, 267(5), pp.2940–2946. Available at: <Go to ISI>://A1992HD15400022.
- Tanveer, a et al., 1996. Involvement of cyclophilin D in the activation of a mitochondrial pore by Ca<sup>2+</sup> and oxidant stress. *European journal of biochemistry / FEBS*, 238(1), pp.166–172.
- Trumpower, B.L., 1990. Cytochrome bc<sub>1</sub> complexes of microorganisms. *Microbiological reviews*, 54(2), pp.101–129.
- Tsukihara, T. et al., 1996. The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science (New York, N.Y.)*, 272(5265), pp.1136–1144.
- Turrens, J.F., 1997. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Bioscience reports*, 17(1), pp.3–8.
- Uribe, S., Ramirez, J. & Pena, a., 1985. Effects of ??-pinene on yeast membrane functions. *Journal of Bacteriology*, 161(3), pp.1195–1200.
- Uribe-Carvajal, S. et al., 2011. Mitochondrial Unselective Channels throughout the eukaryotic domain. *Mitochondrion*, 11(3), pp.382–390.

- Veiga, A. et al., 2003. Energy conversion coupled to cyanide-resistant respiration in the yeasts *Pichia membranifaciens* and *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*, 3(2), pp.141–148.
- De Vries, S. et al., 1992. Primary structure and import pathway of the rotenone-insensitive NADH-ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *European journal of biochemistry / FEBS*, 203(3), pp.587–592.
- Wallace, P.G. et al., 1994. A Method for the Determination of the Cellular Phosphorylation Potential and Glycolytic Intermediates in Yeast. *Analytical biochemistry*, 222(2), pp.404–408. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269784715090#>.
- Xia, D. et al., 1997. Crystal structure of the cytochrome bc1 complex from bovine heart mitochondria. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5322), pp.60–66.
- Yamada, A. et al., 2009. Ca<sup>2+</sup>-induced permeability transition can be observed even in yeast mitochondria under optimized experimental conditions. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1787(12), pp.1486–1491. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.07.001>.
- Zhou, M. et al., 1997. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Analytical biochemistry*, 253(2), pp.162–168.