



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Efecto de los metales pesados en la
actividad de ATPasa del dímero y
monómero de la F_1F_0 -ATP sintasa de
*Ustilago maydis***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO

P R E S E N T A

Giovanni Garcia Cruz



CIUDAD DE MÉXICO

MARZO, 2020



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: ROGELIO RODRIGUEZ SOTRES**
VOCAL: **Profesor: SAMUEL CANIZALES QUINTEROS**
SECRETARIO: **Profesor: OSCAR FLORES HERRERA**
1er. SUPLENTE: **Profesor: FELIX MORALES FLORES**
2º SUPLENTE: **Profesor: MANUEL GUTIERREZ AGUILAR**

**ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL L- 4 bis, LABORATORIO DE
BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL DEL DEPARTAMENTO DE
BIOQUÍMICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.**

ASESOR DEL TEMA: **DR. OSCAR FLORES HERRERA**

SUPERVISOR TÉCNICO: **M. EN C. MARIA DE LAS MERCEDES
ESPARZA PERUSQUIA**

SUSTENTANTE: **GIOVANNI GARCIA CRUZ**

ESTE PROYECTO FUE FINANCIADO POR EL PROGRAMA DE APOYO A PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN TECNOLÓGICA (PAPIIT IN214914-OFH, IN222617-OFH, IN215518-FMM, IN222117-JPP), ASÍ COMO POR EL CONACYT CON EL PROYECTO 168025.



INDICE	
LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE TABLAS	V
LISTA DE ECUACIONES	VI
ABREVIATURAS	VII
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	4
CADENA DE TRANSPORTE ELECTRÓNICO	5
LA F_1F_0 – ATP SINTASA	9
F_1F_0 – ATP SINTASA COMO DÍMERO	13
EL DÍMERO DE LA F_1F_0 -ATP SINTASA EN LAS ALGAS	13
EL DÍMERO DE LA F_1F_0 -ATP SINTASA EN LOS MAMÍFEROS	15
EL DÍMERO DE LA F_1F_0 -ATP SINTASA EN LAS LEVADURAS	20
EL DÍMERO DE LA F_1F_0 -ATP SINTASA EN USTILAGO MAYDIS	21
LOS METALES PESADOS A NIVEL CELULAR	22
ANTECEDENTES	24
DEFINICIÓN DEL PROYECTO	25
OBJETIVO GENERAL	27
HIPÓTESIS	27
OBJETIVOS PARTICULARES	27
MATERIALES Y MÉTODOS	28
CULTIVO CELULAR Y AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS.	28
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA.	29
SOLUBILIZACIÓN Y AISLAMIENTO DEL MONÓMERO Y DÍMERO DE LA F_1F_0 -ATP SINTASA.	30
ELECTROFORESIS EN CONDICIONES NATIVAS (HRCN-PAGE).	30
ELECTROFORESIS EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (TRICINA SDS-PAGE).	31
ACTIVIDAD EN GEL PARA LOS OLIGÓMEROS DEL COMPLEJO V.	32
PURIFICACIÓN DEL DÍMERO Y DEL MONÓMERO DEL COMPLEJO V.	33
ENSAYO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE LA ACTIVIDAD DE LOS OLIGOMEROS DEL COMPLEJO V.	33
DILUCIÓN DE LOS METALES DURANTE LA INTERACCIÓN METAL-COMPLEJO V.	36
CULTIVO DE CÉLULAS DE USTILAGO MAYDIS EN PRESENCIA DE METALES PESADOS.	36
ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE SECUENCIAS.	37
RESULTADOS	39
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS OLIGOMEROS DEL COMPLEJO V	39
CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL COMPLEJO V.	41



ENSAYO ESPECTROFOTOMÉTRICO DEL EFECTO DE LOS METALES EN LA ACTIVIDAD DE ATPASA DE LAS ESPECIES OLIGOMÉRICAS DE LA F_1F_0 -ATP SINTASA.	51
ESTABILIDAD DE LA ACTIVIDAD DE HIDROLISIS DE ATP DEL V_1 Y DEL V_2 DE LA F_1F_0 -ATP SINTASA FRENTE A METALES PESADOS.	53
DEPENDENCIA DEL CRECIMIENTO DE CÉLULAS DE USTILAGO MAYDIS EN PRESENCIA DE METALES PESADOS.	57
EFFECTO DE LA DILUCIÓN DE LOS METALES PESADOS EN LA ACTIVIDAD RESIDUAL DE ATPASA DE LA F_1F_0 -ATP SINTASA.	61
DISCUSIÓN	64
ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE SECUENCIAS	72
CONCLUSIONES	74
PERSPECTIVAS	76
BIBLIOGRAFÍA	77

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. CADENA DE TRASPORTE DE ELECTRONES.	6
FIGURA 2. ESTRUCTURA DE LA F_1F_0-ATP SINTASA.	11
FIGURA 3. ESTRUCTURAS DE LA F_1F_0-ATP SINTASA DE <i>E. COLI</i>, <i>P. DENITRIFICANS</i> Y <i>S. CEREVISIAE</i>.	15
FIGURA 4. ESTRUCTURA GENERAL DEL SECTOR F_0 DEL DÍMERO DE F_1F_0-ATP SINTASA MITOCONDRIAL.	16
FIGURA 5. ESTRUCTURA DÍMÉRICA DE LA F_1F_0-ATP SINTASA.	19
FIGURA 6. SISTEMA REGENERADOR.	34
FIGURA 7. ACTIVIDAD DE COMPLEJO V EN GELES NATIVOS CLAROS.	39
FIGURA 8. CUANTIFICACIÓN DE COMPLEJO V MEDIANTE TRICINA SDS-PAGE.	41
FIGURA 9. EFECTO DE LOS METALES EN LA ACTIVIDAD DE ATPASA DEL V_1.	49
FIGURA 10. EFECTO DE LOS METALES EN LA ACTIVIDAD DE ATPASA DEL V_2.	50
FIGURA 11. ACTIVIDAD RESIDUAL DE ATPASA EN PRESENCIA DE ARSÉNICO.	54



FIGURA 12. ACTIVIDAD RESIDUAL DE ATPASA EN PRESENCIA DE CADMIO.	55
FIGURA 13. ACTIVIDAD RESIDUAL DE ATPASA EN PRESENCIA DE COBRE.	56
FIGURA 14. ACTIVIDAD RESIDUAL DE ATPASA EN PRESENCIA DE MERCURIO.	57
FIGURA 15. ACTIVIDAD RESIDUAL DE ATPASA EN PRESENCIA DE ZINC.	58
FIGURA 16. DEPENDENCIA EN EL CRECIMIENTO DE CÉLULAS DE <i>USTILAGO MAYDIS</i> CON LOS METALES PESADOS.	60
FIGURA 17. TRAZOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS REPRESENTATIVOS DE LA DILUCIÓN DEL METAL.	61
FIGURA 18. MODELO ESTRUCTURAL DE LA INTERFASE ENTRE LAS SUBUNIDADES A/C.	65
FIGURA 19. ESTRUCTURA DE LA SUBUNIDAD A.	70

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. SUBUNIDADES DE LA F₁F₀-ATP SINTASA.	7
TABLA 2. SUBUNIDADES DE LA F₁F₀-ATP SINTASA EN DIFERENTES ORGANISMOS.	12
TABLA 3. RESIDUOS DE AMINOÁCIDOS DE LAS SUBUNIDADES A Y C DE LA F₁F₀-ATP SINTASA EN DIFERENTES ORGANISMOS.	38
TABLA 4. ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LAS SUBUNIDADES DEL COMPLEJO V₁ Y V₂ DE MITOCONDRIA DE <i>USTILAGO MAYDIS</i>.	42
TABLA 5. CUANTIFICACIÓN DE LAS SUBUNIDADES α Y β PARA MONÓMERO CON BASE A LA REGRESIÓN LINEAL.	45
TABLA 6. CUANTIFICACIÓN DE COMPLEJO V₁ TOTAL POR MG DE PROTEÍNA.	46
TABLA 7. CUANTIFICACIÓN DE α Y β PARA DÍMERO CON BASE A LA REGRESIÓN LINEAL.	47
TABLA 8. CUANTIFICACIÓN DE COMPLEJO V₂ TOTAL POR MG DE PROTEÍNA.	47



TABLA 9. IC₅₀ DE CADA METAL PARA CADA ESPECIE OLIGOMÉRICA.	59
TABLA 10. ACTIVIDADES RESIDUALES DEL MONÓMERO EN LA ACTIVIDAD DE ATP SINTASA CUANDO EXISTE UNA DILUCIÓN.	62
TABLA 11. ACTIVIDADES RESIDUALES DEL DÍMERO EN LA ACTIVIDAD DE ATP SINTASA CUANDO EXISTE UNA DILUCIÓN.	63

LISTA DE ECUACIONES

ECUACIÓN 1. ECUACIÓN PARA EL CALCULO DE LA ACTIVIDAD DE HIDROLISIS DE ATP.	35
---	-----------



Abreviaturas

ADP	Adenosín 5'-difosfato.
ATP	Adenosín 5'-trifosfato.
b	Ordenada al origen de la recta.
BN-PAGE	Electroforesis nativa en geles azules.
Bis-Tris	2,2-Bis(hydroxymethyl)-2,2',2''-nitrilotriethanol, 2-Bis(2-hydroxyethyl)amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol, Bis(2-hydroxyethyl)amino tris(hydroxymethyl)methane.
BSA	Albúmina Sérica de Bovino.
CdCl ₂	Cloruro de cadmio (II).
CT	Cadena de transporte electrónico.
CuSO ₄	Sulfato de cobre (II).
CV	Complejo V o F ₁ F ₀ -ATP sintasa.
DDM	<i>n</i> -Dodecil β-D-maltosido.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
DOC	Ácido 3α, 12α-Dihidroxi-5β-colan-24-oico.
DTT	Ditiotritol.
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-hidroxietyl)-1-piperazina-etanosulfónico.
HgCl ₂	Cloruro de mercurio (II).
hrCN-PAGE	Electroforesis nativa en geles claros de alta resolución.
Hyg	Higromicina.
IC ₅₀	Concentración a la cual existe el 50% de inhibición de la actividad enzimática.
kDa	KiloDaltones.
KCl	Cloruro de Potasio.
K_m	Constante cinética de Michaelis-Menten.
LDH	Lactato deshidrogenasa.
M	Concentración molar.
MW	Masa molecular.
m	Pendiente de la línea recta.
MgSO ₄	Sulfato de Magnesio.
mM	Concentración milimolar.
mg	Miligramos.
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado.
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido.



NaAsO ₂	Arsenito de sodio.
nm	nanometro
OSCP	Del inglés "Oligomycin - Sensitivity Conferring Protein".
Pb (NO ₃) ₂	Nitrato de plomo.
PBS	Amortiguador de fosfato salino.
PEP	Fosfoenol piruvato.
Pi	Fosfato inorgánico.
PK	Piruvato cinasa.
pM	Concentración picomolar.
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
RNA	Ácido ribonucleico.
ROS	Especies reactivas de oxígeno.
SCS	Amortiguador para resuspender células de <i>Ustilago maydis</i> .
SDS	Dodecilsulfato sódico.
Tris	Tris(hidroximetil) aminometano.
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).
ZnSO ₄	Sulfato de zinc (II).
μM	Concentración micromolar.



$\Delta\mu_{H^+}$

Gradiente electroquímico de protones.



Resumen

La continua exposición a metales pesados, producto de la contaminación ambiental, es la causa de algunas enfermedades asociadas a la sobreproducción mitocondrial de especies reactivas de oxígeno (ROS), provocando una disminución de la síntesis de ATP. La F_1F_0 -ATP sintasa produce cerca del 90% del ATP celular, y su estado dimérico está relacionado al plegamiento de las crestas mitocondriales, lo que resulta en una mayor eficiencia bioenergética.

En este trabajo se determinó el efecto de los metales pesados en la actividad de ATPasa del monómero (V_1) y dímero (V_2) de la F_1F_0 -ATP sintasa y se discute su repercusión en la síntesis mitocondrial de ATP. El V_1 y V_2 de la F_1F_0 -ATP sintasa de *Ustilago maydis* (cepa FB2) fueron solubilizados con digitonina (2 g digitonina/1 g proteína) y se centrifugaron en un gradiente de sacarosa (0.5 – 1.5 M) como se describió por nuestro laboratorio (*Esparza-Perusquía et al.*, 2017). Se colectaron 50 fracciones y el perfil proteico se analizó por una electroforesis en condiciones nativas (hrCN-PAGE) en un gel en gradiente de poliacrilamida del 4 – 10%. Las fracciones con V_1 y V_2 fueron colectadas por separado y se determinó espectrofotométricamente su actividad de ATPasa, siguiendo la oxidación del NADH a 340 nm ($\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), utilizando las reacciones acopladas de la piruvato cinasa y la lactato deshidrogenasa.



La velocidad inicial se determinó a partir de la pendiente del trazo espectrofotométrico. El efecto del CuSO_4 , CdCl_2 , HgCl_2 , ZnSO_4 y NaAsO_2 sobre la actividad de ATPasa se determinó mediante una curva de dosis-respuesta (0.1 – 1500 μM). Nuestros resultados muestran un decaimiento significativo en la actividad de ATPasa del V_1 en presencia de As^{3+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} con una IC_{50} de 10, 76, 23 y 2 μM respectivamente y una ligera resistencia al Zn^{2+} .

El V_2 presenta una mayor resistencia en comparación del monómero siendo sensible únicamente al Cd^{2+} , Cu^{2+} y Hg^{2+} con una IC_{50} de 2.4 mM, 74 y 11 μM respectivamente, mientras que para As^{3+} y Zn^{2+} no se observa disminución en la actividad, aún a 1 mM.

Simultáneamente, experimentos de dilución del metal (1:10) mostraron la reactivación total de la enzima, lo que sugiere que la interacción del metal con la enzima, o su modificación, no es permanente. Los resultados sugieren que la interacción entre monómero-monómero en el dímero le confiere resistencia a la inhibición por metales, particularmente el Cd^{2+} . El sitio probable para la interacción de los metales en el complejo V es entre las subunidades a y c, que en el V_2 podría estar protegida, preservando así la actividad de la F_1F_0 -ATP sintasa. Así pues, la dimerización del complejo V promueve el plegamiento de las crestas mitocondriales y le confiere



resistencia a algunos metales pesados, permitiendo que la síntesis de ATP se preserve.



Introducción

La mitocondria es un orgánulo citoplasmático en el que se lleva a cabo el metabolismo oxidativo eucariótico. Es en la mitocondria en donde se encuentran las enzimas que median este proceso, incluyendo a la piruvato deshidrogenasa, las enzimas del ciclo de Krebs, las enzimas que catalizan la oxidación de los ácidos grasos y las enzimas y proteínas redox implicadas en la cadena de transporte electrónico y la fosforilación oxidativa. Por todo esto, se describe a la mitocondria como la central productora de energía en la célula.

Las mitocondrias están constituidas por dos membranas cuya composición proteica y lipídica varía significativamente: una membrana externa (MEM) lisa la cual es relativamente permeable a la mayoría de las moléculas y una membrana interna (MIM) que es impermeable a los iones y diversas moléculas orgánicas. La MIM incrementa su área de superficie creando invaginaciones que reciben el nombre de crestas mitocondriales, las cuales varían con la actividad respiratoria del tipo particular de célula. Las mitocondrias, de este modo, contienen tres compartimentos: el espacio intermembranal, el espacio de la matriz y el interior de las crestas. Las proteínas que median el transporte electrónico y la fosforilación oxidativa están incorporadas a la membrana mitocondrial interna, de modo que, al tener muchas invaginaciones, el área de superficie de la MIM será mayor y podrá aumentar la tasa de respiración.



Las enzimas que catalizan las reacciones de óxido-reducción y la respiración son componentes de la MIM. La mayoría de las vías productoras de energía, tales como la descarboxilación del piruvato, el ciclo de Krebs y la β -oxidación, se llevan a cabo en la matriz; sin embargo, cerca del 90% de la demanda energética de la célula es sustentada por la fosforilación oxidativa.

Cadena de transporte electrónico

La cadena de transporte electrónico (CTE) mitocondrial es un conjunto de transportadores de electrones situados en la membrana interna, en orden creciente de afinidad electrónica, ya que transfiere los electrones provenientes del potencial reductor de las coenzimas obtenidas en las vías metabólicas tales como la glucólisis y el ciclo de Krebs hacia el oxígeno; durante esa transferencia se realizan la conversión de energía en forma de un gradiente electroquímico de protones. La cadena de transporte electrónico consta de cuatro complejos, los cuales están situados en las crestas de la membrana interna mitocondrial y la enzima F_1F_0 -ATP sintasa (figura 1).

El complejo I (NADH:ubiquinona oxidoreductasa) es el componente proteico más grande de la membrana interna con un peso molecular de 980 kDa, conformado por 44 subunidades en mamífero, de las cuales 7 son codificadas por el genoma mitocondrial. Los análogos de este complejo en



bacterias contienen menos polipéptidos (14 subunidades) pero los cofactores y los grupos redox son similares. El complejo I cataliza la transferencia de dos electrones desde el NADH hasta la ubiquinona (UQ). Está compuesto por un grupo prostético flavinmononucleotido (FMN) y varios centros de hierro-azufre, los que funcionan como intermediarios en las reacciones de transferencia de electrones; adicionalmente al transporte de los electrones, se realiza el bombeo de $4H^+$ desde la matriz hasta el interior de la cresta. Se ha definido que el lado de la matriz donde existe una disminución de protones es el lado N (negativo) y el lado en donde la concentración es creciente, el lado P (positivo; Nicholls, 2013).

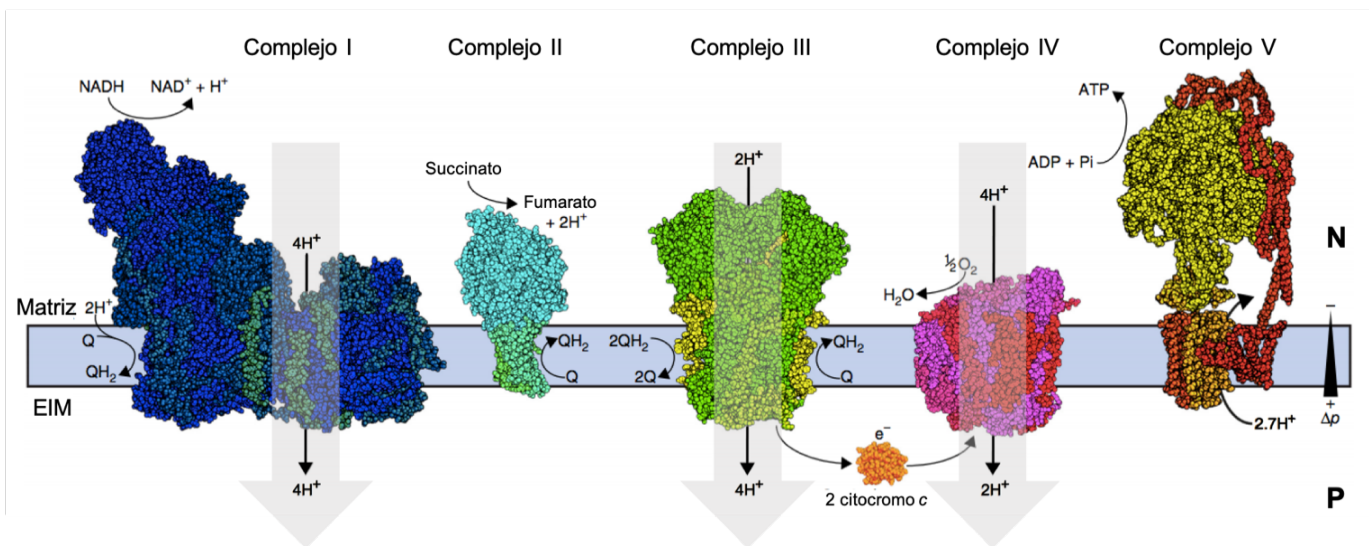


Figura 1. Cadena de transporte de electrones. Los electrones se transportan a través de los complejos respiratorios a la coenzima Q y el citocromo c hasta el complejo IV (CIV). El CIV reduce al oxígeno molecular para formar agua. Los protones se traslocan mediante los complejos respiratorios I, III y IV desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal impulsados por el transporte electrónico, lo que genera un gradiente de protones, el cual es aprovechado para la síntesis de ATP por la F_1F_0 -ATP sintasa. EIM: Espacio intermembranal, N: Lado negativo de la membrana, P: Lado positivo de la membrana, Δp : Fuerza protón matriz. Modificado de Letts y Sazano (2017).



Tabla 1. Subunidades de la F₁F₀-ATP sintasa. Se presentan todas las subunidades de la F₁F₀-ATP sintasa categorizándolas por función y con base a su sector perteneciente. (Senior *et al.*, 2004)

Sector	Función	Subunidad
F ₁	F ₁ -estator	α β
	F ₁ -rotor	γ δ ϵ
F ₀	F ₀ -rotor	ATP 9 (c)
	Estator-tallo periférico	OSCP ATP 4 (b) h (F6) d f
	Estator de membrana	ATP 6 (a) ATP 8 (A6L) i/j
	Subunidades de dimerización	e g k (s)
	Regulación	IF ₁

El complejo II (succinato:ubiquinona oxidorreductasa) tiene un funcionamiento dual en el metabolismo; pues participa en el ciclo del ácido cítrico y en la CT, uniendo así dos importantes vías metabólicas para la obtención de energía. La succinato deshidrogenasa es una proteína de 128 kDa que contiene 4 subunidades: SDHA (F_p), SDHAB (I_p), SDHC (Cyb_L) y SDHD (Cyb_S), (llamadas Sdh1-4 en levaduras y SdhA-D en bacterias) y, a



diferencia de otros complejos mitocondriales, estas subunidades no son codificadas por el genoma mitocondrial. El complejo II participa en la transferencia de electrones desde el succinato hasta la ubiquinona a través de su grupo prostético FAD, sin embargo, este complejo no trasloca protones al interior de las crestas. De esta manera el complejo I y II reducen a la ubiquinona formando ubiquinol que es sustrato del complejo III (Ubiquinol:citocromo c oxidoreductasa) que transfiere los electrones al citocromo c (cit. c; Nicholls, 2013).

El complejo III posee una masa de 248 kDa y está conformado por 11 subunidades, de las cuales tres tienen función respiratoria (citocromo b, citocromo c y una proteína Rieske), dos "core" y seis proteínas de bajo peso molecular. La subunidad citocromo b (la única codificada en el genoma mitocondrial) alberga dos grupos hemo tipo b (b_L y b_H); el citocromo c tiene un grupo hemo tipo c (c_1) y la proteína Rieske posee una agrupación de dos átomos de hierro y dos de azufre (2Fe/2S).

El CIII es un dímero obligado y realiza el ciclo Q; en este ciclo un e^- del QH_2 pasa al citocromo c por medio de la proteína Rieske; mientras que el otro e^- pasa a los citocromos b_L y b_H y reduce a una quinona en semiquinona, un nuevo ubiquinol es oxidado de manera similar transfiriendo un e^- a un nuevo citocromo c y otro e^- a la semiquinona, reduciéndola en ubiquinol. El complejo



III adicionalmente contribuye con el bombeo de 4H^+ al espacio intermembranal (Nicholls, 2013).

El complejo IV (citocromo c oxidasa) realiza la oxidación del citocromo c y cataliza la reducción del oxígeno molecular para formar una molécula de agua y adicionalmente trasloca 2H^+ de la matriz al interior de las cestas por cada 2e^- cedidos al oxígeno. Al bombear protones del lado N al lado P se genera un gradiente electroquímico que más adelante se utiliza junto al ADP y el P_i , para formar ATP. Estructuralmente el complejo IV tiene un peso de 200 kDa, esta conformado por 13 subunidades de las cuales 3 son codificadas en el genoma mitocondrial el complejo posee dos grupos hemo (Cyt_a y Cyt_{a3}), así como dos centros de cobre (Cu_A y Cu_B); el Cyt_{a3} y el Cu_B forman un centro binuclear en el que se lleva a cabo la reducción del oxígeno en agua, (Nicholls, 2013).

La F_1F_0 – ATP sintasa

La fosforilación oxidativa tiene lugar en la F_1F_0 -ATP sintasa, también llamada complejo V (CV), al acoplar su actividad con el gradiente electroquímico de protones. Es una enzima multimérica embebida en la membrana interna mitocondrial y es considerada un nanomotor que puede ser descrito estructuralmente por un sector hidrofílico F_1 y un sector hidrofóbico



F_0 (Senior *et al.*, 2004), mientras que funcionalmente es descrita por dos dominios, un rotor y un estator (figura 2A). Al considerar ambas clasificaciones se ha definido que el dominio catalítico hidrofílico F_1 -estator está compuesto por las subunidades solubles α , β ; mientras que el dominio F_1 -rotor contiene las subunidades γ , δ y ε (tabla 1).

El dominio F_1 -estator permanece unido al tallo central que a su vez se liga con el dominio hidrofóbico embebido en la membrana interna mitocondrial conocido como F_0 , formado por las subunidades a, b, c, d y e. Adicionalmente, existe una proteína cuyo papel es inhibir y/o regular la hidrólisis de ATP por parte de la F_1F_0 -ATP sintasa, la cual en *Saccharomyces cerevisiae* es Inh1 e IF_1 en mamíferos. Este complejo sintetiza ATP gracias a un mecanismo rotacional que acopla el flujo de protones a través del sector F_0 con la rotación en la subunidad c que a su vez provoca la torsión que fuerza el giro del tallo periférico (subunidades γ y ε); este giro repercute en el dominio F_1 -estator produciendo un cambio conformacional de las subunidades α y β provocando una diferente afinidad por los nucleótidos; la interfase de las subunidades α y β es el sitio activo para la unión de ADP + Pi (figura 2B). Se tiene un total de 3 sitios de unión y por cada rotación de 120° habrá la formación de una molécula de ATP. Se requieren 9 protones transferidos al lado N, por cada giro de 360° que genera 3 moléculas de ATP (Christoph *et al.*, 2009)



Así mismo, se ha descrito que la estructura (figura 3) de la F_1F_0 -ATP sintasa y algunas subunidades de gran importancia sean altamente conservadas en distintos organismos (tabla 2) permitiendo que el funcionamiento y mecanismo de síntesis de ATP sea idéntico para los diversos organismos.

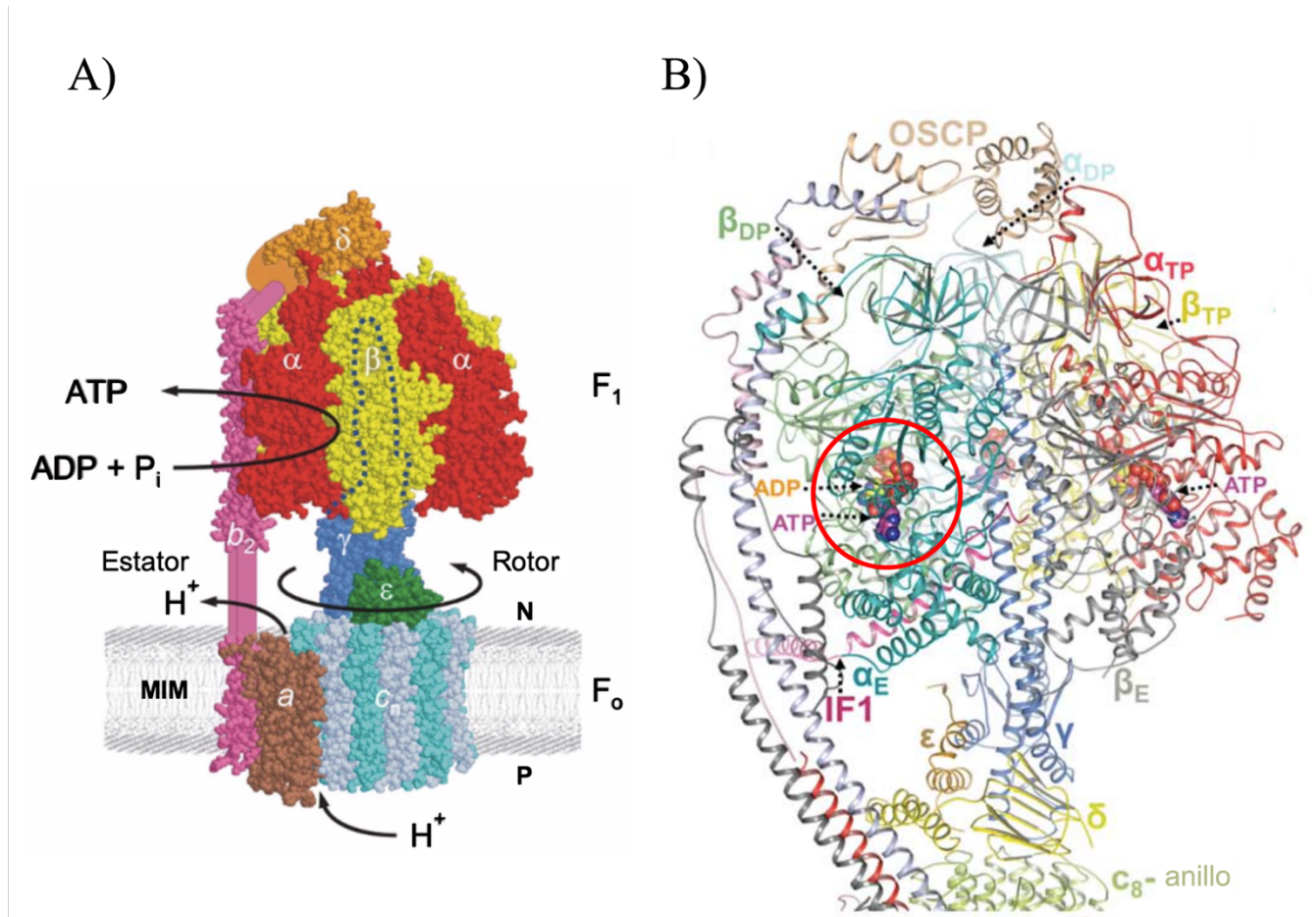


Figura 2. Estructura de la F_1F_0 -ATP sintasa. A) F_1F_0 -ATP sintasa de *E. coli*. F_0 : Sector hidrofóbico, F_1 : Sector hidrofílico, MIM: membrana interna mitocondrial, N: Lado negativo de la membrana y P: Lado positivo de la membrana (modificado de Senior *et al.*, 2004). B) Vista lateral del sector F_1 de la F_1F_0 -ATP sintasa, en rojo se circula la interfase α/β correspondiente al sitio de unión ADP + Pi (modificado de Jinke *et al.*, 2019).



Tabla 2. Subunidades de la F₁F_o-ATP sintasa en diferentes organismos. Las subunidades se muestran de acuerdo con su homología en las otras enzimas (mismo renglón y color), las subunidades inhibitorias están marcadas con un asterisco y la estequiometria se indica en forma de subíndice (modificado de Mendoza-Hoffmann *et al.*, 2018)

Subunidades de la la la F ₁ F _o -ATP sintasa en diferentes organismos				
Sector	Bacteria	Cloroplasto	α-proteobacteria	Mitocondria
F ₁	α ₃	α ₃	α ₃	α ₃
	β ₃	β ₃	β ₃	β ₃
	γ	γ	γ	γ
	δ	δ	δ	OSCP
	*ε	*ε	ε	δ
			*ζ	ε
				*IF ₁
F _o	a	IV	a	a o Sub.6
	b ₂	I,II	b ₂	b
	c ₉₋₁₂	III ₉₋₁₂	c ₁₂	c ₈₋₁₂
				A6L, d, e, f, g, i/j, F6, 8.



F₁F₀ – ATP sintasa como dímero

Se ha reportado que la F₁F₀ – ATP sintasa no tiene únicamente una función bioenergética al producir ATP, sino que también puede desempeñar un papel morfo-funcional dentro de la arquitectura mitocondrial. Esta enzima puede adquirir diferentes estructuras supramoleculares conocidas como homo-oligómeros siendo los más estudiados el dímero (V₂) y el monómero (V₁). A pesar de que aún se desconoce el papel bioenergético del dímero, se ha reportado que estructuralmente está relacionado con el plegamiento de la membrana interna mitocondrial para garantizar la formación de las crestas mitocondriales y dar estabilidad a la MIM (Davies *et al.*, 2012). Debido a la asociación angular de dos monómeros, la dimerización conduce a la flexión de la membrana interna mitocondrial y con ello al plegamiento de las crestas.

El dímero de la F₁F₀-ATP sintasa en las algas

En algunas algas clorofíceas como *Chlamydomonas reinhartii* y *Polytomella sp.* se ha encontrado una F₁F₀-ATP sintasa que presenta las subunidades homólogas a *E. coli* como α , β , γ , δ , OSCP, a y c (tabla 2). A pesar de que las subunidades catalíticas presentan una alta similitud, también tienen diferencias conformacionales, ya que tienen extensiones en las secuencias de aminoácidos; la subunidad α cuenta con 20 aminoácidos aproximadamente en el amino terminal y la subunidad β contiene 60 aminoácidos extras en el



carboxilo terminal y no se ha logrado elucidar la función que ejercen estas extensiones, pero se ha propuesto que podrían desempeñar un papel regulador en la actividad del complejo, ya que para estas algas no se ha logrado identificar una proteína inhibidora homóloga a la IF_1 (Villavicencio-Quijeiro *et al.*, 2009)

En este tipo de algas, se han identificado una serie de 9 subunidades llamadas ASA (ATP Synthase-Associated, Funes *et al.*, 2002; Cardol *et al.*, 2005; Vázquez-Acevedo *et al.*, 2006; van Lis *et al.*, 2007), las cuales están asociadas al brazo periférico y se ha propuesto que las ASA 6 y 9 son las proteínas dimerizantes (van Lis *et al.*, 2007).

Aunque todavía no es clara la función de estas subunidades dentro del complejo enzimático, se sugiere que están involucradas en el estator de la enzima y que son esenciales para la estructura del complejo en su forma dimérica, contribuyendo a la morfología de las crestas mitocondriales. La F_1F_0 -ATP sintasa de estas algas forma un dímero muy estable (figura 5B), el cual se puede aislar como un supercomplejo de aproximadamente 1600 kDa (van Lis *et al.*, 2003; Cano-Estrada *et al.*, 2010).



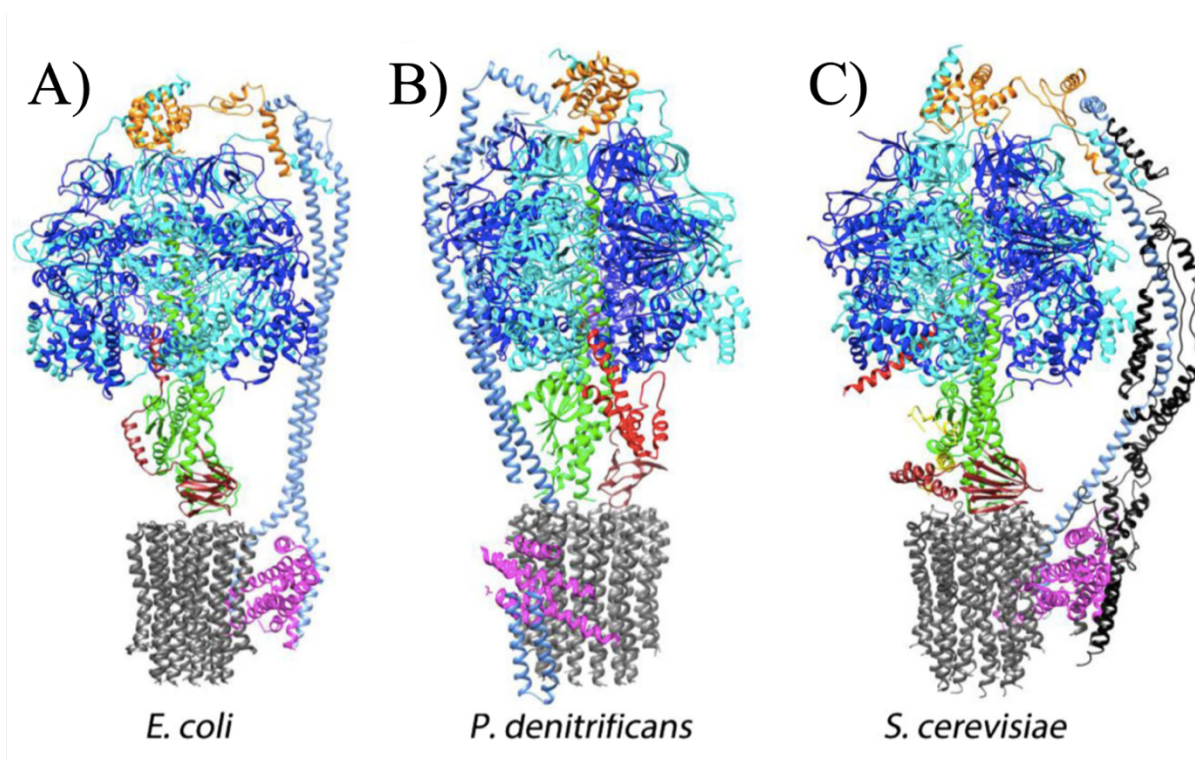


Figura 3. Estructuras de la F_1F_0 -ATP sintasa de *E. coli*, *P. denitrificans* y *S. cerevisiae*. A) F_1F_0 -ATP sintasa de bacteria representada por *E. coli* (PDB ID 5T40), B) F_1F_0 -ATP sintasa de α -proteobacteria representada por *P. denitrificans* (modelo de Mendoza- Hoffmann *et al.*, 2018) y C) F_1F_0 -ATP sintasa mitocondrial representada por *S. cerevisiae* (PDB ID 6CP6). En cada modelo se muestran las respectivas subunidades y a su vez la homología entre enzimas siguiendo el patrón de colores de la tabla 2. Se muestran en color rojo las subunidades inhibitorias A) ϵ B) ζ y C) IF₁. (Mendoza-Hoffmann *et al.*, 2018)

El dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa en los mamíferos

La F_1F_0 -ATP sintasa de corazón de bovino presenta las subunidades catalíticas homologas a *E. coli* (tabla 2), así mismo contiene las subunidades que conforman el rotor de la enzima; la b, d, F₆, OSCP y como subunidad reguladora o inhibitora la IF₁. Cuenta con las subunidades supernumerarias membranales e, g, A6L y f de las cuales se ha reportado que a y A6L (ATP8)



tienen un papel importante dentro de la estabilización del homo-dímero (Wittig *et al.*, 2010).

Se ha demostrado que la formación del dímero es fundamental para la biogénesis de las crestas mitocondriales, así mismo, se ha reportado que la subunidad IF₁ puede promover la dimerización del complejo V (Cabezón *et al.*, 2000, García *et al.*, 2006; Couoh-Cardel *et al.*, 2010).

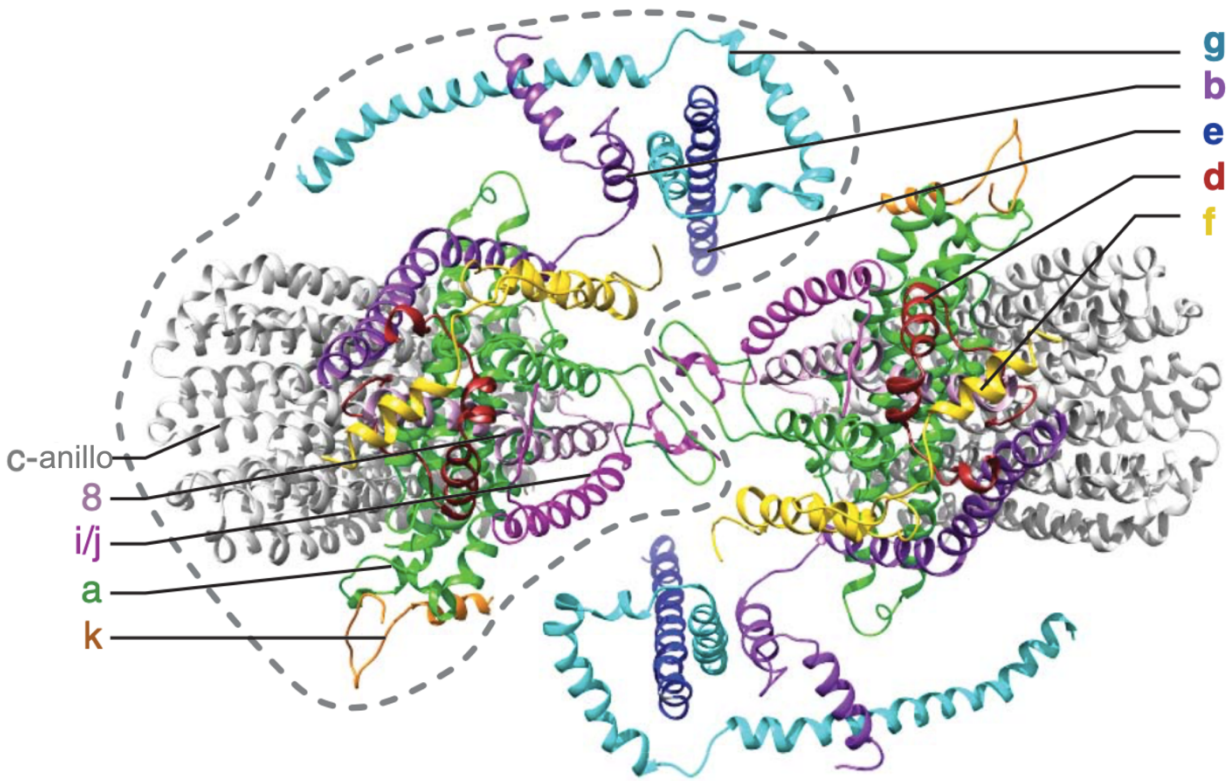


Figura 4. Estructura general del sector F₀ del dímero de F₁F₀-ATP sintasa mitocondrial. Vista superior el dímero F₀ que revela la disposición de las subunidades. Un monómero se describe con una línea discontinua (modificado de Guo *et al.*, 2017)



Por largo tiempo se ha pensado que el mecanismo de inhibición de la subunidad IF₁ es el interferir con los cambios conformacionales en las interfases de α y β . Posteriormente, se resolvió la estructura aislada de la subunidad inhibidora y se encontró que contiene una larga α -hélice con un dominio inhibitorio localizado en el N-terminal, mientras que en el C-terminal la IF₁ contiene un dominio dimerizante con el cual tiene una auto asociación. De esta manera, se ha sugerido que IF1 puede favorecer a la dimerización del complejo V (figura 5C; Cabezón *et al.*, 2003; Cabezón *et al.*, 2000).

Por el otro lado, se ha demostrado que aunque la IF₁ no es necesaria para la dimerización, sí la favorece mediante un puente que interconecta los dominios F₁ solubles (Cabezón *et al.*, 2003). De igual manera, se ha encontrado que una sobreexpresión de la proteína IF₁ interfiere con la relación monómero/dímero generando una tendencia a la formación del dímero y que al eliminar esta proteína la especie dimérica desaparece y, a su vez, la arquitectura mitocondrial se ve afectada. Lo anterior sugiere a la IF₁ como una subunidad dimerizante (Campanella *et al.*, 2008).

Adicionalmente, se ha encontrado que la proteína IF1 no es esencial para el crecimiento (Nakamura *et al.*, 2013). Según lo reportado por la ausencia de esta proteína no modifica la morfología de los tejidos en comparación con los ratones WT. Sin embargo, se encontró que no existen



diferencias en la expresión de F_1F_0 -ATP sintasa, la cuantificación de las subunidades α y β , la relación entre monómero-dímero y la síntesis de ATP en diversos órganos no fueron significativamente diferentes en los ratones IF1-KO lo cual permite un crecimiento normal en estos ratones.



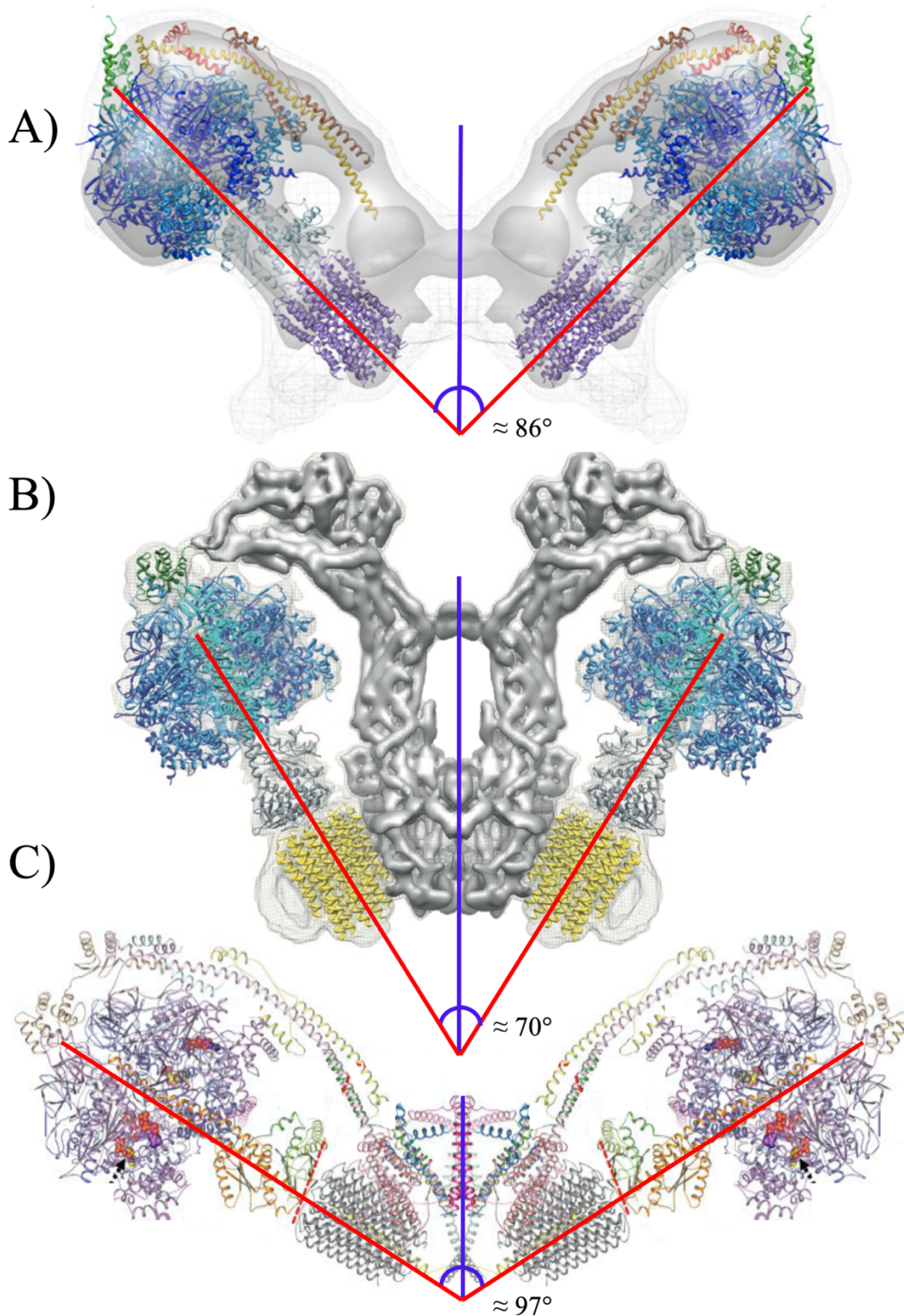


Figura 5. Estructura dimerica de la F_1F_0 -ATP sintasa. Criotomografía electrónica del dímero de F_1F_0 -ATP sintasa de A) *Saccharomyces cerevisiae*, se observa una estructura tipo V con doble simetría y con un ángulo de 86° entre monómeros (modificado de Davies, K. 2012). B) dímero de *Poytomella sp.* con estructura tipo V y un ángulo de 70° entre monómeros (modificado de Allegretti, M. 2015). C) dímero de *Sus scrofa* con estructura tipo V y un ángulo de 97° entre ambos monómeros (modificado de Gu, J. 2019).



El dímero de la F₁F₀-ATP sintasa en las levaduras

La F₁F₀-ATP sintasa de las levaduras presenta algunas subunidades homólogas a las algas y los mamíferos (tabla 2) y también pueden formar homo-oligómeros. En contraste con los mamíferos, en *Saccharomyces cerevisiae*, el dominio de interacción para la dimerización del complejo V es el sector F₀. Se ha encontrado que las subunidades e, g y k se encuentran presentes únicamente en el dímero de la F₁F₀-ATP sintasa por lo cual se han propuesto como las subunidades dimerizantes (Arnold *et al.*, 1998).

La interfase de interacción de dos monómeros se encuentra principalmente en el dominio F₀ formando un ángulo de $\approx 86^\circ$ entre los dos monómeros con respecto a su eje central (Davies, K. 2012; figura 5A) y se ha sugerido que la subunidad a tiene una función importante al servir como base para la dimerización. Junto con la subunidad a, las subunidades del tallo estator y las subunidades accesorias e, g, b, i, k y 8 (figura 4) estabilizan la interfase del homo-dímero y se ha encontrado que una alteración en cualquiera de estas subunidades desestabiliza las formas oligoméricas de la enzima lo que repercute en la arquitectura mitocondrial, teniendo morfologías anómalas en las crestas mitocondriales a las que comúnmente se les conoce como aros de cebolla (Velours *et al.*, 2009). Sin embargo, dentro de estas subunidades se han descrito que las subunidades e, g y k no son esenciales para la dimerización, sino que más bien tienen un papel estabilizador para el



dímero; así mismo se ha demostrado que la proteína inhibidora de esta enzima (Inh1) no es necesaria para la oligomerización (Arnold *et al.*, 1998; Dienhart *et al.*, 2002; Wittig *et al.*, 2008; Wagner *et al.*, 2010).

*El dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa en *Ustilago maydis**

Ustilago maydis es un basidiomiceto aeróbico parásito del maíz. El metabolismo de este hongo depende fuertemente de la fosforilación oxidativa para obtener su suplemento de ATP, por lo que la mitocondria es importante para la viabilidad de este hongo.

Recientemente, se ha caracterizado el V_2 y V_1 de *Ustilago maydis* solubilizados con digitonina (Esparza-Perusquía *et al.*, 2017). El peso molecular calculado para el V_1 y V_2 es 660 kDa y 1200 kDa, respectivamente. El análisis por espectrometría de masas (MS/MS) mostró que el V_1 tiene 17 subunidades de la F_1F_0 -ATP sintasa, mientras que el V_2 presenta, adicionalmente, a las subunidades dimerizantes e y g.



Los metales pesados a nivel celular

Los metales pesados son inductores bien conocidos del estrés oxidativo, debido a que pueden estimular la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la célula mediante la interacción con el oxígeno de manera inespecífica. La sobreproducción de las ROS puede conducir a diversos efectos dentro de la célula, entre los cuales se encuentran la peroxidación lipídica, la desnaturalización de proteínas o ácidos nucleicos y de igual manera pueden estimular la expresión de genes involucrados en la defensa contra el estrés oxidativo y modular la actividad de enzimas involucradas en diversas vías metabólicas (Defo *et al.*, 2018)

Se ha reportado (Bo y Xu, 2006; Adiele *et al.*, 2011) que los metales como el Zn, el Cd y el Cu pueden acumularse dentro de las células, siendo la mitocondria el organelo más sensible, causando una gran cantidad de efectos tóxicos dañando la estructura y función mitocondrial.

Algunos de los mecanismos de unión de los metales se dan en los grupos tiol de proteínas, por ejemplo: la inactivación del grupo sulfhidrilo de algunas proteínas esenciales podría producir déficit en las funciones de organelos subcelulares, como núcleos, mitocondrias y retículo endoplásmico (Diep *et al.*, 2005). Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales los metales pesados pueden causar toxicidad, es muy diversa y hay muchos aspectos que no han



sido estudiados con suficiente detalle y es posible que algunos no hayan sido aún descritos.



Antecedentes

El V_2 y el V_1 son obtenidos de acuerdo con el método descrito por Esparza-Perusquía *et al.*, (2017). La actividad de ATPasa para V_1 y V_2 aislado es evaluado espectroscópicamente por la oxidación del NADH ($\epsilon_{\text{NADH}} = 6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 340 nm) utilizando un sistema de reacciones acopladas con la piruvato cinasa y lactato deshidrogenasa.

La actividad de ATPasa para el V_1 y V_2 es dependiente de la concentración de Mg-ATP y se ha observado que presenta una cinética de Michaelis -Menten. El monómero tiene una $V_{\text{max}} = 0.83 \pm 0.05 \text{ } \mu\text{mol de ATP hidrolizado/mg F}_1\text{F}_0\text{-ATP sintasa}\cdot\text{min}^{-1}$ y una $K_m = 308 \pm 90 \text{ } \mu\text{M}$, mientras que el dímero tiene una $V_{\text{max}} = 0.54 \pm 0.08 \text{ } \mu\text{mol de ATP hidrolizado/mg F}_1\text{F}_0\text{-ATP sintasa}\cdot\text{min}^{-1}$ y una $K_m = 884 \pm 100 \text{ } \mu\text{M}$ (Esparza-Perusquía *et al.*, 2017).

Se ha reportado que la actividad de ATPasa de la $\text{F}_1\text{F}_0\text{-ATP sintasa}$ se incrementa en presencia del dodecil-maltósido (DDM), un detergente no iónico. En presencia del DDM se observó un incremento en la actividad de ATPasa para el V_2 , que presentó una $V_{\text{max}} = 9.604 \pm 0.26 \text{ } \mu\text{mol de ATP hidrolizado/mg F}_1\text{F}_0\text{-ATP sintasa}\cdot\text{min}^{-1}$ y una $K_m = 490 \pm 80 \text{ } \mu\text{M}$. En contraste, el V_1 presentó una $V_{\text{max}} = 1.431 \pm 0.04 \text{ } \mu\text{mol de ATP hidrolizado/mg F}_1\text{F}_0\text{-ATP sintasa}\cdot\text{min}^{-1}$ y una $K_m = 207 \pm 30 \text{ } \mu\text{M}$. La actividad del dímero aumenta 9 veces respecto al monómero. Aunado a esto, los valores de k_{cat}/K_m para el V_1 y el V_2



son 7×10^4 y $4.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ respectivamente; se concluye que el V_2 es 7 veces más activo y tiene mayor especificidad que el V_1 en presencia de DDM (Esparza-Perusquía *et al.*, 2017).

Otra diferencia encontrada entre el V_1 y el V_2 es la sensibilidad a la oligomicina. La oligomicina es un inhibidor específico para la actividad de la ATPasa de la F_1F_0 -ATP sintasa. La K_i para el V_2 fue de $24 \pm 3 \text{ nM}$ mientras que para el V_1 fue de $169 \pm 10 \text{ nM}$. Todos los resultados reportados (Esparza-Perusquía *et al.*, 2017) sugieren que la interfase entre los monómeros en el dímero afecta la eficiencia catalítica de la enzima y su sensibilidad a los inhibidores.

Definición del proyecto

El complejo V es una enzima mitocondrial productora de aproximadamente el 90% del ATP celular a partir de $\text{ADP} + \text{P}_i$, por lo cual, la insuficiencia funcional de dicho complejo terminaría por dejar a la célula sin energía, lo que inevitablemente conduciría a la muerte.

Es bien sabido que los metales pesados son producto de la contaminación de diversas industrias que a su vez llegan a tener una concentración elevada en mantos acuíferos, aguas residuales e incluso en el



agua para reuso. Sabemos de igual manera que los metales pesados inducen y aumentan las especies reactivas de oxígeno en la mitocondria a través de los complejos respiratorios resultando en una disminución en la síntesis de ATP y causando diversas enfermedades asociadas a la sobre producción de ROS. Sin embargo, el efecto de los metales pesados en el V_2 y el V_1 de la F_1F_0 -ATPsintasa no ha sido estudiado.

La importancia del trabajo radica en la caracterización de un efecto diferencial sobre la actividad de hidrólisis del complejo V por los metales pesados (arsénico, cadmio, cobre, mercurio y zinc), cuando dicho complejo se encuentra en dos posibles estados de asociación: dímero y monómero. El impacto de los metales sobre esta proteína es relevante para la fisiología de los organismos, dada la importancia de este complejo en la producción de energía.



Objetivo general

Estudiar el efecto de los metales pesados en la estabilidad y actividad del monómero y dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa de *Ustilago maydis*.

Hipótesis

Debido a las diferencias estructurales y cinéticas entre el dímero y el monómero de la F_1F_0 -ATP sintasa, se espera que el comportamiento frente a algunos metales pesados sea diferente para cada estado oligomérico.

Objetivos particulares

- Aislar el monómero y dímero de complejo V en su forma soluble.
- Determinar la hidrólisis de ATP de los oligómeros en presencia de metales pesados.



Materiales y métodos

Cultivo celular y aislamiento de mitocondrias.

La cepa FB2 de *U. maydis* fue sembrada en un medio sólido de YPD (0.5% glucosa, 0.5% de extracto de levadura, 0.25% bactopectona, 2% de agar) y 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 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.

Las mitocondrias fueron aisladas como lo describió Juárez *et al.*, (2006) con algunas modificaciones (Guérin *et al.*, 1979; Díaz-Ruiz *et al.*, 2008, Esparza-Perusquía *et al.*, 2017). Las células fueron cosechadas por centrifugación a 5,500 *g* durante 10 min a 4°C; se resuspendieron y se lavaron 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 y 20 mM KH_2PO_4 , en una relación de 100 ml por cada 8 g de células. 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 45 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, 2 mM EDTA, 20 mM KH₂PO₄, 0.3% albúmina desgrasada, 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, 2 mM EDTA, 20 mM KH₂PO₄, 0.3% albúmina desgrasada, pH 7.0 y se homogenizaron 15 veces con un homogenizador Potter, en presencia de 2 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, y se mantuvieron a 4 °C, hasta su uso.

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 (Mahuran *et al.*, 1983). Las muestras fueron tratadas con 0.4% desoxicolato de sodio (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. Para conocer la concentración de proteína en mg/ml, se utiliza el método de regresión lineal o mínimos cuadrados (Waterborg *et al.*, 1984).

Solubilización y asilamiento del monómero y dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa.

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, suplementado con 10 mM de succinato y 20 mM de ATP; 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 respiratorios se recuperaron en el sobrenadante (Schägger *et al.*, 1991).

Electroforesis en condiciones nativas (hrCN-PAGE).

Los complejos respiratorios de las mitocondrias de *U. maydis* se resolvieron por medio de la electroforesis clara en condiciones nativas de alta resolución (hrCN-PAGE) en geles de gradiente de poliacrilamida (4 – 10%). Para la hrCN-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% DOC y 0.01% n-dodecil β -D-maltosido (DDM; Wittig *et al.*, 2008). Se utilizó como marcador del frente de corrida al colorante rojo de Ponceau. Se aplicaron 100 μ g 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*.

Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (tricina SDS-PAGE).

Las subunidades del complejo V de *U. maydis* se resolvieron por medio de la electroforesis en condiciones desnaturalizantes (tricina SDS-PAGE) en geles de poliacrilamida al 10%. Para la tricina SDS-PAGE el amortiguador del ánodo contenía tris 100 mM y HCl 22.5 mM; el amortiguador del cátodo contenía tris 100 mM, tricina 100 mM y SDS al 0.1%. Se aplicó en el primer carril marcador de peso molecular *Precision Plus Protein Standards Unstained*, (BIO-RAD #161-0363). Posteriormente, se preparó una curva estándar de albumina desde 0.3 – 1.0 μ g utilizando una solución de BSA con una concentración de 1 mg/mL, se verificó esta concentración en un



espectrofotómetro utilizando el coeficiente de extinción molar del BSA ($\epsilon=6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a una longitud de onda de 280 nm. Se aplicaron 10-50 μg de la proteína de interés por carril, las condiciones de la corrida electroforética fueron 50 V durante 30 minutos y, posteriormente, 110 V durante hora y media a 4°C. Las proteínas se tiñeron con azul de Coomassie, el peso molecular de las subunidades α y β del complejo V fue determinado mediante su factor electroforético y comparándolas con el estándar de peso molecular. La cuantificación de las proteínas fue determinada mediante el programa *MyImageAnalysis Thermo Scientific* utilizando la intensidad media de las bandas teñidas. De esta manera, se realizó una regresión lineal de la curva de albumina y, mediante la extrapolación de la curva, se obtuvieron las concentraciones de las subunidades α y β del complejo V. La cantidad de complejo V se calculó tomando en cuenta la masa molecular de la proteína madura y su estequiometría en el complejo funcional (Esparza-Perusquía *et al.*, 2017).

Actividad en gel para 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, 10 mM MgSO_4 , pH 8.0, 0.2% $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ y 5 mM ATP; ajustando el pH con trietanolamina para evitar la precipitación



inespecífica del plomo. La actividad de hidrólisis de ATP se observó como un depósito blanco del fosfato de plomo, para hacer contraste se escaneó sobre un fondo oscuro (Jung *et al.*, 2000).

Purificación del dímero y del monómero del complejo V.

Los complejos respiratorios solubilizados con digitonina (2:1) 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 (3.5 ml del solubilizado) en 24 ml de gradiente y se centrifugaron a 131,000 *g* durante 16 h a 4°C. Se colectaron fracciones de 500 μ l y se almacenaron a -70°C. La presencia de los oligómeros del complejo V se determinó por medio de hrCN-PAGE.

Ensayo espectrofotométrico de la actividad de los oligómeros del complejo V.

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 (figura 6), 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 μ g de



muestra y se empleó una solución equimolar de Mg-ATP para iniciar la reacción de hidrólisis de ATP. En esta reacción, el ATP hidrolizado es regenerado a partir del ADP liberado 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. Resultando así la producción de una molécula de ATP por una molécula de NADH.

La reacción se inició agregando la proteína a una celda de cuarzo mediante agitación y se realizaron lecturas cada 0.5 seg durante 10 min a 340 nm en un espectrofotómetro (marca Hewlett Packard, modelo 8453). 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).

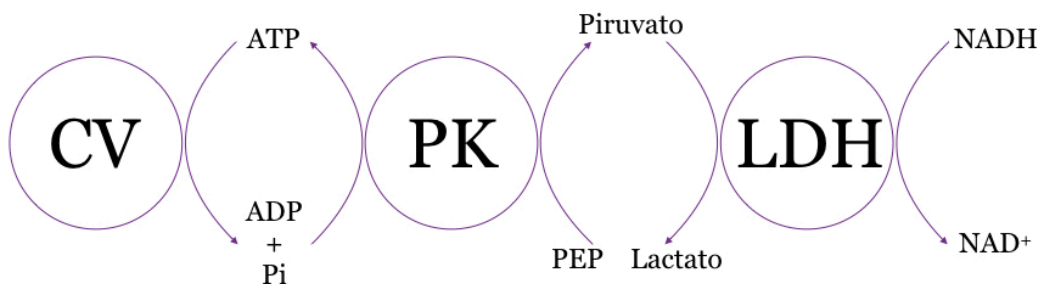


Figura 6. Sistema regenerador. Conjunto de reacciones acopladas para determinar la hidrólisis de ATP mediante la cuantificación del NADH oxidado. CV: complejo V (F_1F_0 -ATP sintasa), PK: piruvato cinasa, LDH: lactato deshidrogenasa, PEP: fosfoenol piruvato.



La actividad y estabilidad frente a los metales pesados (As^{3+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} y Zn^{2+}). Se realizó agregando todos los reactivos a la celda de cuarzo, incluyendo el ATP y posteriormente, se adicionó NADH e inmediatamente se añadió la muestra para observar las velocidades iniciales en la actividad de hidrólisis del complejo V. En seguida, alrededor de los 250 segundos, se adicionó el metal en un intervalo de concentración de 1 a 1000 μM . Para verificar que las enzimas del sistema regenerador no se inhibían por el metal pesado, se añadió una dosis alta de ADP (300 μM).

La actividad de hidrólisis de ATP para el complejo V se calculó mediante la ecuación 1.

$$\text{Pendiente} \left(\frac{1 \mu\text{mol ATP hidrolizado}}{6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}} \right) \left(\frac{1}{1 \text{ s}} \right) \left(\frac{60 \text{ s}}{1 \text{ min}} \right) \left(\frac{x_1 \mu\text{g proteina}}{x_2 \mu\text{g } V_1 \text{ o } V_2} \right) \left(\frac{1}{x_3 \mu\text{g proteina}} \right) \left(\frac{1000 \mu\text{g } V_1 \text{ o } V_2}{1 \text{ mg } V_1 \text{ o } V_2} \right)$$

Ecuación 1. Ecuación para el calculo de la actividad de hidrolisis de ATP. Con base en la pendiente obtenida en los trazos espectrofotométricos, se utiliza el coeficiente de extinción molar, la cantidad total del complejo V por mg de proteína y factores de conversión matemáticos para obtener los mol de ATP hidrolizado por unidad de tiempo.

De la forma anterior, se calcularon las actividades iniciales (V_0) y finales (V) para cada concentración y para cada metal, posteriormente, se calculó la actividad residual mediante el cociente V/V_0 y con el regráfico de la actividad residual contra el pM ($-\log[\text{Metal}]$) se obtuvo una curva dosis-respuesta para cada metal. Dicha curva se ajustó al modelo sigmoideo para de esta forma, calcular la concentración de metal a la cual la actividad de hidrólisis se reduce



al cincuenta por ciento (IC_{50}). El ajuste de los datos para determinar los parámetros cinéticos se realizó en el programa Sigma Plot versión 10.0.

Dilución de los metales durante la interacción metal-complejo V.

El complejo V en ambas especies oligoméricas se incubó en presencia de cada metal a una concentración mayor al IC_{50} . Se tomó una alícuota de cada concentración y se realizaron ensayos espectrofotométricos como se describió. En el ensayo la celda no contenía el metal, por lo cual la concentración del metal en la alícuota se diluyó 10 veces en el ensayo.

Cultivo de células de Ustilago maydis en presencia de metales pesados.

La cepa FB2 de *U. maydis* fue sembrada en un medio sólido de YPD (0.5% glucosa, 0.5% 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 centrifugó 1 mL del inóculo a 15,000 rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se determinó el peso húmedo. Posteriormente, se



resuspendieron las células en un volumen de 1 mL y se preparó una solución a 20 mg/mL.

En una microplaca se realizaron diluciones seriadas de células de *Ustilago maydis*, desde 10^0 a 10^5 partiendo de una concentración inicial de 10 mg/mL. Luego, se realizaron las mismas diluciones a una concentración fija de 10, 50, 100, 500 y 100 μ M para cada metal, posteriormente se cultivaron 2 μ L de cada dilución en un medio sólido mínimo de glucosa (1% glucosa, 0.3 % sulfato de amonio, 2% agar, 4 mM KH_2PO_4 , 0.1 mM Na_2SO_4 , 3 mM KCl, 0.5 mM MgSO_4 , 0.3 mM CaCl_2 , 0.16 μ L H_3BO_3 , 0.11 μ L $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.5 μ L ZnCl_2 , 0.03 μ L $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.06 μ L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.25 μ L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, pH= 2.8 - 3), cultivada a 28°C por 60 horas. La fisionomía de las colonias fue fotografiada contra un fondo oscuro.

Alineamiento múltiple de secuencias.

Las secuencias de los residuos de aminoácidos de las proteínas ATP6(a) y ATP9(c) de la F_1F_0 -ATP sintasa de *Escherichia coli*, *Ustilago maydis*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Bos taurus* fueron recolectadas del National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). Posteriormente mediante el programa en línea ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) se



realizó el alineamiento múltiple de secuencias en el cual se especifica que los residuos de aminoácidos alineados y señalizados con un asterisco (*) son idénticos, mientras que los marcados con dos puntos (:) son residuos que pertenecen al mismo grupo. Las secuencias utilizadas para los diferentes organismos son indicadas en la tabla 3.

Tabla 3. Residuos de aminoácidos de las subunidades a y c de la F₁F₀-ATP sintasa en diferentes organismos. Se muestra el número de aminoácidos y los números de acceso de las subunidades a y c de los diferentes organismos de los que se hizo el alineamiento de secuencias. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>.

Subunidad	Organismo	Nº de aminoácidos	Nº de acceso
a	<i>Escherichia coli</i>	271	AAA24731.1
	<i>Ustilago maydis</i>	254	sp Q0H8Y6.1
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	259	GAX72539.1
	<i>Bos taurus</i>	217	pdb 5ARH W
c	<i>Escherichia coli</i>	79	AAA24732.1
	<i>Ustilago maydis</i>	73	sp Q0H8W9.1
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	76	AJU15826.1
	<i>Bos taurus</i>	72	pdb 5FIL J



Resultados

Aislamiento e identificación de los oligómeros del complejo V.

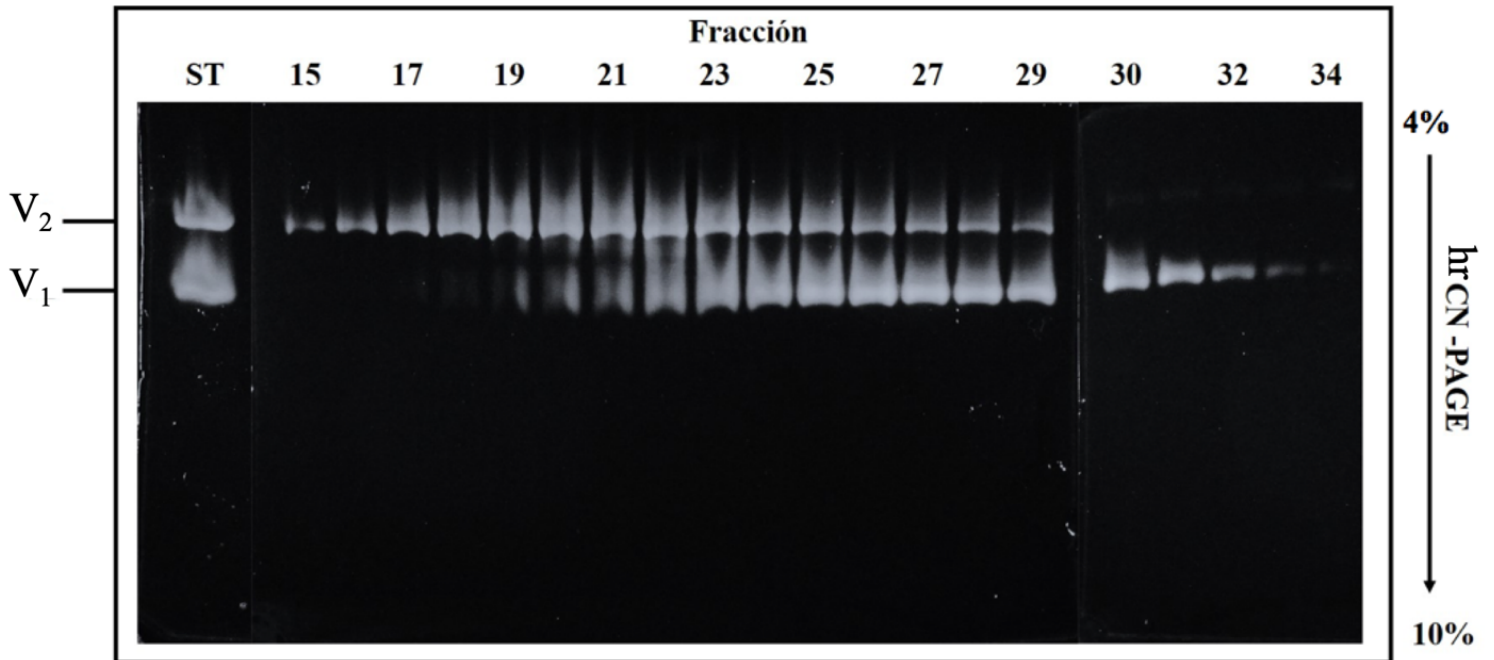


Figura 7. Actividad de complejo V en geles nativos claros. Aislamiento del complejo V en donde se identifican las dos especies oligoméricas mediante hidrólisis de ATP formando un precipitado $Pb_3(PO_3)_2$. El dímero (V_2) con un peso molecular de 1600 kDa se encuentra entre las fracciones 15-19, mientras que el monómero (V_1) con un peso de 660 kDa se observa entre las fracciones 30-34. ST: Estándar de bovino.

Después de solubilizar los complejos V y aislarlos mediante un gradiente continuo de sacarosa, se analizaron mediante electroforesis en geles claros nativos de poliacrilamida (hrCN-APGE). Posteriormente, se les determinó la actividad de ATPasa del complejo V y se puede observar en la figura 7 la presencia de bandas color blanco, correspondiente a precipitados de fosfato de plomo dada la reacción $3Pb^{2+} + 2PO_4^{3-} = Pb_3(PO_3)_2$, lo cual nos indica que las zonas en las que esté presente este precipitado es debido a que se está



llevando a cabo la hidrólisis de ATP mediante la F_1F_0 -ATP sintasa dejando Pi libre disponible para dicha reacción.

En la figura 7, podemos observar en el primer carril correspondiente al CV estándar de bovino (ST) en el que están presentes dos bandas de 1600 y 750 kDa, adjudicables al dímero y monómero, respectivamente. A su vez, observamos a lo largo del gradiente continuo la presencia de dímero y monómero en diferentes fracciones. Se seleccionaron aquellas en las que se encontraban las especies oligoméricas aisladas, es decir el dímero (V_2) en las fracciones 15-17 se encuentra aislado mientras que las fracciones 30-33 contienen exclusivamente al monómero (V_1).

Estas fracciones se reunieron por separado en una muestra para el V_2 y otra para el V_1 , y se cuantificó la cantidad de complejo V para cada una (ver abajo).



Cuantificación de la concentración del complejo V.

En la figura 8 se muestra la electroforesis en condiciones desnaturalizantes (tricina-SDS) para el dímero y monómero. En el panel (A) la cuantificación del monómero, el primer carril corresponde al marcador de peso molecular, los carriles 2-5 correspondientes a una curva estándar de albumina (BSA) de 0.3 a 1.0 μg y finalmente los carriles 7-10 corresponden a la muestra de V_1 (10, 15, 30 y 50 μg de proteína, respectivamente). En el panel (B) se muestra la cuantificación del dímero para el cual se siguió el mismo procedimiento experimental.

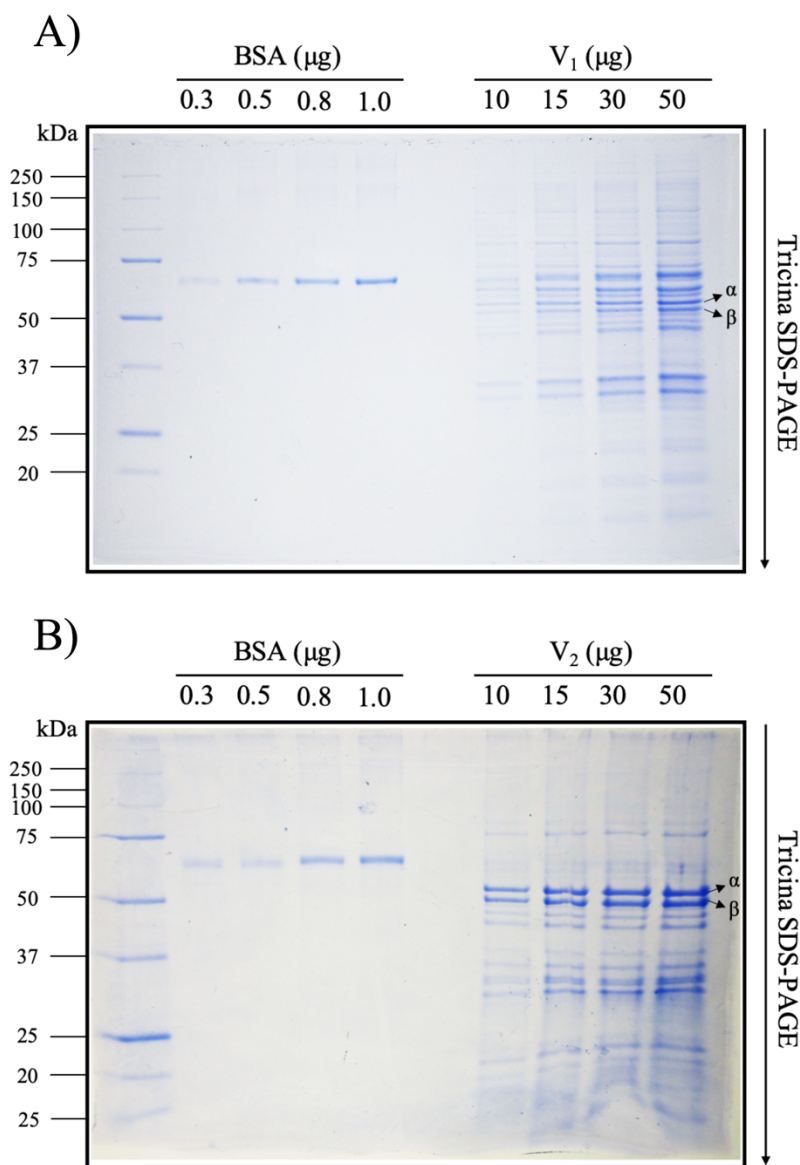


Figura 8. Cuantificación de complejo V mediante tricina SDS-PAGE. La identificación de las subunidades α y β se realizó por su movilidad electroforética alrededor de los 50 y 52 kDa respectivamente y se cuantificó mediante la interpolación lineal con la curva estándar de albumina. A) Monómero B) Dímero. BSA: curva estándar de albúmina. Las proteínas se tiñeron con azul brillante de Coomassie. Se utilizó como estándar de peso molecular el reactivo *Precision Plus Protein Estándar - BIORAD*.



Tabla 4. Espectrometría de masas para las subunidades del complejo V₁ y V₂ de mitocondria de *Ustilago maydis*.

Identidad de subunidades y pesos moleculares para cada una de las especies oligoméricas del complejo V. El peso molecular para V₂ y V₁ fue determinado mediante BN-PAGE usando complejos respiratorios mitocondriales de corazón de bovino como estándar. El peso molecular de las subunidades fue determinado mediante 2D-Tricina-SDS-PAGE. ANT: adenin nucleotido translocasa; PC: acarreador de fosfatos; PHB1: prohibitina 1; PHB2: prohibitina 2; ANT: proteína acarreadora ADP/ATP. La identidad de cada proteína fue determinada por espectrometría de masas. El número de acceso fue obtenido de NCBI.

Masa molecular e identidad de subunidades del complejo V ₁ y V ₂ de mitocondria de <i>Ustilago maydis</i>						
V2 (1200 kDa)	V1 (660 kDa)	Masa molecular (kDa)	Peptidos exclusivos	Espectro único/espectro total	Cobertura (%)	Números de acceso NCBI
Identidad de subunidad						
α	α	55.05	16	20/41	32	XP_011392137
β	β	50.47	21	39/99	50	XP_011389783
γ	γ	31.16	9	10/18	39	XP_011388164
a	a	27.74	5	6/10	40	Q0H8Y6
b	b	22.28	7	7/9	21	XP_011392148
OSCP	OSCP	21.00	7	8/14	38	XP_011388314
d	d	15.55	3	4/9	41	XP_011392758
δ	δ	14.62	4	4/4	39	XP_011387060
h	h	10.42	5	7/9	43	XP_011388666
ϵ	ϵ	7.54	7	9/22	74	XP_011391935



(continuación tabla 4)

c	c	7.39	7	10/15	62	Q0H8W9
f	f	7.37	3	3/5	32	XP_011388343
Inh1	Inh1	7.28	5	6/11	41	XP_011388667
i/j	i/j	6.45	5	5/9	36	XP_011391953
8	8	5.71	5	6/11	28	Q0H8Y5
g	-	17.30	5	6/14	22	XP_011386964
e	-	9.24	6	8/14	31	XP_011389516
<i>Proteínas accesorias</i>						
ANT	ANT	33.75	11	12/22	32	XP_011386926
PC	PC	34.00	12	13/25	30	XP_011388175
PHB2	PHB2	35.56	13	17/75	43	XP_011391320
PHB1	PHB1	29.76	11	15/49	32	XP_011390099



Se puede observar en la figura 8, cerca del marcador de peso molecular de 50 kDa para ambos geles, que se encuentran dos bandas gemelas señaladas como α y β , las cuales después de analizar mediante MyImageAnalysis tienen un peso molecular de 52 y 50 kDa, que se aproximan considerablemente al peso molecular reportado en la tabla 4 para las subunidades α y β , respectivamente.

Dado que α y β se considera la huella proteómica del complejo V al lograr su identificación se confirma la presencia de CV y nos permite cuantificar su cantidad en cada preparación de V_1 y V_2 .

Con el uso de MyImageAnalysis se cuantificaron las intensidades medias de cada una de las bandas de interés, así como las bandas de la curva estándar de albumina. Con la intensidad media y la concentración conocida de albumina en cada carril se realizó un análisis de regresión lineal, con la cual se interpoló la concentración de las bandas de interés, con base a su intensidad media, permitiendo cuantificar las cantidades de α y β del complejo V de *Ustilago maydis* en cada carril (tabla 5).



Tabla 5. Cuantificación de las subunidades α y β para monómero con base a la regresión lineal. Se muestran las intensidades medias de la curva de albumina como de α y β así como los parámetros de la regresión lineal y la cuantificación de las subunidades de interés en μg , pmol y la relación α/β .

BSA Curva estandar (monómero)				
Concentración (μg)	Intensidad media	Regresión lineal		
0.3	18761	r= 0.941130		
0.5	21331	b= 16430.27		
0.8	21845	m= 8330.34		
1	25443			
Ensayo (15 μg) WT V ₁				
Subunidad	Intensidad media	μg	pmol	Relación α/β
α	21074	0.5574	10.13	1.27
β	19789	0.4032	7.99	
		Promedio = 9.06		
Ensayo (30 μg) WT V ₁				
Subunidad	Intensidad media	μg	pmol	Relación α/β
α	24415	0.9585	17.41	1.01
β	23644	0.8660	17.16	
		Promedio = 17.29		

Como se describió, la F_1F_0 -ATP sintasa está conformada por tres subunidades α y tres subunidades β , (que son consideradas su huella proteómica) por lo que el cociente de α/β se espera que sea cercano a uno, lo que nos indicaría acerca de la integridad de la enzima durante el proceso de purificación. Por otro lado, la integridad de la enzima nos permite utilizar la estequiometría reportada en la tabla 4 y utilizando los contenidos promedio, ya cuantificados para α y β , pudimos cuantificar la cantidad de complejo V presente por mg de proteína (como se ejemplifica en la tabla 6) lo que permitió determinar con más exactitud las actividades específicas de hidrólisis de ATP



(por mg) del complejo V. Se realizó este procedimiento tanto para el monómero (figura 8A, tablas 5 y 6) y para el dímero (figura 8B, tablas 7 y 8).

Tabla 6. Cuantificación del complejo V₁ total por mg de proteína. Con base a lo pmol totales de α y β , la estequiometría por subunidad y peso molecular se calculó el contenido total de complejo V en 15 μ g de muestra. La cantidad promedio de monómero (V₁) fue de 120 μ g por mg de proteína.

Ensayo (15 μg)						
Subunidad	Estequiometría	MW	MW total	pmol por subunidad	pmol total	μg
α	3	55047	165141	3.01	9.05	0.498
β	3	50465	151395	3.01	9.05	0.457
b	2	22281	44562	3.01	6.03	0.134
γ	1	33157	33157	3.01	3.01	0.100
a	1	27742	27742	3.01	3.01	0.083
OSCP	1	21001	21001	3.01	3.01	0.063
d	1	15552	15552	3.01	3.01	0.047
f	1	7371	7371	3.01	3.01	0.022
δ	1	14615	14615	3.01	3.01	0.044
h	1	10419	10419	3.01	3.01	0.031
ϵ	1	7538	7538	3.01	3.01	0.022
Inh1	1	7281	7281	3.01	3.01	0.022
c	12	7394	88728	3.01	36.23	0.267
i/j	1	6454	6454	3.01	3.01	0.019
8	1	5713	5713	3.01	3.01	0.017
g	-	-	-	-	-	-
e	-	-	-	-	-	-
Total		292030	606669	45.28	93.59	1.831



Tabla 7. Cuantificación de α y β para dímero con base a la regresión lineal. Se muestran las intensidades medias de la curva de albumina como de α y β así como los parámetros de la regresión lineal y la cuantificación de las subunidades de interés en μg , pmol y la relación α/β .

BSA Curva estandar (dímero)				
Concentración (μg)	Intensidad media	Regresión lineal		
0.3	35980	r=0.973794		
0.5	37522	b=32727.62		
0.8	39578	m=9748.27		
1	43176			
Ensayo (10 μg) WT V ₂				
Subunidad	Intensidad media	μg	pmol	Relación α/β
α	37522	0.4918	8.93	0.92
β	36236	0.4918	9.75	
		Promedio =	9.34	
Ensayo (15 μg) WT V ₂				
Subunidad	Intensidad media	μg	pmol	Relación α/β
α	46003	1.3618	24.74	0.97
β	45232	1.2827	25.42	
		Promedio =	25.08	

Tabla 8. Cuantificación del complejo V₂ total por mg de proteína. Con base a lo pmol totales de α y β , la estequiometría por subunidad y peso molecular se calculó el contenido total de complejo V en 10 μg de muestra. La cantidad promedio de dímero (V₂) fue de 200 μg por mg de proteína.

Ensayo (10 μg)						
Subunidad	Estequiometría	MW	MW total	pmol por subunidad	pmol total	μg
α	3	55047	165141	3.11	9.33	0.514
β	3	50465	151395	3.11	9.33	0.471
b	2	22281	44562	3.11	6.22	0.138
γ	1	33157	33157	3.11	3.11	0.103
a	1	27742	27742	3.11	3.11	0.086



(continuación tabla 8)

OSCP	1	21001	21001	3.11	3.11	0.065
d	1	15552	15552	3.11	3.11	0.048
f	1	7371	7371	3.11	3.11	0.022
δ	1	14615	14615	3.11	3.11	0.045
h	1	10419	10419	3.11	3.11	0.032
ε	1	7538	7538	3.11	3.11	0.023
Inh1	1	7281	7281	3.11	3.11	0.022
c	12	7394	88728	3.11	37.35	0.276
i/j	1	6454	6454	3.11	3.11	0.020
8	1	5713	5713	3.11	3.11	0.017
g	1	17300	17300	3.11	3.11	0.053
e	1	9240	9240	3.11	3.11	0.028
Total		318570	633209	52.92	102.73	1.971



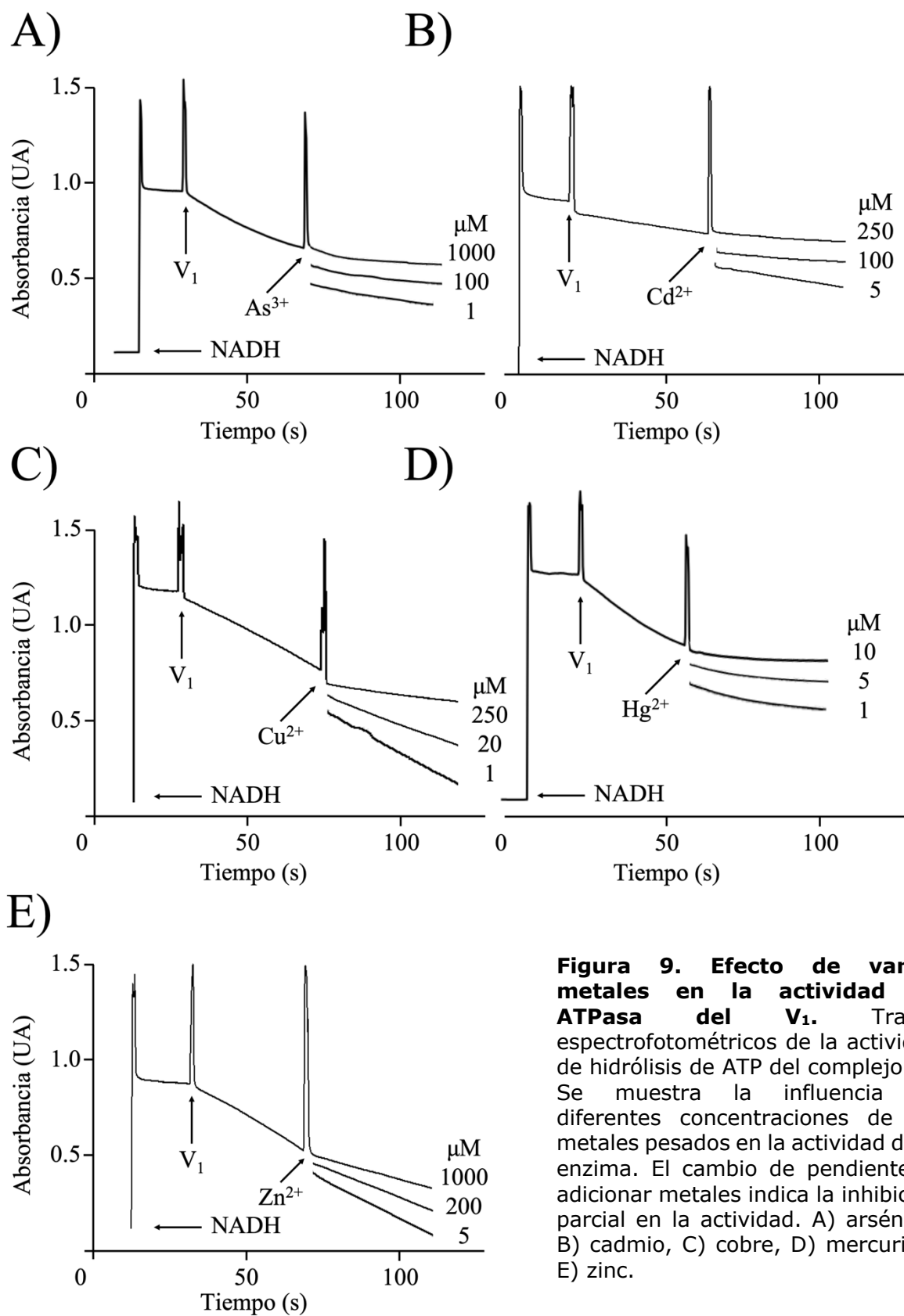


Figura 9. Efecto de varios metales en la actividad de ATPasa del V_1 . Trazos espectrofotométricos de la actividad de hidrólisis de ATP del complejo V_1 . Se muestra la influencia de diferentes concentraciones de los metales pesados en la actividad de la enzima. El cambio de pendiente al adicionar metales indica la inhibición parcial en la actividad. A) arsénico, B) cadmio, C) cobre, D) mercurio y E) zinc.



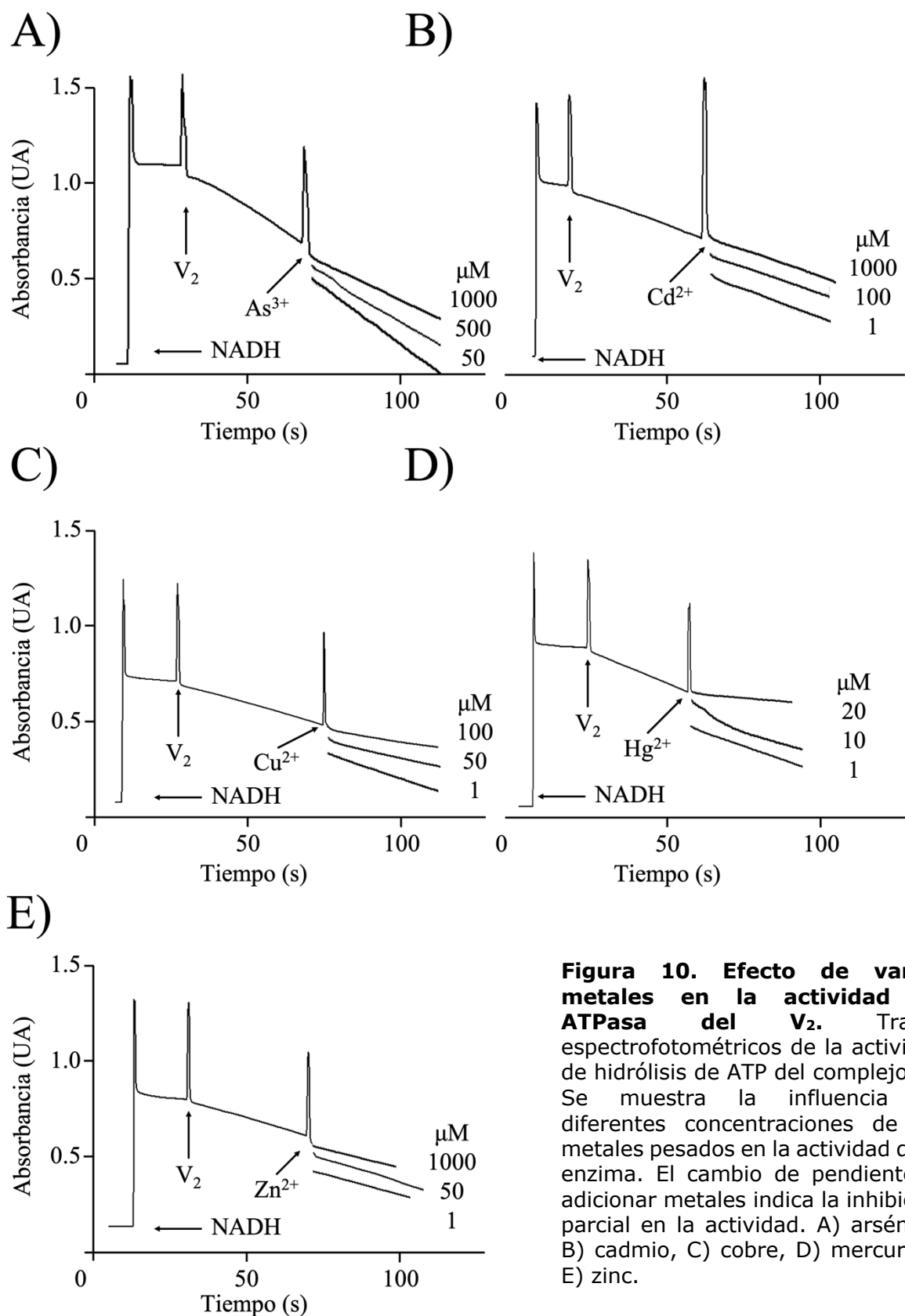


Figura 10. Efecto de varios metales en la actividad de ATPasa del V₂. Trazos espectrofotométricos de la actividad de hidrólisis de ATP del complejo V₁. Se muestra la influencia de diferentes concentraciones de los metales pesados en la actividad de la enzima. El cambio de pendiente al adicionar metales indica la inhibición parcial en la actividad. A) arsénico, B) cadmio, C) cobre, D) mercurio y E) zinc.



Ensayo espectrofotométrico del efecto de los metales en la actividad de ATPasa de las especies oligoméricas de la F_1F_0 -ATP sintasa.

Para determinar como afectan los metales pesados a la F_1F_0 -ATP sintasa, se probaron los siguientes metales: arsénico, cadmio, cobre, mercurio y zinc sobre la actividad de la enzima. En la figura 9, se muestra la actividad de hidrólisis de ATP por el monómero (V_1). En general, se agregó el NADH y debido a su coeficiente de extinción a 340 nm podemos ver una señal de alrededor de 0.8 UA.

Posteriormente, se adicionó la muestra, con lo cual comenzamos a ver la oxidación del NADH que es reflejo de la hidrólisis del ATP. A la pendiente inmediata a la adición de la enzima la llamaremos actividad inicial (V_0), después de tener una pendiente continua se adicionaron distintas concentraciones del metal y la pendiente resultante después de esa adición la llamaremos actividad residual (V) que en el caso de que la pendiente reduzca su magnitud será debido a una menor oxidación de NADH, por lo tanto, será la inhibición en la actividad de hidrólisis de ATP por el complejo V. En la figura 9, se muestran los trazos espectrofotométricos para el monómero en presencia de tres concentraciones distintas para cada metal; se puede observar el cambio en la magnitud de éstas dependiendo del metal. Para el arsénico (figura 9A) a una concentración de 1000 μM no se observa un cambio significativo en la magnitud de la pendiente después de la adición del metal;



sin embargo, con el zinc (figura 9E) a la misma concentración se observa un cambio de pendiente significativo, reflejado en una menor hidrólisis de ATP.

En las figuras 9B y 9D se presentan los trazos para cadmio y cobre, respectivamente, que a una concentración de 250 μM se observa que el cadmio tiene un ligero cambio de pendiente, sin embargo, para el cobre este cambio es más pronunciado, tendiendo completamente a la inhibición de la enzima, por otro lado, para el mercurio (figura 9D) se observa un cambio de pendiente similar al del cobre, pero a una concentración de 2 μM .

En la figura 10 se presentan de la misma forma los trazos espectrofotométricos del efecto de los metales pesados sobre la actividad del V_2 . Se puede observar que el dímero tiene una mayor resistencia a los metales comparado con el monómero; para el cadmio (figura 10B) a una concentración de 2000 μM no hay un cambio significativo en la actividad residual con respecto a la actividad inicial; así mismo, con el zinc (figura 10E) el dímero no presenta una diferencia significativa entre las dos actividades de hidrólisis a una concentración de 1000 μM . Para el arsénico (figura 10A) a la misma concentración de 1 mM se percibe un ligero cambio de pendiente, sin embargo, este cambio no refleja un cambio bioquímicamente importante



debido a que se conserva gran parte de la actividad de ATPasa de la enzima y la concentración utilizada para producir este cambio es muy grande.

En presencia de cobre (figura 10C; 80 μM) se observa un cambio significativo en la pendiente, por lo cual el cobre se comporta como un elemento más agresivo para esta enzima. Finalmente, para el mercurio (figura 10D) observamos que a una concentración de 20 μM la magnitud de la pendiente, en comparación con la pendiente inicial cambia drásticamente, indicando en mayor medida, la inhibición de la enzima.

Estabilidad de la actividad de hidrolisis de ATP del V_1 y del V_2 de la F_1F_0 -ATP sintasa frente a metales pesados.

Para estudiar la estabilidad de la actividad de ATPasa se realizaron diferentes ensayos espectrofotométricos para cada metal en un intervalo de concentraciones desde 1 μM hasta 1 mM, obteniendo esta colección de puntos y pendientes, antes y después de la adición de cada concentración de metal (ver figuras 8 y 9).

Al analizar las curvas dosis-respuesta se encontraron diferencias tanto entre especies oligoméricas como en el tipo de metal involucrado. Podemos observar en la figura 11 que en presencia de arsénico el dímero del complejo



V presenta una resistencia mayor que el monómero ya que a una concentración de 1 mM del metal libre en solución, la actividad de hidrólisis de ATP de la F_1F_0 -ATP sintasa no se ve disminuida; mientras que para el monómero a una concentración de $10 \mu\text{M}$ la actividad se vio disminuída un 50% y a una concentración de 1 mM de arsénico la actividad disminuyó cerca del 70%.

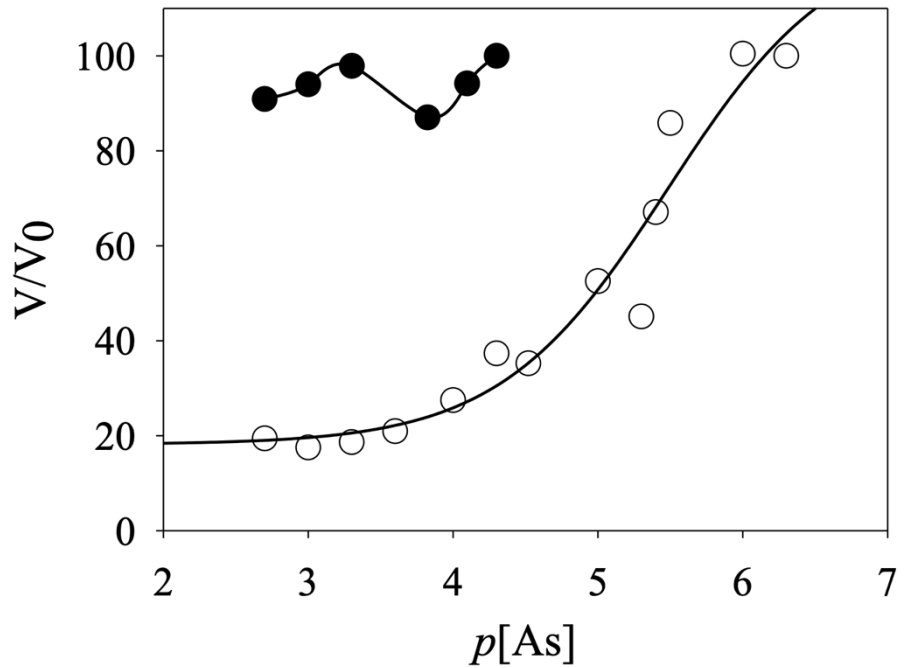


Figura 11. Actividad residual de ATPasa en presencia de arsénico. Comparación de la actividad residual del monómero (círculos vacíos) contra el dímero (círculos rellenos). Del ajuste de los datos al modelo sigmoide se obtuvo un valor para la IC_{50} de $10 \mu\text{M}$ para el monómero, mientras que el dímero no fue afectado.

Al observar la figura 12, podemos notar una diferencia significativa entre la respuesta del monómero y el dímero ante el cadmio; mientras que para el monómero se requirió una concentración de $76 \mu\text{M}$ para disminuir la actividad a la mitad, el dímero requirió 2.4 mM del metal. Esto indica una diferencia



significativa en la sensibilidad de ambas especies oligoméricas al mismo metal.

En la figura 13 observamos que con el cobre se presenta una diferencia en la estabilidad de ambas especies oligoméricas. Se calculó para el monómero una IC_{50} de $23 \mu M$ y para el dímero de $74 \mu M$, con esto podemos observar que a pesar de que para este metal existe también una diferencia entre la respuesta entre especies oligoméricas, la IC_{50} se encuentra en el mismo orden de magnitud a diferencia del cadmio (figura 12).

Así mismo en (figura 14) la curva de dosis respuesta en presencia de mercurio, es evidente que a pesar de que existe una diferencia entre el valor de IC_{50} del dímero ($11 \mu M$) y monómero ($2 \mu M$) ambos requieren una concentración

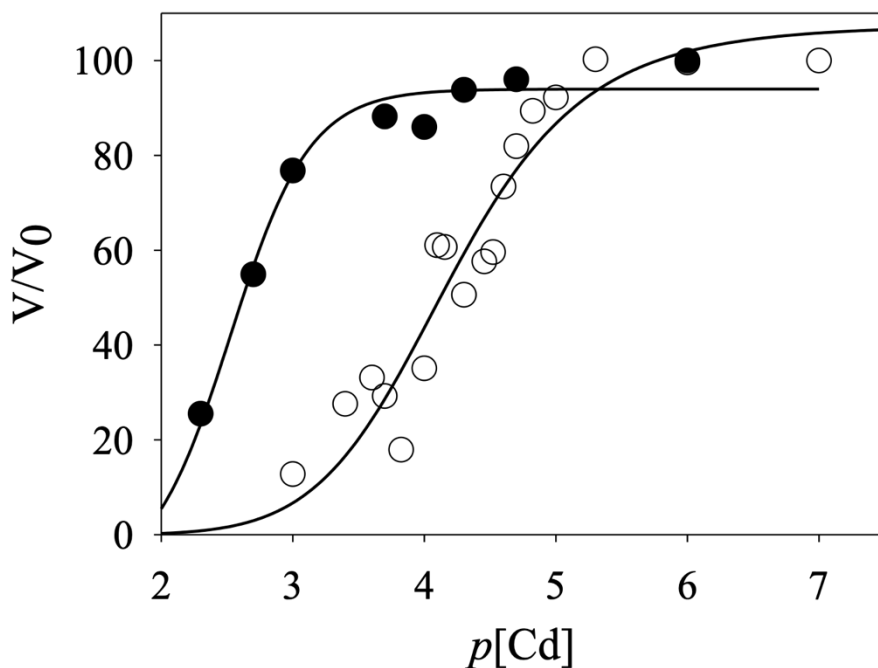
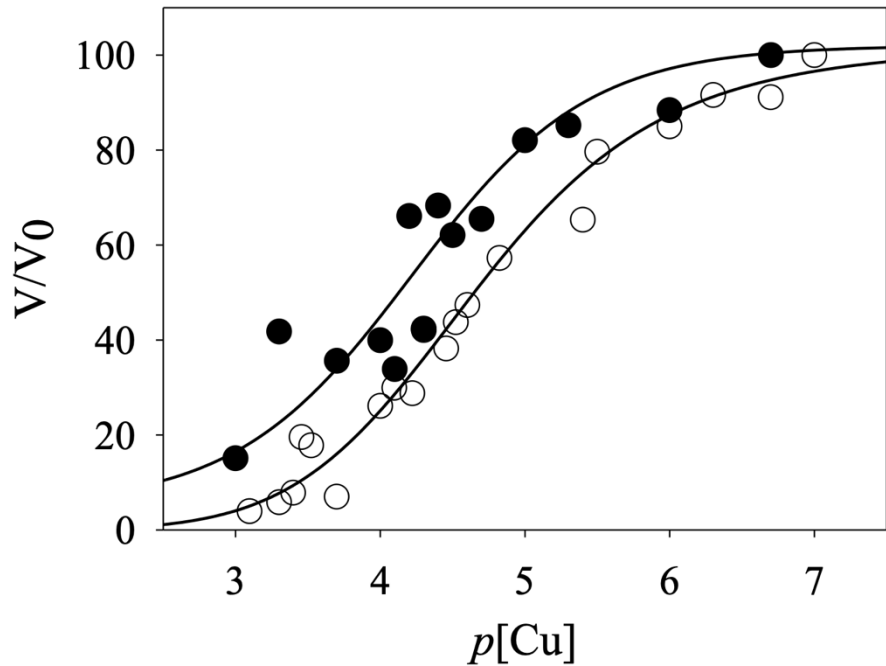


Figura 12. Actividad residual de ATPasa en presencia de cadmio. Comparación de la actividad residual del monómero (círculos vacíos) contra el dímero (círculos rellenos). Del ajuste de los datos al modelo sigmoideo se obtuvo un valor para la IC_{50} de $76 \mu M$ para el monómero y $2.4 mM$ para el dímero.



extremadamente
pequeña para inhibir
su actividad en un
cincuenta por ciento,
lo que sugiere que el
mercurio es el metal
más agresivo para la
F₁F₀-ATP sintasa.



En la figura 15 se
muestra la curva de la
actividad residual en
presencia de zinc. Se

Figura 13. Actividad residual de ATPasa en presencia de cobre. Comparación de la actividad residual del monómero (círculos vacíos) contra el dímero (círculos rellenos). Del ajuste de los datos al modelo sigmoideo se obtuvo un valor para la IC₅₀ de 23 μM para el monómero y 74 μM para el dímero.

puede observar que del mismo modo que con los otros metales, existe una diferencia entre la sensibilidad del monómero y del dímero, sin embargo, estos valores se encuentran en el intervalo mM para ambas especies oligoméricas; de hecho, a la concentración de 1 mM el dímero únicamente redujo su actividad en un 25%, mientras que el monómero disminuye el 50% su actividad. En la tabla 9, se presenta la compilación de las IC₅₀ del dímero y del monómero para cada metal.



Dependencia del crecimiento de células de Ustilago maydis en presencia de metales pesados.

Para estudiar el efecto de los metales pesados en el crecimiento en las células de nuestro modelo experimental, se realizaron diluciones seriadas, (figura 16).

Podemos observar que con arsénico (figura 16A), cadmio (figura 16B) y zinc (figura 16E) no existe efecto en el crecimiento del cultivo celular incluso a una

concentración de 1 mM ya que a pesar de que tengamos la máxima dilución y la mayor concentración de metal aun se aprecia un poco de crecimiento celular. Sin embargo, para el cobre (figura 16C) observamos que si hay una dependencia directa del crecimiento con la concentración de metal, en la primera columna en donde no existe dilución se puede apreciar que hay una ligera disminución en el crecimiento conforme se incrementa la concentración de metal, se puede observar este patrón en cada concentración

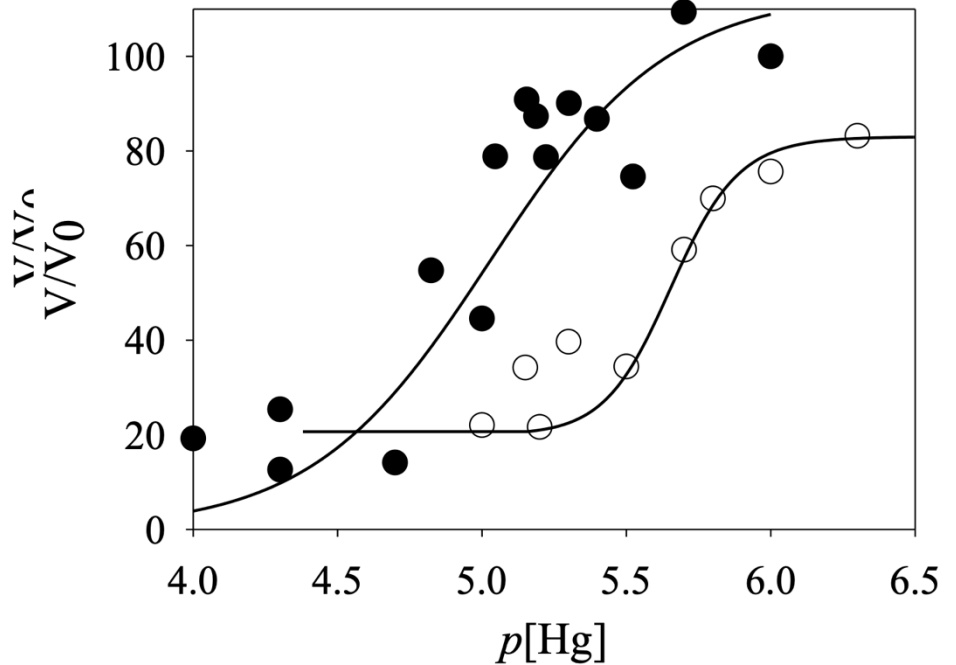


Figura 14. Actividad residual de ATPasa en presencia de mercurio. Comparación de la actividad residual del monómero (círculos vacíos) contra el dímero (círculos rellenos). Del ajuste de los datos al modelo sigmoideo se obtuvo un valor para la IC_{50} de 2 μM para el monómero y 11 μM para el dímero.



y en cada dilución y al observar la fila en la que tenemos la concentración de 1 mM en el cultivo solamente se aprecia crecimiento cuando no hay dilución y a partir de las siguientes diluciones se ve completamente detenido el crecimiento celular.

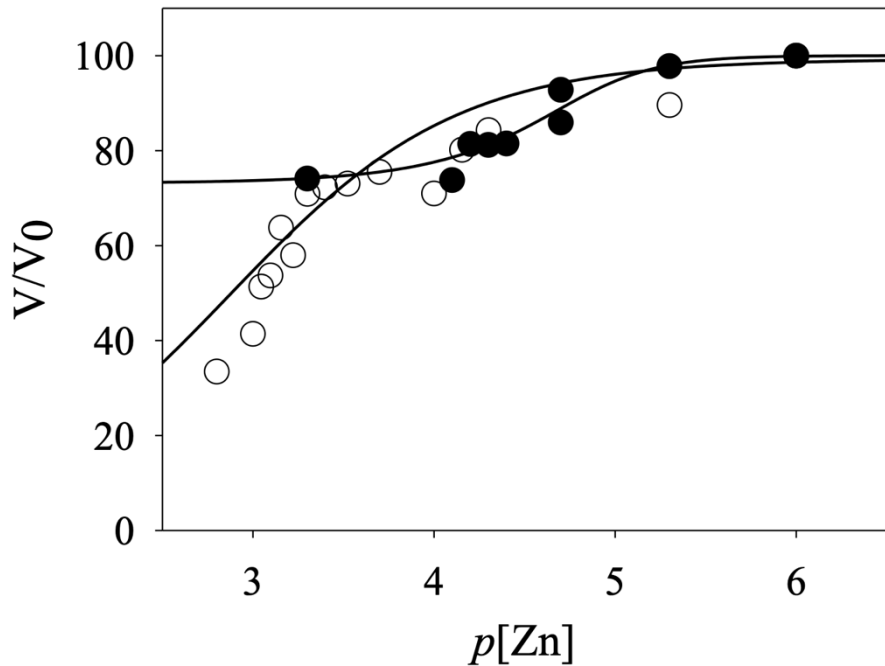


Figura 15. Actividad residual de ATPasa en presencia de zinc. Comparación de la actividad residual del monómero (círculos vacíos) contra el dímero (círculos rellenos). Del ajuste de los datos al modelo sigmoideo se obtuvo un valor para la IC_{50} de 1.3 mM para el monómero, mientras que el cambio en la actividad para el dímero fue marginal. La línea en este último caso no refleja un ajuste formal.

De la misma forma, en la figura 16D se observa una eventual dependencia del crecimiento con la concentración de mercurio presente, mientras que para los otros metales aun se podía observar crecimiento en la primera columna sin dilución a concentración de 1 mM; para el mercurio basta una concentración de 50 μ M para detener completamente el crecimiento celular. Sin embargo, al comparar las concentraciones utilizadas para detener



Tabla 9. IC₅₀ de cada metal para cada especie oligomérica. Valores de las concentraciones de metal, a las cuales tanto el dímero como el monómero reducen a un 50% su actividad de hidrolisis de ATP.

Metal	Radio iónico (pm)	IC ₅₀ (μM)	
		Monómero	Dímero
Cobre	71	23	74
Arsénico	72	10	> 1000
Zinc	88	> 1000	> 1000
Cadmio	109	76	>1000
Mercurio	110	2	11

el crecimiento celular en las diluciones seriadas, no observamos una relación directa con las IC₅₀ calculadas con excepción del mercurio. Con base a estos resultados podemos inferir que el mercurio es el metal más agresivo para *Ustilago maydis* ya que detuvo completamente el crecimiento celular y que no existe una relación directa entre el crecimiento celular y las IC₅₀ calculadas para la F₁F₀-ATP sintasa en sus formas oligoméricas, lo que podría estar indicando que los metales pesados detienen el crecimiento celular por un mecanismo diferente a la inhibición del complejo V.



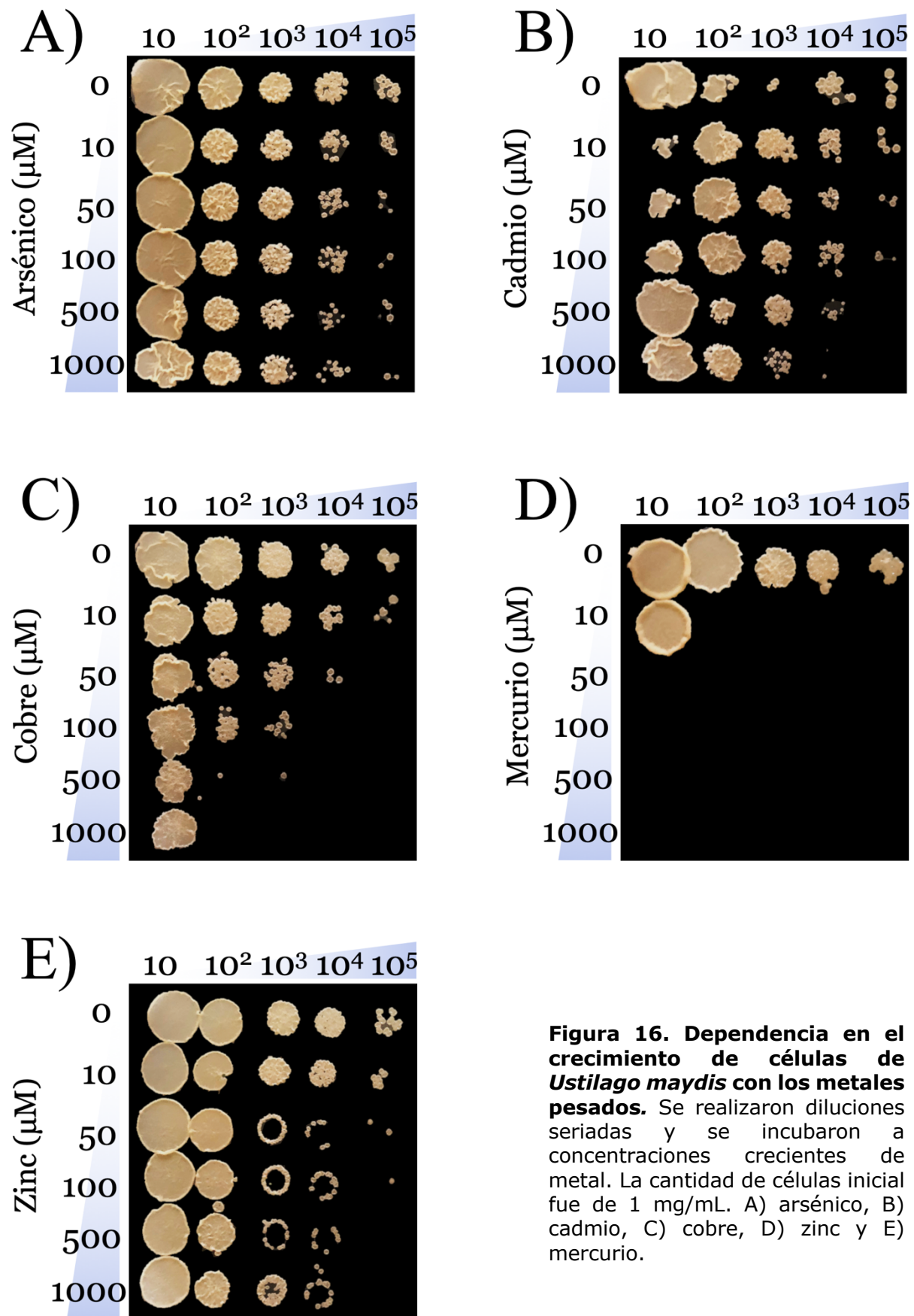


Figura 16. Dependencia en el crecimiento de células de *Ustilago maydis* con los metales pesados. Se realizaron diluciones seriadas y se incubaron a concentraciones crecientes de metal. La cantidad de células inicial fue de 1 mg/mL. A) arsénico, B) cadmio, C) cobre, D) zinc y E) mercurio.



Efecto de la dilución de los metales pesados en la actividad residual de ATPasa de la F_1F_0 -ATP sintasa.

Con el objetivo de entender qué tipo de interacción se estaba llevando a cabo entre los cationes de metales pesados y la F_1F_0 ATP sintasa, se realizaron experimentos en los cuales el metal se diluyó por lo menos diez veces antes de determinar la actividad de ATPasa (figura 17). Los resultados mostrados en las tablas 10 y 11 indican que cuando la enzima se incubaba en presencia de una concentración de metal mayor que la IC_{50} ($[M] > IC_{50}$), la enzima muestra una actividad residual baja; al hacer la dilución del metal (1:10) la enzima se reactiva, recuperando en algunos casos hasta el 80% de la actividad residual.

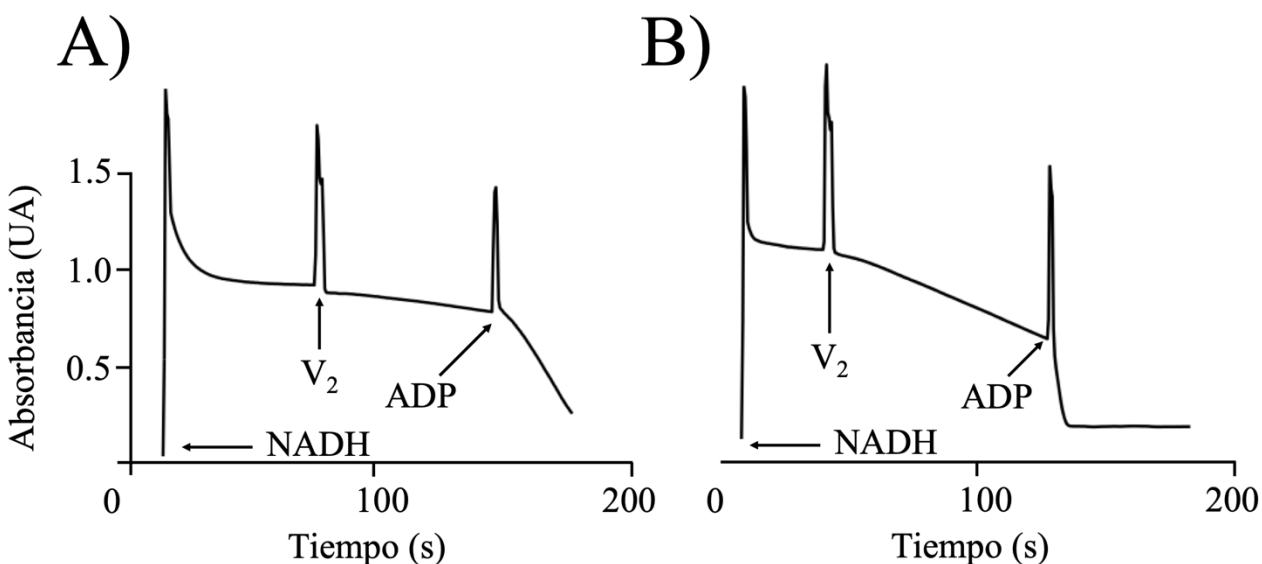


Figura 17. Trazos espectrofotométricos representativos de la dilución del metal.

La celda en la que se llevo a cabo el ensayo del panel A) contenía 100 μ M de cobre al momento de adicionar el V₂, por lo cual, no hay dilución y no se reactiva la enzima, en el panel B) el metal se diluyo con relación 1:10 y se observa la recuperación en la actividad de ATPasa de la enzima.



De esto surge como hipótesis que la interacción entre los cationes y la enzima podría ser mediante un enlace débil con algunos residuos importantes para el funcionamiento de la F_1F_0 -ATP sintasa. De tal forma, que la dilución rompa la interacción débil y permita de nuevo el funcionamiento de la enzima restableciendo su actividad de hidrólisis de ATP.

Tabla 10. Actividades residuales del monómero en la actividad de ATP sintasa cuando existe una dilución. Se muestran las actividades residuales de ATPasa con un tratamiento previo en presencia de metales pesados a las concentraciones indicadas y la actividad residual de la enzima después de una dilución 1:10 de los metales.

Concentración de incubación con metales	Actividad residual	
	Tratamiento	Dilución 1:10
Arsénico (1 mM)	0.18	0.80
Cadmio (400 μ M)	0.16	0.59
Cobre (100 μ M)	0.28	0.69
Mercurio (5 μ M)	0.21	0.49
Zinc (1 mM)	0.43	0.58



Tabla 11. Actividades residuales del dímero en la actividad de ATP sintasa cuando existe una dilución. Se muestran las actividades residuales de ATPasa con un tratamiento previo en presencia de metales pesados a las concentraciones indicadas y la actividad residual de la enzima después de una dilución 1:10 de los metales.

Concentración de incubación con metal	Actividad residual	
	Tratamiento	Dilución 1:10
Arsénico (1 mM)	1.05	1.81
Cadmio (1 mM)	0.86	1.23
Cobre (200 µM)	0.39	0.78
Mercurio (10 µM)	0.18	1.10
Zinc (1 mM)	0.51	1.03



Discusión

La F_1F_0 -ATP sintasa es responsable de más del 90% del aporte energético celular, la capacidad de formar oligómeros de este complejo tiene un impacto que se refleja en una mayor eficiencia energética. La capacidad de poder aislar sus especies oligoméricas principales, V_1 y V_2 en una forma soluble y estable como se muestra en la figura 7, nos abre la posibilidad de estudiar las diferencias tanto estructurales como bioenergéticas entre estos dos oligómeros del complejo V. Al analizar la respuesta que tiene esta enzima frente a los metales pesados, encontramos que existe una clara diferencia entre la dependencia en la actividad de hidrólisis de ATP para cada oligómero.

La inhibición provocada por los metales pesados tiene un comportamiento distinto en el dímero en comparación con el monómero. El dímero es menos sensible a la inhibición por los metales, ya que tiene una menor pérdida de actividad en la curva dosis-respuesta. Con base en estos experimentos de resistencia a los metales pesados pudimos observar una peculiaridad interesante con el cadmio, de todos los metales que se analizaron el Cd^{2+} es el metal el cual tiene la diferencia más grande en cuanto a los valores de IC_{50} entre monómero y dímero, mientras que para el monómero la



IC₅₀ es de 76 μM, el dímero es resistente a una concentración mayor que 1 mM conservando más del 80% de su actividad de hidrólisis. Debido a esto podemos sugerir la resistencia al cadmio como un método de identificación entre el dímero y el monómero, es decir, si en una muestra de F₁F₀-ATP sintasa se desconoce el estado oligomérico

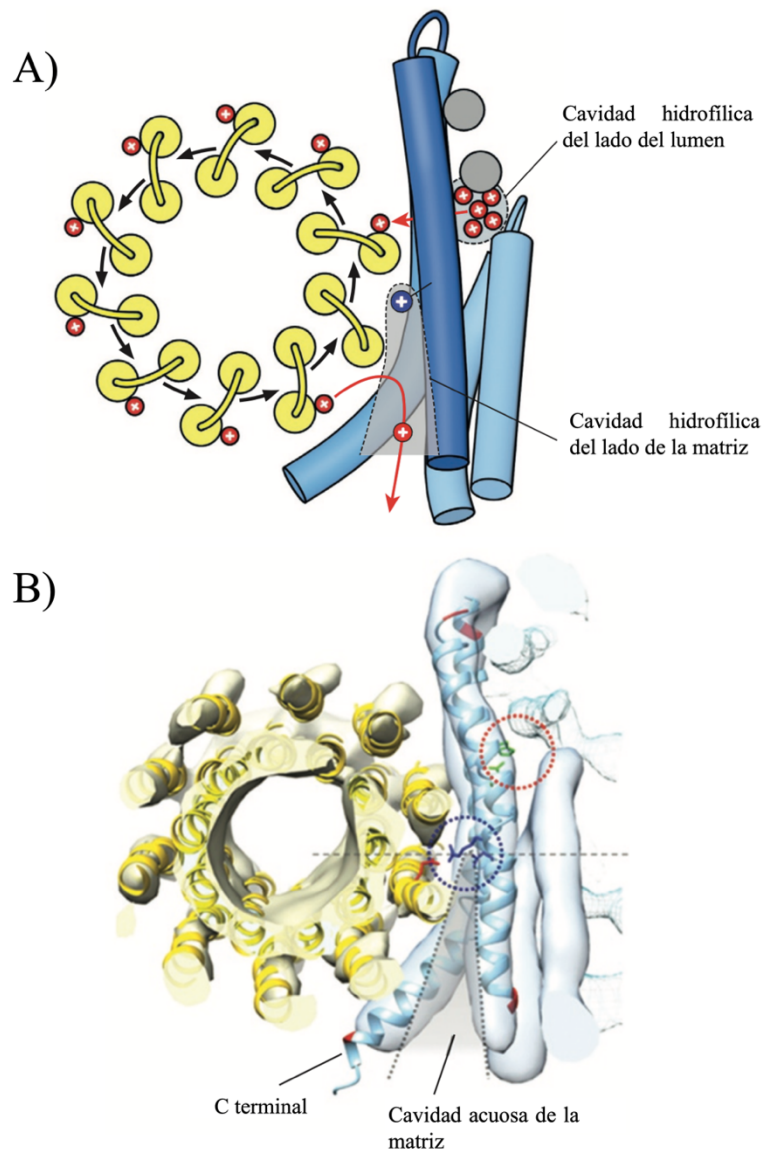


Figura 18. Modelo estructural de la interfase entre las subunidades a/c. A) Translocación de protones a través de la F₁F₀-ATP sintasa. Los protones (rojo) se unen al glutamato en la subunidad c a través del hemicanal luminal acuoso (círculo gris discontinuo). El protón compite con el residuo R-239 de la subunidad a (azul) estrictamente conservado en los organismos por la interacción con los glutamatos del anillo c, que transportan el protón alrededor del anillo. Cuando la subunidad c se aproxima al hemicanal hidrofílico en el lado de la matriz (contorno gris discontinuo), el glutamato se hidrata y adopta una conformación abierta, desde la cual el protón puede escapar a la matriz. Los círculos grises sólidos indican hélices transmembranales. B) Vista matricial del anillo c (amarillo PDB 3U2Y7) y del carbono terminal de la subunidad a con hélices transmembranales. Los círculos punteados en azul y rojo indican las posiciones aproximadas de los pares de residuos a-R-239 / aQ295 (azul) y aE288 / aH248 (verde). El contorno gris punteado marca la cavidad matricial acuosa c (modificado de Allegretti *et al.*, 2015).



presente), es inhibida a una concentración aproximada de 200 μM de cadmio nos estaríamos refiriendo a la especie monomérica mientras que si a la misma concentración la actividad permanece sin cambio nos estaríamos refiriendo a la especie dimérica.

Para tratar de explicar la sensibilidad de los oligómeros en presencia de los metales pesados y su disminución en la actividad de hidrólisis, se realizaron ensayos de dilución para determinar el tipo de interacción entre el metal y la enzima. Los ensayos de dilución (tabla 10 y 11) demostraron que sin importar la especie metálica utilizada ni el valor de la IC_{50} para los oligómeros del complejo V, las enzimas recuperan en su totalidad la actividad de hidrólisis, por lo tanto, se deduce que los metales y la enzima tienen una interacción débil, lo cual, provoca un cambio momentáneo en el complejo V impidiendo así la hidrólisis de ATP. Por el otro lado, al observar el comportamiento de la enzima ante la dilución de los metales (incluso los más agresivos) suponemos que la interacción debe ser temporal, desplazable mediante el equilibrio químico y que permita que la F_1F_0 -ATP sintasa conserve su estructura, que se comprueba por su sensibilidad a la oligomicina, lo cual concuerda con su posible integridad y funcionamiento. Por el otro lado, para demostrar que la formación de un complejo metal-ATP pudiera estar compitiendo como sustrato en la actividad de ATPasa se comparó el logaritmo de las constantes de formación a 20°C para cada metal, las constantes del



cobre y zinc son de 5.82 y 4.75 respectivamente (Sillén, L. G., Martell, A. E. 1971), comparado con la constante del magnesio de 3.84. Por lo cual, en una disolución con una concentración de 5 mM de ATP, 6 mM de magnesio, 100 μ M de cobre y 1 mM de zinc, la cantidad de complejo Mg-ATP sería de 207 mM mientras que para Cu-ATP y Zn-ATP sería de 330 mM y 281 mM respectivamente, de esta forma los complejos Cu-ATP y Zn-ATP podrían competir como sustrato para la actividad de la enzima disminuyendo así la actividad de hidrolisis. Las constantes de formación para los cationes As^{3+} , Cd^{2+} y Hg^{2+} no se encontraron en la literatura.

El estudio estructural reportado para el complejo V de otros organismos permite sugerir algunos residuos de aminoácidos que pueden estar involucrados en el efecto de los metales pesados. Según lo reportado por (Angevine *et al.*, 2007) en *E. coli*, el residuo Asp-61 es mediante el cual se lleva a cabo la protonación y desprotonación de cada subunidad c, pasando por un estado estacionario en la subunidad a al momento de su rotación; este residuo está ubicado en el centro de la segunda hélice transmembranal (TMH2) de la subunidad c. Se ha propuesto que la rotación de la subunidad c es mediante el transporte de protones en una interfase formada entre a/c. Se sabe que la subunidad a está plegada formando cinco helices transmembranales (TMH's), mientras que la subunidad c tiene dos TMH's, la TMH4 de la subunidad a se encuentra empaquetada paralelamente con la



TMH2 de la subunidad c y se piensa que el residuo conservado a-Arg-210 es crítico para el ciclo de protonación-desprotonación de c-Asp-61 debido a que la interacción de estos residuos incrementa el pka del c-Asp-61 facilitando su protonación (figura 18A).

Se sabe que hay varias cisteínas en las hélices transmembranales de las subunidades a y c y que su reactividad difiere entre ellas. Mediante algunos reactivos como el NEM y la Ag^+ , que reaccionan preferentemente con la forma tiolato de las cisteínas, se descubrió que existen dos regiones acuosas accesibles en los segmentos transmembranales de la subunidad a. La primera región consiste en un lado de la TMH4 que se extiende hacia el residuo Asn-214 y Arg-210 cerca del centro de la superficie citoplasmática de la membrana; la segunda región se ubica en la cara opuesta al lado periplasmático superficial de TMH4 y se extiende al centro de la superficie periplasmática membranaral de TMH2 y TMH5 (figura 18B).

También, se demostró que la adición de Ag^+ , con un radio iónico similar al Na^+ y H_3O^+ , afecta a algunos aminoácidos presentes en estas regiones acuosas lo que repercute en una inhibición en la síntesis de ATP dirigida mediante traslocación de protones (Angevine *et al.*, 2007).



Así mismo se ha propuesto que el cadmio a una concentración de 300 μM produce una inhibición similar a la Ag^+ en los residuos de los canales acuosos antes mencionados (Steed P. y Fillingame R., 2013), se sugiere que existen dos tipos de inhibición por estos metales a la F_1F_0 -ATP sintasa; un tipo de inhibición la cual no permite el restablecimiento de la actividad de la enzima, que se lleva a cabo mediante la ruptura de la unión entre el sector catalítico F_1 y el sector hidrofóbico F_0 , de tal forma que a pesar de retirar los metales del medio, la modificación es permanente lo que no permite la hidrólisis de ATP. Por el otro lado, se sugiere una inhibición que bloquea la translocación de protones impidiendo así la rotación de la subunidad c, se ha observado que al agregar agentes quelantes de metales como el ditioneitol (DTT) o β -mercaptoetanol (β -MSH) la enzima recupera completamente su actividad. Con base a los experimentos realizados de dilución de los metales en los que observamos el restablecimiento de la actividad de hidrólisis de ATP, se propone a estos canales acuosos como el sitio probable de inhibición por los metales pesados utilizados en este proyecto.

Es por ello, que sugerimos a los metales pesados como elementos que interactúan en los canales acuosos de las TMH's, con los residuos sensibles dentro de estas hélices, dado que la inhibición observada en la actividad de hidrólisis de la F_1F_0 -ATP sintasa por los metales pesados sea mediante el bloqueo en la traslocación de protones impidiendo que se genere la rotación



de la subunidad c y a su vez que el sector catalítico F_1 no pueda realizar la hidrólisis de ATP. Sin embargo, continúa sin esclarecerse la razón por la que algunos metales son más agresivos que otros, ya que no se encontró un patrón que relacione alguna característica fisicoquímica de los cationes metálicos con la concentración de inhibición media de los oligómeros. Por ejemplo, se pensaría que, al interactuar con los residuos involucrados en el sitio de traslocación de protones, los cationes más reactivos serían los que tendrían una mayor inhibición al reaccionar de manera más fuerte, sin embargo, debido a las diversas propiedades fisicoquímicas de los cationes metálicos, se requerirían mayores estudios para determinar cual característica pueda estar relacionada con este tipo de comportamiento.

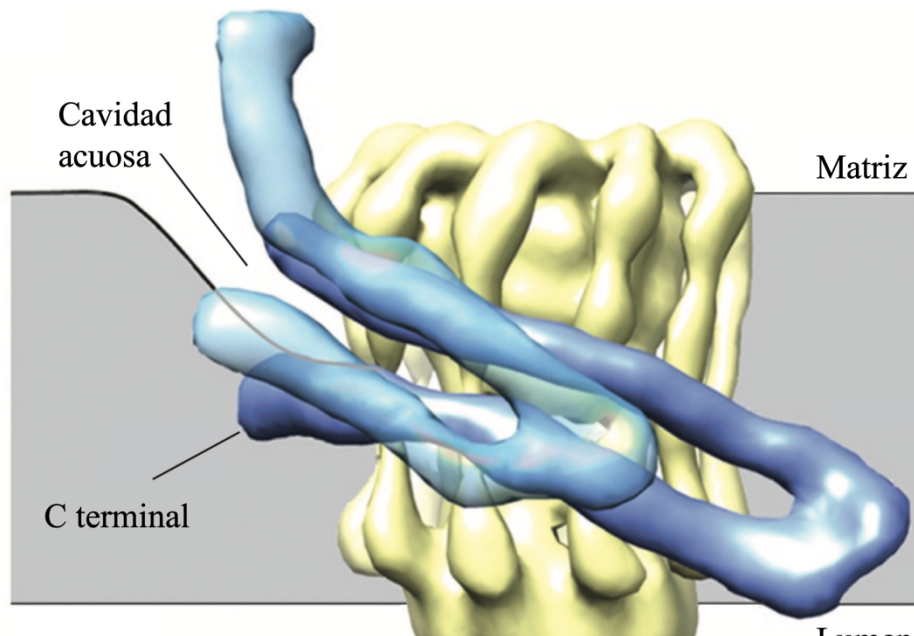


Figura 19. Estructura de la subunidad a. Hélices transmembranales de la subunidad a (azul) y el anillo rotor de c_{10} (amarillo). Modelo visto desde la interfase del dímero. Dado que se muestra solamente la estructura de un monómero desde la zona dimerizante, al colocar la estructura complementaria del otro monómero, provocaría impedimento estérico y restringiría el acceso a los canales acuosos de la interfase a/c (modificado de Allegretti *et al.*, 2015).



Por el otro lado, si el mecanismo de inhibición por los metales en la actividad de hidrólisis de ATP fuera el mismo que para la Ag^+ y el Cd^{2+} (Steed P. y Fillingame R., 2013) la divergencia en el comportamiento entre ambas especies oligoméricas podría deberse a la diferencia estructural de estas especies, el V_1 no posee subunidades dimerizantes e y g, por lo cual, podría ser la zona dimerizante, en la región F_0 , la que este involucrada en el mecanismo de inhibición diferencial entre dímero y monómero, dado que, el dímero al presentar estas subunidades dimerizantes y al formar el ángulo $\approx 90^\circ$ entre ambos monómeros, podría limitar el acceso a los hemicanales debido a la conformación espacial de nuevas subunidades y un mayor recubrimiento lipídico de esta zona membranal (figura 19).



Alineamiento múltiple de secuencias

Subunidad ATP9 (c)

<i>E. coli</i>	1	MENLNMDLLY	MAAAVMMGLA	AIGAAIGIGI	LGKGFLEGAA	RQPDLIPLLR
<i>U. maydis</i>	1	---MLAAAKY	IGSGVAA-LG	LIGAGIGVGI	VFAALIQQVS	RNPSLRGQLF
<i>S. cerevisiae</i>	1	-MQLVLAAKY	IGAGIST-IG	LLGAGIGIAI	VFAALINGVS	RNPSIKDTVF
<i>B. taurus</i>	1	---IDTAAKF	IGAGAAT-VG	VAGSGAGIGT	VFGSLIIGYA	RNPSLKQQLF
		:	:	:::	::	*:.*: : . : : * : *:*: : :
<i>E. coli</i>	51	TQFFIVMGLV	DAIPMIAVGL	GLYVMFAVA		
<i>U. maydis</i>	51	TYAILGFALS	EATGLFALMV	SFLLLYS--		
<i>S. cerevisiae</i>	51	PMAILGFALS	EATGLFCLMV	SFLLLFV-		
<i>B. taurus</i>	51	SYAILGFALS	EAMGLFCLMV	AFLILF---		
		.	:: : : *	: *	: : : : :	: : : :

Subunidad ATP6 (a)

<i>E. coli</i>	1	MASENMTPQD	YIGHHLNNLQ	LDLRTFSLVD	PQNPPATFWT	INIDSMFFSV
<i>U. maydis</i>	1	-----	-MAFLIHSPL	EQFEVTS LIS	LNLPLVGYIN	LSLTNLGLYT
<i>S. cerevisiae</i>	1	-----MFN	LLNTYITSPL	DQFEIRTLFG	LQSSFIDLSC	LNLTTFSLYT
<i>B. taurus</i>	1	-----	-----	-----	-----	--ITPVILGL
						: . :
<i>E. coli</i>	51	VLGLLFLVLF	RSVAKKATSG	VPGKFQTAIE	LVIGFVNGSV	KDMYH-GKSK
<i>U. maydis</i>	51	ILTVYLV LAL	HIMGSNKQL	IPSRWSIALE	SSFASVHGLV	KSQIG-AAANE
<i>S. cerevisiae</i>	51	IIVLLVITSL	YTLTNNNNKI	IGSRWLISQE	AIYDTIMNMT	KGQIGGKNWG
<i>B. taurus</i>	51	PLVTLIVLFP	SLLFPTS NRL	VSNRFVTLQQ	WMLQLVSKQM	MSIHN-SKGQ
		:	::	:	. .	: : : : :
<i>E. coli</i>	101	LIAPLALTIF	VWVFLMNLMD	LLPIDLLPYI	AEHVLGLPAL	RVVPSADVNV
<i>U. maydis</i>	101	MYLPFIYSLF	FFILIANLSG	NVPYGFT---	-----	---VATSIMV
<i>S. cerevisiae</i>	101	LYFPMIFTLF	MFIFIANLIS	MIPYSFA---	-----	---LSAHLVF
<i>B. taurus</i>	101	TWTLMLMSLI	LFIGSTNLLG	LLPHSFT---	-----	---PTQLSM
		:	:::	:::	** .	:* : :
<i>E. coli</i>	151	TLSMALGVFI	LILFYSIKMK	GIGGFTKELT	LQPFNHWAFI	PVNLILEGVS
<i>U. maydis</i>	151	SIGLSMTIFI	GVTILGLRLH	KVHFFSFFVP	SG--TPLGLV	PLLVP IELIS
<i>S. cerevisiae</i>	151	IISLSIVIWL	GNTILGLYKH	GWVFFSLFVP	AG--TPLPLV	PLLVI IETLS
<i>B. taurus</i>	151	NLGMAIPLWA	GAVITGFRNK	TKASLAHFLP	QG--TPTPLI	PMLVI IETIS
		: : : : :	:	: :	:	: : .
<i>E. coli</i>	201	LLSKPVSLGL	RLFGNMYAGE	LIFIL IAGLL	P-----	---WWSQWIL
<i>U. maydis</i>	201	YLARAFSLGV	RLFANVTAGH	VLMKILAGFL	APLFTSTFII	SVLTVLPII
<i>S. cerevisiae</i>	201	YIARAI SLGL	RLGSNILAGH	LLMVILGGLT	FNFM LINLFT	FVFGFVPLAM
<i>B. taurus</i>	201	LFIQPMALAV	RLTANITAGH	LLIHLIGGAT	LALMSISTTT	ALITFTILIL
		: : : : * : :	** .	*: *	: : : : *	:
<i>E. coli</i>	251	NVPWAIFHIL	IITLQAFIFM	VLTIVYLSMA	SEEH	
<i>U. maydis</i>	251	FTGIIGLEIA	VSFIQAYVFC	VLTCSYLKDA	IDLH	
<i>S. cerevisiae</i>	251	ILAIMMLEFA	IGIIQGYVWA	ILTASYLKDA	VYLH	
<i>B. taurus</i>	251	LT---ILEFA	VAMIQAYVFT	LLVSLYLHDN	T---	
		: :	:	: * : : :	: *	**



Para determinar si los residuos (a-R-210 y c-D-61) responsables de la translocación de protones en *E. coli* estaban conservados en algunos otros organismos, se realizó el alineamiento múltiple de secuencias, comparando las subunidades a y c de *E. coli* con *U. maydis*, *S. cerevisiae* y *B. taurus* (ver arriba).

Observamos que el residuo responsable de la protonación-desprotonación en la subunidad c (Asp-61) en *E. coli* es uno diferente para el resto de los organismos, sin embargo, el aminoácido que poseen (ácido glutámico) es de la misma familia que el ácido aspártico, por lo cual tiene la misma propiedad de poder protonarse y desprotonarse con facilidad debido a que ambos son considerados ácidos o con carga negativa.

Por el otro lado el residuo a-R-210 y c-D-61 es conservado en todos los organismos lo cual apoya la hipótesis de que este residuo es importante para el ciclo de protonación-desprotonación del aspartato/glutamato mediante la interacción de estos dos aminoácidos y que genera la rotación de la subunidad c y así permite el correcto funcionamiento de la F_1F_0 -ATP sintasa en todos los organismos.



Conclusiones

La F_1F_0 -ATP sintasa es una enzima de mucha importancia debido al aporte energético que brinda al organismo y por su funcionalidad estructural para la mitocondria, un mal funcionamiento de esta enzima repercute en procesos metabólicos esenciales, sin los cuales cualquier organismo podría morir.

Es claro que las especies oligoméricas V_1 y V_2 presentan muchas diferencias bioenergéticas y estructurales tales como; actividad de hidrólisis de ATP, afinidad a sustrato, constante de inhibición a oligomicina, velocidad máxima de actividad y una diferente conformación estructural en la membrana interna mitocondrial (Esparza-Perusquía *et al.*, 2017). Aunado a estas diferencias se encontró que las especies oligoméricas de complejo V presentan un comportamiento distinto frente a los metales pesados, siendo el V_1 más sensible que el V_2 . Ambas especies tienen un comportamiento sigmoideal dosis-respuesta con concentraciones medias de inhibición para el arsénico de 10 μM y mayor a 1 mM; para el cadmio de 76 μM y mayor a 1 mM; para el cobre de 23 μM y 74 μM ; para el mercurio de 2 μM y 11 μM y para el zinc, mayor a 1 mM y mayor a 1 mM, para monómero y dímero respectivamente en cada caso. Así mismo, se observó que los metales pesados influyen en el crecimiento celular de *Ustilago maydis*, en su forma levaduriforme.



Se observó que la inhibición por metales pesados es reversible mediante un desplazamiento químico, lo cual restablece en su totalidad la actividad de ATPasa del complejo V, proponiendo al sitio de traslocación de protones como el más probable para la inhibición por estos metales.



Perspectivas

- Elucidar la estructura tridimensional del complejo V en su forma monomérica y dimérica para *Ustilago maydis* y determinar si existe alguna diferencia estructural entre las especies oligoméricas de forma que el dímero tenga mayor impedimento estérico para la inhibición por metales en los residuos de aminoácidos en la translocación de protones.
- Estudiar el mecanismo mediante el cual los metales inhiben el crecimiento celular y elucidar en qué organelos se distribuyen, siendo de principal interés si pueden los metales desplazarse a la mitocondria e inhibir a la F_1F_0 -ATP sintasa.



Bibliografía

- [1] Adiele, R., Stevens, D. y Kamunde, C., (2011). Cadmium- and calcium-mediated toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in vivo: interactions on fitness and mitochondrial endpoints. *Chemosphere*, 85:1604–1613.
- [2] Allegretti, M., Klusch, N., Mills, D., Vonck, J., Kühlbrandt, W. y Davies, K., (2015). Horizontal membrane-intrinsic α -helices in the stator α -subunit of an F-type ATP synthase. *Nature*, 521:237-240
- [3] Andrianaivomananjaona, T., Moune-Dimala, M., Herga, S., David, V. y Haraux, F., (2011). How the N-terminal extremity of *Saccharomyces cerevisiae* IF₁ interacts with ATP synthase: a kinetic approach. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1807(2):197-204.
- [4] Angevine, M., Herold K., Vincent O. y Fillingame R., (2007). Aqueous access pathways in ATP synthase subunit a. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(12):9001-9007
- [5] Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R. y Schagger H., (1998). Yeast mitochondrial F₁F₀-ATP synthase exist as a dimer. Identification of tree dimer- specific subunits. *The EMBO Journal*, 17:7171-7178.



- [6] Bo, S. y Xu, Z., (2006). Effects of cadmium on mitochondrion structure and energy metabolism of *Pelteobagrus fulvidraco* gill. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 17(7):1213–1217.
- [7] Cabezón, E., Arechaga, I., Jonathan, P., Butler, G. y Walker, J., (2000). Dimerization of bovine F1-ATPase by binding the inhibitor protein, IF1. *The Journal of Biological Chemistry*, 275:28353-28355.
- [8] Cabezón, E., Montgomery, M., Leslie, A., y Walker, J., (2003). The structure of bovine F1-ATPase in complex with its regulatory protein IF1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 10:744-750.
- [9] Campanella, M., Casswell, E., Chong, S., Farah, Z., Wieckowski, M., Abramov, A., Tinker, A. y Duchen, M., (2008). Regulation of Mitochondrial Structure and Function by the F₁F₀-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., Foguel, D., Cardol, P., Lapaille, M., Remacle, C., Wilkens, S. y González-Halphen, D., (2010). Subunitsubunit 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. y Remacle, C., (2005). The mitochondrial oxidative phosphorylation proteome of *Chlamydomonas reinhardtii* deduced from



- the Genome Sequencing Project. *Plant Physiology*, 137:447-489.
- [12] Couoh-Cardel, S., Uribe-Carvajal, S., Wilkens, S. y García-Trejo, J.J., (2010). Structure of dimeric F_1F_0 -ATP synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(47):36447-36455.
- [13] Davies, K., Anselmi, C., Wittig, I., Faraldo-Gómez, J. y Kühlbrandt, W., (2012). Structure of the yeast F_1F_0 -ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(34):13602-13607
- [14] Defo, A., Bernatchez, L., Cambell, P. y Couture, P., (2018). Temporal variations in kidney metal concentrations and their implications for retinoid metabolism and oxidative stress response in wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquatic Toxicology*, 202:26–35.
- [15] Díaz-Ruiz, R., Avaret, N., Araiza, D., Pinson, B., Uribe-Carvajal, S., Devin, A. y Rigoulet, M., (2008). Mitochondrial oxidative phosphorylation is regulated by fructose 1,6-bisphosphate. A possible role in Crabtree effect induction? *The Journal of Biological Chemistry*, 40:948-955.
- [16] Dienhart, M., Pfeiffer, K., Schagger, H. y Stuart, R., (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.



- [17] Diep, P., DenizEAU, F. y Jumarie, C., (2005). Kinetics of the early subcellular distribution of cadmium in rat hepatocytes. *Biometals*, 18:255–267.
- [18] Esparza-Perusquía, M., Olvera-Sánchez, S., Pardo, J.P., Mendoza-Hernández, G., Martínez, F. y Flores-Herrera, O., (2017). Structural and kinetics characterization of the F_1F_0 -ATP synthase dimer. New repercussion of monomer-monomer contact. *Biochimica et Biophysica Acta*, 12:975-981
- [19] Funes, S., Davidson, E., Claros, M., van Lis, R., Pérez-Martínez, X., Vázquez- Acevedo, M., King, M.P. y González-Halphen, D., (2002). The typically mitochondrial DNA-encoded ATP6 subunit of F_1F_0 -ATPase is encoded by a nuclear gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Journal of Biological Chemistry*, 277:6051-6058.
- [20] García, J.J., Morales-Ríos, E., Cortés-Hernández, P. y Rodríguez-Zavala, J.S., (2006). The inhibitory protein (IF₁) promotes dimerization of the mitochondrial F_1F_0 - ATP synthase. *Biochemistry*, 45(42):12695-12703.
- [21] Gu, J., Zhang, L., Zong, S., Guo, R., Liu, T., Yi, J., Wang, P., Zhuo, W. y Yang, M., (2019). Cryo-EM structure of mammalian ATP synthase tetramer bound with inhibitory protein IF1. *Science*, 364:1068-1075.
- [22] Guo, H., Bueler, S. A. y Rubinstein, J.L., (2017). Atomic model for the dimeric F_0 region of mitochondrial ATP synthase. *Science*, 358:936-



940.

- [23] Juárez, O., Guerra, G., Velázquez, I., Flores-Herrera, O., Rivera-Pérez, R.E. y Pardo, J.P., (2006). The physiologic role of alternative oxidase in *Ustilago maydis*. *The Federation of European Biochemical Societies Journal*, 273:4603-4615.
- [24] Jung, C., Higgins, C.M. y 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.
- [25] Letts, J. y Sazanov, L., (2017). Clarifying the supercomplex: the higher-order organization of the mitochondrial electron transport chain. *Nature Structural and Molecular Biology*, 24(10):800-808
- [26] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J., (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193:265-275.
- [27] Mendoza-Hoffmann, F., Pérez-Oseguera, Á., Cevallos, M. A., Espinoza-Simón, E., Uribe-Carvajal, S., García-Trejo, J. J., (2018). The Biological Role of the z Subunit as Unidirectional Inhibitor of the F_1F_0 -ATPase of *Paracoccus denitrificans*. *Cell Reports*, 22:1067–1078
- [28] Mendoza-Hoffmann, F., Zarco-Zavala, M., Ortega, R., García-Trejo, J.J., (2018). Control of rotation of the F_1F_0 -ATP synthase nanomotor by an inhibitory α -helix from unfolded ϵ or intrinsically



- disordered ζ and IF₁ proteins. *The Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 50(5):403-424
- [29] Nakamura, J., Fujikawa, M., y Yoshida, M., (2013). IF₁, a natural inhibitor of mitochondrial ATP synthase, is not essential for the normal growth and breeding of mice. *Bioscience Reports*, 33(5):735-741
- [30] Nicholls, D. G. (2013). Bioenergetics. *Academic Press*. pp. 91-131
- [31] Penefsky, H.S., Pullman, M.E., Datta, A. y 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.
- [32] Senior, A.E., y Weber, J., (2004). Happy motoring with ATP synthase. *Nature Structural and Molecular Biology*, 11(2):110-2.
- [33] Sillén, L. G. y Martell, A. E., (1971). Stability constants of metal-ion complexes. Supp. N° 1. Burhngton house, London. *The Chemical Society*, pp. 650-654
- [34] Steed, P., y Fillingame R., (2013). Residues in the polar loop of subunit *c* in *Escherichia coli* ATP synthase function in gating proton transport to the cytoplasm. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(4):2127-2138
- [35] van Lis, R., Atteia, A., Mendoza-Hernández, G. y González-Halphen, D., (2003). Identification of novel mitochondrial protein



components of *Chlamydomonas reinhardtii*. A proteomic approach. *Plant Physiology*, 132:318-330.

- [36] van Lis, R., Mendoza-Hernández, G., Groth, G. y Atteia, A., (2007). New insights into the unique structure of the F₀F₁-ATP synthase from the chlamydomonas algae *Polytomella sp.* and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 144:1190-1199.
- [37] Vázquez-Acevedo, M., Cardol, P., Cano-Estrada, A., Lapaille, M., Remacle, C. y González-Halphen, D., (2006). The mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae contains eight subunits of unknown origin involved in the formation of an atypical stator-stalk and in the dimerization of the complex. *The Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 38:271-282.
- [38] Velours, J., Dautant, A., Salin, B., Sagot, I. y Brèthes, D., (2009). Mitochondrial F₁F₀-ATP synthase and organellar internal architecture. *The Internal Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 41:1783-1789.
- [39] 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. y González-Halphen, D., (2009). The fully-active and structurally stable form of the mitochondrial ATP synthase of *Polytomella sp.* is dimeric. *The Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 41:1-13.
- [40] von Ballmoos, C., Wiedenmann, A. y Dimroth, P., (2009).



Essentials for ATP synthesis by F_1F_0 -ATP Synthases. *The Annual Review of Biochemistry*, 78:647-672.

- [41] Wagner, K., Perschil, I., Fichter, C.D. y 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.
- [42] Wittig, I., Meyer, B., Heide, H., Steger, M., Bleier, L., Wumaier, Z., Karas, M. y Schägger, H., (2010). Assembly and oligomerization of human ATP synthase lacking mitochondrial subunits a and A6L. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1797:1004-1011.
- [43] Wittig, I., Velours, J., Stuart, R. y Schägger, H., (2008). Characterization of domain interfases in monomeric and dimeric ATP synthase. *Molecular and Cellular Proteomics*, 5:995-1004.
- [44] Wittig, I. y Schagger, H., (2008). Structural organization of mitochondrial ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1777:592-598.

