



Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Medicina

**Caracterización de la cadena respiratoria y la transición  
de la permeabilidad de mitocondrias aisladas de  
*Debaryomyces hansenii***

TESIS

Que para obtener el título de  
LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

Presenta:

Alfredo Cabrera Orefice

Director de tesis: Dr. Salvador Uribe Carvajal

México, D. F., Febrero de 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

# Agradecimientos

A mis padres, que siempre me mostraron el sendero del estudio y me dieron todo el amor y apoyo, por estar ahí cuando los necesité y por dejarme elegir mi camino y convertirme en un hombre humilde y feliz, por todos los pequeños momentos de alegría que vivimos y sobretodo por el inmenso esfuerzo que realizaron para sacarme adelante.

A mi hermana, que siempre esta ahí para mí aunque muchas veces no estemos juntos, por ser innumerables veces mi aprendiz y por las tantas veces que reímos, lloramos, peleamos y nos reconciliamos.

A mi novia, que ha creído en mí y me ha dado la oportunidad de tener una gran relación, por todos los bonitos días y palabras que me regalas, por esas agallas que tienes para salir adelante, por todo el amor de los 'burritos'.

A mis abuelos, que con su sabiduría, paciencia y amor, me mostraron que siempre hay mas lugares por conocer, mas cosas por descubrir, mas palabras por aprender y mas sueños por conseguir. Agradezco en especial a mi abuela Aurora por apoyarme en todo lo que he hecho y permitirme recordar con alegría todos los ratos que vivimos, viajamos y nos divertimos.

A mi primo Héctor y mi sobrina Isabella, con quienes cuento para velar por la verdadera familia y mantener vivo junto con todos, el espíritu y los deseos del abuelo Antonio.

A Eva Muñoz, por iniciarme en la ciencia desde joven, por el apoyo, por todos sus buenos consejos y por cultivar desde hace mucho tiempo una agradable amistad.

Al Dr. Salvador Uribe, por permitirme participar en su grupo de investigación, por la amistad y paciencia, por sus palabras de aliento y por darme esas lecciones que han sido y seguirán forjando las bases con las que me convertiré en un hombre de ciencia.

A mis queridos amigos: Yarim Venegas, Arturo Flores, Israel Pérez, Christian Pérez, Daniel Alegre, David Palomo, Zuly Saucedo, Nathan Muñoz, Idalia Rojas, Dunia Rassy, Rodolfo García y Marco Alfonzo que mas que amigos son como mis hermanos y les agradezco que hayamos pasado los mejores momentos de mi vida, las tocadas, las desveladas... y que junto con ustedes he aprendido a ser una mejor persona cada día, a vencerme a mí mismo y a seguir luchando para salir adelante. Gracias por estar ahí y jamás dejarme solo.

A todos los compañeros de los laboratorios en los que he realizado mis estancias, que en las buenas y en las malas me han apoyado con sus conocimientos para sacar adelante el trabajo. En especial agradezco a Sergio Couoh, Daniela Araiza, Gisela Ruiz y Esmeralda Lira, por la valiosa amistad que cultivamos al trabajar juntos día a día.

A mis sinodales: Dr. Antonio Peña, Dra. Xóchitl Pérez, Dr. Rafael Camacho y Dra. Irma Romero, por su tiempo y las valiosas sugerencias y comentarios que me han permitido mejorar este trabajo.

# ÍNDICE

## LISTA DE ABREVIATURAS

### 1. RESUMEN

### 2. INTRODUCCIÓN

- 2.1. La mitocondria. Generalidades
- 2.2. Origen de las mitocondrias. Teoría endosimbiótica
- 2.3. La fosforilación oxidativa y la cadena de transporte de electrones
  - 2.3.1. Complejos respiratorios en mitocondrias de mamíferos
  - 2.3.2.  $F_1F_0$  ATP sintasa
  - 2.3.3. Componentes respiratorios alternos
- 2.4. La transición de la permeabilidad mitocondrial
  - 2.4.1. El mPTP y el YMUC
  - 2.4.2. Regulación de la transición de la permeabilidad
- 2.5. *Debaryomyces hansenii* como modelo de estudio
- 2.6. Principales estudios realizados en *Debaryomyces hansenii*

### 3. HIPÓTESIS

### 4. OBJETIVOS

- 4.1. Objetivo general
- 4.2. Objetivos particulares

### 5. MATERIAL Y MÉTODOS

- 5.1. Materiales químicos
- 5.2. Materiales biológicos
- 5.3. Cultivo de las levaduras

- 5.4. Aislamiento de las mitocondrias acopladas de *D. hansenii*
- 5.5. Cuantificación de proteína
- 5.6. Oximetría
- 5.7. Potencial transmembranal ( $\Delta\Psi$ )
- 5.8. Síntesis de ATP
- 5.9. Búsqueda, alineamiento y análisis de secuencias de proteínas

## **6. RESULTADOS**

- 6.1. Cultivo de *D. hansenii* y aislamiento de las mitocondrias
- 6.2. Caracterización de NADH deshidrogenasas tipo II
- 6.3. Caracterización de la transición de la permeabilidad mitocondrial
  - 6.3.1. Efecto del fosfato y del  $K^+$  sobre el consumo de oxígeno
  - 6.3.2. Efecto del fosfato y de los cationes monovalentes sobre el  $\Delta\Psi$
  - 6.3.3. Efecto de los cationes divalentes sobre el  $\Delta\Psi$
  - 6.3.4. Efecto del fosfato y del  $K^+$  sobre la síntesis de ATP

## **7. DISCUSIÓN**

- 7.1. El aislamiento de las mitocondrias de *D. hansenii*
- 7.2. La cadena respiratoria ramificada de *D. hansenii* contiene una NDE
- 7.3. La transición de permeabilidad mitocondrial en *D. hansenii*

## **8. CONCLUSIONES**

## **9. PERSPECTIVAS**

## **10. BIBLIOGRAFÍA**

## **ANEXO**

Mitochondria from the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* (halophilic organelles?).

## LISTA DE ABREVIATURAS

A <sub>540</sub>	Absorbencia a 540 nm
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNmt	ADN mitocondrial
ADNn	ADN nuclear
ADP	Adenosín difosfato
ANT	Acarreador de adenín nucleótidos
AOX	Oxidasa alterna
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
BLAST	Herramienta Básica de Búsquedas de Alineamientos Locales
BSA	Albúmina sérica bovina
CCCP	<i>p</i> -clorocarbonilcianuro fenilhidrazona
CR	Control respiratorio
CsA	Ciclosporina A
Cyp-D	Ciclofilina D
D. E.	Desviación estándar
Da	Dalton
FAD	Dinucleótido de flavina adenina oxidado
FADH <sub>2</sub>	Dinucleótido de flavina adenina reducido
FMN	Mononucleótido de flavina oxidado
FMNH <sub>2</sub>	Mononucleótido de flavina reducido
IC <sub>50</sub>	Concentración media de inhibición
MME	Membrana mitocondrial externa
MMI	Membrana mitocondrial interna
mPTP	Poro de la transición de la permeabilidad de mamíferos
MUC	Canal inespecífico mitocondrial
NAD <sup>+</sup>	Dinucleótido de nicotinamida adenina oxidado
NADH	Dinucleótido de nicotinamida adenina reducido
NADP <sup>+</sup>	Dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato oxidado
NADPH	Dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato reducido
NDE	NADH deshidrogenasa alterna externa
NDH2	NADH deshidrogenasa alterna tipo II
NDI	NADH deshidrogenasa alterna interna
Pi	Fosfato inorgánico
PiC	Acarreador de fosfato
PTP	Poro de la transición de la permeabilidad
Q	Ubiquinona
Q•	Semiquinona
QH <sub>2</sub>	Ubiquinol
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SHAM	Ácido salicilhidroxámico
TPM	Transición de la permeabilidad mitocondrial
Tris	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
VDAC	Canal aniónico dependiente de voltaje
YMUC	Canal inespecífico mitocondrial de levadura
ΔΨ	Potencial transmembranal eléctrico

## 1. RESUMEN

*Debaryomyces hansenii* es una levadura halófila que suele residir en hábitats con alta salinidad, como el agua marina. Diversos estudios han demostrado que grandes cantidades de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  permean hacia el interior para balancear la presión osmótica. En el citoplasma de esta levadura, las proteínas y los organelos están expuestos constantemente a estos cationes, por lo que se propone la existencia de adaptaciones para contrarrestar los efectos tóxicos de las sales. En este estudio se caracterizó la cadena respiratoria ramificada y la transición de la permeabilidad en mitocondrias aisladas intactas de *D. hansenii*. La cadena respiratoria de esta levadura contiene los complejos I, II, III y IV y una oxidasa alterna. En el presente trabajo se encontró otro componente alterno adicional: una NADH deshidrogenasa externa tipo II sensible a flavona. Por otro lado, las mitocondrias de *D. hansenii* muestran una transición de la permeabilidad sensible a los cationes monovalentes  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . Esto fue evidenciado por el aumento en el control respiratorio, en el potencial transmembranal ( $\Delta\Psi$ ) y en la síntesis de ATP de la muestra mitocondrial, al exponerla a una mayor concentración de estos cationes. Además, al igual que en *Saccharomyces cerevisiae*, este tipo de transición de la permeabilidad es sensible al fosfato y a los cationes divalentes  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . Los resultados permiten sugerir la existencia de un poro inespecífico mitocondrial (MUC) que a diferencia con lo reportado en la literatura, es cerrado excepcionalmente por cationes monovalentes. En este trabajo se propone que los cambios en la concentración citosólica de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  podrían participar en la modulación del metabolismo aeróbico, tal y como se observó bajo las condiciones experimentales utilizadas y optimizarlo cuando esta levadura se encuentra en ambientes hipersalinos.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. *La mitocondria. Generalidades*

Las células eucariontes se caracterizan por poseer organelos especializados y un núcleo bien delimitado en su interior. Los organelos llevan a cabo funciones particulares y son pieza fundamental de todos y cada uno de los procesos realizados por la célula como el almacenamiento y expresión de información genética, la síntesis de proteínas, el metabolismo energético, la detoxificación, el transporte de moléculas, etc. (Alberts y cols., 2002)

Las mitocondrias son organelos formado por dos membranas, una externa y otra interna; esta última forma una serie de invaginaciones denominadas crestas. Entre ambas membranas se encuentra el espacio intermembranal. El interior de la mitocondria constituye la matriz mitocondrial, espacio donde se llevan a cabo diversos procesos como el ciclo de Krebs, la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, el ciclo de la urea, el metabolismo de ciertos aminoácidos, entre otros (Nelson y Cox, 2000).

La membrana mitocondrial externa (MME), además de mantener la integridad del organelo, se ha reconocido como una estructura primordial en la comunicación intergenómica, la regulación metabólica y el transporte del organelo a través del citoplasma (unida a elementos del citoesqueleto) (Hirano y Vu, 2000; Boldogh y Pon, 2006). Por otro lado, la membrana mitocondrial interna (MMI) es una estructura con una arquitectura altamente versátil, y modifica su organización en función del estado metabólico celular (Frey y cols., 2000; Mannella y cols. 2002). La MMI puede remodelar su conformación para incrementar o disminuir el número, tamaño y forma de las crestas

(Manella, 2006). Este fenómeno permite modificar la proporción de proteínas que se encuentran sobre la MMI, acomodándolas en sitios específicos. Se cree que esto favorece la interacción y asociación de las proteínas involucradas en la fosforilación oxidativa, además de promover la formación de gradientes localizados (Gilkerson y cols., 2003; Manella, 2006).

Las mitocondrias poseen material genético propio (ADN) y cuentan con toda la maquinaria necesaria para su expresión, es decir, para replicar, transcribir y traducir la información genética que contienen. Las proteínas contenidas en este organelo están codificadas por dos genomas: el nuclear (ADNn) y el mitocondrial (ADNmt). El genoma mitocondrial codifica diversos ARN de transferencia (ARNt) y ribosomales (ARNr) y algunas subunidades proteicas. Sin embargo, cerca del 98% de las proteínas mitocondriales son codificadas fuera de ella y una vez sintetizadas, son dirigidas y transportadas a este organelo (Pfanner y Meijer, 1997; Chacinska y cols., 2009); tal es el caso de transportadores de solutos, proteínas de importación, subunidades de la cadena respiratoria, enzimas de la replicación, etc. Por lo tanto, es necesaria la expresión coordinada de los dos sistemas genómicos para que el organelo realice sus funciones de manera óptima y en respuesta a las necesidades de la célula.

Durante el siglo XX, diversos grupos de investigación se dedicaron al estudio minucioso de las mitocondrias con el objeto de caracterizar a mayor detalle la morfología y elucidar su función. En los primeros estudios (1900–1925) se encontraron por microscopía de luz, las dos membranas que delimitan el organelo; se encontraron diversos citocromos a los que se les asoció con la función de la respiración celular y se observó que la mitocondria no es un organelo estático sino que está en continuo movimiento (Tuena de Gómez Puyou y Vázquez, 2002). En la segunda mitad del siglo

XX, al realizarse con éxito diversos experimentos con la mitocondria aislada, se pudo demostrar que el mecanismo principal de obtención de energía a partir de la oxidación de diversas moléculas reside en este organelo (Nelson y Cox, 2000).

Posteriormente a través del uso de herramientas como la microscopía electrónica, la biología molecular y la cristalografía, fueron descubiertos un gran número de componentes proteicos mitocondriales, se resolvieron las estructuras de la mayor parte de los complejos involucrados en la fosforilación oxidativa y se caracterizaron diversas vías metabólicas realizadas en este organelo (Tuena de Gómez Puyou y Vázquez, 2002).

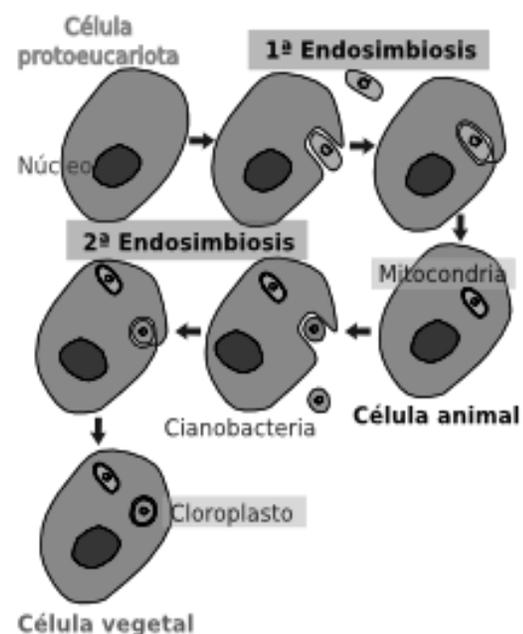
En la actualidad, el estudio de las mitocondrias se ha enfocado asimismo en la comprensión de su participación en diversos padecimientos clínicos y en su biogénesis; caracterizar las diferencias que presentan entre organismos evolutivamente relacionados y no relacionados, y evidenciar el papel que tiene en la regulación de diversos procesos celulares como la apoptosis, la formación de tumores y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés *reactive oxygen species*).

## **2.2. Origen de las mitocondrias. Teoría endosimbiótica.**

Durante el estudio de las mitocondrias surgieron dos importantes incógnitas; por un lado cómo se originaron y por otro porqué sólo los eucariontes las contienen. Ante estos enigmas, se formularon diversas teorías sobre su origen, siendo la más aceptada la propuesta por Margulis (Sagan, 1967). Esta teoría, denominada “endosimbiótica”, argumenta que organismos similares a los procariontes fueron engullidos por células proto-eucariontes y sobrevivieron en su interior; establecieron una dependencia

metabólica mutua y finalmente formaron una unidad, convirtiéndose a lo largo de su “coevolución” en un organelo (Sagan, 1967).

Según esta teoría, las mitocondrias se formaron en un primer evento endosimbiótico (Figura 1); este hecho originó a las células eucariontes animales. Además, ocurrió un segundo evento endosimbiótico, en donde incorporaron un organismo capaz de aprovechar la energía luminosa en su metabolismo. Este hecho dio lugar a las células eucariontes vegetales. El segundo evento es, hipotéticamente, el origen del cloroplasto (Figura 1). La razón principal por la que esta teoría es altamente aceptada, es el gran parecido que presentan las mitocondrias y los cloroplastos con los organismos procariontes. Ambos organelos contienen ADN, poseen ribosomas similares a los bacterianos, su formación se lleva a cabo por un mecanismo similar a la bipartición y las enzimas involucradas en la fosforilación oxidativa y en la fotosíntesis comparten un enorme parecido con los complejos caracterizados en diversos procariontes (Alberts y cols., 2002).



**Fig. 1. Teoría endosimbiótica.** Las mitocondrias y los cloroplastos de las células eucariontes se originaron hipotéticamente mediante dos eventos independientes de endosimbiosis. Las mitocondrias se formaron a partir de células similares a los procariontes aeróbicos y los cloroplastos a partir de organismos relacionados con las cianobacterias actuales. Imagen tomada de Megías y cols., 2008.

### **2.3. La fosforilación oxidativa y la cadena de transporte de electrones**

La principal característica de las mitocondrias es su especialización en la transducción de energía y la producción de adenosín trifosfato (ATP), el compuesto energético más importante en las células. La síntesis del ATP en este organelo se lleva a cabo a través de la fosforilación oxidativa (Nelson y Cox, 2000).

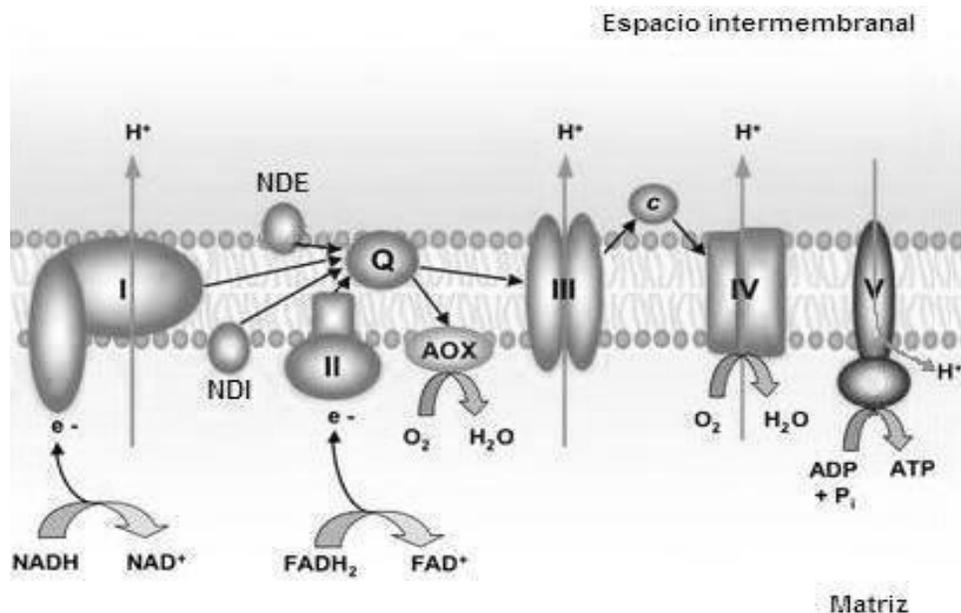
Las fuentes de energía, como la glucosa, son inicialmente metabolizadas en el citoplasma y los productos obtenidos son llevados al interior de la mitocondria donde se continúa el catabolismo usando rutas metabólicas que incluyen el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos y la oxidación de los aminoácidos. El resultado final de estas rutas es la producción de dos donadores de electrones: NADH y FADH<sub>2</sub>. Los electrones de estos dos donadores son transferidos a través de una serie de complejos de proteínas integrales de membrana, llamados en conjunto “cadena respiratoria”, hasta el O<sub>2</sub>, el cual se reduce para formar agua. Este proceso ocurre en la MMI, mientras que en los procariontes aerobios ocurre en la membrana plasmática (Nicholls y Ferguson, 2002).

La cadena respiratoria tiene como finalidad la generación de un gradiente electroquímico de protones (H<sup>+</sup>) (Mitchell, 1961). Esto ocurre gracias al transporte de electrones a través de una serie de reacciones de oxido-reducción. El paso de electrones promueve un bombeo vectorial de H<sup>+</sup> desde la matriz al espacio intermembranal. Este fenómeno provoca que el espacio intermembranal quede positivo (lado P) con respecto a la matriz, que queda negativa (lado N).

Peter Mitchell definió un término conocido como fuerza protón-motriz ( $\Delta p$ ) al manipular algebraicamente la ecuación de Nernst (Mitchell, 1966). Este término se

puede interpretar como la energía que puede transformarse en trabajo útil (Nicholls y Ferguson, 2002). La fuerza protón-motriz, incluye los componentes químico ( $\Delta\text{pH}$ ) y eléctrico ( $\Delta\Psi$ ) de los  $\text{H}^+$  separados por la MMI. Una vez generado el gradiente, éste es utilizado por la enzima  $\text{F}_1\text{F}_0$  ATP sintasa (conocida también como complejo V), la cual es capaz de acoplar el paso de  $\text{H}^+$  desde el espacio intermembranal a la matriz mitocondrial con la síntesis de ATP a partir de adenosín difosfato (ADP) y fosfato ( $\text{P}_i$ ) (Hatefi, 1962).

La cadena de transporte de electrones mitocondrial está conformada por 4 complejos enzimáticos principales, conocidos como I, II, III y IV (Figura 2). Sin embargo, diversos organismos poseen además otras enzimas (deshidrogenasas y oxidasas) involucradas en el transporte de electrones. La presencia de éstas da lugar a nuevos puntos de entrada y a la ramificación del flujo de electrones. Gracias a esto, los electrones transportados pueden seguir dos vías hasta el  $\text{O}_2$ : la citocrómica, si son transportados por los complejos III y IV; y la alterna, cuando se transfieren hacia una oxidasa alterna (AOX, por sus siglas en inglés *alternative oxidase*) (Figura 2). Este tipo de proteínas se ha encontrado y caracterizado principalmente en bacterias, hongos y plantas (Joseph-Horne y cols., 2001). En las mitocondrias de los mamíferos no se han encontrado esta clase de enzimas, aunque sí contienen distintas proteínas de otras vías metabólicas que participan en el transporte de electrones (Nelson y Cox, 2000).



**Fig. 2. Representación esquemática de la cadena respiratoria.** La vía citocrómica ocurre a través de los complejos III y IV. La transferencia de electrones en los complejos I, III y IV se utiliza para el bombeo de protones a través de la MMI desde la matriz al espacio intermembranal. El gradiente de  $H^+$  resultante impulsa la síntesis de ATP por el complejo V. En algunos organismos, el flujo de electrones se puede desviar hacia una oxidasa alternativa (**AOX**) a nivel de la poza de quinonas (**Q**). NADH deshidrogenasa (**I**); succinato deshidrogenasa (**II**); citocromo  $bc_1$  (**III**); citocromo c oxidasa (**IV**);  $F_1F_0$  ATP sintasa (**V**); citocromo c (**c**); NADH deshidrogenasa alternas: externa (**NDE**) e interna (**NDI**). Imagen modificada de Sainsard-Chanet.

### 2.3.1. Complejos respiratorios en mitocondrias de mamíferos

El complejo I o NADH:ubiquinona óxido-reductasa es la enzima respiratoria más grande (aprox. de 1 MDa en mamíferos y 500 kDa en procariontes) y contiene el mayor número de subunidades de todos los complejos respiratorios. Las imágenes de microscopía electrónica, revelan que este complejo posee dos dominios principales: uno hidrofóbico, embebido en la MMI y otro soluble, orientado hacia la matriz. Estructuralmente, el complejo I de mamíferos está compuesto por 46 subunidades (14 conservadas y alrededor de 32 adicionales dependiendo la especie) (Nelson y Cox, 2000). Siete subunidades son codificadas por el ADNmt y cinco de ellas contienen a los grupos prostéticos FMN y hierro-azufre (centros Fe-S) (Brandt y cols., 2003; Hinchliffe y

Sazanov, 2005). El complejo I puede ser inhibido por rotenona, amital y piericidina (Nelson y Cox, 2000). Esta enzima pertenece a la familia de las NADH deshidrogenasas tipo I (Kerscher y cols., 2008).

El complejo I capta los electrones acarreados por el NADH y los transfiere a un intermediario liposoluble llamado ubiquinona (Q) reduciéndolo a ubiquinol (QH<sub>2</sub>). Tanto la Q como el QH<sub>2</sub> son intermediarios que se encuentran localizados en la MMI y pueden difundir a través de ella. El complejo I toma al NADH y lo oxida a NAD<sup>+</sup> reduciendo a su vez al grupo prostético FMN a FMNH<sub>2</sub> en un único paso que implica la transferencia de dos electrones. Posteriormente estos electrones continúan su paso a través de siete centros Fe-S que sólo pueden aceptar un electrón a la vez. El último centro Fe-S, transfiere el primer electrón proveniente del NADH a la Q generando una de sus formas reducidas: la semiquinona (Q<sup>•</sup>). Esta semiquinona vuelve a reducirse por el centro Fe-S con el segundo electrón generando QH<sub>2</sub>. El paso de electrones en esta enzima se encuentra acoplado a una serie de cambios conformacionales en las subunidades del dominio hidrofóbico, que durante la transferencia, permiten la translocación de cuatro protones desde la matriz hasta el espacio intermembranal (Walker y cols., 1992).

El Complejo II o succinato:ubiquinona oxidoreductasa es una enzima que forma parte del ciclo de Krebs y no bombea protones (Hederstedt y Ohnishi, 1992). Este complejo utiliza los electrones del succinato y los transfiere a través de un grupo prostético FAD, tres centros Fe-S y un grupo hemo *b* hasta la Q para formar QH<sub>2</sub> (Lemire y Oyedotun, 2002). El complejo II está formado al menos por cuatro subunidades codificadas por genes nucleares (Nelson y Cox, 2000). Esta enzima puede inhibirse de manera competitiva por malonato (Hagerhall, 1997).

El complejo III (citocromo  $bc_1$ ) o ubiquinol:citocromo  $c$  oxidoreductasa obtiene dos electrones del  $QH_2$  y los transfiere a un transportador móvil de electrones hidrosoluble que se encuentra en el espacio intermembranal, llamado citocromo  $c$  (*cyt c*). Esta enzima transloca cuatro protones a través de la membrana por cada dos electrones transportados desde el ubiquinol (Hatefi y cols., 1962). El complejo  $bc_1$  de bovino está formado por once subunidades (una codificada por el ADNmt) y cuatro grupos prostéticos: dos hemos tipo  $b$  ( $b_L$  y  $b_H$ ), un hemo tipo  $c$  y un centro hierro-azufre (2Fe-2S). Este último ubicado en una subunidad conocida como “proteína de Rieske”. El transporte de electrones en esta enzima, se lleva a cabo a través de un mecanismo conocido como ciclo Q, en el cual se transfiere un electrón al *cyt c* y otro se mantiene en una  $Q^{\bullet}$  hasta que otro ubiquinol entra y completa el ciclo (Braun y Schmitz, 1995; Darrouzet y cols., 2001). El complejo III presenta una forma dimérica obligatoria, ya que la forma monomérica no es funcional, como lo observado en los complejos I y II. Esto se debe principalmente a que las proteínas de Rieske sólo ejercen su función en monómeros contrarios (Covian y Trumpower, 2005). Esta enzima se puede inhibir por antimicina A, mixotiazol y estigmatelina (Nelson y Cox, 2000).

El complejo IV o citocromo  $c$  oxidasa capta los electrones provenientes del *cyt c* y los transfiere al oxígeno molecular ( $\frac{1}{2}O_2$ ). Al igual que el complejo III, esta enzima también es dimérica. En mamíferos, cada monómero está compuesto por 13 subunidades, de las cuales 3 son codificadas por el ADNmt. Este complejo, contiene dos grupos hemo ( $a$  y  $a_3$ ) y dos centros cobre ( $Cu_A$  y  $Cu_B$ ) a través de los cuales son transferidos los electrones (Tsukihara y cols., 1995). El centro  $Cu_A$  se ubica en la subunidad II y contiene dos iones cobre que forman un complejo con los grupos tiol de dos residuos de cisteína, formando un centro binuclear. La subunidad I contiene los dos

grupos hemo y el  $\text{Cu}_B$ . En esta última, el citocromo  $a_3$  y el  $\text{Cu}_B$  forman otro centro binuclear, el cual acepta los electrones que provienen del hemo  $a$  y permite que se lleve a cabo la reducción del  $\frac{1}{2}\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  (Iwata y cols., 1995). La energía de las reacciones redox es aprovechada también en este complejo para impulsar la translocación de protones. Por cada cuatro electrones que atraviesan el complejo IV, se permite el bombeo de dos protones netos al espacio intermembranal, ya que otros dos protones son utilizados para formar el  $\text{H}_2\text{O}$ . Esta reducción del oxígeno molecular, implica centros redox que transportan un único electrón a la vez y se lleva a cabo sin la liberación de los intermediarios parcialmente reducidos, tales como el peróxido de hidrógeno o el radical hidroxilo. La actividad de este complejo puede ser inhibida por cianuro ( $\text{CN}^-$ ), azida, monóxido de carbono ( $\text{CO}$ ) y dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2$ ) a nivel del *cyt a<sub>3</sub>* (Nelson y Cox, 2000).

### **2.3.2. $F_1F_0$ ATP Sintasa**

Debido al uso de la nomenclatura de los complejos respiratorios es frecuente encontrar a la  $F_1F_0$  ATP sintasa referida como complejo V. Esta enzima se caracteriza por tener dos dominios: el  $F_1$ , soluble en el lado matricial y el  $F_0$ , embebido en la MMI. El dominio  $F_0$  es el responsable de captar los protones del espacio intermembranal. Los  $\text{H}^+$  promueven la rotación de un anillo de subunidades (denominadas  $c$ ) y posteriormente son liberados en el lado matricial. Este movimiento promueve una serie de cambios conformacionales en las subunidades del dominio  $F_1$ , permitiendo una transición entre tres estados catalíticos responsables de la síntesis de ATP (Lutter y cols., 1993; Boyer, 2002). La relación entre los protones utilizados por la ATP sintasa para sintetizar el ATP es de 3-4  $\text{H}^+/\text{ATP}$  (Stock y cols., 2000). En condiciones

energéticas ideales, la transferencia del par de electrones proveniente del NADH hasta el  $O_2$  permite que la cadena respiratoria bombee  $10 H^+$  al espacio intermembranal, los cuales al ser utilizados por el complejo V, permiten la síntesis de 2.5 moléculas de ATP. En el otro caso, cuando el par de electrones ingresa a la cadena respiratoria a través de la succinato deshidrogenasa, solo se pueden sintetizar 1.5 moléculas de ATP empleando los protones bombeados por los complejos III y IV. La  $F_1F_0$  ATP sintasa puede inhibirse por moléculas como la oligomicina, venturicidina y aurovertina que frenan el mecanismo rotatorio o directamente a la subunidad  $F_1$  (Nelson y Cox, 2000).

### **2.3.3. Componentes respiratorios alternos**

Los estudios que se tienen hasta ahora sobre la cadena respiratoria, han sido descritos mayoritariamente en mitocondrias de mamífero. En estas mitocondrias, el flujo de electrones a partir de la poza de quinonas, se realiza de manera lineal hasta el  $O_2$  a través de la vía citocrómica. Estudios realizados en mitocondrias de plantas, hongos y otros microorganismos, han demostrado que este flujo no se realiza únicamente de ese modo y los electrones pueden ser dirigidos a través de diferentes vías desde el NADH (citosólico o mitocondrial) hasta el oxígeno (Joseph-Horne y cols., 2001). En este tipo de mitocondrias, además de los complejos I, II, III y IV, existen enzimas 'alternas' que catalizan las mismas reacciones que los complejos I y IV. Principalmente se han encontrado NADH deshidrogenasas alternas, una familia de enzimas periféricas ubicadas en la MMI y orientadas hacia el lado matricial (internas o NDI) o hacia el lado citosólico (externas o NDE). Las NDE utilizan como sustrato el NADH citosólico de manera directa; las NDI pueden utilizar el NADH producido por el ciclo de Krebs al igual que el complejo I. Este tipo de proteínas son monoméricas, codificadas por genes

nucleares, tienen FAD unido como grupo prostético, no bombean protones y su catálisis aparentemente no es afectada por inhibidores del complejo I; son inhibidas específicamente por flavonas (Juárez y cols., 2004). Estructuralmente, se reconocen cuatro dominios conservados en este tipo de deshidrogenadas: dos dominios de unión a dinucleótidos (que forman el sitio donde se transfieren los electrones del NADH al FAD) y dos motivos hidrofóbicos (Kerscher y cols., 2008). Estas enzimas alternas pertenecen a la familia de las NADH deshidrogenasas tipo II (NDH2) (Kerscher y cols., 2008).

En las mitocondrias de la planta *Arabidopsis thaliana* se han encontrado siete NADH deshidrogenadas alternas, tanto NDI como NDE, cuya expresión varía dependiendo de las condiciones del medio (luz, temperatura, humedad, etc.) (González-Meler y cols., 1999). Las mitocondrias de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* no poseen complejo I, pero contienen tres NADH deshidrogenasas alternas (dos NDE y una NDI), que le confieren la posibilidad de utilizar los electrones del NADH. Otros hongos como *Neurospora crassa*, *Yarrowia lipolytica* y *Ustilago maydis* poseen tanto el complejo I como NDH2 (Veiga y cols., 2003; Juárez y cols., 2004). También se han caracterizado deshidrogenasas alternas que pueden utilizar indistintamente el NADH o el NADPH como sustrato (Joseph-Horne y cols., 2001).

Es posible encontrar otras enzimas que pueden donar electrones a la ubiquinona a partir de deshidrogenasas mitocondriales diferentes a los complejos I, II y las NDH2. Este tipo de proteínas se encuentran también en mitocondrias de mamífero. Durante la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, los electrones extraídos de los acil-CoAs por diversas acil-CoA deshidrogenasas (a través de FAD), pueden llegar a la poza de quinonas a

través de una proteína transferidora de electrones (ETF) y una ETF:ubiquinona oxidoreductasa. En otro caso, el glicerol 3-fosfato (G3P), formado a partir de la hidrólisis de triglicéridos, así como en la reducción de la dihidroxiacetona fosfato en la glucólisis, es oxidado por la flavoproteína conocida como G3P deshidrogenasa. Esta enzima también dona electrones a la poza de quinonas.

Otros componentes de la cadena respiratoria mitocondrial son las oxidasas alternas (AOXs), cuya función es equivalente a la del complejo IV, sin embargo, éstas no bombean protones y no están acopladas a la síntesis de ATP (Moore y Siedow, 1991). Las AOXs se encuentran codificadas en el genoma nuclear y se localizan en el lado matricial de la MMI. La característica particular de las AOXs es su insensibilidad a inhibidores de los complejos III y IV; particularmente al cianuro (CN<sup>-</sup>) y a la antimicina A (Lambers, 1980; Albury y cols., 2002). Por esta razón, las AOXs confieren a diversos organismos respiración resistente a cianuro. Las AOX son sensibles a ácidos hidroxámicos y a *n*-alquil-galatos. Se ha propuesto que la AOX es una proteína integral de membrana dimérica (Siedow y Umbach, 2000). En su estructura se muestran diversos motivos conservados: dos  $\alpha$ -hélices transmembranales, una hélice anfipática orientada hacia el espacio intermembranal y dos regiones hidrofílicas en el extremo C-terminal solubles en la matriz. La AOX contiene dos sitios catalíticos: el sitio de unión al ubiquinol y el sitio de reducción del oxígeno (Albury y cols., 2002).

Las AOXs se encuentran en la mayoría de los hongos; con algunas excepciones como *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Kluyveromyces lactis* y diversas plantas. Estas enzimas pueden expresarse de manera constitutiva o inducible. Tal es el caso de *Candida albicans* en donde se han identificado dos AOXs: AOX1a y AOX1b. La

primera se expresa constitutivamente en niveles bajos, mientras que la otra se expresa ante la presencia de inhibidores (principalmente del complejo IV), ROS o cuando existe alta carga energética y el flujo a través de la vía citocrómica disminuye (por el nivel de reducción de la poza de quinonas) (Siedow y Umbach, 2000).

#### **2.4. La transición de la permeabilidad mitocondrial**

En mitocondrias aisladas de diversos organismos, ocurre una transición de la permeabilidad (TPM) cuando un canal inespecífico de alta conductancia denominado poro de transición de la permeabilidad (PTP) se abre y permite el libre paso de solutos a través de la MMI, cuyo tamaño permite el paso de moléculas de hasta 1.5 kDa (Jung y cols., 1997). Una característica particular de estos poros es su fluctuación entre un estado abierto y otro cerrado. La apertura del poro permite que los iones fluyan libremente entre el espacio intermembranal y la matriz, abatiendo los gradientes químicos ( $\Delta\mu$ ) y eléctricos ( $\Delta\Psi$ ), acelerando el consumo de oxígeno y provocando el hinchamiento de las mitocondrias (Bernardi y cols., 1994; Zoratti y Szabo, 1995; Manon y cols., 1998). Este PTP fue descrito inicialmente en las mitocondrias de los mamíferos (referido como mPTP por sus siglas en inglés *mitochondrial permeability transition pore*) (Beutner y cols., 1998); más tarde se encontró en mitocondrias de levadura, en donde se le conoce, particularmente, como canal inespecífico mitocondrial de levadura (YMUC por sus siglas en inglés *yeast mitochondrial unspecific channel*) (Manon y cols., 1998).

Hasta el momento no se ha esclarecido completamente el papel fisiológico de la transición de la permeabilidad mitocondrial modulada por el PTP, aunque se ha observado que se encuentra involucrada en gran medida en el acoplamiento de la

fosforilación oxidativa, la disipación de energía en forma de calor, la detoxificación de las ROS, la regulación del volumen mitocondrial y en la apoptosis (Bernardi y Petronilli, 1996; Crompton y cols., 1999; DeJean y cols., 2000; Rostovtseva y cols., 2004). Diversos estudios sobre la sensibilidad del mPTP a iones inorgánicos como el  $\text{Ca}^{2+}$ , han hecho que se postule su participación en la homeostasis de este catión. Dicha regulación estaría implicada en la transducción de diversas señales, la importación de proteínas mitocondriales o la termogénesis producida por la disipación del gradiente de  $\text{H}^+$  (Crompton y cols., 1987).

#### **2.4.1. El mPTP y el YMUC**

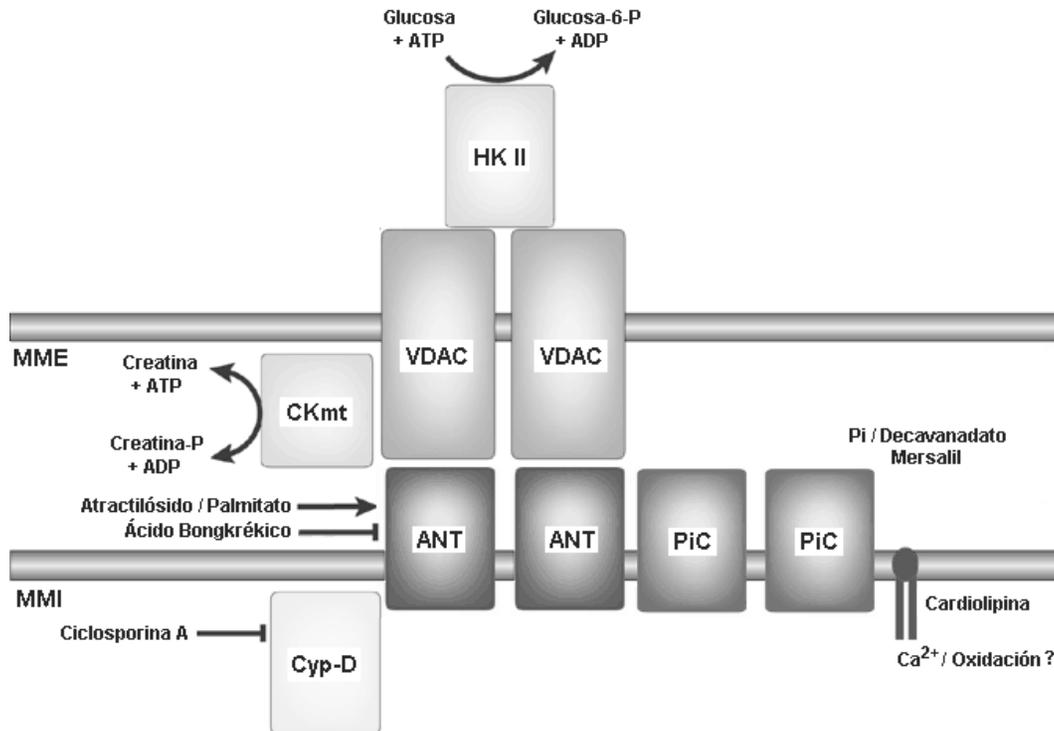
Hipotéticamente, el mPTP se forma por la interacción de diversas proteínas en sitios específicos entre la MMI y la MME (Figura 3). Los componentes que se han descrito como parte de esta estructura en mitocondrias de mamífero, suelen tener otras funciones celulares; tal es el caso del canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), el acarreador de adenín nucleótidos (ANT), la ciclofilina D (Cyp-D) y el acarreador de fosfatos (PiC) (Manon y cols., 1998). Estos componentes fueron propuestos debido a que la transición de la permeabilidad es específicamente promovida o inhibida por diversas moléculas que interactúan sobre dichas proteínas (Figura 3) (Halestrap, 1991; Baines y cols., 2005).

El VDAC es un canal localizado en la MME que permite el paso de iones, sustratos y moléculas pequeñas del citosol al espacio intermembranal. Se propuso su participación en la formación del mPTP, debido la sensibilidad de la transición de permeabilidad al voltaje en estudios *in vitro*. Empleando cromatografías de afinidad (usando Cyp-D anclada), se logró retener al VDAC junto con el ANT (Crompton y cols.,

1998). El ANT se ubica en la MMI y tiene como función primordial internalizar ADP a la matriz y sacar el ATP producto de la fosforilación oxidativa. Se ha propuesto al ANT como fuerte candidato para conformar el mPTP, ya que la transición de la permeabilidad se inhibe con carboxiatractilósido; un inhibidor específico del translocador (Halestrap, 1991). La Cyp-D, es una proteína matricial, encargada del plegamiento de las proteínas que son transportadas a este compartimento y que son sintetizadas previamente en el citosol. Su participación en el mPTP se sugirió debido a la sensibilidad de la transición de permeabilidad al fármaco ciclosporina A (CsA). La CsA se une específicamente a la Cyp-D y puede inhibir procesos apoptóticos como la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADNn (Kroemer y cols., 1995). La sensibilidad de éste fenómeno a la variación de la concentración de fosfato inorgánico (Pi), sugirió que el PiC es uno de los componentes primordiales del mPTP. Este hecho fue más tarde demostrado en mitocondrias de mamífero (Leung y cols., 2008). Dependiendo del tipo de mitocondria y el organismo o tejido de donde se obtengan, pueden asociarse otras proteínas al mPTP, tales como la hexocinasa o la creatín cinasa (Manon y cols., 1998) (Figura 3).

En las mitocondrias de *S. cerevisiae*, también existe un canal inespecífico de alta conductancia: el YMUC, equivalente al mPTP (Jung y cols., 1997). Este hallazgo fue producto de diversos estudios fallidos que pretendían caracterizar un PTP expresado de manera heteróloga en las mitocondrias de esta levadura. La regulación del YMUC es diferente a la descrita para el mPTP y no se tiene un modelo concertado de su estructura. Algunos estudios sugieren que la composición del YMUC es muy similar a la del mPTP con la diferencia de que en levaduras no se encuentra la Cyp-D (Manon y cols., 1998). Recientemente se ha demostrado la participación del VDAC (Gutiérrez-

Aguilar y cols., 2007) y del acarreador de fosfatos (PiC) (Gutiérrez-Aguilar y cols., 2009) en la TPM de esta levadura, sugiriendo que tanto el mPTP como el YMUC tienen una estructura altamente conservada.



**Fig. 3. Estructura del PTP de mamíferos.** El mPTP está formado principalmente por el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), el acarreador de adenín nucleotidos (ANT), el acarreador de fosfatos (PiC) y la ciclofilina-D (Cyp-D). En algunos casos, se ha observado la asociación de la hexocinasa II (HK II) y la creatín cinasa mitocondrial (CKmt) a la estructura principal. Membrana mitocondrial interna (MMI) y externa (MME). En la imagen se muestran algunos de las moléculas e iones que promueven la apertura o cierre del mPTP. Imagen modificada de Zamzami y Kroemer, 2001.

#### 2.4.2. Regulación de la transición de la permeabilidad

La regulación de los poros de transición varía de acuerdo con las características tanto del YMUC como del mPTP (Tabla A). Al comparar ambos poros se observa que son principalmente aniónicos y permiten el paso de moléculas de tamaño similar (Jung y cols., 1997; Manon y cols., 1998). Ambas estructuras atraviesan las MMI y MME, por

lo que deben encontrarse en los sitios de contacto intermembranales. La apertura del mPTP es inducida cuando aumenta la concentración de fosfato inorgánico y es inhibida por ATP, mientras que el YMUC se cierra en presencia de Pi y se abre con ATP (Manon y cols., 1998; Pérez-Vázquez y cols., 2003). Al igual que el Pi, otros aniones como son el arsenato, el sulfato (Cortés y cols., 2000), el propionato y el decavanadato (Manon y cols., 1998) son capaces de cerrar el YMUC.

En contraste con lo observado en el mPTP, el  $\text{Ca}^{2+}$  no es capaz de abrir el YMUC ni promover la TPM por sí solo (Jung y cols., 1997). Sin embargo, las mitocondrias de *S. cerevisiae* pueden ser capaces de llevar a cabo una TPM inducida por  $\text{Ca}^{2+}$ , cuando se agregan ionóforos como el ETH129 o la alameticina (Yamada y cols., 2009). En cambio, el  $\text{Mg}^{2+}$  es capaz de inhibir la transición de la permeabilidad en ambos poros (Bernardi y cols., 1994; Pérez-Vázquez y cols., 2003). Ante esto, se plantea la existencia de un sitio específico en algún componente del poro y permite vincular a esta estructura como participe en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial (Gutierrez-Aguilar y cols., 2007).

Por otro lado, el carboxiatractilósido y el ácido bongkrékico cierran tanto el PTP como el YMUC (Halestrap, 1991), al unirse específicamente al ANT (Halestrap y Brennerb, 2003). En estudios recientes, se ha observado que el mersalil es capaz de inducir el hinchamiento mitocondrial, posiblemente por unirse al PiC e inducir un cambio conformacional que permite la apertura del poro (Gutiérrez-Aguilar y cols., 2009).

Como se mencionó anteriormente, la CsA cierra el PTP a nivel de la Cyp-D (Baines y cols., 2005) pero no tiene actividad en el YMUC, probablemente porque en la levadura no se codifica esta proteína. Además, la hexil y octilguanidina cierran el YMUC a nivel del VDAC1 (Pérez-Vázquez y cols., 2003; Gutierrez-Aguilar y cols., 2007).

**Tabla A. Principales efectores del mPTP y del YMUC**

<b>Efactor</b>	<b>mPTP</b>	<b>YMUC</b>
Fosfato	+	-
Ca <sup>2+</sup>	+	-
Mg <sup>2+</sup>	-	-
ATP	-	+
Ciclosporina A	-	x
Ácido Bongkrékico	-	-
Hexilguanidina	-	-
Octilguanidina	-	-
Carboxiatractilósido	+	-
Decavanadato	+	-
Mersalil	+	+

\*Simbología: abre el poro (+); cierra el poro (-); no tiene efecto (x)

## **2.5. *Debaryomyces hansenii* como modelo de estudio**

*Debaryomyces hansenii* es una levadura que normalmente reside en hábitats con alto contenido de sal como el agua marina, de donde se aisló por primera vez (Norkrans y Kylin, 1969) y en otros como los quesos, la cerveza, el vino, productos cárnicos y los lácteos (Breuer y Harms, 2006).

Desde el punto de vista biotecnológico, en los últimos años esta levadura se ha convertido en un modelo de gran interés para la investigación básica y aplicada. Este interés se debe principalmente a diversas características del microorganismo, como su no patogenicidad, su gran versatilidad para metabolizar diversas fuentes de carbono (glucosa, sacarosa, galactosa, glicerol, lactato, manitol, etanol, trehalosa, celobiosa, ribitol, succinato, gluconato, etc.) (Breuer y Harms, 2006) y una gran capacidad para crecer en ambientes con bajas temperaturas (Norkrans, 1966), alta salinidad (Norkrans, 1966; Prista y cols., 2005) y en diversos intervalos de pH (Norkrans, 1966; Hobot y

Jennings, 1981). Aunque facultativa, esta levadura emplea el metabolismo aeróbico en mayor medida que la fermentación (Sánchez y cols., 2006).

Estas cualidades son aprovechadas enormemente en la industria para la síntesis de compuestos naturales y artificiales (carbohidratos y lípidos, principalmente), expresión de enzimas y proteínas de interés comercial, elaboración de probióticos, fermentación, etc. (Fadda y cols., 2004; Breuer y Harms, 2006).

## **2.6. Principales estudios realizados en *Debaryomyces hansenii***

Los primeros estudios realizados en *D. hansenii* se enfocaron a caracterizar los mecanismos por los que la levadura se adapta a la alta osmolaridad. Estos demostraron que reside en ambientes donde se encuentra expuesto constantemente a altas concentraciones de cationes monovalentes ( $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ) (Norkrans, 1966; Prista y cols., 1997). La preferencia por este tipo de hábitats no se debe únicamente a la capacidad de resistir al estrés osmótico, sino a que en estas condiciones optimiza su crecimiento (Prista y cols., 1997). Por ello se ha propuesto clasificar a este organismo como halófilo (González-Hernández y cols., 2002) y no sólo como halotolerante.

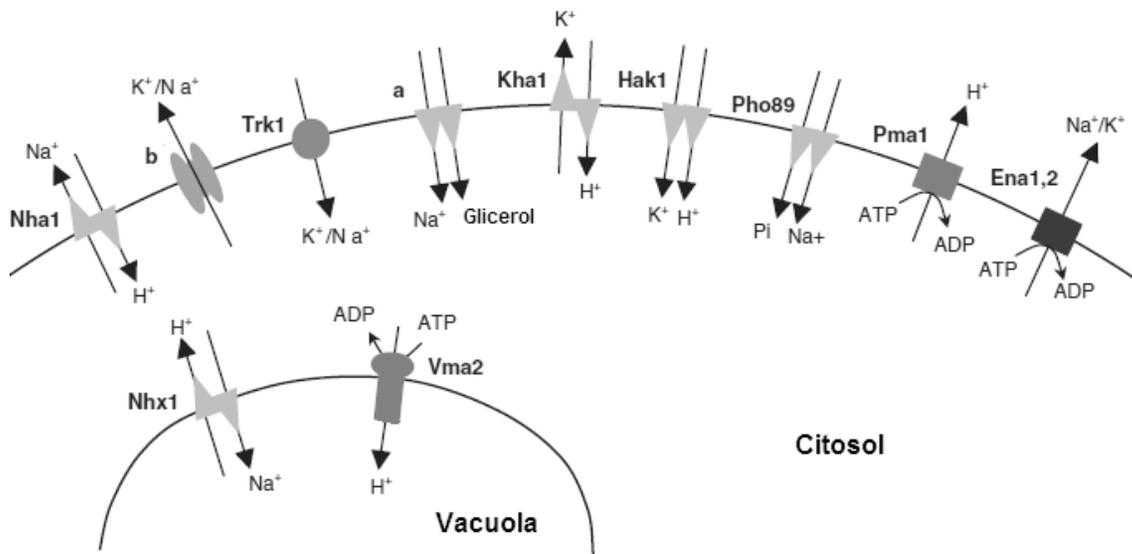
Los microorganismos halófilos son aquellos que pueden reproducirse y realizar sus funciones metabólicas con mayor eficacia en medios con alta salinidad. Son diferentes los halotolerantes, que únicamente modulan sus funciones para resistir al estrés en dichas condiciones (González-Hernández y cols., 2002). Dos estrategias principales son llevadas a cabo por los organismos que resisten la hipersalinidad: la “sodio-excluyente” y “sodio-incluyente”. La primera es llevada a cabo por los halotolerantes, microorganismos capaces de expulsar la mayor cantidad de sodio posible de su citoplasma y balancear la presión osmótica con solutos compatibles

(sacarosa, trehalosa, glicerol, etc.). La segunda es utilizada por los halófilos; éstos almacenan grandes concentraciones de sal en el interior para balancear la presión osmótica. Por ello, se ha propuesto que han desarrollado diversas adaptaciones internas que les permiten resistir los efectos nocivos de la sal y además beneficiarse (González-Hernández y cols., 2002; Sánchez y cols., 2006, 2008).

Otros hallazgos han demostrado la presencia de varios transportadores de cationes monovalentes en la membrana plasmática y vacuolar de *D. hansenii* (Figura 3), y se demostró que al incubar el microorganismo en medios salinos se acumula una gran cantidad de cationes monovalentes en su citoplasma (Norkrans, 1969; Hobot y cols., 1981; Prista y cols., 1997). La concentración de cationes monovalentes en el agua marina es de 600 mM y 10 mM, para el Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, respectivamente. En presencia de concentraciones desiguales de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, esta levadura es capaz de internalizar en mayor medida al catión que se encuentre más concentrado en el exterior y expulsar del citosol una gran parte del otro que se encuentre en menor cantidad. En presencia de concentraciones iguales de estos cationes, se ha observado que *D. hansenii* acumula al K<sup>+</sup> preferentemente y con mayor rapidez que al Na<sup>+</sup> (Thomé-Ortiz y cols., 1998; González-Hernández y cols., 2004). Cuando la levadura se cultiva en 0.6 M de NaCl, ambos cationes se encuentran en concentraciones similares en el interior (~150 mM Na<sup>+</sup> y ~100 mM K<sup>+</sup>). Por el contrario, si es incubada en ausencia de sales o en presencia de KCl, se observa un aumento en la concentración de K<sup>+</sup> intracelular y el Na<sup>+</sup> es expulsado casi por completo (González-Hernández y cols., 2004).

Diversos autores coinciden en que los efectos internos de las sales descritos hasta el momento sobre esta levadura, probablemente son la causa por la que mejora el crecimiento y aumenta la biomasa. Se cree que la razón principal de este

comportamiento es la optimización de su metabolismo al incubarse en presencia de sales (Almagro y cols., 2000; González-Hernández y cols., 2002). Se ha observado que en presencia de NaCl y KCl mejora la actividad de las enzimas glucolíticas y del metabolismo aeróbico (Sánchez y cols., 2006) y se induce la expresión de algunas enzimas (Alba-Lois y cols., 2004). Además de las enzimas y proteínas en el citoplasma de *D. hansenii*, los organelos como el retículo endoplásmico y las mitocondrias también se encuentran expuestos al Na<sup>+</sup> y al K<sup>+</sup>.



**Fig. 4. Transportadores membranales y vacuolares involucrados en el flujo de cationes en *Debaryomyces hansenii*.** Los transportadores conocidos hasta el momento fueron encontrados mediante la búsqueda de los genes que los codifican en el genoma de esta levadura o por experimentos de transporte iónico. El cotransportador Na<sup>+</sup>/glicerol (**a**) y el uniportador K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> (**b**), no se han identificado aún, pero se tienen diversas evidencias experimentales que sugieren su existencia (Lucas y cols., 1990; González-Hernández y cols., 2004). Imagen modificada de Prista y cols., 2005.

Durante el proyecto *Génolevures*, se secuenció y reportó el genoma de *D. hansenii* junto con el de otras levaduras (Sherman y cols., 2009). Éstos se encuentran disponibles para su consulta en el sitio web del proyecto<sup>1</sup>.

En cuanto a estudios bioenergéticos reportados en este organismo, se sabe que la cadena respiratoria presenta los complejos I, II, III y IV y una oxidasa alterna insensible a cianuro e inhibida por ácido salicilhidroxámico (SHAM) y octilgalato (Veiga y cols., 2003a; Sánchez y cols., 2006). No se tienen reportes bioquímicos o por búsqueda de secuencias de genes o proteínas que demuestren la presencia de otras enzimas respiratorias alternas a parte de la AOX en esta mitocondria. El metabolismo aeróbico de *D. hansenii* se ha estudiado sólo en células intactas (Veiga y cols., 2003b; Sánchez y cols. 2006) y en partículas submitocondriales (Veiga y cols., 2003b). Hasta ahora no existen estudios cuidadosos en mitocondrias intactas, por lo que en este trabajo se propuso estandarizar las condiciones para aislarlas, determinar la presencia de otros componentes alternos como NDH2s, si ocurre una transición de la permeabilidad como en las mitocondrias de *S. cerevisiae* y el papel de los cationes monovalentes ( $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ) en el funcionamiento del organelo. El estudio de la mitocondria de *D. hansenii*, forma parte de un proyecto global que tiene como meta describir las diferencias y similitudes en la composición y regulación de la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa en mitocondrias de diversas especies de levaduras.

---

<sup>1</sup> <http://www.genolevures.org/>

### 3. HIPÓTESIS

Si en las mitocondrias de la levadura *Debaryomyces hansenii* existe una cadena respiratoria ramificada que posee los cuatro complejos respiratorios ortodoxos y una oxidasa alterna, tal y como en las mitocondrias de otras levaduras evolutivamente relacionadas, entonces es probable que posean también NADH deshidrogenasas alternas.

Si en el citoplasma de la levadura *Debaryomyces hansenii*, la mitocondria funciona óptimamente en presencia de altas concentraciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , entonces deben de existir mecanismos adaptativos específicos en las membranas mitocondriales y en las proteínas involucradas en la fosforilación oxidativa.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Identificar la presencia de NADH deshidrogenasas alternas en la cadena respiratoria y caracterizar efecto que tienen los cationes monovalentes  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  sobre los principales procesos involucrados en la fosforilación oxidativa en la mitocondria aislada de la levadura *Debaryomyces hansenii*.

### 4.2. Objetivos Particulares

- Diseñar un protocolo para aislar mitocondrias acopladas de *Debaryomyces hansenii*.
- Caracterizar experimentalmente y por búsqueda y comparación de secuencias proteicas, la presencia de componentes alternos no reportados en la cadena respiratoria de *Debaryomyces hansenii*.
- Identificar si en las mitocondrias aisladas de esta levadura ocurre una transición de permeabilidad provocada por la apertura y cierre de un poro inespecífico (MUC).
- Observar el efecto que tienen algunos moduladores de la transición de la permeabilidad en la mitocondria aislada de *Debaryomyces hansenii*.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Materiales químicos**

Todos los materiales químicos que se utilizaron son de la más alta pureza asequible comercialmente. Los materiales para realizar los ensayos experimentales, como el sorbitol, Trizma® base, antiespumante A, ácido málico, ácido pirúvico, ácido succínico, ácido maleico, ADP, NADH, NADP<sup>+</sup>, rotenona, flavona, CCCP, oligomicina, safranina y las enzimas hexocinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa son de Sigma Chem Co. (St. Louis, MO). La albumina sérica bovina (BSA) es de Millipore. La bacto-peptona y el extracto de levadura, son de BD Bioxon. Las sales (NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub> y MgCl<sub>2</sub>), el ácido fosfórico y el DL-ácido láctico son de J.T. Baker.

### **5.2. Materiales biológicos**

Se utilizaron células de la levadura *Debaryomyces hansenii* cepa Y7426 (US Department of Agriculture, Peoria, IL), donada por el Dr. Antonio Peña del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. La cepa fue estriada y resembrada periódicamente en cajas de cultivo con medio sólido YPGal–NaCl (extracto de levadura 1%, bacto-peptona 2%, galactosa 2%, NaCl 1 M y bacto-agar 2%).

### **5.3. Cultivo de las levaduras**

Se empleó como medio de crecimiento el YPLac–NaCl (extracto de levadura 1%, bacto-peptona 2%, lactato 2%, 0.6 M NaCl, pH 5.5 ajustado con NaOH). Aunque la galactosa es un sustrato no fermentable, el tiempo de crecimiento de *D.hansenii* en

cultivo líquido con este sustrato, es mayor a 48 horas para llegar a la mitad de la fase exponencial. En cambio, al utilizar lactato como fuente de carbono no fermentable, el tiempo de cultivo para alcanzar la fase logarítmica media-tardía de crecimiento es mucho más corto (~24 hrs). Para obtener una biomasa suficiente de levadura, se inocularon cuatro precultivos de 100 mL del medio YPLac–NaCl y se pusieron en agitación continua a 250 rpm durante 36 hrs en un cuarto de temperatura constante (30°C). Posteriormente, los precultivos se vaciaron en matraces con 750 mL del mismo medio y se continuó la incubación bajo las mismas condiciones hasta llegar a una  $A_{540}$  de 1.6–2.0, correspondiente a la fase exponencial media-tardía.

#### **5.4. Aislamiento de las mitocondrias acopladas de *D. hansenii***

Las células se cosecharon por centrifugación y se lavaron con agua destilada. Posteriormente, se resuspendieron en un medio de extracción (sorbitol 1 M, maleato 10 mM y BSA 0.2%, pH 6.8 (Tris)) y se mantuvieron en hielo durante diez minutos. Para la obtención de las mitocondrias se empleó el método mecánico descrito por Uribe y cols. (1985) con algunas modificaciones. Se usaron perlas de vidrio (0.5 mm de diámetro) para romper las células (70% v/v). La levadura resuspendida se vació en una cámara del homogenizador (Bead-Beater Biospec products, USA) enfriada con una camisa de hielo y se sometió a 4 ciclos de ruptura de 20 segundos e intervalos de 2 minutos de reposo.

Las mitocondrias se aislaron por centrifugación diferencial a 4°C, siguiendo el protocolo descrito para *S. cerevisiae* (Peña y cols., 1977) utilizando una centrífuga Sorvall RC-5B y rotores FIBERlite® F21-8x50y y F14-6x250y. El homogenado se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min; se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a

12,000 rpm durante 15 min. El precipitado obtenido se resuspendió en medio de aislamiento fresco con un pincel fino y a continuación se centrifugó nuevamente como en los dos ciclos anteriores. El paquete mitocondrial final fue resuspendido en 500  $\mu$ L del medio de aislamiento a 4°C y se mantuvo en hielo durante todas las cuantificaciones de proteína y experimentos.

### **5.5. Cuantificación de proteína**

La concentración de proteína mitocondrial se determinó por el método del Biuret (Gornal *et al.*, 1949) en un espectrofotómetro Beckman DU-50 a 540 nm. Se empleó BSA como estándar.

### **5.6. Oximetría**

La velocidad de consumo de oxígeno se midió en estado de reposo (edo. IV, en presencia de un sustrato y sin ADP) y en estado fosforilante (edo. III, en presencia de un sustrato y ADP), utilizando un electrodo tipo Clark conectado a un oxímetro YSI-5300 equipado con un graficador. La cámara de reacción se mantuvo a 30°C de manera constante. Como medio de respiración se utilizó una solución de sorbitol 1 M y como amortiguador se le agregó maleato 10 mM y se ajustó el pH a 6.8 con Trizma® base (Tris). Como sustrato respiratorio se utilizó piruvato-malato 10 mM. Se utilizó una concentración de proteína mitocondrial de 0.5 mg/mL para cada experimento.

Los valores del control respiratorio (CR) se obtuvieron como el cociente de la respiración en estado III sobre el estado IV. Las concentraciones de fosfato (Pi), ADP y K<sup>+</sup> utilizadas se muestran en la tabla III. La solución madre de Pi se preparó a partir de

ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) 1 M y se llevó a pH 6.8 agregando Trizma base®. La solución madre de KCl se preparó a 2 M.

### **5.7. Potencial transmembranal ( $\Delta\Psi$ )**

El potencial transmembranal fue determinado utilizando naranja de safranina, siguiendo los cambios de absorbancia a 511-533 nm en espectrofotómetros Aminco DW 2000 y Aminco DW2C, en modo dual (Akerman y Wikström, 1976). Para estos ensayos se empleó el mismo medio de respiración y condiciones que en las oximetrías, sólo se agregó naranja de safranina 10  $\mu\text{M}$  a la celda de reacción. El naranja de safranina es un colorante catiónico que interactúa con la membrana mitocondrial cuando se genera el potencial transmembranal (negativo al interior), cambiando de color. Se utilizó una concentración final de proteína mitocondrial de 0.5 mg/mL. Para abatir el  $\Delta\Psi$ , se agregó a la reacción el protonóforo *p*-clorocarbonilcianuro fenilhidrazona (CCCP) 5  $\mu\text{M}$ . Las soluciones madre de KCl, NaCl,  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{MgCl}_2$  se prepararon a 2 M.

### **5.8. Síntesis de ATP**

Se utilizó un ensayo acoplado a enzimas para cuantificar la velocidad de síntesis de ATP aprovechando las reacciones catalizadas por la hexocinasa (HK) y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) (Figura 5). La reacción se inició agregando ADP 200  $\mu\text{M}$  y se siguió la reducción de  $\text{NADP}^+$  a 340-390 nm en un espectrofotómetro Aminco DW2C en modo dual (Cortés y cols., 2000). Se utilizó oligomicina para inhibir la síntesis de ATP y determinar la señal residual, la cual fue restada a los valores experimentales. Las concentraciones de sustratos, enzimas y muestra mitocondrial utilizadas para este

ensayo fueron: piruvato-malato 10 mM,  $MgCl_2$  200  $\mu$ M, glucosa 20 mM,  $NADP^+$  1.4 mM, hexocinasa 162.5  $\mu$ g/mL, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 2 U/mL y mitocondrias 0.5 mg prot/mL.

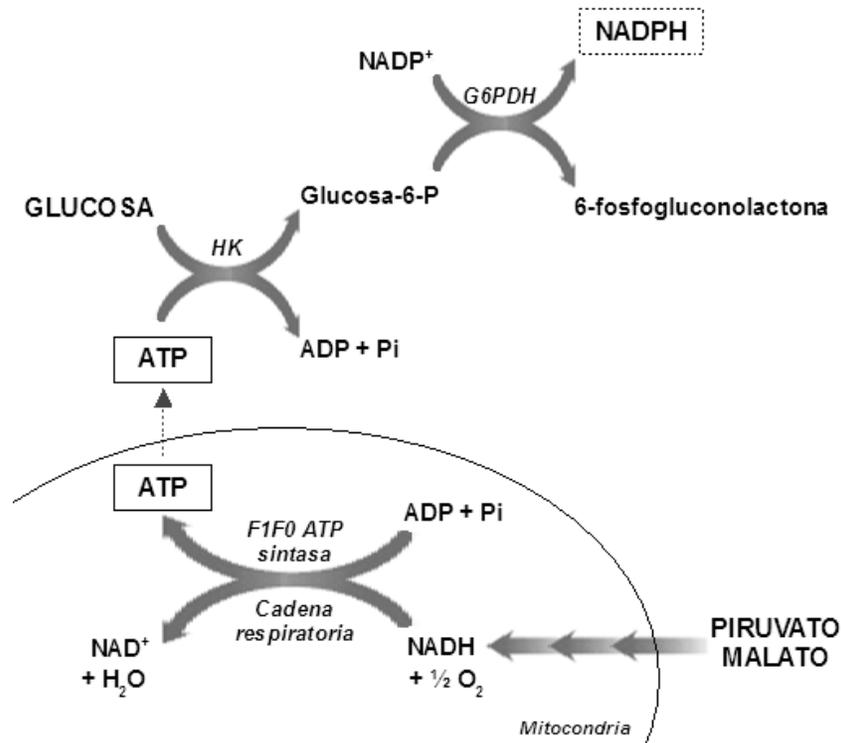


Fig. 5. Ensayo acoplado a las enzimas hexocinasa (HK) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) para cuantificar la velocidad de síntesis de ATP mitocondrial.

### 5.9. Búsqueda, alineamiento y análisis de secuencias de proteínas

Se utilizó la interfase de la Herramienta Básica de Búsquedas de Alineamientos Locales (BLAST por sus siglas en inglés *Basic Local Alignment Search Tool*) y la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés *National Center for Biotechnology Information*) para buscar y comparar distintas secuencias proteicas de complejos respiratorios alternos. Se realizó la búsqueda de

NADH deshidrogenasas alternas tipo II (NDH2), codificadas en el genoma de *D. hansenii* a partir de las secuencias de aminoácidos reportadas previamente y disponibles en la base de datos (Dujon y cols., 2004; Sherman y cols., 2009). Las secuencias de aminoácidos candidatas de *D. hansenii*, se alinearon por pares y de manera simultánea con las de NADH deshidrogenasas alternas de *S. cerevisiae* y *Y. lipolytica* utilizando ClustalW<sup>1</sup>. Con la herramienta BLAST en línea<sup>2</sup> se calcularon los porcentajes de identidad y similitud entre las secuencias de aminoácidos analizadas.

---

<sup>1</sup> <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>

<sup>2</sup> <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

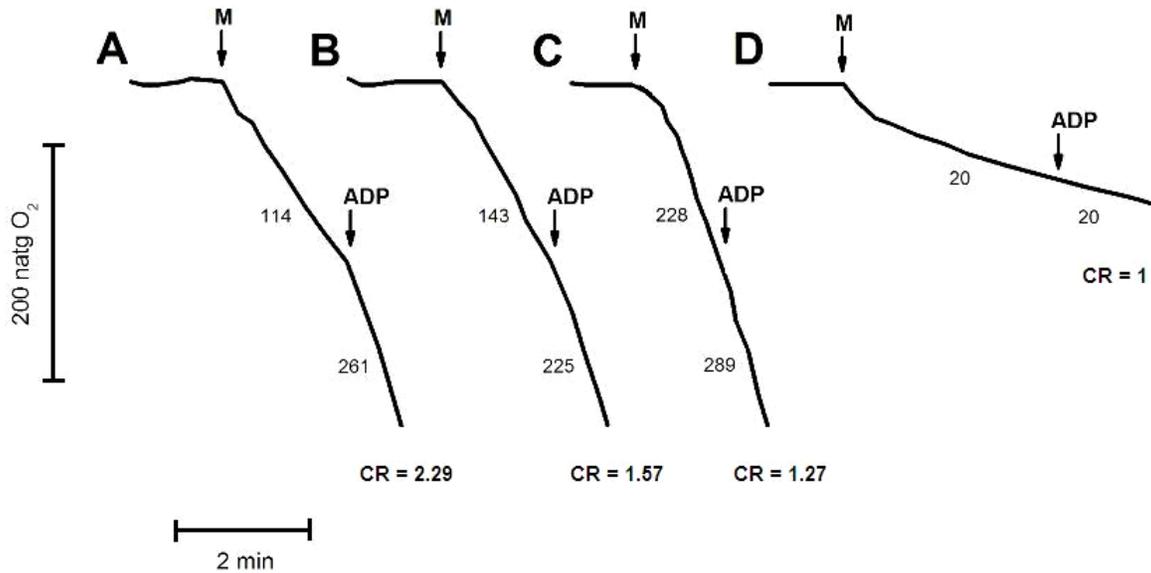
## 6. RESULTADOS

### 6.1. Cultivo de *D. hansenii* y aislamiento de las mitocondrias

Los primeros experimentos de este proyecto permitieron definir las mejores condiciones para el cultivo de este microorganismo y para la obtención de las mitocondrias acopladas de *D. hansenii*. Se observó que suplementando el medio de cultivo YPLac con NaCl 0.6 M y agregando antiespumante A (50  $\mu\text{L/L}$ ), *D. hansenii* alcanza la fase exponencial media-tardía de crecimiento en 24 hrs. Estas condiciones permitieron obtener una biomasa suficiente para el aislamiento mitocondrial por el método mecánico y permitieron un incremento en la cantidad de muestra mitocondrial obtenida. En relación con la metodología de aislamiento de las mitocondrias de esta levadura, al utilizar el medio de extracción utilizado para *S. cerevisiae* y *Y. lipolytica* (manitol 0.6 M), se obtuvo un rendimiento mitocondrial bajo al concluir la purificación del organelo. Utilizando sorbitol e incrementando la osmolaridad del medio a aprox. 1 OsM, se obtuvo el mejor rendimiento de purificación y acoplamiento mitocondrial. Esta osmolaridad se mantuvo en todos los experimentos realizados.

### 6.2. Caracterización de NADH deshidrogenasas tipo II

En los estudios de oximetría realizados, se observó que las mitocondrias aisladas de *D. hansenii* fueron capaces de usar diferentes donadores de electrones en la cadena respiratoria: piruvato-malato 10 mM y succinato 10 mM, sustratos del complejo I y del complejo II, respectivamente (Figura 6, A y B). Además, se observó un pequeño consumo de  $\text{O}_2$  utilizando etanol ( $20 \pm 4 \text{ natgO}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgProt}^{-1}$ ) (Figura 6, D).



**Fig. 6. Consumo de oxígeno con diferentes sustratos respiratorios en mitocondrias aisladas de *D. hansenii*.** Sustratos respiratorios: (A) piruvato-malato 10 mM; (B) succinato 10 mM; (C) NADH 1 mM y (D) etanol 25  $\mu$ L/mL. El consumo de O<sub>2</sub> con succinato se midió en presencia de rotenona 50  $\mu$ M. El estado fosforilante (III) se indujo agregando ADP 500  $\mu$ M. Mezcla de reacción: sorbitol 1 M, maleato 10 mM, pH 6.8 (Tris), KCl 75 mM, fosfato 4 mM, mitocondrias 0.5 mgProt/mL (vol. final 1.5 mL). Trazos representativos.

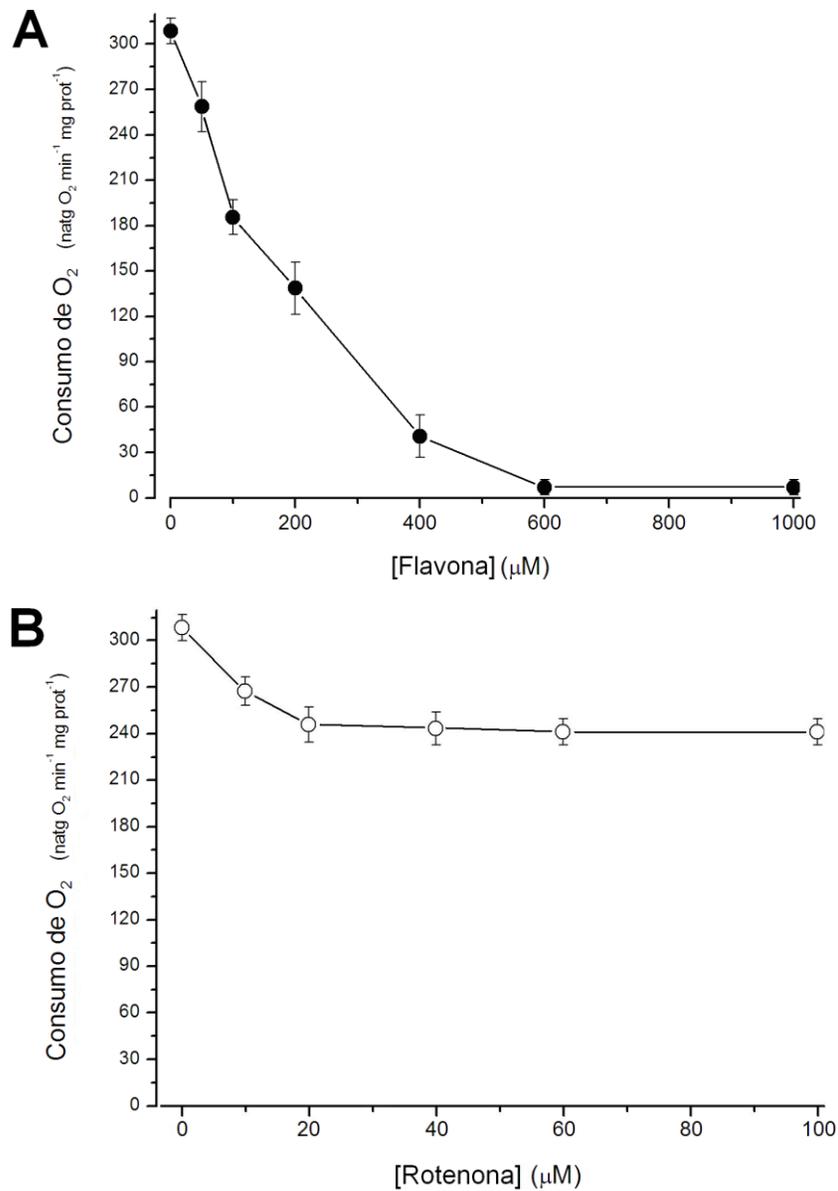
Por otro lado, estas mitocondrias fueron capaces de utilizar NADH exógeno como sustrato respiratorio, observándose un consumo mucho más elevado que al utilizar los otros sustratos (Figura 6, C). Dicho consumo de oxígeno corresponde al estado de reposo (IV). Al agregar ADP 500  $\mu$ M se observó que utilizando piruvato-malato, succinato o NADH, se induce el estado fosforilante (III), no así para la respiración con etanol (figura 6). Esto último es de gran importancia porque a diferencia de *S. cerevisiae*, en donde el etanol al oxidarse y generar NADH matricial promueve un consumo de O<sub>2</sub> elevado, en *D. hansenii* podría haber una menor oxidación por una menor cantidad de la alcohol deshidrogenasa matricial o que ésta enzima tenga una actividad mucho menor, comparada con la de *S. cerevisiae* (Sánchez y cols, 2006).

El mayor control respiratorio (CR), se obtuvo utilizando piruvato-malato como alimentador de la cadena respiratoria. El CR obtenido con piruvato-malato fue de 2.29, mientras que los CRs obtenidos con succinato y NADH, fueron de 1.57 y 1.27, respectivamente (Figura 6). En general, los valores de CR iguales o mayores a 2 en experimentos con mitocondrias aisladas de levadura se consideran óptimos (Pérez-Vázquez, 2003). El CR de 2.29 que se observó en la preparación mitocondrial, sugirió que el protocolo de extracción y las condiciones experimentales funcionaron de manera adecuada permitiendo obtener un alto porcentaje de mitocondrias intactas. En el caso del etanol y en general en los experimentos en donde no se indujo el estado III al agregar ADP, el valor del CR se tomó como 1. En los ensayos de oximetría realizados en ausencia de sustratos exógenos, se observó un consumo de O<sub>2</sub> mínimo, el cual fue restado a los valores experimentales ( $5 \pm 2 \text{ natgO}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgProt}^{-1}$ ). Se sugiere que este ligero consumo fue promovido por la presencia de sustratos endógenos. Lo anterior ocurrió muy probablemente porque las levaduras no se pusieron en ayuno previamente a la extracción de mitocondrias.

La respiración producida con el NADH exógeno, sugirió que la cadena respiratoria de esta levadura presenta otros componentes alternos como las NADH deshidrogenasas alternas. Para demostrar su presencia experimentalmente, se realizó una curva de inhibición con flavona, un inhibidor específico de esta familia de deshidrogenasas (de Vries y Grivell, 1988). Se midió el consumo de O<sub>2</sub> utilizando NADH 1 mM como sustrato respiratorio y en presencia de diversas concentraciones de flavona (50, 100, 200, 400, 600 y 1000  $\mu\text{M}$ ). La respiración fue inhibida gradualmente al aumentar la concentración de flavona; obteniéndose la máxima inhibición con 600  $\mu\text{M}$

de flavona (Figura 7A). Se decidió observar también el efecto de la rotenona sobre la respiración promovida por NADH exógeno. Este experimento sirve como control para discriminar que el NADH sea oxidado solamente por NADH deshidrogenasas alternas y no por el complejo I. Se realizó una curva de titulación con este inhibidor y se pudo observar una inhibición de aproximadamente 20% con respecto al valor de consumo en ausencia de rotenona (Figura 7B). En concentraciones arriba de 50  $\mu\text{M}$  del inhibidor no se observaron cambios significativos en el consumo de oxígeno. Una de las causas de esta inhibición puede ser la presencia de partículas submitocondriales, las cuales son capaces de utilizar el NADH tanto por las NDH2 como por el complejo I directamente (Veiga y cols., 2003b). El consumo de oxígeno utilizando piruvato-malato como sustrato respiratorio, resultó sensible parcialmente a la adición de flavona y fue inhibido completamente con rotenona (resultados no mostrados).

Por otra parte, se realizó una búsqueda y comparación de secuencias de aminoácidos por BLAST codificadas en *D. hansenii* con las secuencias de NDH2s de otras levaduras como *S. cerevisiae* y *Y. lipolytica*. Además, se realizó un análisis de comparación global contra las secuencias proteicas de todos los organismos alojadas en la base de datos. Se encontró solo una secuencia proteica en *D. hansenii* que presentó una gran similitud con las NADH deshidrogenasas tipo II, anotada como proteína hipotética DEHA2D07568p. El análisis global mostró que dicha secuencia cruza principalmente con NDH2 externas (localizadas en la cara externa de la MMI).



**Fig. 7. Inhibición de la respiración promovida por NADH exógeno en mitocondrias aisladas de *D. hansenii*.** Se utilizaron como inhibidores la flavona (**A**) y la rotenona (**B**). Mezcla de reacción: sorbitol 1 M, maleato 10 mM, pH 6.8 (Tris), KCl 75 mM, fosfato 4 mM, mitocondrias 0.5 mg prot/mL y NADH 1 mM como sustrato respiratorio (vol. final 1.5 mL). Las mediciones del consumo de oxígeno se realizaron en estado IV. Cada punto representa el promedio de 4 experimentos independientes  $\pm$  D.E.

La secuencia DEHA2D07568p se alineó por pares y de manera múltiple con la NDH de *Y. lipolytica* (YALI0F25135p) y con las tres NADH deshidrogenasas alternas reportadas de *S. cerevisiae*: NDI1 (YML120c), NDE1 (YMR145c) y NDE2 (YDL085w),

empleando la herramienta ClustalW (Figura 8). Los porcentajes de identidad y similitud entre la secuencia DEHA2D07568p y las otras secuencias se muestran en la tabla I. En general con este análisis, se pudo observar que todas las secuencias son muy parecidas y sobretodo que la secuencia de *D. hansenii* presenta una mayor identidad con las NDEs. Lo anterior, junto con la evidencia experimental, sugiere fuertemente que la proteína hipotética DEHA2D07568p codificada en el genoma de *D. hansenii*, es una NADH deshidrogenasa alterna ubicada en el lado citosólico de la MMI.

Asimismo, se compararon las secuencias de los cuatro motivos conservados de las NDH2s descritas en la NDH de *Y. lipolytica* (Kerscher y cols., 1999) con las de la proteína candidata de *D. hansenii*. Estos motivos corresponden a los sitios de unión a dinucleótidos (NADH y FAD) y a dos regiones hidrofóbicas conservadas (figura 9). Los porcentajes de identidad y similitud obtenidos se muestran en la tabla II. Esta comparación adicional se realizó para ejemplificar que la secuencia de los motivos encontrados en la proteína DEHA2D07568p, efectivamente corresponden a las secuencias de aminoácidos conservados descritas por Kerscher y cols., evidenciando que se trata de una NDE como la que poseen las mitocondrias de *Y. lipolytica*.

**Tabla I. Porcentajes de identidad y similitud entre la secuencia proteica encontrada en *D. hansenii* y las secuencias de NADH deshidrogenasas alternas de otras levaduras.**

<b>Secuencias</b>	<b>Identidad* (%)</b>	<b>Similitud** (%)</b>
DEHA2D07568p vs. YALI0F25135p	50	65
DEHA2D07568p vs. YML120c	45	64
DEHA2D07568p vs. YMR145c	52	69
DEHA2D07568p vs. YDL085w	50	69

\*El porcentaje de identidad corresponde al número de residuos idénticos de ambas secuencias entre el número total de residuos, multiplicado por 100. \*\*El porcentaje de similitud corresponde al número de residuos idénticos, sustituciones conservadas y sustituciones semi-conservadas de ambas secuencias entre el número total de residuos, multiplicado por 100.

```

DEHA2D07568p -----MFSRIGSRLLSTKSRLNLTIK-----TVEVKGG-----AVP 33
Y1 NDH MLRLRPVAVRAVSVALTRSLHVSVAKFNKIEGTAPAGLPKEVKQTAGHQ-GHHQEIP 59
Sc NDE1 -----MIRQSLMKTWANSRFSLQSKSGLVKYAKNRSFHAARNLLEDKKVILQ 49
Sc NDE2 -----MLPRLGFARTARSIRHFKMTQIS-----KPPFHSTEVG--KPGPQQ 39
Sc NDI1 -----MLSKNLYSNKRLLTSTN-----TLV 20
:
DEHA2D07568p P P P P P P P P K K R R S I W K T --- T K R V T L F S I L A A V G T L S Y K I Y S E S H P G E Q Q K Q V P Y F E N G 89
Y1 NDH K P D E N H P R R K K F H F W R S --- L W R L T Y L S A I A S L G Y I G Y R I Y V I R N P S D Q --- L P A D 109
Sc NDE1 K V A P T T G V V A K Q S F F K R T G K F T L K A L L Y S A L A G T A Y V S Y S L Y R E A N P S T Q V P Q S D T F P N G 109
Sc NDE2 K L S K S Y T A V F K K W F V R --- G L K L T F Y T T L A G T L Y V S Y E L Y K E S N P P K Q V P Q S T A F A N G 94
Sc NDI1 R F A S T R S T G V E N --- S G A G P T S F K T M K V I D P Q H S --- 51
. : . : * .
DEHA2D07568p Q K K K T L V I L G S G W G S I S L L K N L D T T L Y N V V V S P R N Y F L F T P L L P S C P T G T V E L R S I I E P 149
Y1 NDH P S K K T L V V L G S G W G S V S F L K K L D T S N Y N V I V V S P R N Y F L F T P L L P S C P T G T I E H R S I M E P 169
Sc NDE1 S K R K T L V I L G S G W G S V S L L K N L D T T L Y N V V V S P R N Y F L F T P L L P S T P V G T I E L K S I V E P 169
Sc NDE2 L K K K E L V I L G T G W G A I S L L K K L D T S L Y N V T V V S P R S F F L F T P L L P S T P V G T I E M K S I V E P 154
Sc NDI1 - D K P N V L I L G S G W G A I S F L K H I D T K K Y N V S I I S P R S Y F L F T P L L P S A P V G T V D E K S I I E P 110
. : : : * : * * : : * : * * : * * * : * * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
DEHA2D07568p V R A I T R K S P G E V L Y L E A E A T D I D P V N N K I T I K Q S T T I Q S G H S G K D T S S S K S T V S E Y T G -- 207
Y1 NDH I R G I I R H K Q A E C Q Y L E A D A T K I D H E K R I V T I R --- S A V S E N S --- 208
Sc NDE1 V R T I A R R S H G E V H Y E A E A Y D V D P E N K T I K V K --- S A K N N --- 207
Sc NDE2 V R S I A R T P G E V H Y I E A E A L D V D P K A K K V M V Q --- S V S E D E --- 192
Sc NDI1 I V N F A L K K K G N V T Y E A E A T S I N P D R N T V T I K S --- L S A V S Q L Y Q P E 154
: : . : * * * : * : : : : : : : : : : : : : : : : :
DEHA2D07568p -----I E E I T T S L N Y D Y L V V G V G A Q P S T F G I P G V A E H S T F L K E V S D S M S I R K R L M D V I E A 262
Y1 NDH -----K E E V I K E I P F D Y L V V G V G A M S T F G I P G V Q E N A C F L K E I P D A Q Q I R R T L M D C I E K 263
Sc NDE1 -----D Y D L D L K Y D Y L V V G V G A Q P N T F G T P G V Y E Y S S F L K E I S D A Q E I R L K I M S S I E K 260
Sc NDE2 -----Y F V S S L S Y D Y L V V S V G A K T T F N I P G V Y G N A N F L K E I E D A Q N I R M K L M K T I E Q 245
Sc NDI1 N H L G L H Q A E P A E I K Y D Y L I S A V G A E P N T F G I P G V T D Y G H F L K E I P N S L E I R R T F A A N L E K 214
. : : * * * : * * * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
DEHA2D07568p A N I L P K G D E D R K R L L S I V V V G G G P T G V E V A G E L Q D Y I D Q D L K K W M P E V A S E L K V I L V E A L 322
Y1 NDH A Q F E - K D P E V R K R L L H T V V V G G G P T G V E F A A E L Q D F F E D D L R K W I P D I R D D F K V T L V E A L 322
Sc NDE1 A A S L S P K D P E R A R L L S F V V V G G G P T G V E F A A E L R D Y V D Q D L R K W M P E L S K E I K V T L V E A L 320
Sc NDE2 A S S F P V N D P E R K R L L T F V V V G G G P T G V E F A A E L Q D Y I N Q D L R K W M P D L S K E M K V I L I E A L 305
Sc NDI1 A N L L P K G D P E R R R L L S I V V V G G G P T G V E A A G E L Q D Y V H Q D L R K F L P A L A E E V Q I H L V E A L 274
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
DEHA2D07568p P N V L N M F N K K L V D Y T K Q V F Q D T N I D L K T N T M V K N V S D K H V T C S V K D P K D G S T E I Q E I P Y G 382
Y1 NDH P N V L P S F S K K L I D Y T E K T F S D E K I S I L T K T M V K S V - D E N V I R A E Q T K G D G T K E T L E M P Y G 381
Sc NDE1 P N I L N M F D K Y L V D Y A Q D L F K E E K I D L R L K T M V K K V D A T T I T A K T --- G D G D I E N I P Y G 375
Sc NDE2 P N I L N M F D K T L I K Y A E D L F A R D E I D L Q V N T A V K V V E P T Y I R T L Q --- N G Q T N T D I E Y G 360
Sc NDI1 P I V L N M F E K K L S S Y A Q S H L E N T S I K V H L R T A V A K V E E K Q L L A K T K H E - D G K I T E E T I P Y G 333
* : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
DEHA2D07568p M L I W A T G N A P R A I T H N L T S K I D E Q R N A R R G L L V D E R L L V D G T D N - I Y A L G D C T F T K - Y A P 440
Y1 NDH T L V W A T G N T V R P V V R E L M S K I P A Q K G S R R G L L V N E Y L V V E G T E G - I W A L G D C S A T K - Y A P 439
Sc NDE1 V L V W A T G N A P R E V S K N L M T K L E E Q - D S R R G L L I D N K L Q L L G A K G S I F A I G D C T F H P G L F P 434
Sc NDE2 M L V W A T G N E P I D F S K T L M S R I P E Q - T N R R G L L I N D K L E L L G S E N S I Y A I G D C T A H T G F F P 419
Sc NDI1 T L I W A T G N K A R P V I T D L F K K I P E Q N S S K R G L A V N D F L Q V K G S N N - I F A I G N A F A G - L P P 391
* : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
DEHA2D07568p T A Q V A F Q E G T F L A K H F E K V H E L A T K F T I Q N P -- T A T D N I D R L K K K --- F S I L Q D K --- 491
Y1 NDH T A Q V A S Q E G S Y L A N L L N G I A K T E D L N N E I T N L E K Q S E H T F D E Q E R K N - I F A Q L E S K S R K L 498
Sc NDE1 T A Q V A H Q E G E Y L A Q Y F K K A Y K I D Q L N W K M T H A -- K D D S E V A R L K N Q --- I V K T Q S Q --- 485
Sc NDE2 T A Q V A H Q E G E Y L A K I L D K K L Q I E Q L E W D M L N S -- T D E T E V S R L Q K E --- V N L R K S K --- 470
Sc NDI1 T A Q V A H Q E A E Y L A K N F D K M A Q I P N F Q K N L S S R --- K D K I D L L F E E N N --- 435
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
DEHA2D07568p -----L P V F E Y V N Q G A L A Y I G S E K A V A D L V W G D W -- S N V T T G G T L T F L F W R S A Y V Y M C L S 544
Y1 NDH R R S R A M L P F E Y S H Q G S L A Y I G S D R A V A D L S F N F W G I M N W S S G G T M T Y F W R S A Y V S M C F S 558
Sc NDE1 -----I E D F K Y N H K G A L A Y I G S D K A I A D L A V G E A --- K Y R L A G S F T F L F W K S A Y L A M C L S 537
Sc NDE2 -----L D K F Y K H M G A L A Y I G S E T A I A D L H M G D S --- S Y Q L K G M F A F L F W K S A Y L A M C L S 522
Sc NDI1 -----F K P F K Y N D L G A L A Y L G S E R A I A T I R S G K R -- T F Y T G G G L M T F Y L W R I L Y L S M I L S 488
: * : * . * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * *

```

```

DEHA2D07568p   VKNQVLVCLDWAKVSIFGRDCSKE- 568
Yl NDH         MRNKILVCIDWMKVRVFGDISRE- 582
Sc NDE1       FRNRVLVAMDWAKVYFLGRDSSI-- 560
Sc NDE2       IRNRILIAMDWTKVYFLGRDSSV-- 545
Sc NDI1       ARSRLKVFFDWIKLAFKRDFFKGL 513
               :.:. : :** *: .: **

```

**Fig. 8. Alineamiento múltiple entre la secuencia DEHA2D07568p de *D. hansenii* y secuencias de NADH deshidrogenasas alternas de otras levaduras.** Las secuencias se anotaron como: **Yl NDH**: NADH deshidrogenasa alterna de *Y. lipolytica*; **Sc NDE1**: NADH deshidrogenasa externa de *S. cerevisiae* isoforma 1; **Sc NDE2**: NADH deshidrogenasa externa de *S. cerevisiae* isoforma 2; **Sc NDI1**: NADH deshidrogenasa interna de *S. cerevisiae*; (\*) residuos idénticos; (:) sustituciones conservadas; (.) sustituciones semi-conservadas. Los motivos de unión a dinucleótidos (I y II) se muestran en gris. Los motivos de hidrofóbicos (I y II) se muestran en los cuadros. Los números indican la posición de los aminoácidos en la secuencia lineal de cada proteína.

#### Motivo de unión a dinucleótidos I

```

D. hansenii      90  QKKKTLVILGSGWGSISLLK NLD TTYLNVVVVSPR 124
Y. lipolytica    10  PSKKTLVVVLGSGWGSVSFLK KLD TSNYNVIVVSPR 144
.                :                : : : : :

```

#### Motivo hidrofóbico I

```

D. hansenii      126  YFLFTPLLPS 135
Y. lipolytica    146  YFLFTPLLPS 155

```

#### Motivo hidrofóbico II

```

D. hansenii      214  SLNYDYL VVG VGAQPSTFGIPGVAEHSTFLKEV 246
Y. lipolytica    215  EIPFDYL VVG VGAMSSTFGIPGVQENACFLKEI 247
.: :                .                :: :

```

#### Motivo de unión a dinucleótidos II

```

D. hansenii      278  SIVVCGGGPTGVEVAGELQDYIDQDLK KWMPEVASELKVILVEA 321
Y. lipolytica    278  HTVVVCGGGPTGVEFAAELQDFFEDDLR KWIPIRDDFKVTLVEA 321
. .                : : : : : : : : :

```

**Fig. 9. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los motivos conservados en la NADH deshidrogenasa alterna de *Y. lipolytica* con la secuencia DEHA2D07568p de *D. hansenii*.** (:) sustituciones conservadas; (.) sustituciones semi-conservadas. Los residuos idénticos en ambas secuencias se muestran en gris. Los números indican la posición de los aminoácidos en la secuencia lineal de cada proteína.

**Tabla II. Porcentajes de identidad y similitud entre las secuencias de aminoácidos de los motivos conservados de la NADH deshidrogenasa alterna de *Y. lipolytica* y las secuencias de la proteína DEHA2D07568p de *D. hansenii*.**

<b>Motivos</b>	<b>Identidad* (%)</b>	<b>Similitud** (%)</b>
Motivo de unión a dinucleótidos I	74.3	94.3
Motivo Hidrofóbico I	100	100
Motivo Hidrofóbico II	66.6	87.9
Motivo de unión a dinucleótidos II	59.1	88.6

\*El porcentaje de identidad corresponde al número de residuos idénticos de ambas secuencias entre el número total de residuos, multiplicado por 100. \*\*El porcentaje de similitud corresponde al número de residuos idénticos, sustituciones conservadas y sustituciones semi-conservadas de ambas secuencias entre el número total de residuos, multiplicado por 100.

### **6.3. Caracterización de la transición de la permeabilidad mitocondrial**

Para determinar la existencia de una TPM en *D. hansenii*, se caracterizaron los efectos del fosfato inorgánico (Pi) y de los cationes divalentes  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , que se han reportado como moduladores ‘clásicos’ de este fenómeno en las mitocondrias de los mamíferos y de la levadura *S. cerevisiae* (Manon y cols., 1997; Pérez-Vázquez y cols., 2003). En ambos tipos de mitocondrias, cuando se varían las concentraciones de Pi y de los cationes divalentes, se observan cambios significativos en los valores de CR y del  $\Delta\Psi$ , los cuales tienen su valor máximo cuando la transición de la permeabilidad es inhibida; es decir, cuando se evita la disipación de los gradientes electroquímicos. Este fenómeno es controlado por la apertura y cierre de un poro inespecífico. En síntesis, cuando el MUC se encuentra abierto, la entrada y salida de solutos provoca que no se mantenga un  $\Delta\Psi$  estable y que se desacople la cadena respiratoria de la síntesis de ATP. Por el contrario, en el estado cerrado, se impide el abatimiento del  $\Delta\Psi$  y se favorece el acoplamiento de la fosforilación oxidativa (aumenta el CR).

Se ensayaron además diversas concentraciones de los cationes monovalentes  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , para determinar la sensibilidad que tienen éstas mitocondrias a éstos cationes y si ejercen algún efecto sobre los procesos involucrados en la fosforilación oxidativa; en particular, en la velocidad de consumo de  $\text{O}_2$ , el potencial transmembranal ( $\Delta\Psi$ ) y la síntesis de ATP. Se determinó también que los cationes monovalentes participan directamente en la modulación de la TPM observada bajo las condiciones experimentales utilizadas en estas mitocondrias.

Para todos los ensayos subsecuentes, se usó como donador de electrones el piruvato-malato 10 mM, el sustrato con el cual se obtuvo mejor acoplamiento respiratorio (Figura 6, A).

### **6.3.1. Efecto del fosfato y del $\text{K}^+$ sobre el consumo de oxígeno**

Se midió la velocidad de consumo de oxígeno empleando tres concentraciones de fosfato (0.4 mM, 4 mM y 10 mM) y variando la concentración de  $\text{K}^+$ , en estado de reposo (edo. IV) y en estado fosforilante (edo. III); se determinaron los controles respiratorios (CR) en cada condición.

Con 0.4 mM de  $\text{P}_i$  y en ausencia de  $\text{K}^+$ , se observó que las mitocondrias están desacopladas (no se indujo el estado III) y su CR fue de 1. Lo mismo se observó al agregar 10 y 20 mM de  $\text{K}^+$  y manteniendo la misma concentración de  $\text{P}_i$ . Al aumentar la concentración de  $\text{K}^+$  a 50 y 75 mM, se observó un aumento en la velocidad de consumo de  $\text{O}_2$  en los dos estados y un acoplamiento mayor, obteniendo CRs de 1.33 y 1.73, respectivamente (tabla III). Este efecto acoplante del catión monovalente se observó con mayor claridad en presencia de 4 mM de  $\text{P}_i$ , en donde aumentando la

concentración de  $K^+$  desde 0 a 75 mM, el CR aumenta de 1.27 a 2.29 (tabla III). Esto implica un efecto acoplante sinérgico entre el Pi y el  $K^+$ , en las condiciones descritas. En presencia de fosfato 10 mM, el  $K^+$  perdió el efecto sinérgico sobre el acoplamiento; las velocidades de consumo de  $O_2$  fueron similares en cada ensayo. En esta concentración de Pi, se obtuvo el mayor acoplamiento observado independientemente de la concentración de  $K^+$  (tabla III). Al probar concentraciones de fosfato mayores a 10 mM no se observaron cambios significativos sobre el acoplamiento (resultados no mostrados).

**Tabla III. Efecto del fosfato (Pi) y el  $K^+$  sobre la velocidad de consumo de  $O_2$  y el control respiratorio (CR) en las mitocondrias aisladas de *Debaryomyces hansenii***

[ $K^+$ ]	0.4 mM Pi			4 mM Pi			10 mM Pi		
	Edo. IV	Edo. III	CR	Edo. IV	Edo. III	CR	Edo. IV	Edo. III	CR
<b>0</b>	75 ± 6	75.0 ± 6	<b>1*</b>	130 ± 9	165 ± 8	<b>1.27</b>	129 ± 6	277 ± 9	<b>2.14</b>
<b>10</b>	79 ± 3	79.0 ± 3	<b>1*</b>	127 ± 10	191 ± 13	<b>1.51</b>	127 ± 6	273 ± 14	<b>2.16</b>
<b>20</b>	79 ± 3	79.0 ± 3	<b>1*</b>	128 ± 8	220 ± 16	<b>1.72</b>	129 ± 6	281 ± 12	<b>2.18</b>
<b>50</b>	127 ± 3	168 ± 5	<b>1.33</b>	122 ± 6	249 ± 4	<b>2.05</b>	124 ± 5	285 ± 3	<b>2.31</b>
<b>75</b>	127 ± 3	219 ± 1	<b>1.73</b>	114 ± 9	261 ± 9	<b>2.29</b>	131 ± 7	293 ± 5	<b>2.24</b>

Mezcla de reacción: sorbitol 1 M, maleato 10 mM, pH 6.8 (Tris), piruvato-malato 10 mM, mitocondrias 0.5 mg prot/mL (vol. final 1.5 mL). El estado III se indujo agregando ADP 500  $\mu$ M. Cada valor representa el promedio de 3, 6 y 4 experimentos independientes  $\pm$  D.E., para las concentraciones de fosfato, 0.4 mM, 4 mM y 10 mM, respectivamente. (\*) Condiciones en donde al agregar ADP no se indujo el estado III (no hay CR). Los valores de la velocidad de consumo de  $O_2$  están expresados en  $\text{natgO}_2 (\text{min}\cdot\text{mgProt})^{-1}$  y la [ $K^+$ ] está en mM.

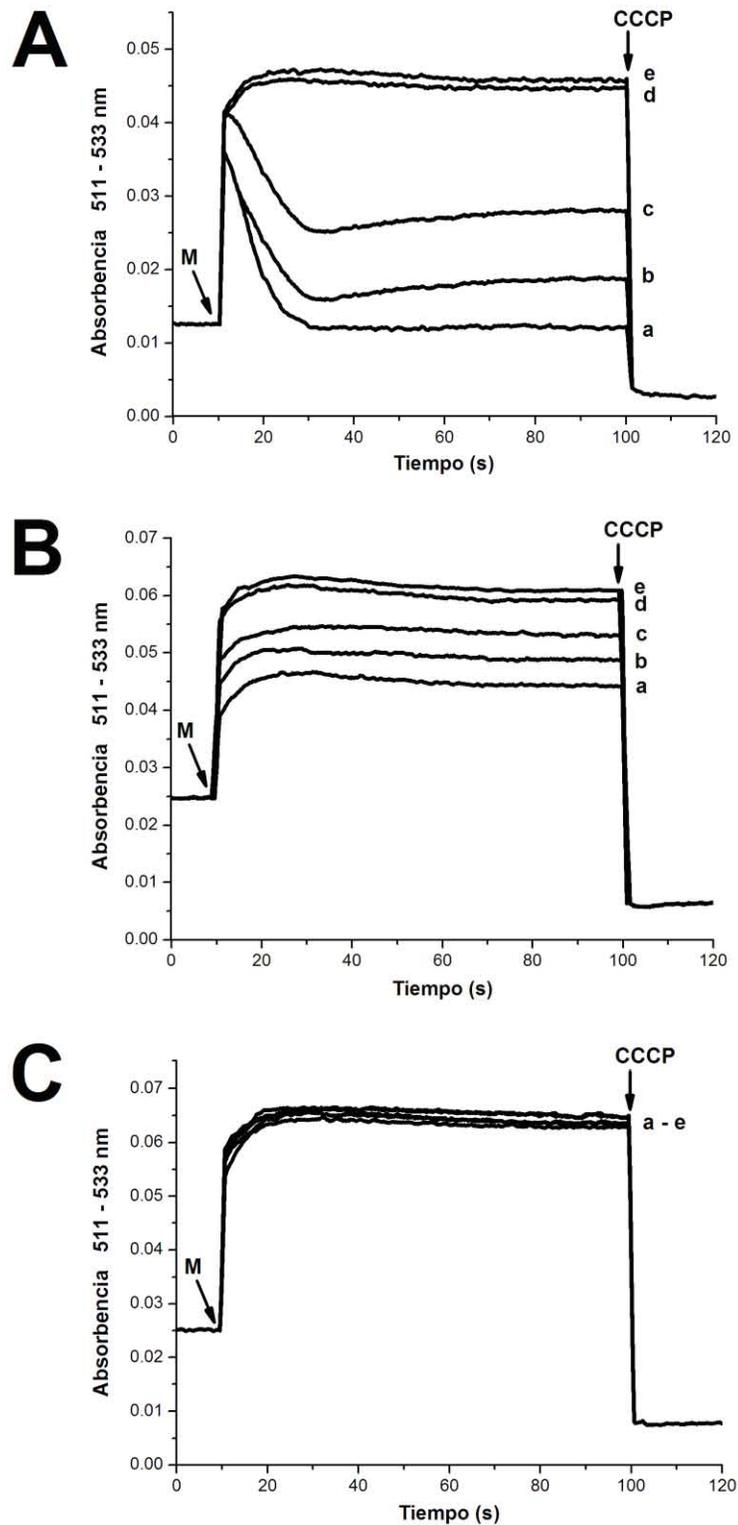
### **6.3.2. Efecto del fosfato y de los cationes monovalentes sobre el $\Delta\Psi$**

Se decidió medir el potencial transmembranal ( $\Delta\Psi$ ) generado en las mismas condiciones utilizadas en las oximetrías (en estado IV, sin agregar ADP). En la

presencia de fosfato 0.4 mM y concentraciones de  $K^+$  bajas (0–20 mM), el  $\Delta\Psi$  fue bajo e inestable (Figura 10A, a, b, c). Al incrementar la concentración de  $K^+$  a 50 y 75 mM, el  $\Delta\Psi$  se volvió estable y aumentó considerablemente (Figura 10A, d, e). Por otro lado, al medir el  $\Delta\Psi$  en presencia de fosfato 4 mM, se observó que en todas las concentraciones de  $K^+$  ensayadas, se mantuvo estable y solo aumentó ligeramente al aumentar la concentración de  $K^+$  (Figura 10B, a–e). Al igual que en los resultados de oximetría, el  $K^+$  ya no mostró efecto sobre el  $\Delta\Psi$  en presencia de 10 mM de  $P_i$ . En este caso el potencial generado se mantuvo alto y estable en todas las condiciones (figura 8C, a-e). Hasta el momento, estos resultados hicieron sospechar que la caída del potencial transmembranal al disminuir tanto la concentración de  $K^+$  como la de  $P_i$ , se podría deber a un abatimiento del gradiente electroquímico causado por una transición de la permeabilidad (Manon y Guérin, 1998).

La TPM propuesta podría ocurrir gracias a la formación y apertura de un MUC en las mitocondrias de *D. hansenii* similar al caracterizado en las mitocondrias de *S. cerevisiae* (YMUC). La idea de una transición de la permeabilidad controlada por un MUC se apoya en la sensibilidad de este fenómeno a la concentración de  $P_i$ . Dicha sensibilidad se ha caracterizado en todas las mitocondrias en donde ocurre una TPM “fisiológica” (no inducida con ionóforos) (Manon y Guérin, 1997).

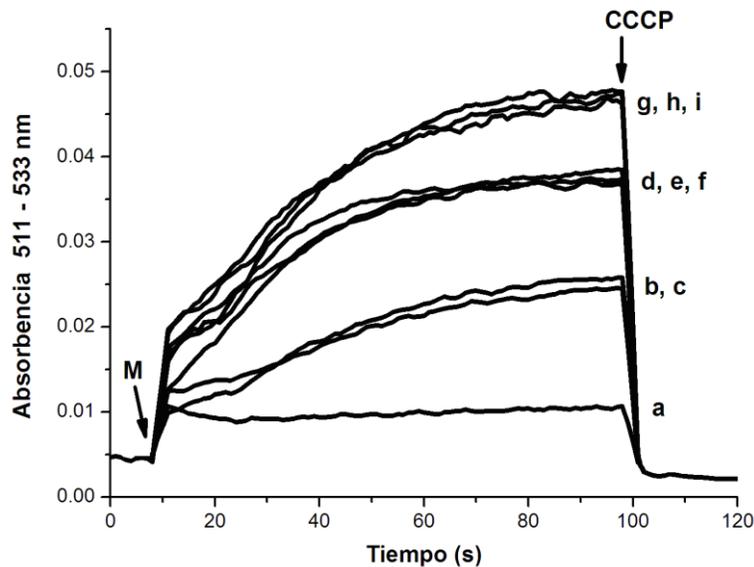
En este tipo de mitocondrias y bajo las condiciones experimentales utilizadas, la transición de la permeabilidad resultó ser mucho menos sensible al  $P_i$  que en el caso de lo observado en *S. cerevisiae*, en donde se requieren concentraciones menores de fosfato para cerrarlo (entre 1 y 2 mM) (Manon y Guérin, 1998). En este caso, la TPM de *D. hansenii* se inhibió completamente con una concentración de  $P_i$  alrededor de 10 mM.



**Fig. 10. Efecto del fosfato y del  $K^+$  sobre el potencial transmembranal ( $\Delta\Psi$ ) de mitocondrias aisladas de *D. hansenii*. (A) 0.4 mM Pi, (B) 4 mM Pi y (C) 10 mM Pi. Las adiciones de  $K^+$  fueron: a, 0; b, 10 mM; c, 20 mM; d, 50 mM; e, 75 mM. Las mitocondrias (M) ó CCCP 5  $\mu$ M, se adicionaron en donde se indica. Las condiciones experimentales fueron las mismas que en la tabla III, solo se agregó safranina 10  $\mu$ M. Volumen final 2 mL. El  $\Delta\Psi$  se midió en estado IV.**

Por otro lado, el efecto del  $K^+$  sobre el  $\Delta\Psi$  sugirió una excepcional sensibilidad de la TPM nunca antes observada en mitocondrias de otras especies. Hasta la fecha, solo se había observado el abatimiento del  $\Delta\Psi$ , al agregar una concentración elevada de  $K^+$  a una muestra de mitocondrias de cualquier tipo (Castrejón y cols., 1997). Este comportamiento se debe a que la MMI es permeable al  $K^+$ . Al incorporarse, se abate el  $\Delta\Psi$  por el ingreso de cargas positivas a la matriz y por el antiporte  $K^+/H^+$  que se utiliza para expulsar al  $K^+$ . El antiportador  $K^+/H^+$  gasta parte de la energía del  $\Delta\Psi$  con la finalidad de mantener el volumen mitocondrial y prevenir el hinchamiento (Garlid, 1988).

Se decidió probar también el efecto del  $Na^+$  sobre el  $\Delta\Psi$ , para determinar si la TPM también resultaba inhibida como ocurrió con el  $K^+$  o evidenciar un papel distinto de los cationes monovalentes en este tipo de mitocondrias. Por un lado se evaluó el efecto del  $Na^+$  y por otro el efecto producido al combinar ambos cationes monovalentes. Estos ensayos se realizaron en presencia de fosfato 0.4 mM para eliminar el efecto propio del anión sobre el acoplamiento (incrementar el CR). El trazo a de la figura 11 corresponde al  $\Delta\Psi$  control en ausencia de cationes monovalentes. Se probaron tres concentraciones de  $Na^+$  y tres de  $K^+$ : 18.75, 37.5 y 75 mM. En cada caso se observó el mismo comportamiento, demostrándose que el efecto del  $Na^+$  sobre el  $\Delta\Psi$  es igual al ejercido por el  $K^+$  (Figura 11, b, c, e, f, h, i). Posteriormente, se midió el efecto de ambos cationes, midiendo el  $\Delta\Psi$  en presencia de la misma concentración de  $Na^+$  y  $K^+$ . Se agregaron a la mezcla de reacción en un ensayo 18.75 mM y en otro 37.5 mM de cada catión monovalente. En el primer caso, el  $\Delta\Psi$  generado fue equivalente al observado al emplear 37.5 mM de cada catión por separado (Figura 9, trazo d). En el segundo, se obtuvo un  $\Delta\Psi$  equivalente al emplear 75 mM de  $Na^+$  o  $K^+$  (Figura 11, g).

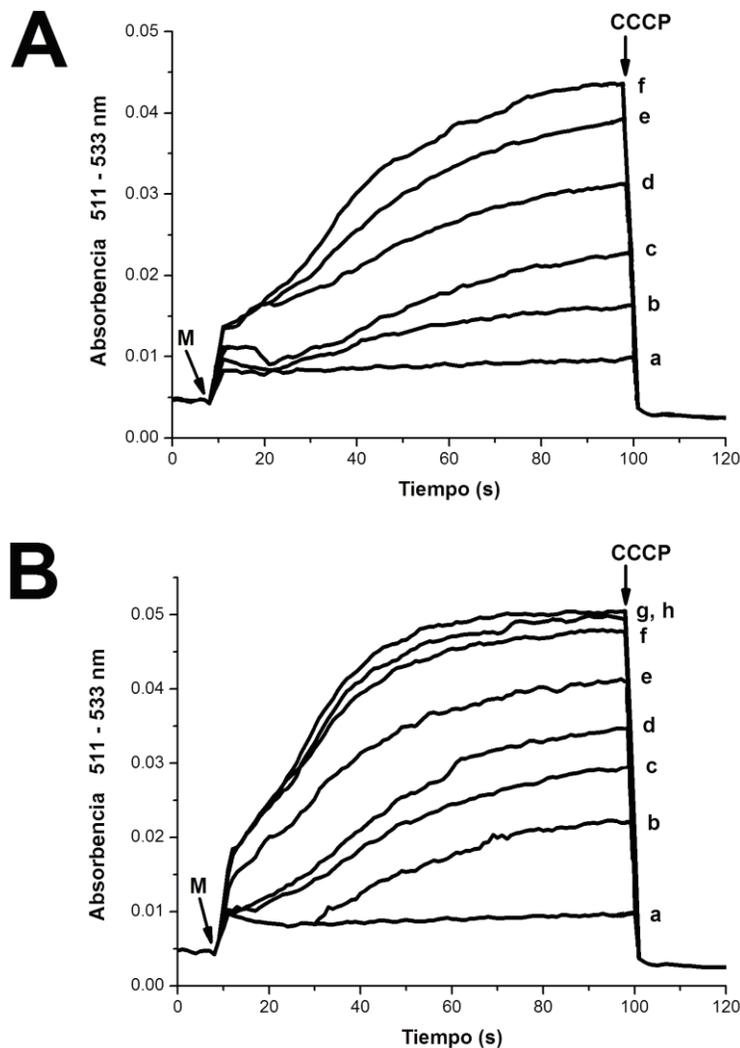


**Fig. 11. Efecto del  $\text{Na}^+$  y del  $\text{K}^+$  sobre el potencial transmembranal ( $\Delta\Psi$ ) en mitocondrias aisladas de *D. hansenii*, en presencia de fosfato 0.4 mM. Las adiciones fueron: a, 0  $\text{Na}^+$ , 0  $\text{K}^+$ ; b, 18.75 mM  $\text{Na}^+$ ; c, 18.75 mM  $\text{K}^+$ ; d, 18.75 mM  $\text{Na}^+$  + 18.75 mM  $\text{K}^+$ ; e, 37.5 mM  $\text{Na}^+$ ; f, 37.5 mM  $\text{K}^+$ ; g, 37.5 mM  $\text{Na}^+$  + 37.5 mM  $\text{K}^+$ ; h, 75 mM  $\text{Na}^+$ ; i, 75 mM  $\text{K}^+$ . Las mitocondrias (M) ó CCCP 5  $\mu\text{M}$ , se adicionaron en donde se indica. Las condiciones experimentales fueron las mismas que en la tabla III, solo se agregó safranina 10  $\mu\text{M}$ . Volumen final 2 mL. El  $\Delta\Psi$  se midió en ausencia de ADP (estado IV).**

### 6.3.3. Efecto de los cationes divalentes sobre el $\Delta\Psi$

La TPM descrita en las mitocondrias de diversas fuentes es también sensible a los cambios en la concentración de los cationes divalentes  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . Por esta razón y para tener mas evidencia de que lo descrito hasta el momento ocurre por una TPM, se decidió estudiar también el efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  sobre el  $\Delta\Psi$ . Las determinaciones se hicieron en presencia de fosfato 0.4 mM. Los trazos a de la figura 12A y 12B, corresponden a los  $\Delta\Psi$  controles en ausencia de cationes divalentes. Al aumentar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , se observó un incremento y estabilización del  $\Delta\Psi$  (Figura 10A). En concentraciones bajas de  $\text{Ca}^{2+}$  (100–200  $\mu\text{M}$ ), se observó un incremento parcial en el  $\Delta\Psi$  (Figura 12A, b, c). El efecto máximo se obtuvo con 1 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 12A, f). Concentraciones superiores a 1 mM no produjeron aumentos adicionales sobre el  $\Delta\Psi$

(resultados no mostrados). El  $Mg^{2+}$  a bajas concentraciones (100–200  $\mu M$ ) incrementó parcialmente el  $\Delta\Psi$  (Figura 12B, b, c). En presencia de 2 mM de  $Mg^{2+}$  y en concentraciones superiores, se observó el máximo  $\Delta\Psi$  generado (Figura 12B, f, g, h). Con esto, se obtuvo mayor evidencia de que el abatimiento del  $\Delta\Psi$  descrito ocurre por una TPM, siendo esta sensible a la concentración de  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ .



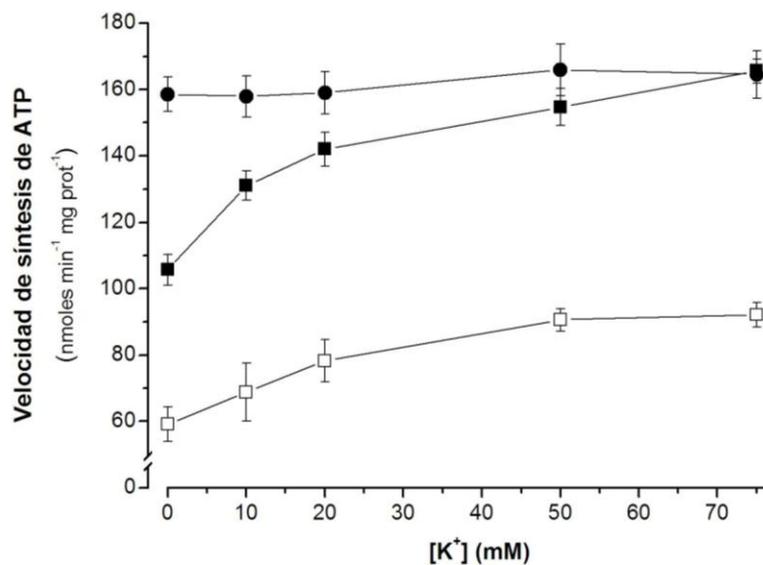
**Fig. 12. Efecto del  $Ca^{2+}$  y del  $Mg^{2+}$  sobre el potencial transmembranal ( $\Delta\Psi$ ) en mitocondrias aisladas de *D. hansenii*, en presencia de fosfato 0.4 mM. (A) Efecto del  $Ca^{2+}$ . Las adiciones de  $Ca^{2+}$  fueron: a, control; b, 100  $\mu M$ ; c, 200  $\mu M$ ; d, 500  $\mu M$ ; e, 750  $\mu M$ ; f, 1 mM. (B) Efecto del  $Mg^{2+}$ . Las adiciones de  $Mg^{2+}$  fueron: a, control; b, 100  $\mu M$ ; c, 200  $\mu M$ ; d, 500  $\mu M$ ; e, 1 mM; f, 2 mM; g, 5 mM; h, 10 mM. En donde se indica se adicionaron las mitocondrias (M) ó CCCP 5  $\mu M$ , Las condiciones experimentales fueron las mismas que en la tabla III.**

#### **6.3.4. Efecto del fosfato y del $K^+$ sobre la síntesis de ATP**

En las mitocondrias de *D. hansenii*, la transición de la permeabilidad fue promovida por una disminución en la concentración de  $P_i$  y de los cationes monovalentes ( $Na^+$  y  $K^+$ ) y divalentes ( $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ ). La TPM provocó el abatimiento en el  $\Delta\Psi$  y la consiguiente disminución en el acoplamiento. Esto sugirió que la fosforilación oxidativa en estas mitocondrias puede optimizarse aumentando la concentración de los moduladores mencionados. Para demostrar lo anterior, se midió la síntesis de ATP en presencia de las tres concentraciones de fosfato utilizadas previamente (0.4, 4 y 10 mM) y variando la concentración de  $K^+$ . En presencia de fosfato 0.4 mM se observó una velocidad de síntesis de ATP lenta ( $59.1 \pm 5.2$  nmoles $\cdot$ min $^{-1}$  $\cdot$ mgProt $^{-1}$ ) y al incrementar la [ $K^+$ ] la velocidad aumentó a  $92.1 \pm 3.7$  nmoles $\cdot$ min $^{-1}$  $\cdot$ mgProt $^{-1}$ . Midiendo el ensayo con fosfato 4 mM se observó una velocidad de  $105.7 \pm 4.6$  nmoles $\cdot$ min $^{-1}$  $\cdot$ mgProt $^{-1}$  en ausencia del catión monovalente; un aumento considerable con respecto a la [ $P_i$ ] anterior. En esta misma condición, elevando la concentración de  $K^+$  hasta 75 mM se optimizó la síntesis de ATP hasta  $165.6 \pm 3.6$  nmoles $\cdot$ min $^{-1}$  $\cdot$ mgProt $^{-1}$ . En la concentración más elevada de fosfato probada, se observó la mayor velocidad de síntesis de ATP  $161.2 \pm 3.8$  nmoles $\cdot$ min $^{-1}$  $\cdot$ mgProt $^{-1}$  (en promedio), la cual no fue superada con la adición de  $K^+$ . Los resultados se muestran en la figura 13.

Al igual que en el consumo de oxígeno y el potencial transmembranal, el  $P_i$  y el  $K^+$  mostraron los mismos efectos sobre la síntesis de ATP. A concentraciones bajas e intermedias de  $P_i$ , el  $K^+$  tiene un efecto sinérgico, mejorando considerablemente la velocidad de síntesis de ATP. Por el contrario, en concentraciones de  $P_i$  elevadas, el  $K^+$  pierde su efecto y el proceso sólo es modulado por el anión. Este efecto sobre la

síntesis de ATP proporciona mayor evidencia experimental de que este proceso puede deberse a la TPM. Bajo las condiciones experimentales utilizadas a lo largo de este estudio, se pudo demostrar que en este tipo de mitocondrias ocurre una transición de la permeabilidad que se inhibe a altas concentraciones de Pi y concentraciones intermedias de K<sup>+</sup> (~75 mM).



**Fig. 13. Efecto del fosfato y del K<sup>+</sup> sobre la velocidad de síntesis de ATP en mitocondrias aisladas de *D. hansenii*.** Se utilizaron tres concentraciones fijas de Pi: 0.4 mM (□), 4.0 mM (■) y 10.0 mM (●). Mezcla de reacción: sorbitol 1.0 M, maleato 10 mM, pH 6.8 (Tris), piruvato-malato 10 mM, hexocinasa 162.5 µg/mL, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 2 U/mL, MgCl<sub>2</sub> 200 µM, glucosa 20 mM y NADP<sup>+</sup> 1.4 mM, mitocondrias 0.5 mg prot/mL, volumen final 2 mL. La reacción fue iniciada al agregar ADP 200 µM. Cada punto representa el promedio de 4 experimentos independientes ± D.E.

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1. *El aislamiento de las mitocondrias de D. hansenii*

Para la obtención de mitocondrias acopladas de *D. hansenii*, se modificaron algunos detalles sobre el cultivo de este microorganismo y el aislamiento que suele realizarse para otras levaduras (Uribe y cols., 1985). Se utilizó lactato como fuente de carbono en el medio de cultivo, debido a que promueve el metabolismo aeróbico. El lactato promueve una mayor biogénesis mitocondrial que fuentes de carbono fermentables, como la glucosa. El NaCl 0.6 M se agregó al medio porque en presencia de esta concentración, *D. hansenii* mejora su crecimiento con respecto a otros medios de cultivo sin sal (Norkrans, 1966, Prista y cols., 1997). Además, se tienen estudios previos en los que la adición de sales al medio, modifica el metabolismo aerobio de esta levadura, aumentando su eficiencia (Thomé-Ortiz y cols., 1998; Sánchez y cols., 2006). Lo anterior permitió la obtención de una biomasa de levadura óptima para el aislamiento de una cantidad de mitocondrias suficiente para los experimentos.

Se modificaron además algunos detalles del protocolo de extracción de mitocondrias. Rutinariamente, para aislar mitocondrias de levadura se emplea un medio de extracción a 0.6 OsM. Utilizando este medio en *D. hansenii* se obtienen preparaciones mitocondriales desacopladas y con bajo rendimiento. En la literatura se ha reportado que en el interior de la levadura se acumulan grandes cantidades de iones y solutos compatibles como el glicerol (Gustafsson y Norkrans, 1976; Larsson y cols., 1990). Por estas razones, el citosol de *D. hansenii* debe poseer una osmolaridad mucho mayor comparada con otras levaduras. Partiendo de este hecho, se incrementó la

osmolaridad del medio de extracción a aprox. 1 OsM. Dadas las diferencias tan grandes que existen en la acumulación de iones y solutos compatibles en *D. hansenii*, según las condiciones de crecimiento (González-Hernández y cols., 2002) y su posible compartimentalización (Montiel y Ramos., 2007), se sugiere que el valor de la osmolaridad utilizada en los experimentos puede aproximarse a la concentración fisiológica del citoplasma de esta levadura. Esta suposición tiene como base que bajo las condiciones experimentales utilizadas y en este valor de osmolaridad en particular se obtuvieron el mejor rendimiento de aislamiento mitocondrial y el mayor acoplamiento de la preparación. Este valor de osmolaridad se utiliza ampliamente en diversos estudios mitocondriales; por ejemplo, en la preservación de los esferoplastos de *S. cerevisiae* y de otras levaduras (Avéret y cols., 1998).

Asimismo, el medio de aislamiento se desionizó con la finalidad de depurar las especies iónicas que pudieran ejercer efectos sobre la preparación e incluso desacoplarla (p. ej. fosfatos, sulfatos, cationes monovalentes, etc.) (Avéret y cols., 1998). Los tiempos de ruptura utilizados también se modificaron para optimizar el rendimiento mitocondrial. Lo anterior se realizó porque al seguir el protocolo reportado por Uribe y cols. (1985), las células de *D. hansenii* no se rompen completamente y la cantidad de mitocondrias obtenidas es muy baja. Esto puede deberse al grosor de la pared celular o al menor tamaño celular de *D. hansenii* comparado con el de otras levaduras como *S. cerevisiae* (Breuer y Harms, 2006).

## **7.2. La cadena respiratoria ramificada de *D. hansenii* contiene una NDE.**

El flujo de electrones a través de la cadena respiratoria en *Debaryomyces hansenii* se puede llevar a cabo por la vía citocrómica y por la vía alterna (Veiga y cols.,

2003b). En 2003, estos autores reportaron la presencia de una AOX expresada presumiblemente solo en la fase estacionaria de crecimiento de esta levadura. Además, sugirieron la presencia de otros componentes respiratorios alternos en *D. hansenii*, al observar que el consumo de O<sub>2</sub> provocado por NADH en partículas submitcondriales no se inhibe completamente con rotenona. En el presente estudio se demuestra la existencia de una sola NDH2 ubicada en la cara externa de la MMI. Esta NDH2 externa (NDE) es capaz de utilizar al NADH exógeno y transferir los electrones a la poza de quinonas para que continúen su camino hasta el O<sub>2</sub>. El consumo de oxígeno utilizando el NADH como sustrato respiratorio es mucho mayor que con piruvato-malato o succinato (en estado IV y estado III), pero el CR es menor. Esta aceleración en el consumo de O<sub>2</sub> y el menor acoplamiento observado al inducir el estado III, posiblemente ocurra porque los electrones donados por la NDE se transfieren principalmente por la vía alterna (sin acoplarse a la síntesis de ATP). Este comportamiento, se ha observado en experimentos realizados con las mitocondrias aisladas de *Y. lipolytica*, en donde presumiblemente la NDE se encuentra en un alto porcentaje asociada con la AOX, canalizando los electrones del NADH directamente a ésta, lo que reduce considerablemente la transferencia a través de la vía citocrómica (Guerrero-Castillo y cols., 2009).

La AOX, al no estar acoplada al bombeo de protones, permite que el flujo de electrones ocurra más rápido y por lo tanto, la reducción del oxígeno por unidad de tiempo es mayor. La combinación de la NDE y la AOX parece establecer un sistema de reoxidación del NADH citosólico que, aunque fuese fútil, permitiría un elevado ritmo metabólico independiente de la fosforilación oxidativa. Este sistema, aparentemente es utilizado como un mecanismo de detoxificación de radicales libres muy eficiente, al

mantener la poza de quinonas oxidada aún en presencia de un flujo de electrones acelerado. La asociación de la NDE y la AOX, podría llevarse a cabo también en las mitocondrias de *D. hansenii* y ser la causa del pequeño acoplamiento observado en presencia del NADH (CR = 1.27). En esta situación, la pequeña fracción de los electrones donados que se van por la vía citocrómica, estaría acoplada a la síntesis de ATP. En el futuro, se analizarán con más detalle las posibles causas de este cambio tan abrupto en el acoplamiento al utilizar distintos sustratos respiratorios y se diferenciará la ruta principal que toman los electrones en cada caso.

El consumo de oxígeno en presencia de NADH exógeno en las mitocondrias de *D. hansenii* se inhibe por flavona. Este compuesto ha sido reportado ampliamente como un inhibidor específico de las NDH2s. La concentración máxima de inhibición del consumo de oxígeno producido por NADH exógeno en las mitocondrias aisladas de *Plasmodium yoelli yoelli* y *Paracoccidioides brasiliensis* por flavona, es de 500  $\mu\text{M}$  en ambas especies (Uyemura y cols., 2008; Martins y cols., 2008). El consumo de  $\text{O}_2$  producido por NADH exógeno en las mitocondrias de *Ustilago maydis* se inhibe en presencia de 250  $\mu\text{M}$  de flavona (Juárez y cols., 2004). En 1988, de Vries y Grivell caracterizaron la inhibición de la actividad de deshidrogenasa de la NADH:Q<sub>6</sub> oxidoreductasa de *S. cerevisiae* por flavona, reportando una IC<sub>50</sub> de 95  $\mu\text{M}$ . En dicha caracterización se observa que en presencia de 300  $\mu\text{M}$  de flavona, la actividad no se pierde por completo y se mantiene en un 20%. La concentración con la que se logra inhibir completamente el consumo de  $\text{O}_2$  por flavona en las mitocondrias aisladas de *D. hansenii* es de aproximadamente 600  $\mu\text{M}$ , congruente con las concentraciones inhibitorias reportadas en la literatura.

Por otro lado, se observó que la rotenona inhibe en una pequeña proporción esta respiración promovida por NADH exógeno. Esta inhibición ocurre probablemente por la presencia de partículas submitocondriales en la preparación que pueden utilizar directamente el sustrato a través del complejo I. Para determinar si esto es lo que ocurre, se realizará un procedimiento de purificación adicional colocando la muestra mitocondrial en un gradiente de percoll o sacarosa y ultracentrifugando para recuperar únicamente a las mitocondrias enriquecidas en una de las fases. De continuar la inhibición, se determinará si la rotenona inhibe inespecíficamente a la NDE de *D. hansenii* o bien si su efecto ocurre a nivel de algún otro complejo respiratorio.

En la cadena respiratoria ramificada de *S. cerevisiae* se encuentran dos NDH2 externas y una NDH2 interna, mientras que en la de *Y. lipolytica* sólo existe una NDH2 externa (Kerscher y cols., 1999). Ante esto, se realizaron búsquedas y comparaciones de las secuencias proteicas codificadas en *D. hansenii* por BLAST, para determinar si la utilización del NADH exógeno pudiera deberse no solo a una isoforma de la NDE. El análisis arrojó solo una secuencia candidata con alta similitud a las NDH2, anotada como proteína hipotética DEHA2D07568p. Esta secuencia se comparó contra toda la base de datos y cruzó principalmente con las secuencias de las NDE alojadas en la base de datos hasta el momento. Los porcentajes de identidad y similitud de esta secuencia son relativamente altos con respecto a la totalidad de las secuencias contra las que se comparó, denotando una gran conservación en este tipo de proteínas. Asimismo, esta proteína presenta los motivos conservados descritos en las otras NDH2s, los cuales presentan secuencias altamente conservadas. Este estudio *in silico* demuestra que en el genoma de *D. hansenii*, aparentemente no se codifican otras isoformas de la NDE ni tampoco NDIs.

### **7.3. La transición de la permeabilidad mitocondrial en *D. hansenii***

En las mitocondrias aisladas de *D. hansenii* y bajo las condiciones experimentales utilizadas, se lleva a cabo una transición de la permeabilidad sensible a diversos iones inorgánicos. Este fenómeno fue evidenciado por diferencias en el acoplamiento (CR), potencial transmembranal ( $\Delta\Psi$ ) y síntesis de ATP al variar las concentraciones de fosfato,  $\text{Ca}^{2+}$  y otros iones.

La sensibilidad de este tipo de transición de la permeabilidad al fosfato y a los cationes divalentes en las mitocondrias de *D. hansenii* sugiere la existencia de un poro inespecífico (MUC) como los que se han estudiado previamente en las mitocondrias aisladas de los mamíferos (Beutner y cols., 1998) y de *S. cerevisiae* (Manon y cols., 1997). En *D. hansenii*, el fosfato evita la transición de la permeabilidad (cierra el MUC) con una menor afinidad que la reportada para el poro de *S. cerevisiae* (Manon y cols., 1997; Pérez-Vázquez y cols., 2003). En esta última, las concentraciones de fosfato arriba de 1 mM, son capaces de inhibir la transición de la permeabilidad, mientras que en *D. hansenii* se inhibe a una mayor concentración (~10 mM).

Una característica bien documentada es que para cualquier mitocondria individual se presenta un fenómeno de “todo o nada”, es decir, las mitocondrias presentan o no la TPM (p. ej. son normales o hinchadas totalmente), sin estados intermedios (Bernardi, 1999). Esto mismo se aplica para la apertura y cierre del MUC; las mitocondrias que presenten la TPM presentan el poro abierto y las que no, tienen el poro cerrado. Sin embargo, en la preparación de mitocondrias aisladas, cada una posee diferente sensibilidad a los efectores; así, la magnitud de la dispersión de la luz observada en una suspensión mitocondrial refleja el número de organelos de la

población que presenta la TPM, más que un aumento concertado y uniforme en el volumen o en el valor del  $\Delta\Psi$  de todas las mitocondrias en suspensión (Bernardi, 1999). Por esta razón, el cierre del posible MUC de *D. hansenii* que ocurre al aumentar la concentración de Pi u otros moduladores, no se da por un cambio en el calibre del poro, sino que en las diferentes concentraciones de los efectores, observamos un porcentaje de mitocondrias con el MUC abierto y el otro restante con el MUC cerrado. Cuando la concentración de los inhibidores de la TPM (en este caso el Pi y los cationes monovalentes y divalentes) alcanza su máximo efecto, todas las mitocondrias poseen el MUC cerrado, es decir, ninguna presenta la TPM.

Además, se ha descrito ampliamente que los cationes divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ) modulan la apertura del MUC en mitocondrias de diferentes especies. En los mamíferos, el  $\text{Ca}^{2+}$  abre el PTP (Bernardi y cols, 1993). En *S. cerevisiae*, los cationes divalentes cierran el YMUC (Pérez-Vázquez y cols., 2003). La imposibilidad del  $\text{Ca}^{2+}$  para abrir el poro en la levadura puede deberse a la inexistencia de un acarreador específico del catión y a su baja captación en estas mitocondrias (Uribe y cols., 1992). En las mitocondrias de *D. hansenii*, ambos cationes divalentes inhiben la transición de la permeabilidad, bajo las condiciones experimentales utilizadas. Asimismo, se pudo notar que la transición de la permeabilidad de *D. hansenii* presenta mayor sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  que al  $\text{Mg}^{2+}$ .

Por otro lado, la exposición al  $\text{Na}^+$  y al  $\text{K}^+$  a la que están sometidas constantemente las mitocondrias de *D. hansenii* sugiere la existencia de adaptaciones o mecanismos que regulen estrictamente la permeabilidad de dichos cationes. De otro modo, un ciclo electroforético de estos cationes a través de la MMI resultaría en el

abatimiento del  $\Delta\Psi$  y el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (Garlid, 1988). En presencia de una concentración de Pi baja, la adición de altas concentraciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en las mitocondrias de *S. cerevisiae* abate el  $\Delta\Psi$  y disminuye la síntesis de ATP. Por el contrario, si la concentración de Pi es elevada, los cationes monovalentes no afectan el  $\Delta\Psi$  (Castrejón y cols., 1997).

En ausencia de Pi y  $\text{K}^+$ , las mitocondrias aisladas de *D. hansenii* mostraron una velocidad baja de consumo de oxígeno en estado IV y estado III. Aumentando la concentración del catión monovalente hasta 75 mM y en presencia de 0.4 y 4 mM de Pi, se observó un aumento en el CR, el  $\Delta\Psi$  y en la síntesis de ATP; este efecto desaparece en presencia de Pi 10 mM. Lo anterior pone en evidencia un efecto acoplante del catión monovalente sobre la fosforilación oxidativa. Se sugiere, que este acoplamiento es causado por la interacción del catión monovalente con el MUC. El  $\text{K}^+$  modula su apertura-cierre con una mayor afinidad que el Pi, cuando este último se encuentra en bajas e intermedias concentraciones. Al incrementar la concentración de  $\text{K}^+$  arriba de 75 mM se observó una disminución considerable en el  $\Delta\Psi$ . Lo anterior podría deberse a un cambio de osmolaridad en la mezcla de reacción que resulta en el desacoplamiento de la muestra y no a un efecto provocado propiamente por el catión monovalente.

Ante la posibilidad de que el  $\text{Na}^+$  exhibiera un efecto diferente al observado, se midió el  $\Delta\Psi$  en presencia del catión monovalente y además junto con el  $\text{K}^+$ . El efecto del  $\text{Na}^+$  sobre el potencial transmembranal fue el mismo que con el  $\text{K}^+$ . Al agregar ambos cationes se observó un efecto aditivo. Este resultado demuestra que el MUC de *D. hansenii* es sensible indistintamente al  $\text{Na}^+$  y al  $\text{K}^+$ .

El papel acoplante del  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , nunca antes se había observado en mitocondria y sugiere que su ocurrencia en *D. hansenii* se debe a una adaptación producida por la presencia constante de sales en el medio. En todas las mitocondrias descritas, la permeabilidad del  $\text{K}^+$  es altamente controlada por medio de un sistema de reciclaje. Este sistema involucra la captación del catión a través de un uniportador y su posterior expulsión por medio de un antiportador  $\text{K}^+/\text{H}^+$ . Este proceso provoca una disminución del gradiente eléctrico a través de la MMI y el gasto de energía como consecuencia. Con este mecanismo se garantiza el mantenimiento del volumen mitocondrial óptimo para el adecuado funcionamiento del organelo (Garlid, 1988). Al ocurrir esto en la mitocondria de *D. hansenii*, una gran cantidad de energía se pierde por la elevada concentración de cationes monovalentes a la que está expuesta. La existencia de un MUC regulado por cationes monovalentes en *D. hansenii* provee de un mecanismo de control exclusivo del funcionamiento mitocondrial. Dos posibles causas de esta modulación podrían deberse a la existencia de un sitio específico para catión monovalente en algún componente del MUC o bien que las conformaciones que adopta el poro sean sensibles particularmente al cambio de la fuerza iónica del medio, producida principalmente por las concentraciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ .

La inhibición de la transición de la permeabilidad en *D. hansenii* en presencia de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  podría permitir que la fosforilación oxidativa no se vea afectada por el ciclo fútil de transporte de los cationes monovalentes. Cuando el MUC se encuentra cerrado, la permeabilidad a los cationes monovalentes se vería drásticamente reducida, permitiendo que la energía del gradiente electroquímico de  $\text{H}^+$  se aproveche óptimamente para la síntesis del ATP. Asimismo, en la glucólisis de éste organismo se ha demostrado que en presencia de cationes monovalentes hay un aumento en la

actividad de la vía (Sánchez y cols., 2006). Estos efectos de las sales sobre la glucólisis y el metabolismo mitocondrial, explicarían en gran medida el incremento en la tasa de crecimiento de esta levadura cuando se cultiva en ambientes hipersalinos.

La caracterización de una mayor cantidad de mitocondrias aisladas de diferentes especies ha permitido evidenciar que estos organelos han evolucionado junto con la célula para adaptarse al ambiente donde residen. Como resultado de estas adaptaciones, existe una variación en la composición proteica del organelo. Se ha observado que esta variabilidad, al menos en los componentes de la cadena respiratoria, no ocurre de manera aleatoria. Por ejemplo, al analizar un grupo de 21 especies de levaduras, doce poseen tanto el complejo I como la AOX, mientras que una, *Pichia anomala*, posee solo la AOX y no el complejo I (Veiga y cols., 2003a); las otras restantes no poseen ni complejo I ni AOX. Esta distribución refleja que la ocurrencia de proteínas mitocondriales como las AOXs podría tener otras funciones en conjunto con componentes específicos de la cadena respiratoria, además de permitir la existencia de una ruta alterna resistente a inhibidores.

La levadura *S. cerevisiae* no posee complejo I ni AOX, pero en sus mitocondrias si se forma un MUC. Por otro lado, *Y. lipolytica* y *D. hansenii*, que son levaduras evolutivamente relacionadas (Dujon y cols., 2004), parecen poseer una composición de la cadena respiratoria muy conservada (las dos contienen complejo I y AOX). A pesar de esto, la primera no lleva a cabo una transición de permeabilidad, mientras que la segunda sí. Con esto podría pensarse que la formación del MUC, no depende únicamente de la presencia de las proteínas que lo conforman (ANT, PiC, etc.), sino que además podría depender de la presencia de otras proteínas de las membranas mitocondriales (entre éstas las de la cadena respiratoria). Además, el MUC podría

formarse preferentemente en mitocondrias que posean sitios particulares generados por la distribución y arreglos específicos de las proteínas sobre la superficie de las membranas mitocondriales (p. ej. en los puntos de contacto de la MMI con la MME).

Hasta el momento, la formación del MUC en levaduras continua siendo un enigma y aún no se han realizado suficientes estudios para determinar las causas por las que se puede ensamblar y controlar la TPM. Por este motivo, se pretende continuar con la caracterización del MUC en ésta y otras levaduras con la finalidad de esclarecer las causas de la existencia de este tipo de estructura en levaduras, determinar el papel fisiológico que tiene y establecer si otras proteínas como los complejos respiratorios y acarreadores intervienen directamente en su ensamblaje.

Para demostrar fehacientemente la existencia del MUC en *D. hansenii* como el responsable de la transición de la permeabilidad descrita en este estudio, se pretende por un lado diseñar un protocolo para medir el hinchamiento-reconstrucción de las mitocondrias aisladas de *D. hansenii*, siguiendo los cambios de  $A_{540}$ . Este experimento ha sugerido en otro tipo de mitocondrias que el cambio de volumen mitocondrial observado es debido a la apertura o cierre de un poro inespecífico (Pérez-Vázquez y cols., 2003; Gutiérrez-Aguilar y cols., 2007, 2009). En el caso de este tipo de mitocondrias, la limitante al emplear este tipo de experimento, hasta el momento, ha sido la imposibilidad de observar el hinchamiento inducido por la adición de  $K^+$ . En este estudio se propone que los cationes monovalentes inhiben la TPM cerrando el MUC, por lo que no se observaría hinchamiento al agregar estos cationes, a diferencia de lo observado en las mitocondrias de otras fuentes (Pérez-Vázquez y cols., 2003). Por otro lado, en estudios preliminares, se pudo notar hinchamiento al medir los cambios de  $A_{540}$  de una muestra mitocondrial en estado IV en presencia de mersalil y ausencia de  $K^+$ .

Asimismo, en presencia de mersalil y 75 mM de  $K^+$ , se observa un incremento de volumen mitocondrial, aunque menor que en el caso anterior. De confirmarse estos resultados, se podría apoyar en mayor medida la premisa de que la TPM descrita en este estudio se debe a la formación de un MUC y que consistentemente con lo descrito, tiene una sensibilidad particular a la concentración de cationes monovalentes.

Otra propuesta experimental para la caracterización del MUC, es la construcción de cepas mutantes de *D. hansenii* que carezcan de alguna de las proteínas que se han sugerido como componentes del MUC en *S. Cerevisiae* y otros organismos (Zamzami y Kroemer, 2001; Gutiérrez-Aguilar y cols., 2007). Tal es el caso del VDAC, el ANC y el PiC. En teoría, la eliminación de cualquiera de estas proteínas, evitaría la formación del MUC y se perdería la transición de la permeabilidad. La eliminación de cualquiera de estas proteínas, podría afectar otros procesos celulares vitales como el transporte de intermediarios de la síntesis de ATP que pudieran generar la inviabilidad de las cepas mutantes. Ante esto, una mejor estrategia parece ser la mutagénesis dirigida para cambiar residuos específicos que modifiquen la afinidad de los componentes del MUC y observar si con esto se pierde la TPM y la sensibilidad descrita en este trabajo al fosfato y a los cationes monovalentes y divalentes. Lo anterior permitirá esclarecer si los efectos descritos son debidos en realidad a la existencia de un MUC regulado específicamente por los cambios de concentración de los diversos iones inorgánicos que se utilizaron a lo largo de este estudio.

## 8. CONCLUSIONES

En las mitocondrias de *Debaryomyces hansenii* existe una NADH deshidrogenasa tipo II localizada en la cara externa de la membrana mitocondrial interna, sensible a flavona.

La presencia de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  aumenta el rendimiento de la fosforilación oxidativa de las mitocondrias aisladas de *D. hansenii*. Esta optimización ocurre al evitarse la transición de la permeabilidad mitocondrial.

En *D. hansenii*, se lleva a cabo una transición de la permeabilidad mitocondrial (TPM) y se propone que probablemente ocurre por la presencia de un canal inespecífico mitocondrial (MUC). En este organismo, la TPM es excepcionalmente inhibida en presencia de concentraciones elevadas de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ .

El fosfato y los cationes divalentes inhiben también la transición de la permeabilidad en las mitocondrias de *D. hansenii*. La TPM en este tipo de mitocondrias, presenta mayor sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  que al  $\text{Mg}^{2+}$  y se cierra con concentraciones mayores de fosfato a las reportadas en la TPM de *S. cerevisiae*.

## 9. PERSPECTIVAS

Se estudiará la transición de la permeabilidad mitocondrial en *D. hansenii* en presencia de concentraciones de fosfato,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  más elevadas y congruentes con las reportadas en la literatura. Para lo anterior será necesario modificar las condiciones de los ensayos para evitar el desacoplamiento de la muestra por los cambios de osmolaridad. Además se analizarán los efectos que presentan otros moduladores descritos en los diversos tipos de MUCs.

Se realizarán diversas estrategias experimentales que permitan determinar fehacientemente la existencia del MUC en este tipo de mitocondrias. Además sería interesante en este caso realizar una comparación entre las proteínas que se han propuesto como parte de los MUCs, con el fin de identificar la existencia de diferencias importantes que permitirían establecer las razones por las cuales se puede conformar y abrir el MUC para permitir la transición de la permeabilidad.

Se continuará el estudio de la cadena respiratoria ramificada en las mitocondrias aisladas de esta levadura para entender de mejor manera la participación de los componentes alternos en el transporte de electrones a través de las vías citocrómica y alterna. Se observará también si la expresión de las enzimas respiratorias varía de acuerdo a la fase de crecimiento. Además se caracterizarán las asociaciones que existen entre los complejos respiratorios en este tipo de mitocondrias y determinar si éstas también son sensibles o no a la presencia de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ .

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Akerman, K. E. O. y Wikström, M. K. (1976). Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett.* 68: 191-197.
- Alba-Lois, L., Segal, C., Rodarte, B., Valdés-López, V., DeLuna, A. y Cárdenas, R. (2004). NADP-glutamate dehydrogenase activity is increased under hyperosmotic conditions in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Curr. Microbiol.* 48: 68-72.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. (2002). Molecular Biology of the Cell. New York and London: Garland Science.
- Albury, M. S., Affourtit, C., Crichton, P. G. y Moore, A. L. (2002). Structure of the plant alternative oxidase. Site-directed mutagenesis provides new information on the active site and membrane topology. *J. Biol. Chem.* 277: 1190-1194.
- Almagro, A., Prista, C., Castro, S., Quintas, C., Madeira-Lopes, A., Ramos, J. y Loureiro-Dias M. C. (2000). Effects of salts on *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under stress conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 56: 191-197.
- Avéret, N., Fitton, V., Bunoust, O., Rigoulet, M. y Guérin, B. (1998). Yeast mitochondrial metabolism: from in vitro to in situ quantitative study. *Mol. Cell. Biochem.* 184: 67-79.
- Baines, C. P., Kaiser, R. A., Purcell, N. H., Blair, N. S., Osinska, H., Hambleton, M. A., Brunskill, E. W., Sayen, M. R., Gottlieb, R. A., Dorn, G. W., Robbins, J. y Molkenkin, J. D. (2005). Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature.* 434: 658-662.
- Bernardi, P. (1999). Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers and permeability transition. *Physiol. Rev.* 79: 1127-1155.
- Bernardi, P. y Petronilli, V. (1996). The permeability transition pore as a mitochondrial calcium release channel: a critical appraisal. *J. Bioenerg. Biomembr.* 28: 131-138.
- Bernardi, P., Broekemeier, K. M., y Pfeiffer, D. R. (1994). Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J. Bioenerg. Biomembr.* 26: 509-517.
- Beutner, G., Ruck, A., Riede, B., y Brdiczka, D. (1998). Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases. *Biochim. Biophys. Acta* 1368: 7-18.
- Boldogh, I. R. y Pon, L. A. (2006). Interactions of mitochondria with the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 1763: 450-62.
- Boyer, P. D. (2002). Catalytic site occupancy during ATP synthase catalysis. *FEBS Lett.* 512: 29-32.
- Brandt, U., Kersch, S., Dröse, S., Zwicker, K. y Zickermann, V. (2003). Proton pumping by NADH:ubiquinone oxidoreductase. A redox driven conformational change mechanism?. *FEBS Letters.* 545: 9-17.
- Braun, H. P. y Schmitz, U. K. (1995). Are the "core" proteins of the mitochondrial bc1 complex evolutionary relics of a processing protease?. *Trends Biochem. Sci.* 20: 171-175.
- Breuer, U. y Harms, H. (2006). *Debaryomyces hansenii* – an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast* 23: 415-437.
- Castrejón, V., Parra, M.C., Moreno, R., Peña, A. y Uribe, S. (1997). Potassium collapses the  $\Delta p$  in yeast mitochondria while the rate of ATP synthesis is inhibited only partially. *Arch. Biochem. Biophys.* 346: 37-44.
- Chacinska, A., Koehler, C. M., Milenkovic, D., Lithgow, T. y Pfanner, N. (2009). Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* 138: 628-44.

- Cortés, P., Castrejón, V., Sampedro, J.G. y Uribe, S. (2000). Interactions of arsenate, sulfate and phosphate with yeast mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1456: 67-76.
- Covian, R. y Trumpower, B. L. (2005). Rapid electron transfer between monomers when the cytochrome *bc1* complex dimer is reduced through center N. *J. Biol. Chem.* 280: 22732-22740.
- Crompton, M., Costi, A. y Hayat, L. (1987). Evidence for the presence of a reversible Ca<sup>2+</sup>-dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. *Biochem J.* 245: 915-918.
- Crompton, M., Virji, S. y Ward, J. M. (1998). Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur. J. Biochem.* 258: 729-735.
- Crompton, M., Virji, S., Doyle, V., Johnson, N. y Ward, J. M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore. *Biochem. Soc. Symp.* 66: 167-179.
- Darrouzet, E., Moser, C. C., Dutton, P. L. y Daldal, F. (2001). Large scale domain movement in cytochrome *bc1*: a new device for electron transfer in proteins. *Trends in Biochem. Sci.* 26: 445-451.
- de Vries, S. y Grivell, L. A. (1988). Purification and characterization of a rotenone-insensitive NADH:Q6 oxidoreductase from mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 176: 377-384.
- Dejean, L., Beauvoit, B., Guérin, B. y Rigoulet, M. (2000). Growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* on a non-fermentable substrate: control of energetic yield by the amount of mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 1457: 45-56.
- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., De Montigny, J., Marck, C., Neuvéglise, C., Talla, E., Goffard, N., Frangeul, L., Aigle, M., Anthouard, V., Babour, A., Barbe, V., Barnay, S., Blanchin, S., Beckerich, J. M., Beyne, E., Bleykasten, C., Boisramé, A., Boyer, J., Cattolico, L., Confanioleri, F., De Daruvar, A., Despons, L., Fabre, E., Fairhead, C., Ferry-Dumazet, H., Groppi, A., Hantraye, F., Hennequin, C., Jauniaux, N., Joyet, P., Kachouri, R., Kerrest, A., Koszul, R., Lemaire, M., Lesur, I., Ma, L., Muller, H., Nicaud, J. M., Nikolski, M., Oztas, S., Ozier-Kalogeropoulos, O., Pellenz, S., Potier, S., Richard, G. F., Straub, M. L., Suleau, A., Swennen, D., Tekaia, F., Wésolowski-Louvel, M., Westhof, E., Wirth, B., Zeniou-Meyer, M., Zivanovic, I., Bolotin-Fukuhara, M., Thierry, A., Bouchier, C., Caudron, B., Scarpelli, C., Gaillardin, C., Weissenbach, J., Wincker, P. y Souciet, J. L. (2004). Genome evolution in yeasts. *Nature.* 430: 35-44.
- Fadda, M. E., Mossa, V., Pisano, M. B., Deplano, M. y Cosentino, S. (2004). Occurrence and characterization of yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 95: 51-59.
- Frey, T. G. y Mannella, C. (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* 25: 319-324.
- Garlid, K. D. (1988). Integration of Mitochondrial Function (J. J. Lemasters, C. R. Hackenbrock, R. G. Thurman, and H. V. Westerhoff, eds.), Plenum Publishing Corp., New York. Págs. 259-278.
- Gilkerson, R. W., Selker, J. M. y Capaldi, R. A. (2003). The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett.* 546: 355-358.
- González-Hernández, J. C. y Peña, A. (2002). Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (levadura halófila). *Rev. Latinoam. Microbiol.* 44 (3-4): 137-156.
- González-Hernández, J. C., Cárdenas-Monroy C. A. y Peña, A. (2004). Sodium and potassium transport in the halophilic yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast* 21: 403-412.

- Gonzalez-Meler, M. A., Ribas-Carbo, M., Giles, L. y Siedow, J. N. (1999). The effect of growth and measurement temperature on the activity of the alternative respiratory pathway. *Plant Physiol.* 120: 765-772.
- Gornal, A. G., Bardavill, C. J. y David, M. M. (1949). Determination of serum protein by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177: 751-760.
- Guerrero-Castillo, S., Vázquez-Acevedo, M., González-Halphen, D. y Uribe-Carvajal, S. (2009). In *Yarrowia lipolytica* mitochondria, the alternative NADH dehydrogenase interacts specifically with the cytochrome complexes of the classic respiratory pathway. *Biochim Biophys Acta.* 1787: 75-85
- Gustafsson, L. y Norkrans, B. (1976). On the mechanism of salt tolerance. Production of glycerol and heat during growth of *Debaryomyces hansenii*. *Arch. Microbiol.* 110: 177-183.
- Gutiérrez-Aguilar, M., Pérez-Martínez, X., Chávez, E. y Uribe-Carvajal S. (2009). In *Saccharomyces cerevisiae*, the phosphate carrier is a component of the mitochondrial unselective channel. *Arch. Biochem. Biophys.* [Article in Press]
- Gutiérrez-Aguilar, M., Pérez-Vázquez, V., Bunoust, O., Manon, S., Rigoulet, M. y Uribe, S. (2007). In yeast,  $Ca^{2+}$  and octylguanidine interact with porin (VDAC) preventing the mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta.* 1767: 1245-1251.
- Hagerhall, C. (1997). Succinate:quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme. *Biochim. Biophys. Acta.* 1320: 107-141.
- Halestrap, A. P. (1991). Calcium-dependent opening of a non-specific pore in the mitochondrial inner membrane is inhibited at pH values below 7. Implications for the protective effect of low pH against chemical and hypoxic cell damage. *Biochem. J.* 278: 715-719.
- Halestrap, A. P. y Brennerb, C. (2003). The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Curr. Med. Chem.* 10: 1507-1525.
- Hatefi, Y. (1985). The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu. Rev. Biochem.* 54: 1015-69.
- Hatefi, Y., Haavik, A. G. y Griffiths D. E. (1962). Studies on the electron transfer system. XLI. Reduce coenzyme Q (QH<sub>2</sub>)-cytochrome c reductase. *J. Biol. Chem.* 237: 1681-1685.
- Hederstedt, L. y Ohnishi, T. (1992). Molecular Mechanisms in Bioenergetics (Ernster, L., ed) págs. 163-197. Elsevier Science Publishers, New York.
- Hinchliffe, P. y Sazanov, L. A. (2005). Organization of the iron-sulfur clusters in respiratory complex I. *Science* 309: 771-774.
- Hirano, M. y Vu, T. H. (2000). Defects of intergenomic communication: where do we stand?. *Brain Pathology* 10: 451-461.
- Hobot, J. A. y Jennings, D. H. (1981). Growth of *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* in relation to pH and salinity. *Exp. Mycol.* 5: 217-228.
- Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B. y Michel, H. (1995). Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature.* 376: 660-669.
- Joseph-Horne, T., Hollomon, D. W. y Wood, P. M. (2001). Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochim. Biophys. Acta.* 1504: 179-195.
- Juárez, O., Guerra, G., Martínez, F., Pardo, J. P. (2004). The mitochondrial respiratory chain of *Ustilago maydis*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1658: 244-251.
- Jung, D. W., Bradshaw, P. C. y Pfeiffer, D. R. (1997). Properties of a cyclosporin-insensitive permeability transition pore in yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* 272: 21104-21112.
- Kerscher, S. J., Okun, J. G. y Brandt, U. (1999). A single external enzyme confers alternative NADH:ubiquinone oxidoreductase activity in *Yarrowia lipolytica*. *J. Cell Sci.* 112: 2347-2354.

- Kerscher, S., Dröse, S., Zickermann, V. y Brandt, U. (2008). The three families of respiratory NADH dehydrogenases. *Results Probl. Cell Differ.* 45: 185-222.
- Kroemer, G., Petit, P., Zamzami, N., Vayssière, J. L. y Mignotte, B. (1995). The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J.* 9: 1277-1287.
- Lambers, H. (1980). The physiological significance of the cyanide-resistant respiration in higher plants. *Plant Cells Env.* 3: 293-302.
- Larsson, C., Morales C., Gustafsson, L. y Adler L. (1990). Osmoregulation of the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* grown in a chemostat at different salinities. *J. Bacteriol.* 172: 1769-1774.
- Lemire, B. D. y Oyedotun, K. S. (2002). The *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial succinate:ubiquinone oxidoreductase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1553: 102-116.
- Leung, A. W., Varanyuwatana, P. y Halestrap, A. P. (2008). The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition. *J. Biol. Chem.* 283: 26312-26323.
- Lucas, C., da Costa, M. y van Uden, N. (1990). Osmoregulatory active sodium-glycerol co-transport in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast.* 6: 187-191.
- Lutter, R., Abrahams, J. P., van Raaij, M. J, Todd, R. J., Lundqvist, T., Buchanan, S. K., Leslie, A. G. y Walker, J. E. (1993). Crystallization of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *J. Mol. Biol.* 229: 787-790.
- Mannella, C. A. (2006). Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim. Biophys. Acta.* 1763: 542-548.
- Mannella, C. A., Pfeiffer, D. R., Bradshaw, P. C., Moraru, I. I., Slepchenko, B., Loew, L. M., Hsieh, C. E., Buttle, K. y Marko, M. (2002). Topology of the mitochondrial inner membrane: dynamics and bioenergetic implications. *IUBMB Life.* 52: 93-100.
- Manon, S. y Guerin, M. (1997). The ATP-induced K<sup>+</sup>-transport pathway of yeast mitochondria may function as an uncoupling pathway. *Biochem. Biophys. Acta.* 1318: 317-321.
- Manon, S., y Guerin, M. (1998). Investigation of the yeast mitochondrial unselective channel in intact and permeabilized spheroplasts. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 44: 565-575.
- Martins, V. P., Soriani, F. M., Magnani, T., Tudella, V. G., Goldman, G. H., Curti, C. y Uyemura, S. A. (2008). Mitochondrial function in the yeast form of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Bioenerg. Biomembr.* 40: 297-305.
- Megías, M., Molist, P. y Pombal, D. (2008). Atlas de Histología Vegetal y Animal, Capítulo 1: Introducción. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología. Universidad de Vigo.
- Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191: 144-148.
- Mitchell, P. (1966). Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 41: 445-502.
- Montiel, V. y Ramos, J. (2007) Intracellular Na and K distribution in *Debaryomyces hansenii*. Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of DhNHX1. *FEMS Yeast Res.* 7: 102-109
- Moore, A. L. y Siedow, J. N. (1991). The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1059: 121-140.
- Nelson, D. L. y Cox M. M. (2000). Lehninger Principles of Biochemistry, 3a. Ed, Cap. 19. W. H. Freeman.
- Nicholls, D. G. y Ferguson, S. J. (2002). Bioenergetics, 3a. Ed, Cap. 5. Academic Press.
- Norkrans, B. (1966). Studies on marine occurring yeasts: growth related to pH, NaCl concentration and temperature. *Arch. Mikrobiol.* 54: 374-392.
- Norkrans, B. y Kylin, A. (1969). Regulation of potassium to sodium ratio and of the osmotic potential in relation to salt tolerance in yeasts. *J. Bacteriol.* 100: 836-845.

- Peña, A., Piña, M. Z., Escamilla, E. y Piña E. (1977). A novel method for the rapid preparation of coupled yeast mitochondria. *FEBS Lett.* 80: 209–213.
- Pérez-Vázquez, V., Saavedra-Molina, A. y Uribe, S. (2003). In *Saccharomyces cerevisiae*, cations control the fate of the energy derived from oxidative metabolism through the opening and closing of the yeast mitochondrial unselective channel. *J. Bioenerg. Biomembr.* Jun 35 (3): 231-241.
- Pfanner, N. y Meijer, M. (1997). Mitochondrial biogenesis: The Tom and Tim machine. *Current Biology.* 7: R100-R103.
- Prista, C., Almagro, A., Loureiro-Dias, M. C. y Ramos, J. (1997). Physiological basis for the high tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4005-4009.
- Prista, C., Loureiro-Dias, M. C., Montiel V, García, R. y Ramos, J. (2005). Mechanisms underlying the halotolerant way of *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res.* 5: 693-670.
- Rostovtseva, T. K., Tan, W. y Colombini, M. (2005). On the role of VDAC in apoptosis: fact and fiction. *J. Bioenerg. Biomembr.* 37: 129-142.
- Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *J. Theor. Biol.* 14: 255-274.
- Sainsard-Chanet, A. Senescence and mitochondria in fungus *Podospora anserina*. CGM-Department Cellular and Integrative Biology.
- Sánchez, N. S., Arreguín, R., Calahorra, M. y Peña, A. (2008). Effects of salts on aerobic metabolism of *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res.* 8: 1303-1312.
- Sánchez, N. S., Calahorra M., González-Hernández, J.C. y Peña, A. (2006). Glycolytic sequence and respiration of *Debaryomyces hansenii* as compared to *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23: 361-374.
- Sherman, D. J., Martin, T., Nikolski, M., Cayla, C., Souciet, J. L. y Durrens, P. (2009). Génolevures: protein families and synteny among complete hemiascomycetous yeast proteomes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 37: D550-D554.
- Siedow, J. N. y Umbach, A. L. (2000). The mitochondrial cyanide-resistant oxidase: structural conservation amid regulatory diversity. *Biochim Biophys Acta.* 1459: 432-439.
- Stock, D., Gibbons, C., Arechaga, I., Leslie, A. G. y Walker, J. E. (2000). The rotary mechanism of ATP synthase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10: 672-679.
- Thomé-Ortiz, P., Peña, A. y Ramírez, J. (1998). Monovalent cation fluxes and physiological changes of *Debaryomyces hansenii* grown at high concentrations of KCl and NaCl. *Yeast* 14: 1355-1371.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. y Yoshikawa, S. (1995). Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* 269: 1069-1074.
- Tuena de Gómez Puyou, M y Vázquez, M. (2002). Mitochondria: Una Mirada a la Evolución de los Conceptos Básicos y Modernos. Editorial Prado.
- Uribe, S., Ramírez, J. y Peña, A. (1985) Effects of beta-pinene on yeast membrane functions. *J. Bacteriol.* 161: 1195-1200.
- Uribe, S., Rangel, P. y Pardo, J. P. (1992). Interactions of calcium with yeast mitochondria. *Cell Calcium.* 13: 211-217.
- Uyemura, S. A., Luo, S., Vieira, M., Moreno, S. N. y Docampo, R. (2008). Oxidative phosphorylation and rotenone-insensitive malate- and NADH-quinone oxidoreductases in *Plasmodium yoelii yoelii* mitochondria in situ. *J. Biol. Chem.* 279: 385-393.
- Veiga, A., Arabaça, J. D. y Loureiro-Dias, M. C. (2003a). Cyanide-resistant respiration, a very frequent metabolic pathway in yeasts. *FEMS Yeast. Res.* 3: 239-245.
- Veiga, A., Arabaça, J. D. y Loureiro-Dias, M. C. (2003b). Stress situations induce cyanide-resistant respiration in spoilage yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 95: 364-371.
- Voet, D. y Voet, J. G. (2004). Biochemistry, 3rd Edition. John Wiley & Sons.

- Walker, J. E. (1992). The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) of respiratory chains. *Q. Rev. Biophys.* 25: 253-324.
- Yamada, A., Yamamoto, T., Yoshimura, Y., Gouda, S., Kawashima, S., Yamazaki, N., Yamashita, K., Kataoka, M., Nagata, T., Terada, H., Pfeiffer, D. R. y Shinohara, Y. (2009). Ca<sup>2+</sup>-induced permeability transition can be observed even in yeast mitochondria under optimized experimental conditions. *Biochim. Biophys. Acta.* 1787:1486-91.
- Zamzami, N. y Kroemer, G. (2001). The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 67-71.
- Zoratti, M. y Szabo, I. (1995). The mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta* 1241: 139-176.

# Mitochondria from the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* (halophilic organelles?)

Alfredo Cabrera-Orefice · Sergio Guerrero-Castillo ·  
Luis A. Luévano-Martínez · Antonio Peña ·  
Salvador Uribe-Carvajal

Received: 3 September 2009 / Accepted: 4 December 2009  
© Springer Science+Business Media, LLC 2010

**Abstract** The yeast *Debaryomyces hansenii* is considered a marine organism. Sea water contains 0.6 M Na<sup>+</sup> and 10 mM K<sup>+</sup>; these cations permeate into the cytoplasm of *D. hansenii* where proteins and organelles have to adapt to high salt concentrations. The effect of high concentrations of monovalent and divalent cations on isolated mitochondria from *D. hansenii* was explored. As in *S. cerevisiae*, these mitochondria underwent a phosphate-sensitive permeability transition (PT) which was inhibited by Ca<sup>2+</sup> or Mg<sup>2+</sup>. However, *D. hansenii* mitochondria require higher phosphate concentrations to inhibit PT. In regard to K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup>, and at variance with mitochondria from all other sources known, these monovalent cations promoted closure of the putative mitochondrial unspecific channel. This was evidenced by the K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-promoted increase in: respiratory control, transmembrane potential and synthesis of ATP. PT was equally sensitive to either Na<sup>+</sup> or K<sup>+</sup>. In the presence of propyl-gallate PT was still observed while in the presence of cyanide the alternative pathway was not active enough to

generate a  $\Delta\Psi$  due to a low AOX activity. In *D. hansenii* mitochondria K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> optimize oxidative phosphorylation, providing an explanation for the higher growth efficiency in saline environments exhibited by this yeast.

**Keywords** Branched respiratory chain · Divalent cations · Monovalent cations · *Debaryomyces hansenii* · Isolated mitochondria · Permeability transition

## Introduction

*Debaryomyces hansenii* is normally found among the microorganisms populating sea waters and other habitats with low water activity where its halotolerance is an advantage (Norkrans 1966; Norkrans and Kylin 1969). This yeast has found diverse biotechnological applications in recent years, such as production of dairy products and of lytic enzymes of commercial interest (Breuer and Harms 2006). In cheese manufacturing, *D. hansenii* is a choice for starter cultures as it catalyzes proteolysis and lipolysis without fermenting sugars (Fadda et al. 2004). This yeast is also attractive for study due to its ability to grow under extreme conditions such as very low temperatures (Norkrans 1966), widely different pHs (Norkrans 1966; Hobot and Jennings 1981) and high salt concentrations (Norkrans 1966, Norkrans and Kylin 1969; Prista et al. 2005; Ramos 2006). The genome of *D. hansenii* was reported by the génolevure project (Sherman et al. 2004).

At least part of the halotolerance of *D. hansenii* may be due to its potent monovalent cation transporters, present both in the plasma membrane (Hobot and Jennings 1981; Prista et al. 1997; Thomé-Ortiz et al. 1998) and in the vacuole (Montiel and Ramos 2007). However, its proteins and enzymes have to be resistant to salts, because in the

---

A. Cabrera-Orefice · S. Guerrero-Castillo ·  
L. A. Luévano-Martínez · S. Uribe-Carvajal  
Department of Biochemistry, Instituto de Fisiología Celular,  
Universidad Nacional Autónoma de México,  
Mexico City, México

A. Peña  
Department of Molecular Genetics, Instituto de Fisiología Celular,  
Universidad Nacional Autónoma de México,  
Mexico City, México

S. Uribe-Carvajal (✉)  
Instituto de Fisiología Celular,  
Universidad Nacional Autónoma de México,  
Apdo. Postal 70-242, Ciudad Universitaria, Coyoacán,  
Mexico City, Mexico  
e-mail: suribe@ifc.unam.mx

presence of high (0.5–1.0 M) external NaCl the cytoplasmic concentrations of monovalent cations ( $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$ ) reach the hundred mM range (González-Hernández et al. 2004). Given the choice, *D. hansenii* accumulates KCl instead of NaCl (Norkrans and Kylin 1969; Thomé-Ortiz et al. 1998) but both cations seem to have the same effects on *D. hansenii*, e.g. the expression of NADP-glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase is modified by either  $\text{Na}^+$  or  $\text{K}^+$ ; this regulation has not been observed in *Saccharomyces cerevisiae* (Alba-Lois et al. 2004). The  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  effect provides an explanation for the increase in biomass obtained when *D. hansenii* is grown in the presence of high salt concentrations (Prista et al. 1997) and fuels the notion that *D. hansenii* is halophilic and not just osmotolerant (González-Hernández et al. 2004).

In the cytoplasm of *D. hansenii*, enzymes are not the only structures exposed to high salts. Organelles also have to deal with concentrations around 0.4 M NaCl/KCl (Neves et al. 1997; González-Hernández et al. 2004). Thus, it would be interesting to analyze the physiology and salt adaptability of each organelle. To do this, we decided to characterize the effect of high salt concentrations on the isolated mitochondria from *D. hansenii*. We theorized that the mitochondrial adaptation to high salt concentrations would have to include strict regulation of cation permeability; otherwise, an electrophoretic cycling of the monovalent cation across the inner mitochondrial membrane would result in the depletion of the transmembrane potential ( $\Delta\Psi$ ) and in uncoupling (Garlid 1988). Indeed, in mitochondria isolated from the yeast *S. cerevisiae* addition of increasing concentrations of  $\text{K}^+$  or  $\text{Na}^+$  in the presence of low phosphate results in depletion of the  $\Delta\Psi$  and a decrease in the synthesis of ATP (Castrejón et al. 1997). By contrast, at high phosphate concentrations monovalent cations do not affect the  $\Delta\Psi$ , and in these conditions a  $\text{Mg}^{2+}$ - and quinine-sensitive uptake of  $^{86}\text{Rb}^+$  is observed (Castrejón et al. 2002).

The permeability transition (PT) occurs when a large mitochondrial unspecific channel (MUC) opens in the inner mitochondrial membrane allowing ions to flow freely into and out from the matrix depleting chemical and electrical gradients (Bernardi et al. 1994; Zoratti and Szabo 1995). The most studied MUCs are those from mammals and from *S. cerevisiae* (Manon et al. 1998). The mammalian MUC is open by  $\text{Ca}^{2+}$  in the presence of high phosphate and is closed by ATP and the cyclophilin-D inhibitor cyclosporine-A (Halestrap and Davidson 1990). In *S. cerevisiae* mitochondria, both phosphate (Guérin et al. 1994) and  $\text{Ca}^{2+}$  (Pérez-Vázquez et al. 2003) prevent the PT. Thus, it was of interest to determine whether  $\text{Ca}^{2+}$  opens or closes the *D. hansenii* MUC. The structure, properties and regulating factors of the MUCs vary between different species (Pavlovskaya et al. 2007; Brustovetsky et

al. 2002; Kusano et al. 2009). However, an organelle normally exposed to high monovalent cation concentrations should be able to block its own conductance to the salts found in high concentrations.

The mitochondria from at least two salinity-adapted yeast species, *Endomyces magnusii* and *Yarrowia lipolytica*, do not seem to undergo PT unless a high concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  plus the  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore ETH129 are added (Deryabina et al. 2004; Kovaleva et al. 2009).

We characterized the PT in isolated mitochondria from *D. hansenii*. We detected a MUC which exhibits a sensitivity to  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  which was similar to the *S. cerevisiae* channel. Also, the *D. hansenii* MUC was closed by phosphate, although at higher concentrations than the *S. cerevisiae* channel. In addition, we observed that this channel was different to the MUCs from *S. cerevisiae*, plants or mammals, in that it was regulated by monovalent cations, i.e. increasing concentrations of  $\text{Na}^+$  or  $\text{K}^+$  closed the *D. hansenii* mitochondrial channel. It is becoming increasingly evident that the physiological role and the control mechanisms of mitochondrial unspecific channels may be different depending of the species under study.

## Materials and methods

### Chemicals

All chemicals were reagent grade. Sorbitol, Trizma<sup>®</sup> base, maleic acid, pyruvic acid, malic acid, NADH, NADP, antifoam emulsion, ADP, safranin-O, hexokinase and bovine serum albumin (BSA) type V were from Sigma Chem Co. (St Louis, MO). Lyophilized glucose-6-phosphate dehydrogenase was from Boehringer-Mannheim.

**Yeast strains** The yeast *Debaryomyces hansenii* strain Y7426 (US Dept. of Agriculture) was used throughout this work. The strain was maintained in Na-YPGal (1% yeast extract, 2% bacto-peptone, 2% galactose, 1 M NaCl and 2% bacto-agar) plate cultures.

### Yeast growth media for mitochondrial isolation

Cells were grown as follows: three 100 mL pre-cultures were prepared immersing a loop of yeast into 100 mL of Na-YPLac (1% yeast extract, 2% bacto-peptone, 2% lactate, pH 5.5 adjusted with NaOH plus NaCl to reach a final 0.6 M  $\text{Na}^+$  concentration). Antifoam emulsion 50  $\mu\text{L}/\text{L}$  was added to the medium. Flasks were incubated for 36 hours under continuous agitation in an orbital shaker at 250 rpm in a constant-temperature room (30°C). Then,

each 100 mL flask was used to inoculate 750 mL of fresh medium. Incubation was continued for 24 h under the same conditions. At a final optical density of 1.6–2.0, the culture was in the mid to late logarithmic growth phase; the cells were harvested at this stage, before they became resistant to disruption.

#### Isolation of coupled mitochondria from *Debaryomyces hansenii*

*D. hansenii* cells were collected and washed by centrifugation and suspended in distilled water. After a second centrifugation, the cells were suspended in ice-cold isolating medium containing 1 M sorbitol, 10 mM maleate, 0.2% bovine serum albumin, pH 6.8 (Tris). The cells were poured into a Bead-Beater 300 mL flask containing 70% v/v 0.5-mm-diameter glass beads. The container was introduced in an ice-jacketed chamber and cells were subjected to four 20 s pulses at 2 min intervals. After homogenization, mitochondria were isolated by differential centrifugation following a protocol described for *S. cerevisiae* mitochondria (Peña et al. 1977). The final mitochondrial pellet was resuspended in 500  $\mu$ L ice-cold isolation medium.

Some details on the isolation of mitochondria seem pertinent as the procedure is slightly different to the usual procedures (Uribe et al. 1985). Sorbitol was deionized before use (Averet et al. 1998). Osmolarity was 1 OsM; lower osmolarities resulted in uncoupled mitochondria. The same osmolarity was used during all experiments. We did not use zymolyase and/or lyticase to disrupt the membrane due to the rapid inactivation of mitochondria that ensues during the isolation procedure. Instead, we used a Bead-Beater with a large amount (70% v/v) of glass beads. The speed of the Bead-Beater was maintained at half maximum by means of a rheostat, to avoid disruption and uncoupling of mitochondria.

#### Protein quantification

The concentration of mitochondrial protein was determined by the biuret method (Gornal et al. 1949). Optical absorbance was determined at 540 nm in a Beckman DU-50 spectrophotometer. Protein was determined using BSA as a standard.

#### Oxygen consumption

The rate of oxygen consumption was measured in the resting state (State IV) and in the phosphorylating state (State III), using an YSI-5300 Oxygraph equipped with a Clark-Type electrode (Yellow Springs Instruments Inc. OH) interfaced to a chart recorder. The reaction vessel was a water-jacketed chamber maintained at 30°C. Mitochondria,

0.5 mg protein·(mL)<sup>-1</sup>. The reaction mixture was 1 M sorbitol, 10 mM maleate, pH 6.8 (Tris); 10 mM pyruvate-malate was added as a substrate. Final volume was 1.5 mL. The concentrations of phosphate (Pi) and K<sup>+</sup> used are indicated in the legends of each illustration. Stock solutions were 2 M KCl or NaCl and 1 or 0.1 M phosphate buffer pH 6.8 (Tris).

#### Transmembrane potential ( $\Delta\Psi$ )

The transmembrane potential was determined using safranin-O, following the absorbance changes at 511–533 nm in a DW2000 Aminco spectrophotometer in dual-wavelength mode (Akerman and Wikström 1976). We used a final concentration of 0.5 mg protein/mL of mitochondria. Yeast mitochondria were assayed in the respiration medium plus 10  $\mu$ M safranin-O. The concentrations of K<sup>+</sup> and Pi are indicated under each figure. Where indicated, the uncoupler *p*-chloromethoxycarbonyl cyanide phenylhydrazone (CCCP) was added to a final concentration of 5  $\mu$ M.

#### ATP synthesis

An enzyme-coupled assay system containing 162.5  $\mu$ g/mL hexokinase, 2 U/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase, 20 mM glucose, 1.4 mM NADP<sup>+</sup>, 200  $\mu$ M MgCl<sub>2</sub> and 10 mM pyruvate-malate, was used to measure the rate of ATP synthesis. The reaction was started by adding 200  $\mu$ M ADP. The reduction of NADP<sup>+</sup> was followed in a DW2C Aminco/Olis spectrophotometer in dual mode at 340–390 nm (Cortés et al. 2000). The NADPH extinction coefficient used was  $6.22 \times 10^3$  (M·cm)<sup>-1</sup>. The lyophilized enzymes were suspended prior to each experiment as follows: hexokinase was suspended in water to 13 mg/mL and glucose-6-phosphate dehydrogenase was suspended in a 5 mM citrate buffer pH 7 to a final concentration of 200 U/mL. Oligomycin (10  $\mu$ g/mg prot) was used to determine the basal ATP synthesis; which was subtracted from the experimental data. The concentrations of Pi are indicated in the legend to the figure.

## Results and discussion

In *D. hansenii* mitochondria oxygen consumption is coupled by phosphate and by monovalent cations

In all cases, the isolated mitochondria from *D. hansenii* exhibited the same sensitivity to KCl or NaCl. Thus, we are presenting mainly the results obtained with KCl. We chose to show the K<sup>+</sup> effect because in the presence of both cations *D. hansenii* prefers to concentrate K<sup>+</sup>; faster and with more affinity than Na<sup>+</sup> (Thomé-Ortiz et al. 1998; González-Hernández et al. 2004). The isolated mitochon-

dria from *D. hansenii* exhibited a slow rate of oxygen consumption both in state IV and in state III, suggesting that the respiratory chain needed the presence of a monovalent cation in order to work at full speed (Table 1). The role of  $K^+$  as an activator of the respiratory chain of mitochondria from yeast (Uribe et al. 1991) and mammals (Peña et al. 1964; Gómez-Puyou et al. 1969; Gómez-Puyou and Tuena de Gómez Puyou 1977) has been described. The respiratory control (RC) is a measure of the ‘integrity’ of mitochondria preparation and coupling efficiency between the respiratory chain and the  $F_1F_0$ -ATP synthase (Nicholls and Ferguson 2001). In *D. hansenii* it was observed that at 0.4 mM Pi mitochondria were uncoupled as evidenced by a RC of 1.0 (Table 1). Then, addition of different concentrations of  $K^+$  led to higher rates of oxygen consumption and to an increased RC (Table 1) as follows: At 0 to 20 mM  $K^+$ , RC was 1.0. However, at 50 mM  $K^+$  RC was 1.33 and increased to 1.73 at the maximum  $K^+$  concentration tested (75 mM) (Table 1). When the phosphate concentration was raised to 4.0 mM, the rates of oxygen consumption were higher (Table 1) and a RC of 1.27 was observed in the absence of  $K^+$  (Table 1). Then, as different  $K^+$  concentrations were added, the RC increased such that at 75 mM  $K^+$ , RC=2.29 (Table 1). In the presence of 10 mM Pi, the rates of oxygen consumption were similar to those obtained at 4 mM Pi (Table 1) and the RC was 2.14 in the absence of  $K^+$ , and increased only slightly at the  $K^+$  concentrations tested (Table 1), i.e. 10 mM Pi closed the channel without  $K^+$ . Even though Pi has the same coupling effect in *D. hansenii* mitochondria as in those from *S. cerevisiae* (Manon and Guérin 1997), the *D. hansenii* organelles need ten times more Pi to close the unspecific channel. In isolated mitochondria from *S. cerevisiae* (Gutiérrez-Aguilar et al. 2010) or mammals (Leung and Halestrap 2008) the Pi site has been located in the inner membrane and it has been tentatively identified as the phosphate carrier.

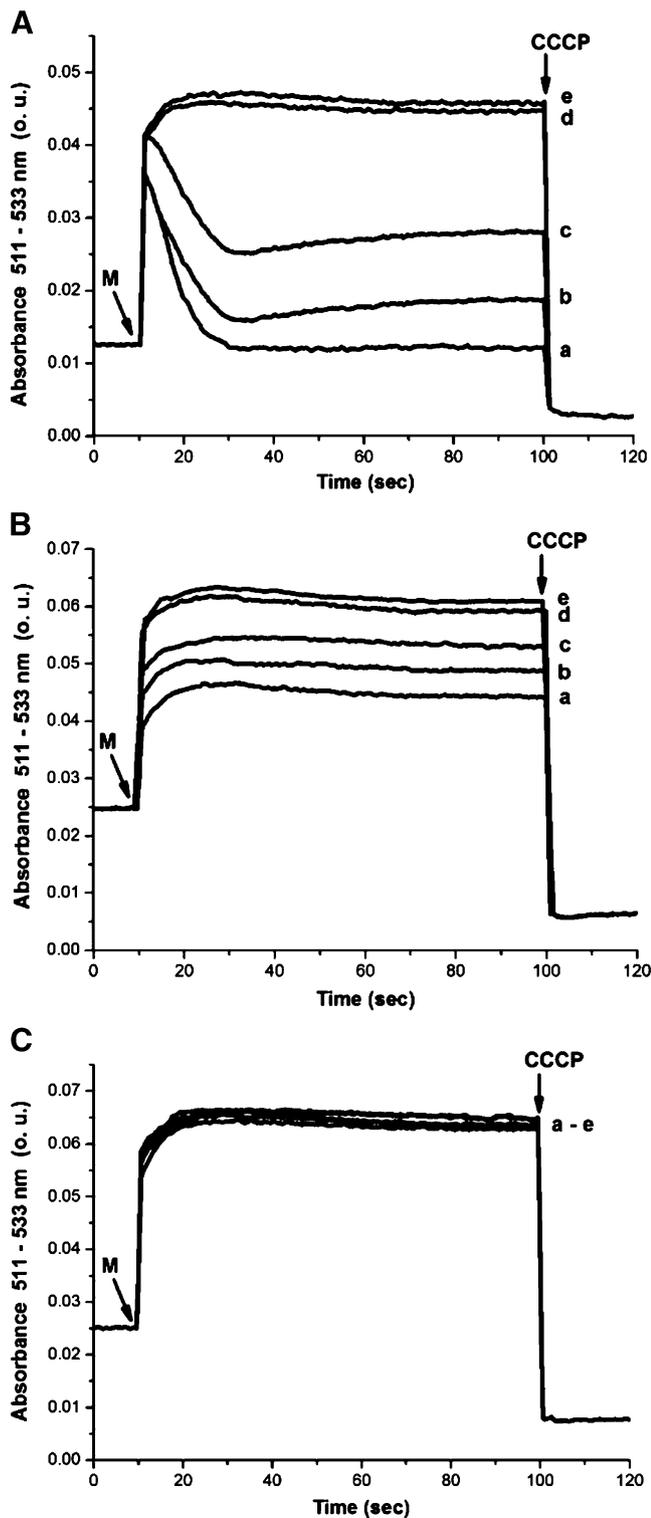
In *D. hansenii* mitochondria, opening of a  $Pi/K^+$ -sensitive unspecific channel results in depletion of the transmembrane potential ( $\Delta\Psi$ )

The oxygen consumption data suggested that there is a MUC in *D. hansenii*. Another yeast species, *S. cerevisiae* contains a MUC which is closed by 1–2 mM phosphate (Manon and Guérin 1997). Thus, in order to further explore the sensitivity of the putative MUC from *D. hansenii* mitochondria to Pi, the electric transmembrane potential ( $\Delta\Psi$ ) was measured in the presence of 0.4, 4.0 and 10 mM Pi (Fig. 1). At 0.4 mM Pi, the  $\Delta\Psi$  was low and unstable (Fig. 1a, trace a). Then in the presence of 4.0 mM Pi the  $\Delta\Psi$  became higher and gained stability (Fig. 1b, trace a) and it reached a high, stable  $\Delta\Psi$  at 10 mM Pi (Fig. 1c, trace a) or higher (Result not shown). These results suggested that *D. hansenii* contain a permeability transition pore similar to that observed in *S. cerevisiae* mitochondria, although the organelle from *D. hansenii* requires a higher Pi concentration to close. The oxygen consumption effects reported in Table 1 also suggested that Pi and monovalent cations exhibit synergistic effects. Thus, to further explore the monovalent cation effect, the  $\Delta\Psi$  was measured at each of the Pi concentrations tested and in the presence of increasing  $K^+$ . At 0.4 mM Pi where the  $\Delta\Psi$  was unstable, increasing concentrations of  $K^+$  resulted in higher, more stable  $\Delta\Psi$ , indicating that at the low Pi concentrations the monovalent cation aided to seal the unspecific channel (Fig. 1a, traces b to e). At 4 mM Pi, the  $\Delta\Psi$  was low in the absence of  $K^+$  and increased with  $K^+$  concentrations. This result probably indicates that Pi was able to partially close the channel, although  $K^+$  was still needed to achieve full closure (Fig. 1b). At 10 mM Pi, the highest concentration tested, MUC was completely closed and the monovalent cation did not have further effects (Fig. 1c).

**Table 1** Effect of phosphate (Pi) and  $K^+$  on the rate of oxygen consumption and respiratory control of isolated mitochondria from *Debaryomyces hansenii*

[ $K^+$ ] (mM)	0.4 mM Pi			4.0 mM Pi			10.0 mM Pi		
	IV	III	RC	IV	III	RC	IV	III	RC
0	75±6	75.0±6	<b>1.0</b>	130±9	165±8	<b>1.27</b>	129±6	277±9	<b>2.14</b>
10	79±3	79.0±3	<b>1.0</b>	127 ± 10	191 ± 13	<b>1.51</b>	127±6	273 ± 14	<b>2.16</b>
20	79±3	79.0±3	<b>1.0</b>	128±8	220 ± 16	<b>1.72</b>	129±6	281 ± 12	<b>2.18</b>
50	127±3	168±5	<b>1.33</b>	122 ± 6	249±4	<b>2.05</b>	124±5	285±3	<b>2.31</b>
75	127±3	219 ± 1	<b>1.73</b>	114±9	261 ± 9	<b>2.29</b>	131 ± 7	293±5	<b>2.24</b>

The rates of oxygen consumption in resting state (IV) and phosphorylating state (III) are expressed in  $\text{natgO}_2(\text{min}\cdot\text{mg prot})^{-1}$ . The respiratory control (RC) is the III/IV quotient. Reaction mixture: 1 M sorbitol, 10 mM maleate, pH 6.8 (Tris). The substrate was always 10 mM pyruvate-malate. Three different phosphate (Pi) concentrations and five different KCl concentrations were used as indicated. State III was initiated by adding 500  $\mu\text{M}$  ADP. Mitochondria 0.5  $\text{mg prot}\cdot(\text{mL})^{-1}$ . Temp 30°C, final vol 1.5 mL. Data from 3 different experiments.



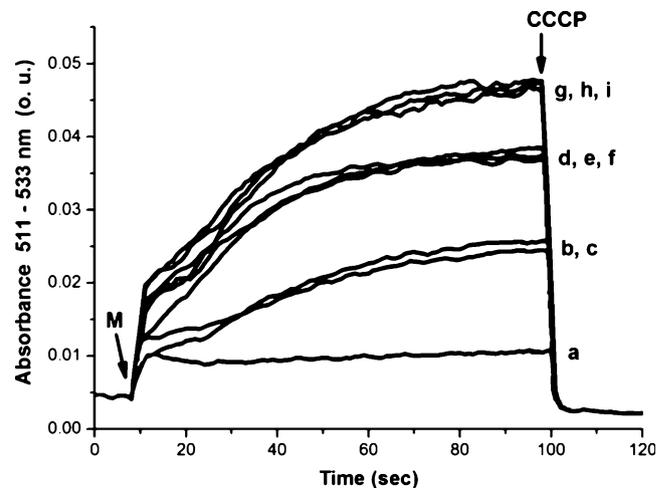
**Fig. 1** Effect of  $K^+$  and phosphate on the transmembrane potential ( $\Delta\Psi$ ) of isolated mitochondria from *D. hanseii*. Reaction mixture as in Table 1 except  $10\mu\text{M}$  safranine-O was added. Final vol. 2 mL; room temperature. Pi concentrations were **A** 0.4 mM; **B** 4.0 mM and **C** 10.0 mM.  $K^+$  concentrations were: **a**, 0; **b**, 10 mM; **c**, 20 mM; **d**, 50 mM; **e**, 75 mM. Where indicated, mitochondria (M)  $0.5\text{ mg prot (ml)}^{-1}$  and CCCP  $5\mu\text{M}$  were added. Representative traces from three independent experiments

The  $\Delta\Psi$  sensitivity to monovalent cations does not discriminate between  $\text{Na}^+$  or  $\text{K}^+$

The possibility that  $\text{K}^+$  or  $\text{Na}^+$  exhibited different effects was explored by measuring the  $\Delta\Psi$  in the presence of three different cation concentrations and in the presence of 0.4 mM Pi. In the absence of cations (Fig. 2 trace a), no increase in  $\Delta\Psi$  was observed. In the presence of 18.75 mM  $\text{Na}^+$  (Fig. 2 trace b) or  $\text{K}^+$  (Fig. 2 trace c), a partial  $\Delta\Psi$  was observed. Then, at 37.5 mM monovalent cation, the  $\Delta\Psi$  increased to a higher extent regardless of whether the cation was  $\text{Na}^+$  (Fig. 2 trace d),  $\text{K}^+$  (Fig. 2 trace e), or a mixture of 18.75 mM  $\text{Na}^+$  plus 18.75 mM  $\text{K}^+$  (Fig. 2 trace f). At 75 mM monovalent cation, a still higher  $\Delta\Psi$  was obtained, which again was the same regardless of whether the cation was  $\text{Na}^+$  (Fig. 2 trace g),  $\text{K}^+$  (Fig. 2 trace h) or a mixture of 37.5 mM  $\text{Na}^+$  plus 37.5 mM  $\text{K}^+$  (Fig. 2 trace i). Thus, the opening of the MUC seemed to be equally sensitive to  $\text{Na}^+$  or to  $\text{K}^+$ .

The mitochondrial permeability transition results in decreased synthesis of ATP

In *D. hanseii* mitochondria, PT was triggered by lowering Pi or  $\text{K}^+$  and resulted in lower CR and decreased  $\Delta\Psi$ , leading us to propose that oxidative phosphorylation might be optimized in the presence of increasing concentrations of Pi and  $\text{K}^+$ . When we tested the synthesis of ATP at three different Pi concentrations and in the presence of different concentrations of  $\text{K}^+$ , we observed that the rate of synthesis

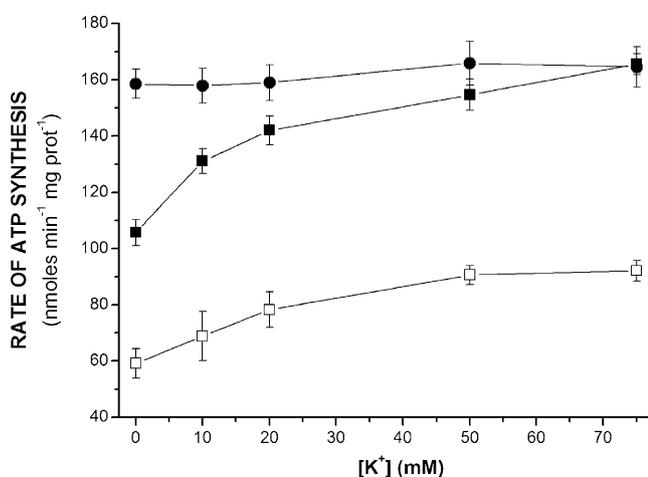


**Fig. 2** Effect of  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  mixtures on the transmembrane potential ( $\Delta\Psi$ ) of isolated mitochondria from *D. hanseii*. Reaction mixture as in Fig. 1. Final volume 2 mL; room temperature. 0.4 mM Pi.  $\text{Na}^+$  and/or  $\text{K}^+$  concentrations were: **a**, 0; **b**, 18.75 mM  $\text{Na}^+$ ; **c**, 18.75 mM  $\text{K}^+$ ; **d**, 37.5 mM  $\text{Na}^+$ ; 18.75 mM  $\text{Na}^+$  plus 18.75 mM  $\text{K}^+$ ; **e**, **f**, 37.5 mM  $\text{K}^+$ ; **g**, 37.5 mM  $\text{Na}^+$  plus 37.5 mM  $\text{K}^+$ ; **h**, 75 mM  $\text{Na}^+$ ; **i**, 75 mM  $\text{K}^+$ . Where indicated, mitochondria (M)  $0.5\text{ mg prot (ml)}^{-1}$  and CCCP  $5\mu\text{M}$  were added. Representative traces from three independent experiments

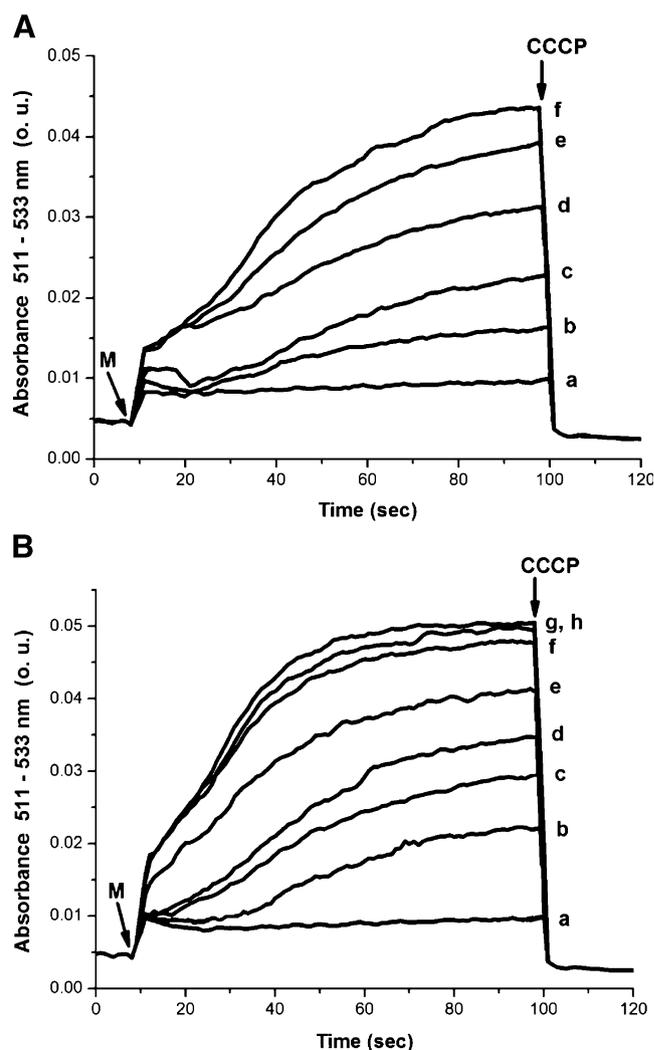
of ATP increased proportionally to Pi and/or  $K^+$ , i.e. at 0.4 mM Pi a slow rate of ATP synthesis was observed which increased as the  $K^+$  concentration was raised (Fig. 3). At 4 mM Pi higher rates of ATP synthesis were obtained and a slight optimization of this rate by  $K^+$  was still observed (Fig 3). At the highest concentration of Pi tested, a high rate of synthesis of ATP was observed which was not further increased by the presence of different concentrations of  $K^+$ . Thus, the effect on the synthesis of ATP provide further support to the notion that there is an unspecific channel in *D. hansenii* mitochondria which is closed by high concentrations of Pi and by intermediate concentrations of monovalent cations.

The *D. hansenii* MUC is regulated by  $Ca^{2+}$  and by  $Mg^{2+}$

Divalent cations modulate the opening of the MUC from different species. However, the effects are opposite as in mammals  $Ca^{2+}$  opens the MUC (Halestrap and Davidson 1990) while in *S. cerevisiae*  $Ca^{2+}$  closes the MUC (Pérez-Vázquez et al. 2003) probably acting at the level of the porine (Gutiérrez-Aguilar et al. 2007). By contrast,  $Mg^{2+}$  seems to close all known MUCs (Bernardi 1999; Kowaltowski et al. 1998; Pérez-Vázquez et al. 2003). Thus, we decided to characterize the effects of  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  on the  $\Delta\Psi$  in the presence of 0.4 mM Pi. In the absence of cations (Fig. 4a trace a; Fig. 4b trace a), a low  $\Delta\Psi$  was observed. In the presence of increasing  $Ca^{2+}$  concentrations,  $\Delta\Psi$  increased (Fig. 4a traces a-f); reaching a maximum at 1 mM  $Ca^{2+}$ . [ $Ca^{2+}$ ] above 1 mM did not promote further changes in  $\Delta\Psi$  (data not shown). In regard



**Fig. 3** Effect of  $K^+$  and phosphate on the rate of ATP synthesis mediated by isolated mitochondria from *D. hansenii*. Experimental conditions as in Table 1, 200  $\mu$ M ADP. In addition, an enzyme coupled ATP assay system was included: 200  $\mu$ M  $MgCl_2$ , 20 mM glucose, 1.4 mM  $NADP^+$ , hexokinase 162.5  $\mu$ g/mL and glucose-6-phosphate dehydrogenase 2 U/mL. Pi concentrations were: 0.4 mM ( $\square$ ), 4.0 mM ( $\blacksquare$ ) and 10.0 mM ( $\bullet$ ). The reaction was initiated with 200  $\mu$ M ADP. Each point is the mean of four independent experiments  $\pm$  SD



**Fig. 4** Effect of divalent cations on the transmembrane potential ( $\Delta\Psi$ ) of isolated mitochondria from *D. hansenii*. Reaction mixture as in Fig. 2, Pi concentration was 0.4 mM. A: Different  $Ca^{2+}$  concentrations were: a, 0; b, 100  $\mu$ M  $Ca^{2+}$ ; c, 200  $\mu$ M  $Ca^{2+}$ ; d, 500  $\mu$ M  $Ca^{2+}$ ; e, 750  $\mu$ M  $Ca^{2+}$ ; f, 1 mM  $Ca^{2+}$ . B: Different  $Mg^{2+}$  concentrations were: a, 0; b, 100  $\mu$ M  $Mg^{2+}$ ; c, 200  $\mu$ M  $Mg^{2+}$ ; d, 500  $\mu$ M  $Mg^{2+}$ ; e, 1 mM  $Mg^{2+}$ ; f, 2 mM  $Mg^{2+}$ ; g, 5 mM  $Mg^{2+}$ ; h, 10 mM  $Mg^{2+}$ . Where indicated, mitochondria (M) 0.5 mg prot (ml)<sup>-1</sup> and CCCP 5  $\mu$ M. Representative traces from three independent experiments

to  $Mg^{2+}$ , 100  $\mu$ M and 200  $\mu$ M resulted in a partial increase in  $\Delta\Psi$  (Fig. 4b, traces a,b). At  $Mg^{2+}$  500  $\mu$ M and 1 mM,  $\Delta\Psi$  was increased to a value near the maximum obtainable (Fig. 4b, traces d,e). At and above 2 mM  $Mg^{2+}$  the maximum  $\Delta\Psi$  was obtained (Fig. 4b, traces f,g,h). These results suggest that both divalent cations closed the MUC from *D. hansenii*, but this closure was promoted at lower [ $Ca^{2+}$ ] than [ $Mg^{2+}$ ].

#### Selective inhibition of each oxidase and its effect on PT

In *D. hansenii* mitochondria there are two terminal oxidases. In addition to cytochrome oxidase (COX), there

is an alternative oxidase (AOX) (Veiga et al. 2003). The presence of AOX allowed us to explore whether PT might depend on whether electrons were accepted by COX or AOX. Oxygen consumption experiments were conducted in the presence of cyanide (to block COX) or propyl-gallate (to block AOX) (Table 2). The rate of oxygen consumption was measured in state IV and in state III. In the presence of cyanide the rate of oxygen consumption was about one third of the non-inhibited rate (shown in Table 1), although increasing concentrations of  $K^+$  did promote an increase in the rate of oxygen consumption both in state IV and state III, such that the CR remained low (Table 2). This effect suggests that under our conditions AOX expression was low and thus the lack of proton pumping activity by the blocked complexes III and IV failed to establish a high protonmotive force. By contrast, when AOX was blocked, the effect of  $K^+$  on the rate of oxygen consumption did lead to an increase in RC (Table 1) to a similar extent as the increase obtained in the absence of propyl-gallate (see Table 1), indicating that in the absence of the (low) AOX activity PT still occurred.

The possible physiological meaning of the unusual sensitivity to monovalent cations observed in the *D. hansenii* MUC

The monovalent cation-mediated prevention of opening of the *D. hansenii* MUC has not been detected in mitochondria from any other species studied so far. It had always been considered that the permeability to these ions had to be closely controlled in order to avoid a recycling of the cation following a uniport mechanism for uptake and a  $H^+$  antiport mechanism for export that would result in depletion of the electrical gradient and the consequent mitochondrial uncoupling and loss of ATP synthesis (Garlid 1988; Castrejón et al. 1997). This monovalent cation-mediated coupling makes sense when it is considered that

**Table 2** Effect of cyanide and propyl-gallate on the rate of oxygen consumption and respiratory control of isolated mitochondria from *Debaryomyces hansenii*

[ $K^+$ ] (mM)	Cyanide			Propyl Gallate		
	IV	III	RC	IV	III	RC
0	18±0.7	19±0.8	1.02	145±9	162± 11	1.12
10	24.7±0.4	26.8± 1.2	1.08	151± 5	193± 10	1.27
20	25.5±0.3	26.8±0.3	1.05	136±3	203±4	1.50
50	28.6± 1.7	29.7± 2	1.04	144±5	221 ± 7	1.53
75	34±6	36±8	1.06	138±8	240± 13	1.73

Experimental conditions and data as in Table 1 except 100  $\mu$ M Cyanide or 25  $\mu$ M propyl gallate were indicated. Data from 4–5 independent experiments.

*in situ*, *D. hansenii* mitochondria are exposed to high  $K^+$  and  $Na^+$  concentrations. It should be noted that the monovalent cation-promoted increase in the efficiency of the oxidative phosphorylation by *D. hansenii* mitochondria may explain, at least partially the increase in the growth rate of the *D. hansenii* cells when these are exposed to high concentrations of monovalent cations (González-Hernández et al. 2004; Sánchez et al. 2008).

As more mitochondria are isolated from different species, it is becoming obvious that these organelles are evolving together with the cell to adapt to the environment. As a result, there are variations in the protein composition of the organelle, e.g. the proteins in the respiratory chain vary widely specially in species with branched respiratory chains. It is noteworthy that the components of the respiratory chain do not seem to vary at random, e.g., from 21 yeast species analyzed, 12 contain both an alternative oxidase and complex I (Veiga et al. 2003), while there is only one species, *Pichia anomala*, that contains an alternative oxidase but no complex I (Nosek and Fukuhara 1994).

The effectors regulating the activity of the mitochondrial unspecific channels from different species may vary widely. In many cases, a given molecule has opposite effects in MUCs from different species (Manon and Guérin 1998). This could be an indication of the different functions the MUC might have depending on the species. The mammalian MUC, widely known as the permeability transition pore (PTP) and the *S. cerevisiae* MUC (YMUC) are the best characterized systems. Both channels have a molecule cutoff size of 1.5 kDa (Zoratti and Szabó 1995; Jung et al. 1997) and some cations such as  $Mg^{2+}$  and alkylamines close both MUCs (Chávez et al. 2000; Castrejón et al. 2002; Pérez-Vázquez et al. 2003). Here we demonstrated that the *D. hansenii* MUC is also closed by  $Mg^{2+}$ . Differences in sensitivity for MUCs from different species to cyclosporin A (CsA) have been reported (Tanveer et al. 1996; Jung et al. 1997). CsA is a potent PT inhibitor in mammalian (Halestrap and Davidson 1990), potato (Fortes et al. 2001) and wheat mitochondria (Pavlovskaya et al. 2007) but has no effect on yeast (Jung et al. 1997) or brine shrimp mitochondria (Menze et al. 2005). In the mammalian PTP, Pi is needed for  $Ca^{2+}$ -mediated opening, but it is also required by CsA to inhibit opening (Halestrap and Davidson 1990). In mitochondria from the yeast species *S. cerevisiae* (Velours et al. 1977; Roucou et al. 1997) and *D. hansenii* (this work), Pi always inhibits PT.  $Ca^{2+}$  opens the MUC in mammals (Crompton et al. 1988; Bernardi et al. 1994), potato (Fortes et al. 2001) and *N. crassa* (Brustovetsky et al. 2002) but it is inhibitory in *S. cerevisiae* (Jung et al. 1997) and in *D. hansenii* (this work). A  $Ca^{2+}$ -porin interaction site has been located both in *S. cerevisiae* (Gutiérrez-Aguilar et al. 2007) and mammals (Israelson et al. 2007). The inability of  $Ca^{2+}$  to

open the *S. cerevisiae* MUC might be explained if it is considered that there is no specific carrier for  $\text{Ca}^{2+}$  in these mitochondria and thus the  $\text{Ca}^{2+}$  uptake is slow (Uribe et al. 1992). Furthermore, addition of a  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore to *S. cerevisiae* mitochondria enables  $\text{Ca}^{2+}$  to induce PT (Jung et al. 1997). It would be interesting to analyze the  $\text{Ca}^{2+}$  transport activity of the isolated mitochondria from *D. hansenii*. Adding to the wide variability in the pattern of PT in mitochondria from different species, recently it was reported that the yeast species *Yarrowia lipolytica* (Deryabina et al. 2004) and *Endomyces magnusii* (Kovaleva et al. 2009) fail to undergo PT unless a high concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  plus the  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore ETH129 are added. Remarkably, *D. hansenii* and *Y. lipolytica* are closely related (Dujon et al. 2004), but the first undergoes PT while the second does so only under very specific conditions (Kovaleva et al. 2009). A comparison between the proteins that have been proposed to constitute the channel might yield abundant information on the mechanisms that lead to PT and on the control mechanisms.

**Acknowledgements** The authors thank Martha Calahorra, Sergio Couoh, Ramón Méndez, Rocío Romualdo and Norma S. Sánchez for technical assistance. Partially funded by grants from: CONACYT-79989 and UNAM/DGAPA-PAPIIT-IN217109-3. ACO is recipient of a CONACYT undergraduate fellowship 102803.

## References

- Akerman KEO, Wikström MK (1976) FEBS Lett 68:191–197
- Alba-Lois L, Segal C, Rodarte B, Valdés-López V, De Luna A, Cárdenas R (2004) Curr Microbiol 48:68–72
- Averet N, Fitton V, Bunoust O, Rigoulet M, Guerin B (1998) Mol Cell Biochem 184:67–79
- Bernardi P (1999) Physiol Rev 79:1127–1155
- Bernardi P, Broekemeier KM, Pfeiffer DR (1994) J Bioenerg Biomembr 26:509–517
- Breuer U, Harms H (2006) Yeast 23:415–437
- Brustovetsky N, Tropschug M, Heimpel S, Heidkämper D, Klingenberg M (2002) Biochemistry 41:11804–11811
- Castrejón V, Parra MC, Moreno R, Peña A, Uribe S (1997) Arch Biochem Biophys 346:37–44
- Castrejón V, Peña A, Uribe S (2002) J Bioenerg Biomembr 34:299–306
- Chávez E, Peña A, Zazueta C, Ramírez J, García N, Carrillo R (2000) J Bioenerg Biomembr 32:193–198
- Cortés P, Castrejón V, Sampedro JG, Uribe S (2000) Biochim Biophys Acta 1456:67–76
- Crompton M, Ellinger H, Costi A (1988) Biochem J 255:357–360
- Deryabina YI, Isakova EP, Shurubor EI, Zvyagil'skaya RA (2004) Biochemistry (Mosc) 69:1025–1033
- Dujon B, Sherman D, Fischer G, Durrens P, Casaregola S, Lafontaine I, De Montigny J, Marck C, Neuvéglise C, Talla E, Goffard N, Frangeul L, Aigle M, Anthouard V, Babour A, Barbe V, Barnay S, Blanchin S, Beckerich JM, Beyne E, Bleykasten C, Boisramé A, Boyer J, Cattolico L, Confanioleri F, De Daruvar A, Despons L, Fabre E, Fairhead C, Ferry-Dumazet H, Groppi A, Hantraye F, Hennequin C, Jauniaux N, Joyet P, Kachouri R, Kerrest A, Koszul R, Lemaire M, Lesur I, Ma L, Muller H, Nicaud JM, Nikolski M, Oztas S, Ozier-Kalogeropoulos O, Pellenz S, Potier S, Richard GF, Straub ML, Suleau A, Swennen D, Tekaiia F, Wésolowski-Louvel M, Westhof E, Wirth B, Zeniou-Meyer M, Zivanovic I, Bolotin-Fukuhara M, Thierry A, Bouchier C, Caudron B, Scarpelli C, Gaillardin C, Weissenbach J, Wincker P, Souciet JL (2004) Nature 430:35–44
- Fadda ME, Mossa V, Pisano MB, Deplano M, Cosentino S (2004) Int J Food Microbiol 95:51–59
- Fortes F, Castilho RF, Catisti R, Carnieri EG, Vercesi AE (2001) J Bioenerg Biomembr 33:43–51
- Garlid KD (1988) In: Lemasters JJ, Hackenbrock CR, Thurman RG, Westerhoff HV (eds) Integration of Mitochondrial Function. Mitochondrial volume control. Plenum Publishing Corp, New York, pp 259–278
- Gómez-Puyou A, Sandoval F, Peña A, Chávez E, Tuena M (1969) J Biol Chem 244:5339–5345
- Gómez-Puyou A, Tuena de Gómez Puyou M (1977) J Bioenerg Biomembr 9:91–102
- González-Hernández JC, Cárdenas-Monroy CA, Peña A (2004) Yeast 21:403–412
- Gornal AG, Bardavill CJ, David MM (1949) J Biol Chem 177:751–760
- Guérin B, Bunoust O, Rouqueys V, Rigoulet M (1994) J Biol Chem 269:25406–25410
- Gutiérrez-Aguilar M, Pérez-Vázquez V, Bunoust O, Manon S, Rigoulet M, Uribe S (2007) Biochim Biophys Acta 1767:1245–1251
- Gutiérrez-Aguilar M, Pérez-Martínez X, Chávez E, Uribe S (2010) Arch Biochem Biophys (in press)
- Halestrap AP, Davidson AM (1990) Biochem J 268:153–160
- Hobot JA, Jennings DH (1981) Exp Mycol 5:217–228
- Israelson A, Abu-Hamad S, Zaid H, Nahon E, Shoshan-Barmatz V (2007) Cell Calcium 41:235–244
- Jung DW, Bradshaw P, Pfeiffer DR (1997) J Biol Chem 272:21104–21112
- Kovaleva MV, Sukhanova EI, Trendeleva TA, Zyl'kova MV, Ural'skaya LA, Popova KM, Saris NE, Zvyagil'skaya RA (2009) J Bioenerg Biomembr 41:239–249
- Kowaltowski AJ, Naia-Da-Silva ZS, Castilho RF, Vercesi AE (1998) Arch Biochem Biophys 359:77–81
- Kusano T, Tateda C, Berberich T, Takahashi Y (2009) Plant Cell Rep 28(9):1301–1308
- Leung AW, Halestrap AP (2008) Biochim Biophys Acta 1777:946–952
- Manon S, Guerin M (1997) Biochem Biophys Acta 1318:317–321
- Manon S, Guerin M (1998) Biochem Mol Biol Int 44:565–575
- Manon S, Roucou X, Guerin M, Rigoulet M, Guerin B (1998) J Bioenerg Biomembr 30:419–429
- Menze MA, Hutchinson K, Laborde SM, Hand SC (2005) Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 289:R68–R76
- Montiel V, Ramos J (2007) FEMS Yeast Res 7:102–109
- Neves ML, Oliveira RP, Lucas CM (1997) Microbiol 143:1133–1139
- Nicholls DG, Ferguson SJ (2001). In Bioenergetics 3. Chapter IV, The chemiosmotic proton circuit. Academic Press, pp. 57–87
- Norkrans B (1966) Mikrobiol 54:374–392
- Norkrans B, Kylin A (1969) J Bacteriol 100:836–845
- Nosek J, Fukuhara H (1994) J Bacteriol 176:5622–5630
- Pavlovskaya NS, Savinova OV, Grabel'nykh OI, Pobezhimova TP, Koroleva NA, Voinikov VK (2007) Dokl Biol Sci 417:446–448
- Peña A, Campillo Serrano C, de Gómez T, Puyou M (1964) Arch Biochem Biophys 106:461–466
- Peña MZ, Piña E, Escamilla E, Piña A (1977) FEBS Lett 80:209–213
- Pérez-Vázquez V, Saavedra-Molina A, Uribe S (2003) J Bioenerg Biomembr 35:231–241
- Prista C, Almagro A, Loureiro-Dias MC, Ramos J (1997) Appl Environ Microbiol 63:4005–4009
- Prista C, Loureiro-Dias MC, Montiel V, Garcia R, Ramos J (2005) FEMS Yeast Res 5:693–701

- Ramos J (2006) In: Gunde-Cimerman N, Oren A, Plemenitas A (eds) Introducing *Debaryomyces hansenii*, a salt loving yeast. Adaptation to life at high salt concentrations in archaea, bacteria and eukarya. Springer, Berlin, pp 443–451
- Roucou X, Manon S, Guerin M (1997) *Biochem Mol Biol Int* 43:53–61
- Sánchez NS, Arreguín R, Calahorra M, Peña A (2008) *FEMS Yeast Res* 8:1303–1312
- Sherman D, Durrens P, Beyne E, Nikolski MJ-L (2004) *Nucleic Acids Res* 32:D315–D318
- Tanveer A, Virji S, Andreeva L, Totty NF, Hsuan JJ, Ward JM, Crompton M (1996) *Eur J Biochem* 238:166–172
- Thomé-Ortiz P, Peña A, Ramírez J (1998) *Yeast* 14:1355–1371
- Uribe S, Ramírez J, Peña A (1985) *J Bacteriol* 161:1195–1200
- Uribe S, Sánchez N, Peña A (1991) *Biochem Int* 24:615–624
- Uribe S, Rangel P, Pardo JP (1992) *Cell Calcium* 13:211–217
- Veiga A, Arabaca JD, Loureiro-Dias MC (2003) *FEMS Yeast Res* 3:239–245
- Velours J, Rigoulet M, Guerin B (1977) *FEBS Lett* 81:18–22
- Zoratti M, Szabo I (1995) *Biochim Biophys Acta* 1241:139–176