



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas

Maestría en Ciencias en Biología Experimental

Tesis:

“Efecto de la mutación del gen *IBA57* de *Saccharomyces cerevisiae* sobre el ensamblaje de la proteína Rieske en el complejo III de la CTE”

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Experimental

Biólogo Luis Alberto Sánchez Briones

Asesor:

**Doctor en Ciencias Biológicas
Jesús Campos García**

Morelia, Michoacán, Agosto 2015



Contenido

Abstract	1
RESUMEN	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Levaduras.....	3
1.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
1.3 Metabolismo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5
1.4 Cadena de transporte de electrones en las levaduras	6
1.5 Ciclo Q y complejo III de <i>S. cerevisiae</i>	9
1.6 Maduración de la subunidad Rip1p (Rieske)	12
1.7 Disfunción del complejo III.....	14
1.8 Especies reactivas de oxígeno (ERO)	15
1.9 Biogénesis de proteínas con centros Fe-S	17
2. ANTECEDENTES	20
3. JUSTIFICACIÓN	21
4. HIPÓTESIS	22
5. OBJETIVO GENERAL.....	23
Objetivos particulares	23
6. MATERIALES.....	24
6.1 Cepas.....	24
6.2 Medios de cultivo	24
6.3 Programas computacionales	25
7. MÉTODOS	25
7.1 Almacenamiento y recuperación de las cepas.....	25
7.2 Caracterización de las cepas a agentes oxidantes	25
7.2.1 Cinéticas de crecimiento.....	25
7.2.2 Curvas dosis respuesta a agentes oxidantes.....	26
7.2.3 Cinéticas de crecimiento con agentes oxidantes	26
7.3 Oximetría.....	26
7.4 Análisis de la actividad del complejo III.....	27
7.4.1 Aislamiento de mitocondrias	27
7.4.2 Permeabilización de mitocondrias	28
7.4.3 Reducción de la decilubiquinona y actividad del complejo III	28

7.5 Geles azules nativos de poliacrilamida (BN-PAGE).....	29
7.5.1 Aislamiento de mitocondrias.....	29
7.5.2 Solubilización de mitocondrias.....	30
7.5.3 Electroforesis del gel nativo.....	30
7.5.4 Tinción del gel nativo.....	31
7.6 Geles desnaturalizantes SDS-PAGE.....	31
7.7 Western blot.....	31
7.7.1 Transferencia de proteínas.....	31
7.7.2 Inmuno-detección.....	32
7.7.3 Revelado.....	32
7.8 Determinación de la concentración de proteínas.....	32
8. RESULTADOS.....	34
8.1 Cinética de crecimiento.....	34
8.2 Curvas dosis respuesta a agentes oxidantes y etanol.....	34
8.2.1 Curva de tolerancia a etanol en medio líquido.....	35
8.2.2 Curva de tolerancia a etanol en medio sólido.....	36
8.2.3 Curva de tolerancia a H ₂ O ₂	36
8.2.4 Curva de tolerancia a H ₂ O ₂ en medio sólido.....	37
8.2.5 Curva de tolerancia con menadiona.....	38
8.2.6 Curva de tolerancia a menadiona en medio sólido.....	39
8.2.7 Determinación de la dosis Letal 50 a agentes oxidantes.....	40
8.3 Cinéticas de crecimiento.....	41
8.3.1 Cinéticas de crecimiento a etanol.....	41
8.3.2 Cinéticas de crecimiento con H ₂ O ₂	42
8.3.3 Cinéticas de crecimiento en presencia de menadiona.....	43
8.4 Determinación del consumo de oxígeno.....	44
8.5 Actividad del complejo III.....	46
8.6 Actividad de la enzima Lactato-citocromo-c-oxidoreductasa.....	47
8.7 Análisis de los supercomplejos de la CTE.....	48
8.8 Inmuno-detección de la proteína Rip1p.....	50
9. DISCUSIÓN.....	52
10. CONCLUSIÓN.....	57
11. PERSPECTIVAS.....	58

12. LITERATURA CITADA 59

Índice de Tablas y Figuras

Figura 1. Metabolismo del carbono de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
Figura 2. Cadena de transporte de electrones de <i>S. cerevisiae</i>	9
Figura 3. Función del complejo III y ciclo Q.....	12
Figura 4. Proceso de maduración de la proteína Rip1p.....	14
Figura 5. Tipos de centros Fe-S.....	18
Figura 6. Biogénesis de proteínas con centros Fe-S.....	19
Figura 7. Modelo hipotético de la función de Iba57p.....	21
Tabla 1. Cepas.....	23
Figura 8. Cinéticas de crecimiento en medio YPD 2% glucosa.....	33
Figura 9. Curva dosis respuesta a etanol.....	34
Figura 10. Dosis respuesta en medio solido con etanol.....	35
Figura 11. Curva dosis respuesta a H ₂ O ₂	36
Figura 12. Dosis respuesta en medio solido con H ₂ O ₂	37
Figura 13. Curva dosis respuesta a menadiona.....	38
Figura 14. Dosis respuesta en medio solido con menadiona.....	39
Tabla 2. Dosis inhibitoria 50.....	39
Figura 15. Cinéticas de crecimiento con etanol.....	40
Figura 16. Cinéticas de crecimiento con H ₂ O ₂	41
Figura 17. Cinéticas de crecimiento con menadiona.....	42
Figura 18. Consumo de oxígeno.....	44
Figura 19. Actividad del complejo III.....	45
Figura 20. Actividad de enzima Lactato-citocromo-c-oxidoreductasa.....	46
Figura 21. Análisis de la formación de supercomplejos de la CTE de <i>S. cerevisiae</i>	48
Figura 22. Inmuno-detección de la proteína Rip1p.....	50
Figura 23. Modelo propuesto para la función de Iba57p.....	56

Abreviaturas	Significado
<i>ADN</i>	Ácido desoxiribonucleico
<i>ATP</i>	Adenosin trifosfato
<i>BN-PAGE</i>	Blue native polyacrilamyde gel electrophoresis
<i>BSA</i>	Bovine serum albumine
<i>CCCP</i>	Carbonilcianuro-M-Clorofenilhidrazona
<i>CIA</i>	Cytosolic Iron-Sulfur cluster assembly
<i>CTE</i>	Cadena de transporte de electrones
<i>Co Q</i>	Coenzima Q
<i>D.O.</i>	Densidad óptica
<i>DL 50</i>	Dosis letal cincuenta
<i>ERO</i>	Especies reactivas de oxígeno
<i>ETF</i>	Flavoproteínas de transferencia de electrones
<i>FAD</i>	Flavin adenin dinucleótido
<i>FDH</i>	Flavodeshidrogenasa
<i>FMN</i>	Flavin mononucleotido
<i>GSH</i>	Glutación
<i>ISC</i>	Maquinaria de ensamble Iron-Sulfur cluster
<i>Mb</i>	Megabases
<i>NAD⁺</i>	Nicotin adenin dinucleotido
<i>NADH</i>	Nicotin adenin dinucleotido reducido
<i>NIF</i>	nitrogen-fixation machinery
<i>Q</i>	Quinona
<i>QH₂</i>	Quinol
<i>RPM</i>	Revoluciones por minuto
<i>SDS-PAGE</i>	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
<i>SQR</i>	Sulfuro coenzima Qreductasa
<i>SUF</i>	Sulfur-mobilization machinery

Dedicatoria:

Este trabajo está dedicado a mi familia, a mis padres José Luis y Juanita por su gran cariño y apoyo incondicional hacia mi persona por haberme educado de la mejor manera, indicándome siempre el camino correcto, a mi hermana Emma por su comprensión, cariño y respeto, además también está dedicado a mi abuelito Pablo quien fue parte fundamental en mi formación y a quien recuerdo siempre con gran amor.

Agradecimientos

Al D. C. Jesús Campos García por haberme aceptado en su grupo de trabajo, por su apoyo, sugerencias y consejos durante mi estancia en el laboratorio de biotecnología, además por haber convertido la relación de asesor estudiante en una grata amistad.

A mis sinodales los D. C. Christian Cortes Rojas, Homero Reyes de la Cruz, Víctor Meza Carmen y Martha Isela Ramírez Díaz por sus aportaciones y sugerencias para que este trabajo fuera terminado de la mejor manera.

A mis compañeros de laboratorio de biotecnología microbiana Alma, Mauricio, Lore, Omar, y Viry por hacer grata la estancia en el laboratorio y por la ayuda incondicional que me brindaron en su momento.

A los vecinos del laboratorio de Bioquímica al D. C. Alfredo Saavedra, a Moni, Christian, Omar, Claudia y Mario pues parte de mi trabajo fue realizado en este lugar y siempre me recibieron con una sonrisa y de manera muy amable.

A mis compañeros de la generación de maestría, Kike, Neto, Daniel, Víctor, Manuel, Lucio, Miguel, Liz, Marisol, Rita y Melina por los buenos momentos que pasamos en los días de estrés del primer semestre.

A mis amigos incondicionales Temo, Nery, Rafa, Melina, Tony, Chelesiy, Paco, Sandra por alentarme siempre a seguir adelante, además a mi hermano de crianza Manuel Scaria Yereña quien recordare siempre con mucho aprecio.

A CONACYT por el apoyo otorgado de la beca durante los dos años de maestría.

Por último pero no menos importante a mi novia Elizabeth por convertirse en mi sostén en momentos difíciles y darme su cariño y una razón para seguir adelante.

Abstract

Fe/S clusters are found like protein cofactors involved in various processes, formation of these clusters and their assembly in the corresponding apo-proteins are processes highly conserved among organisms of the various kingdoms. There are two main forms of Fe/S, the rhombic type having two atoms of iron (Fe) and two sulfur atoms (S) ([2 Fe-2S]) and cubic type which has four iron atoms and four atoms of S ([4Fe-4S]). It has been established that there are specialized machines for the insertion of prosthetic groups (NIF system, nitrogen-fixing bacteria, CIA, machinery responsible for the maturation of cytological proteins, and the SUF and ISC machinery, systems for maturation dependent proteins of Fe/S in mitochondria). All systems require of multiple proteins to perform biogenesis, iron and sulfur donors, and scaffold proteins, which together perform the transfer the prosthetic group to the target protein. The ISC machinery in yeast has the Ssq1p, Grx5p and Jac1p proteins which are involved in the transfer of all the Fe/S clusters, also has established a group of proteins (Iba57p, Isa1p and Isa2p) are responsible for assemble the Fe/S cubic groups. IBA57, ISA1 and ISA2 yeast mutants, shown deficient phenotypes in respiration, similarly, it has been observed that a mutant in the RIP1 gene which codes for a subunit of complex III, shows a similar phenotype to the mutant *iba57Δ*, suggesting a possible dependence between them. In this work we were evaluated tolerance to oxidizing agents in *rip1Δ* and *iba57Δ* strains and compared the parental strain noting that these mutants have similar degree of sensitivity to oxidative stress. Isolated mitochondria of the strains mentioned tests were conducted to determine the activity of complex III. It was observed that the complex III of both mutants is dysfunctional. Subsequently, by immunoblotting it was identified that the Rip1p protein is absent in the mutant *iba57Δ*, and that this affected the formation of protein supercomplexes in electron transport chain. The results suggest that the Iba57 protein is involved in maturation Rieske subunit of respiratory complex III and this is a center dependent protein [2Fe-2S]. In mitochondria isolated from the strains mentioned, assays were performed to determine the activity of complex III. We observed that the complex III of both mutants is dysfunctional. Subsequently, We identified by immuno Rip1p, that is absent in the mutant *iba57Δ*, and that this affected the formation of supercomplexes in electron transport chain. The results suggest that the Iba57p is involved in maturation Rieske subunit of respiratory complex III, a protein dependent of [2Fe-2S] cluster.

RESUMEN

Los centros Fe/S son cofactores encontrados en proteínas que están involucradas en procesos diversos, la formación de estos grupos y su ensamble en las correspondientes apo-proteínas son procesos altamente conservados entre los organismos de los diversos reinos. Existen dos formas principales de centros Fe/S, el tipo rómbico que presenta dos átomos de hierro (Fe) y dos átomos de azufre (S) ([2Fe-2S]) y el tipo cúbico que tiene cuatro átomos de Fe y cuatro átomos de S ([4Fe-4S]). Se ha establecido que existen maquinarias especializadas para la inserción de estos grupos prostéticos (sistema NIF, en bacterias fijadoras de nitrógeno; CIA, maquinaria encargada de la maduración de proteínas citológicas; y las maquinarias SUF e ISC, sistemas encargados de la maduración de proteínas dependientes de centros Fe/S en mitocondrias). Todos los sistemas requieren de múltiples proteínas para llevar a cabo la biogénesis, factores donadores de hierro y azufre, así como proteínas de andamiaje, que en conjunto realizan la transferencia del grupo prostético a la proteína blanco. La maquinaria ISC de levaduras cuenta con las proteínas Ssq1p, Jac1p y Grx5p las cuales están involucradas en la transferencia de todos los centros Fe/S tipo rómbico, además se ha establecido que un grupo de proteínas (Iba57p, Isa1p y Isa2p) están encargadas de ensamblar los grupos Fe/S tipo cúbico. Mutantes de levaduras en *IBA57*, *ISA1* e *ISA2* muestran fenotipos deficientes en respiración, de similar manera, se ha observado que una mutante en el gen *RIP1* el cual codifica para una subunidad proteica del complejo III, presenta un fenotipo similar a la mutante *iba57Δ*, sugiriendo una posible dependencia entre estas. En el presente trabajo se evaluó la tolerancia a agentes oxidantes en las cepas *rip1Δ* e *iba57Δ*, comparándose con la cepa parental observando que dichas mutantes presentan similar grado de sensibilidad al estrés oxidativo. En mitocondrias aisladas de las cepas mencionadas se realizaron ensayos para determinar la actividad del complejo III. Se observó que el complejo III de ambas mutantes es disfuncional. Posteriormente, mediante inmunodetección se identificó que la proteína Rip1p se encuentra ausente en la mutante *iba57Δ*, y que esto afectó la formación de supercomplejos proteínicos en la cadena transportadora de electrones. Los resultados sugieren que la proteína Iba57 está involucrada en la maduración de la subunidad Rieske del complejo respiratorio III y que ésta es una proteína dependiente de un centro [2Fe-2S].

Palabras clave: mitocondria, Rieske, inmunodeteccion, estrés oxidativo, centros Fe/S y apo-proteinas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Levaduras

Las levaduras son hongos unicelulares cuya característica más conocida y usada es la capacidad de fermentar los azúcares para la producción de etanol. Las levaduras se caracterizan por una gran dispersión en sus hábitats naturales. Comúnmente se encuentran en las hojas y flores de plantas, el suelo y el agua. Las levaduras también se encuentran en las superficies de la piel y en el tracto intestinal de animales de sangre caliente, donde pueden vivir en simbiosis o como parásitos.

Las levaduras se dividen por gemación (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*), por fisión binaria (por ejemplo, *Schizosaccharomyces pombe*), o bien pueden crecer como filamentos irregulares como simples micelios. En la reproducción sexual, la mayoría de las levaduras forman ascas que contienen hasta ocho ascosporas haploides. Estas ascosporas pueden fusionarse con núcleos colindantes y se multiplican a través de división vegetativa o como ocurre con ciertas levaduras al fusionarse con otras ascosporas.

El impresionante poder de la genética de las levaduras se debe en parte a la capacidad de asignar rápidamente un fenotipo a un gen; ejemplo de esto es la levadura *S. cerevisiae*. En las últimas dos décadas, *S. cerevisiae* ha sido el sistema modelo para gran parte de la investigación de la genética molecular, pues los mecanismos celulares básicos de la replicación, la recombinación, la división celular y el metabolismo se conservan entre la levadura y eucariontes superiores, incluyendo mamíferos (Schneiter, 2004).

1.2 *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura más conocida comercialmente es *Saccharomyces cerevisiae*, este organismo ha sido utilizado durante mucho tiempo para fermentar los azúcares de arroz, trigo, cebada y maíz, para producir bebidas alcohólicas y en la industria de la panificación para expandir o aumentar la masa. *S. cerevisiae* se conoce comúnmente como la levadura del pan, sin embargo, esta levadura además se toma a menudo como un suplemento vitamínico, ya que es una rica fuente de vitaminas del complejo B, niacina y ácido fólico (Schneiter, 2004).

La levadura *S. cerevisiae* se divide por gemación, son hongos del phylum Ascomycetes, de la clase Hemiascomycetes dividiéndose en uno de los principales ordenes Saccharomycetales (Schneiter, 2004).

S. cerevisiae fue adoptado como un sistema modelo para el estudio de laboratorio en la década de 1930, pues los investigadores desarrollaron una variedad de herramientas genéticas para comprender su ciclo de vida y diferenciación (Hall y Linder, 1993). Este sistema biológico proporcionó herramientas importantes para entender la recombinación y la transmisión de material genético, y adquirió un mayor protagonismo con la era molecular en la década de 1970, cuando llegó a ser identificado como la "especie" de *Escherichia coli* en eucariotes. Con potentes herramientas genéticas y una organización típica de célula eucarionte, la levadura se convirtió en el sistema preferido para hacer frente a cuestiones de biología celular y molecular. Fue el primer eucarionte en ser secuenciado (Goffeau *et al*, 1996) y se ha destacado por ser utilizado para el desarrollo de herramientas genómicas en la actualidad. La levadura tiene una alta organización de estructuras internas como los compartimentos de membrana delimitados típicos de las células eucariontes superiores, incluyendo un núcleo, mitocondrias, aparato de Golgi y otras estructuras. Al crecer por gemación *S. cerevisiae* requiere de una gran coordinación espacial entre el crecimiento celular y los mecanismos para la división nuclear (Pruyne *et al*, 2004).

S. cerevisiae tiene un genoma con más de 12 megabases (Mb) de ADN, tiene 16 cromosomas y alrededor de 5800 genes. Una fracción significativa de estos son parálogos, es decir, son genes de secuencia relacionada que no son exactos homólogos funcionales. La evidencia sugiere que el genoma de la levadura ha sufrido varias duplicaciones a gran escala a través de la evolución, y tras la pérdida de genes, los duplicados restantes pueden haber divergido en la expresión o función (Dietrich *et al*, 2004; Kellis *et al*, 2004; Wolfe y Shields, 1997).

Como modelo de estudio, *S. cerevisiae* ha sido de gran utilidad para estudiar una gran variedad de funciones celulares, por ejemplo, se ha usado para estudiar el peroxisoma, un orgánulo metabólico que funciona en la oxidación de los ácidos grasos y en estrés oxidativo (Brown y Baker, 2003; Lazarow, 2003); también se ha estudiado intensamente para determinar los mecanismos de control de la división celular (Forsburg y Nurse,

1991), entre otros. Estos estudios han permitido la identificación y caracterización de muchos genes que se requieren para regular eventos normales en la progresión del ciclo celular y responder a cualquier defecto, por lo tanto, el análisis de las respuestas biológicas de la células de tipo silvestre y las células de levadura mutantes proporcionan importantes conocimientos sobre los tipos de daños sufridos por los diferentes sistemas biológicos. *S. cerevisiae* junto con otras especies de levadura son los caballos de batalla de la biología celular moderna. Su estudio ha proporcionado importantes conocimientos no sólo en las respuestas de control del ciclo celular, sino para todos los aspectos del comportamiento de las células como la segregación cromosómica, la secreción de proteínas, etc. Estos organismos proporcionan herramientas genéticas y moleculares sofisticadas, así como estrategias a nivel de genoma para examinar la regulación de genes y las respuestas celulares (Forsburg, 2005).

1.3 Metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*

Una de las más prominentes características de *S. cerevisiae* es la rápida conversión de azúcares a etanol y dióxido de carbono por la vía de Embden- Meyerhof-Parnas en condiciones anaeróbicas. Bajo condiciones aeróbicas, la respiración es posible con el oxígeno como aceptor final de electrones, sin embargo, *S. cerevisiae* exhibe fermentación alcohólica hasta que el azúcar se agota del medio. Este fenómeno se conoce como efecto Crabtree. Sin embargo, es posible obtener el crecimiento respiratorio puro bajo condiciones aeróbicas si la concentración de glucosa se mantiene muy baja en el medio, a pesar de que las células de levadura censan la glucosa y esta señal es transmitida para disminuir las actividades respiratorias, esta complejidad del proceso aun no es comprendida completamente (Hagman *et al*, 2014).

La capacidad respiro-fermentativa de este modelo biológico permite la realización de estudios de mutaciones puntuales en genes que codifican proteínas involucradas en vías metabólicas importantes como lo es el ciclo de Krebs o en la cadena de transporte de electrones, pudiéndose extrapolar el conocimiento que se genera en levaduras con organismos en que dichas mutaciones son letales. En la figura 1 se muestra las rutas metabólicas que puede seguir *S. cerevisiae* mencionadas anteriormente.

Metabolismo del carbono de *Saccharomyces cerevisiae*

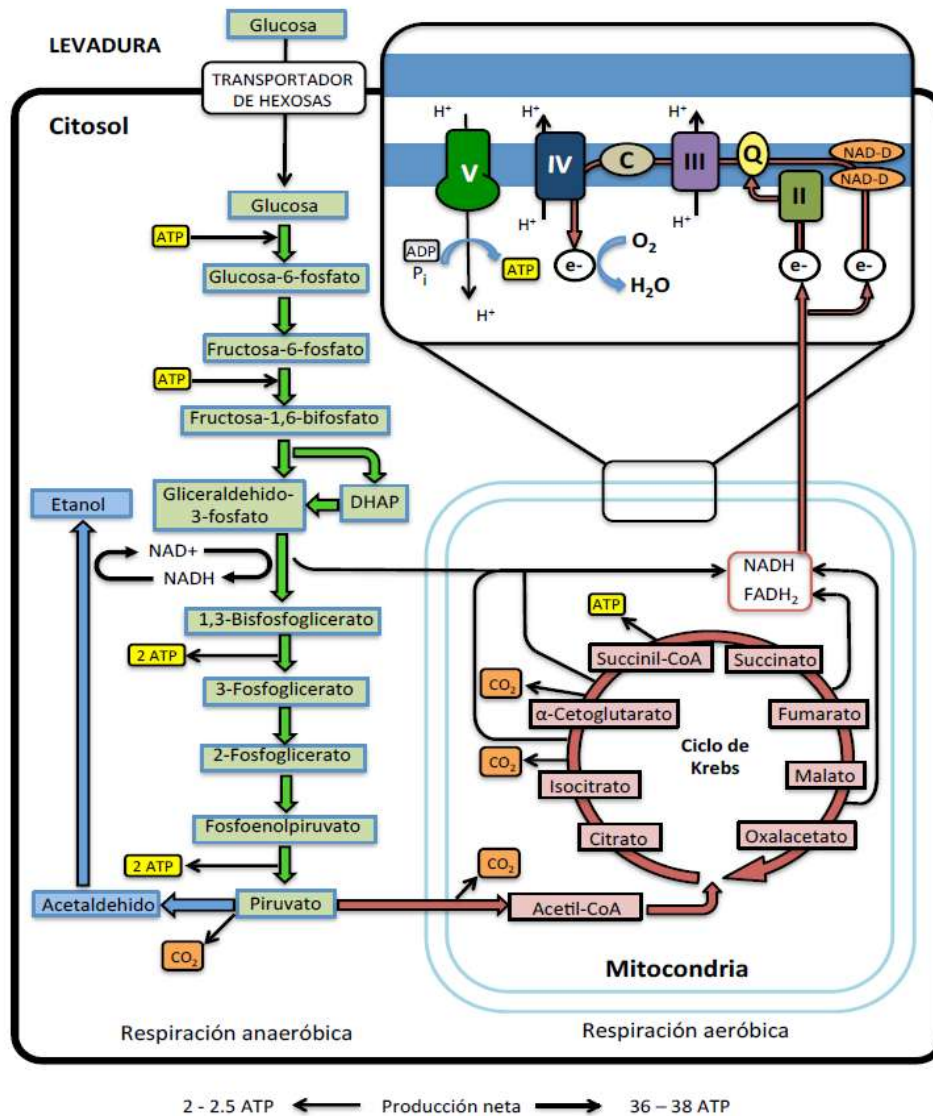


Figura 1. Diagrama del metabolismo central del carbono de *S. cerevisiae* (Fermentación; Glucólisis; Ciclo del ácido cítrico y Cadena de transporte de electrones) Modificado de Mathews *et al*, 2003.

1.4 Cadena de transporte de electrones en las levaduras

La cadena de transporte de electrones clásica se describió como la secuencia funcional de 4 grandes complejos enzimáticos con múltiples subunidades dispersadas al azar en la

membrana mitocondrial interna, designados con el nombre de NADH: coenzima Q oxidoreductasa (Complejo I, CI), succinato: CoQ-oxidoreductasa (Complejo II, CII), ubiquinol: citocromo *c* oxidoreductasa (Complejo III, CIII) y citocromo *c* oxidasa (Complejo IV, CIV). Se propuso que estos complejos enzimáticos están conectados por 2 moléculas móviles con actividad redox, una quinona lipófila, llamada Coenzima Q o ubiquinona, incrustada en la bicapa lipídica de la membrana y una proteína hemo hidrófila, el citocromo *c*, localizada en la superficie externa de la membrana interna (Green y Tzagoloff, 1966). Además, se han reportado vías alternas para el suministro de electrones. En la membrana interna existen además otras proteínas con actividad de transferencia de electrones; entre estas se encuentran flavoproteínas de transferencia de electrones (ETF por sus siglas en inglés), capaces de suministrar electrones a la cadena respiratoria por vías que no implican la actividad del complejo Complejo I y/o NAD, también las enzimas glicerol 3-fosfato deshidrogenasa, dihidroorotato deshidrogenasa, colina deshidrogenasa, sulfuro CoQ reductasa (SQR) y prolina deshidrogenasa. (Lenaz y Génova, 2010). Asimismo, también existen procesos alternativos para la reducción del citocromo *c* como la lactato citocromo-*c*-oxidoreductasa o citocromo *b2* (Diêp Lê *et al*, 2010).

En la actualidad, se ha demostrado que los complejos respiratorios no están dispersos azarosamente en la membrana interna de la mitocondria, se propone que los diferentes complejos forman estructuras superiores denominadas supercomplejos. La evidencia de lo anterior se ha obtenido en mitocondrias de levadura y mamíferos mediante electroforesis en geles nativos de poliacrilamida (BN-PAGE) (Schägger y Pfeiffer, 2000). En mitocondrias de corazón de bovino, se han observado interacciones entre los complejos I y III y los complejos III y IV, mientras que sólo 14-16% de total de Complejo I se encontró en forma libre en presencia del detergente digitonina (Schägger y Pfeiffer, 2001). Esto sugiere que todos los complejos están unidos al complejo III en condiciones fisiológicas. A partir de estos estudios iniciales, los supercomplejos respiratorios se han identificado en las mitocondrias de muchas especies (Wittig y Schägger, 2008; Lenaz y Genova, 2012).

La cadena de transporte de electrones de *S. cerevisiae* está integrada por el complejo II y las dos unidades de translocación de protones, el complejo III y el complejo IV, figura 2. Estos dos últimos complejos se asocian para la formación de supercomplejos los cuales

mejoran la eficiencia del transporte de electrones disminuyendo la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Heinemeyer *et al*, 2007). Estos supercomplejos son claramente apreciados mediante geles azules nativos de poliacrilamida (BN-PAGE, del inglés Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis), donde se observan las bandas que conforman los supercomplejos del dímero del complejo III asociado a un monómero o un dímero del complejo IV (Schägger y Pfeiffer, 2000). La principal diferencia de la cadena respiratoria de *S. cerevisiae* con las cadenas respiratorias de mamíferos superiores es la ausencia del complejo I. Sin embargo, las mitocondrias de *S. cerevisiae* cuentan con dos tipos de NADH deshidrogenasas: una orientada hacia la matriz mitocondrial, encargada de la oxidación del NADH de la matriz, mientras que el NADH del citoplasma es oxidado por dos NADH deshidrogenasas externas orientadas hacia el espacio intermembranal de la mitocondria. Estas enzimas están constituidas por una sola subunidad, contienen FAD como único grupo prostético y son insensibles a los inhibidores clásicos del complejo I. La principal diferencia funcional de las NADH deshidrogenasas externas respecto al complejo I es que el transporte de electrones hacia la ubiquinona no está acoplado a la translocación de protones (Joseph-Horne *et al*, 2001 y Yagi *et al*, 2006).

La biogénesis de los complejos respiratorios es una serie de procesos muy complejos que aun en la actualidad no han sido completamente elucidados. El complejo III es el centro principal de generación de ERO en la célula de levadura, por lo cual la completa dilucidación de su biogénesis es de gran relevancia.

Cadena de transporte de electrones de *S. cerevisiae*

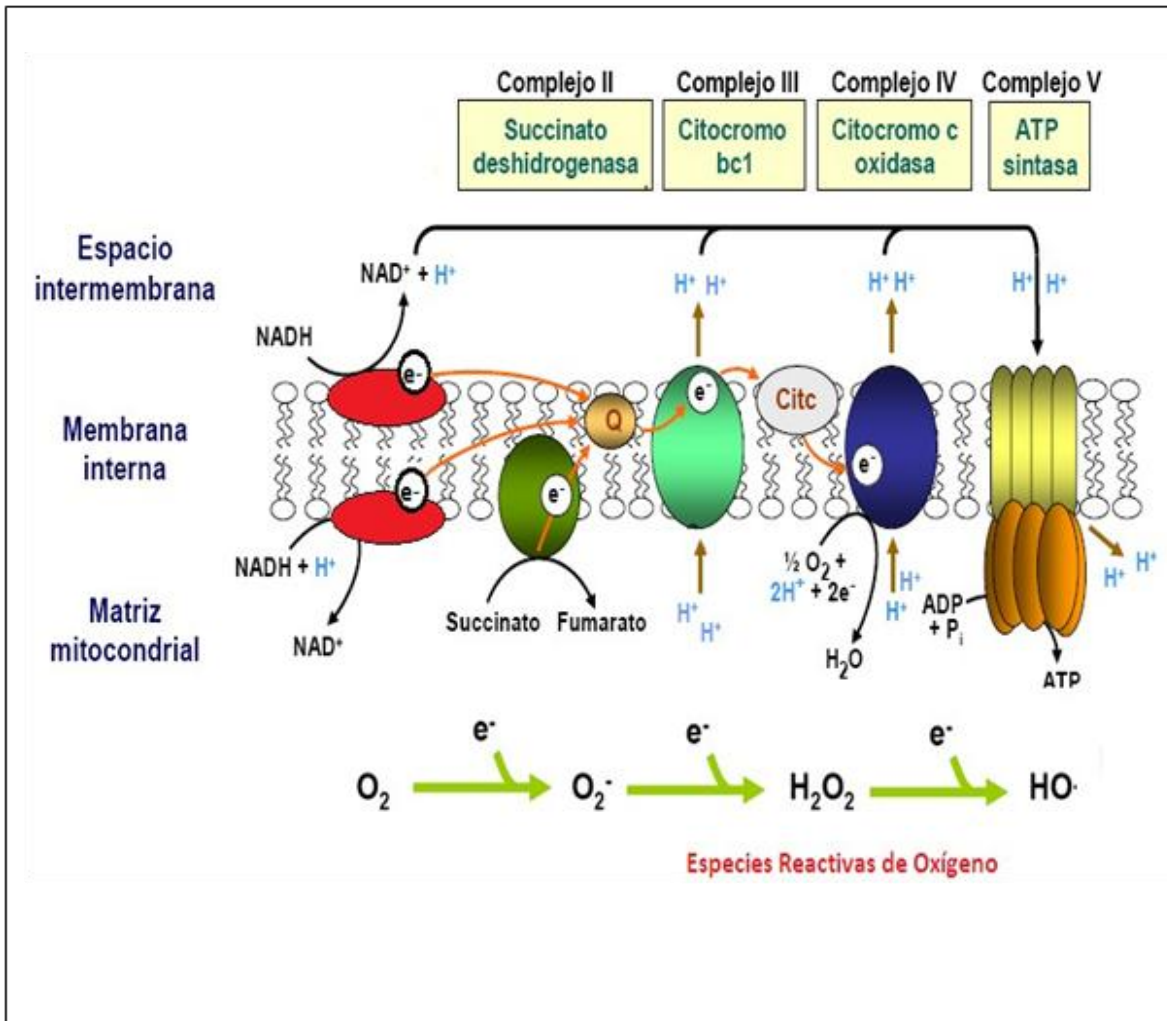


Figura 2. Se muestra el flujo de electrones a partir del NADH y succinato a través de los diferentes complejos respiratorios de *S. cerevisiae* para la formación de agua por el complejo IV y ATP por la ATP-sintasa, además se muestra la generación de ERO en los diferentes pasos de la CTE. Modificado de Home *et al*, 2001.

1.5 Ciclo Q y complejo III de *S. cerevisiae*

Los complejos citocromo bc_1 representan un grupo filogenéticamente diverso de complejos proteicos de transferencia de electrones en membranas, representados por el complejo bc_1 de la membrana mitocondrial interna, los complejos bc_1 bacterianos y los complejos b_6f de cloroplastos y cianobacterias. Todos estos complejos de transferencia de electrones translocan protones a través de una membrana lipídica impermeable a los H^+ (Berry *et al*, 2000).

El complejo III, transfiere electrones del ubiquinol al citocromo *c* y esta transferencia de electrones se relaciona con la translocación de protones a través de la membrana en el que residen los complejos citocromo *bc₁*. El mecanismo por el cual se acoplan la transferencia de electrones y la translocación de protones en los complejos *bc₁* se denomina ciclo Q. Este ciclo es uno de los mecanismos más importantes en la transducción de la energía celular, estando presente en un rango muy diverso de organismos (Trumpower, 1990).

El ciclo Q, describe la secuencia en la transferencia de electrones entre los grupos prostéticos redox de los complejos *bc₁* (el centro Fe-S de la subunidad de Rieske, el grupo hemo tipo *c* de la subunidad citocromo *c₁* y los grupos hemos b-566 y b-560 de la subunidad citocromo *b*), así como la translocación de protones a través de la membrana. En el primer paso del ciclo, el ubiquinol (QH₂) se oxida de manera bifurcada en el centro P del complejo *bc₁* por la proteína de Rieske, la cual cede un electrón al hemo de bajo potencial b-566 y otro al citocromo *c₁*. Posteriormente el hemo b-566 reduce al grupo hemo de alto potencial b-560, el cual reduce a una quinona en el centro N para transformarla en radical ubisemiquinona, proceso en el cual se translocan dos protones. Por otro lado, el citocromo *c₁* transfiere el otro electrón proveniente del QH₂ al citocromo *c*. En este punto, el ciclo Q se encuentra a la mitad, se requiere de una segunda molécula de ubiquinol para la completa reducción de la ubiquinona en el centro N por el citocromo *b*. Como resultado neto del ciclo, dos moléculas de citocromo *c* se reducen, cuatro protones se translocan al lado positivo de la membrana, y se consumen dos protones de la matriz mitocondrial por la reducción de la ubiquinona a ubiquinol por el citocromo *b* (Trumpower, 1990).

La maduración de los complejos de la cadena de transporte de electrones depende de pasos coordinados en la inserción en la membrana interna de la mitocondria de subunidades codificadas en el genoma mitocondrial y la inserción de subunidades proteicas importadas del citoplasma codificadas en el núcleo (Tie-Zhong *et al*, 2014). La maduración del complejo III es un proceso muy complicado y altamente coordinado, en el cual se ha propuesto la formación de sub complejos, primeramente el citocromo *b* forma un subcomplejo con las subunidades Qcr7 y Qcr8, posteriormente el citocromo *c₁*, Cor1, Cor2, Qcr6 y Qcr9 son ensamblados con este subcomplejo para formar el complejo *bc₁* premaduro. Las subunidades Qcr10 y Rip1

son ensamblados finalmente para formar el complejo maduro, una vez maduro el complejo III forma homodímeros que después formarán supercomplejos con el complejo IV (Rie Sawamura *et al*, 2014).

La mayoría de las subunidades del complejo bc_1 son sintetizadas en el citosol, siete subunidades son denominadas supernumerarias y no se les ha asignado una función específica (Qcr6, Qcr7, Qcr8, Qcr9, Qcr10, Cor1 y Cor2). El núcleo catalítico del complejo III comprende tres subunidades: el citocromo c_1 , el citocromo b (única subunidad codificada por el ADN mitocondrial por lo tanto sintetizada en la mitocondria) y la proteína Rieske que contiene un centro Fe-S, estas subunidades están involucradas en la transferencia de electrones y la translocación de protones (Zara *et al*, 2007, 2009).

Función del complejo III y ciclo Q

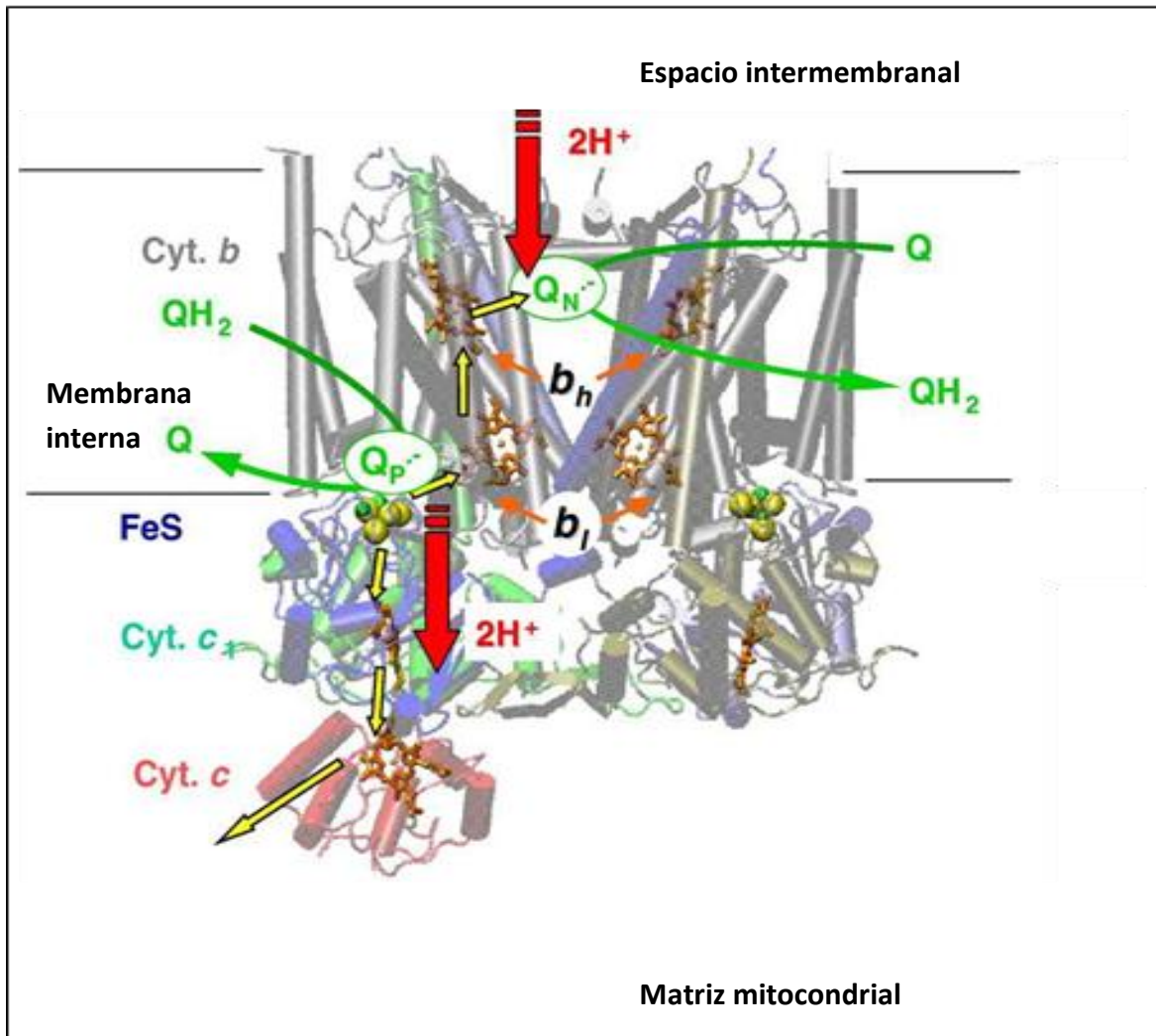


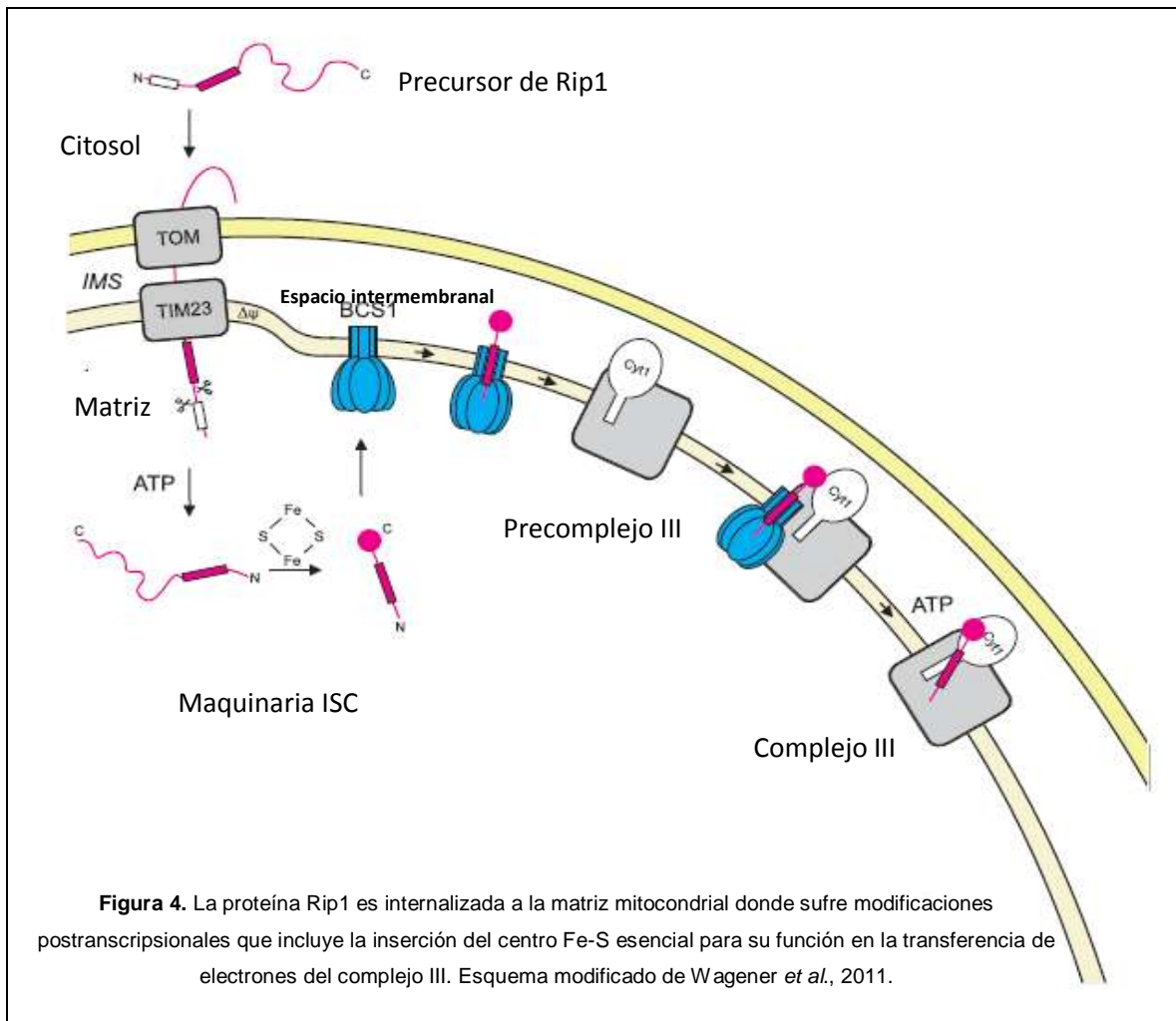
Figura 3. Diagrama de ciclo Q superpuesto sobre la estructura de rayos X de las tres subunidades catalíticas del complejo III de levadura. La estructura de rayos X del complejo III de levadura se co-cristalizó con citocromo c, se observa el flujo de electrones a partir de la quinona hacia el citocromo c mediante las subunidades catalíticas del complejo así como el flujo de protones hacia el espacio intermembranal para la generación del gradiente. Modificado de Mulikjanian, 2004.

1.6 Maduración de la subunidad Rip1p (Rieske)

La subunidad Rip1p es sintetizada en el citosol, presenta un motivo en su amino terminal para la internalización hacia la mitocondria, la secuencia precursora tiene 215 aminoácidos y es importada a la matriz mitocondrial mediante los transportadores TOM

y TIM23 (Wagener, 2011). Posteriormente, Rip1p sufre dos cortes proteolíticos, el primero de 22 aminoácidos seguido de la remoción de un octa-péptido en el amino terminal de la proteína (Conte y Zara, 2011). El proceso de maduración de Rip1p termina en la matriz mitocondrial con la inserción en un grupo Fe-S tipo rómbico [2Fe-2S] mediado por la maquinaria mitocondrial de ensamblaje de centros hierro-azufre (ISC). Rip1p interactúa con la chaperona Bcs1p, primeramente por un sitio de reconocimiento situada en la superficie del dominio Fe-S, se transloca con el dominio C-terminal por delante a través del canal central de Bcs1p. La liberación lateral de Rip1p depende de un segundo sitio de reconocimiento situado en el segmento transmembranal del N-terminal y se produce de una manera dependiente de ATP cuando el segmento hidrófobo de Rip1p alcanza el anillo de transmembrana del complejo Bcs1p. Como el complejo Bcs1p interactúa con el precomplejo III, Rip1p se puede transferir directamente a su ubicación final (Wagener, 2011). Un paso importante en la maduración de la proteína Rip1p es la inserción de su grupo prostético, el cual está coordinado por dos residuos de cisteína y dos residuos de histidina en el carboxilo terminal (C159, H161, C178, y H181) (Iwata *et al*, 1996). Mutaciones en estos residuos demuestran que si Rip1p no presenta su grupo Fe-S, la proteína es susceptible de ser degradada por proteasas; sin embargo, la apoproteína de Rip1 puede llegar a ser insertada en el complejo III siendo este disfuncional (Cruciat *et al*, 1999. Gutierrez-Cirlos *et al*, 2002).

Proceso de maduración de la proteína Rip1p



1.7 Disfunción del complejo III

Las mutaciones en genes implicados en la maduración o integridad del complejo III en *S. cerevisiae* no son letales a menos que este se encuentre en un ambiente aerobio y libre de azúcares, pues está bien documentado que gracias al efecto Crabtree esta levadura puede metabolizar la glucosa en un proceso respiro-fermentativo bajo condiciones aeróbicas (Rodríguez *et al.*, 2006), debido a esto pueden sobrevivir en gran cantidad de ambientes sin necesidad de usar un metabolismo respiratorio. Sin embargo,

otros organismos no son capaces de sobrevivir con deficiencias en la cadena de transporte de electrones. Por ejemplo, en humanos, las deficiencias del complejo III son relativamente raras entre todos los defectos de la cadena respiratoria. Se han reportado mutaciones en subunidades estructurales, catalíticas y factores de ensamble del complejo III, por ejemplo, defectos en *BCS1L* pueden causar el síndrome de Bjornstad (debilidad muscular, atrofia óptica, encefalopatía e insuficiencia hepática). Otro síndrome es el síndrome Gracile, el cual daña el hígado, afecta el crecimiento, produce aminoaciduria, sobrecarga de hierro, acidosis láctica y muerte temprana. Un estudio en fibroblastos primarios de piel de pacientes con mutaciones en el gen *BCS1L* comprobó que a causa de la deficiencia en la actividad del complejo III mitocondrial, se producen alteraciones en el metabolismo energético pues presentan bajas tasas de consumo de oxígeno así como bajos niveles de ATP intracelular, lo que indica que el principal evento molecular alterado es la respiración celular, otros. Asimismo, otros procesos como la señalización celular, la regulación de la expresión génica, la formación y mantenimiento del citoesqueleto y las respuestas al estrés intracelulares también se ven afectados (Marín *et al*, 2015; Díaz *et al*, 2012). Además de los trastornos mitocondriales específicos, el deterioro de la función mitocondrial se ha vinculado también a muchas enfermedades crónico-degenerativas, neurodegenerativas y al envejecimiento, debido a que el deterioro de la cadena de transporte de electrones puede producir radicales libres que conducen a un exceso de estrés oxidativo (Lin y Beal, 2006). El papel del daño oxidativo en las enfermedades mitocondriales no se ha documentado ampliamente *in vivo* y la mayoría de los estudios se refieren a un aumento de ERO en células cultivadas derivados de los pacientes con trastornos mitocondriales. A pesar del conocimiento generado hasta ahora, se entienden de manera muy pobre los trastornos mitocondriales clínicos en humanos, aquí radica la importancia en la investigación y dilucidación total de los eventos que llevan a cabo la maduración completa del complejo III.

1.8 Especies reactivas de oxígeno (ERO)

Los organismos aerobios usan el oxígeno como aceptor terminal de electrones para la producción de energía en forma de ATP. El aumento de los niveles intracelulares de oxígeno, sin embargo, es potencialmente tóxico. Esta toxicidad se debe principalmente a las formas de oxígeno parcialmente reducidas (Gille y Sigler, 1995), ya que la molécula de

O_2 *per se* tiene baja reactividad (Halliwell y Gutteridge, 1990). Las moléculas y radicales formados por la reducción incompleta de oxígeno se denominan especies reactivas de oxígeno (Halliwell y Gutteridge, 1989). Las ERO que comúnmente se forman *in vivo* incluyen el radical superóxido (O_2^{\cdot}), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) y su formación puede resultar en daños a las proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos (Aung-Htut *et al*, 2012).

El primer producto intermedio en la reducción secuencial de oxígeno es a menudo el radical superóxido, este se produce por la reducción de un solo electrón del oxígeno en la cadena respiratoria en las mitocondrias (Lambert y Brand, 2004).

En *S. cerevisiae* el gen *SOD1* codifica una enzima que contiene cobre y zinc, se encuentra en el citoplasma y el espacio intermembranal mitocondrial. También cuenta con el gen *SOD2* el cual codifica una enzima que contiene manganeso que se encuentra en la matriz mitocondrial (Bermingham-McDonogh *et al*, 1988; Gralla y Kosman, 1992; O'Brien *et al*, 2004). A partir del O_2^{\cdot} se producen moléculas de H_2O_2 (Gille y Sigler, 1995) por las reacciones enzimáticas de las superóxidos dismutasas, estas reacciones están entre las principales fuentes de H_2O_2 *in vivo*. Sin embargo, la principal amenaza para la célula es la posterior transformación del O_2^{\cdot} y del H_2O_2 a oxidantes más fuertes, en particular el radical hidroxilo, que es el radical más oxidante conocido en sistemas biológicos, puesto que debido a su alta reactividad puede dañar prácticamente todas las macromoléculas y no puede ser desintoxicado por acciones enzimáticas como por ejemplo el H_2O_2 (Youngman, 1984; Buettner, 1993).

La reducción incompleta del O_2 se produce principalmente en dos sitios en la cadena respiratoria: el complejo I (Turrens y Boveris, 1980) y el complejo III (Boveris *et al*, 1976; Cadenas *et al*, 1977; Turrens *et al*, 1985). Se acepta ampliamente que los radicales derivados de la reducción parcial de la ubiquinona en el complejo III son los principales generadores de ERO durante la respiración. Esto ocurre principalmente en la semiquinona portadora de electrones en el centro p en el complejo III (Trumpower, 2002; Andreyev *et al*, 2005). *S. cerevisiae* es una herramienta útil en el estudio de la función mitocondrial debido a que las mutaciones en el ADN mitocondrial o la supresión de genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales no son letales. Aunque hay diferencias entre la cadena de transporte electrónico de los mamíferos y levaduras, en su

mayoría en el complejo I, la producción de $O_2^{\cdot -}$ en el complejo III resulta de mecanismos similares en levaduras y mamíferos (Sun y Trumpower, 2003).

Las células de levadura han desarrollado mecanismos de defensa complejos para protegerse contra ERO. Estos mecanismos de defensa utilizan moléculas de bajo peso molecular como el glutatión, el D-erythroascorbato y defensas enzimáticas tales como superóxidos dismutasas, catalasas, tioredoxinas y glutatión peroxidases (Temple, 2005), cuya finalidad es la desintoxicación de ERO de la célula.

1.9 Biogénesis de proteínas con centros Fe-S

El modelo actual de la biogénesis de las proteínas con centros Fe-S de las mitocondrias involucra la importación de hierro desde el citosol, lo que implica la participación de las glutaredoxinas (GRX) como donantes de hierro y los transportadores de la membrana interna Mrs3-Mrs4 que utilizan el potencial de membrana como fuente de energía para el transporte de membrana. La biogénesis de proteínas mitocondriales Fe-S se lleva a cabo por la maquinaria de ensamblaje de centros Fe-S denominada ISC (por sus siglas en inglés iron sulfur cluster) en tres pasos principales. En primer lugar, el cluster Fe-S se sintetiza en la proteína de andamiaje Isu1p, un paso que requiere el complejo cisteín desulfurasa Nfs1-Isd11 como donador de azufre al liberar el azufre de la cisteína convirtiéndola en alanina. Este paso requiere además la frataxina Yfh1p que interacciona de una manera dependiente de hierro con Isu1p y puede servir como un donador de hierro y/o un regulador alostérico de la enzima desulfurasa. Se necesita una cadena de transferencia de electrones que consta de NAD(P)H, una ferredoxin reductasa (Arh1) y una ferredoxina (Yah1) para el ensamble del centro Fe-S en Isu1p. En el segundo paso, Isu1p unida al centro Fe-S es reconocida por una chaperona molecular dependiente de ATP, Ssq1 (chaperona molecular de la familia de las Hsp70), su co-chaperona Jac1 y un factor intercambiador de nucleótidos Mge1. La glutaredoxina Grx5 entonces ayuda a transferir el cluster Fe-S hacia las apoproteínas receptoras, presumiblemente a través de la unión transitoria del centro Fe-S en un complejo que contiene glutatión (GSH). En un tercer paso, se ha propuesto que componentes especializados de la maquinaria ISC catalizan la generación de centros [4Fe-4S] de tipo cúbico, mediante la participación de las proteínas Isa1-Isa2-Iba57, que ayudan a la inserción de los centros Fe-S en apoproteínas específicas que contienen este tipo de

centros (Lill *et al*, 2012).

Tipos de centros Fe-S

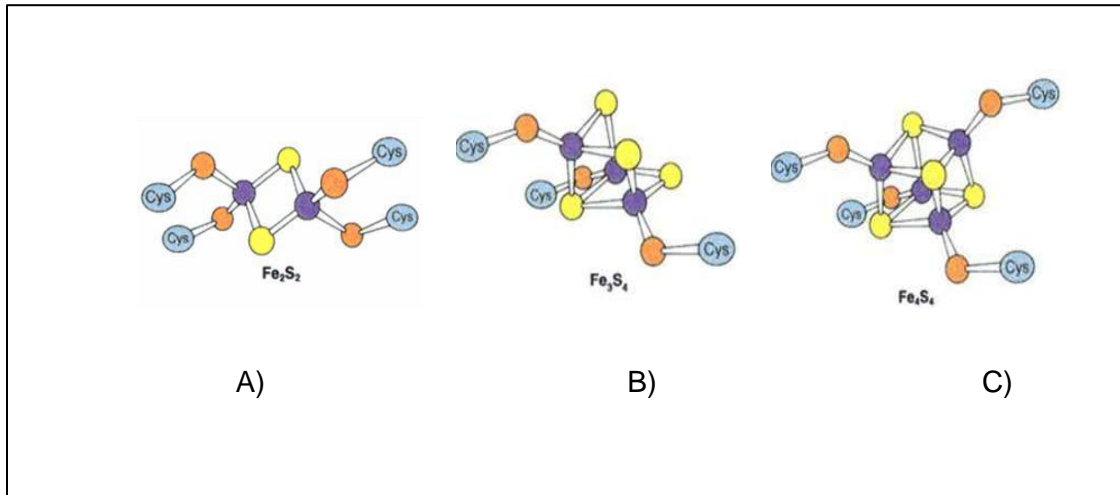
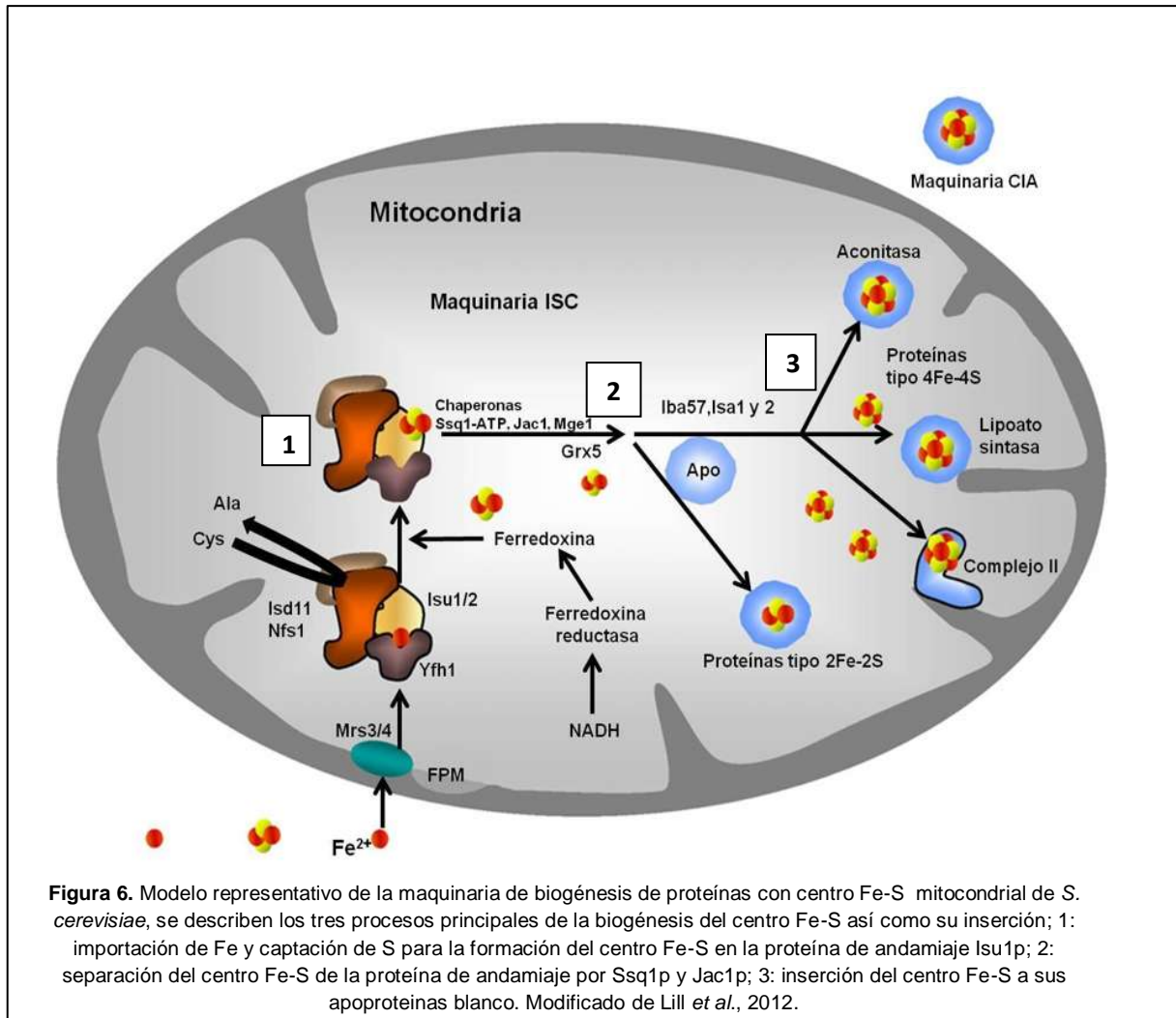


Figura 5. A) Centro Fe-S rómbico; dos átomos de hierro y dos átomos de azufre; B) Centro Fe-S semi-cúbico; tres átomos de hierro y cuatro átomos de azufre; C) Centro Fe-S cúbico; cuatro átomos de hierro y cuatro átomos de azufre. Tomado y modificado de Mathews *et al*, 2003

La función específica de las proteínas "tipo A" Isa1p e Isa2p en el marco de la maquinaria ISC mitocondrial y bacteriana siguen sin resolverse del todo. En un análisis integral *in vivo*, se demostró que las proteínas Isa1p e Isa2p de *S. cerevisiae* forman un complejo que se requiere para la maduración de proteínas mitocondriales con centros tipo cúbico [4Fe-4S], como ejemplo de estas son la aconitasa y homoaconitasa. En contraste, Isa1p-Isa2p son prescindibles para la generación de proteínas mitocondriales del tipo rómbico [2Fe-2S] y de proteínas citosólicas de tipo cúbico [4Fe-4S]. Se ha demostrado que las proteínas Isa1p e Isa2p se unen *in vivo* al hierro, sin embargo, el hierro unido a las proteínas Isa1p-las2p no es necesario para el ensamble *de novo* de los centros tipo rómbico [2Fe-2S] en las proteínas de andamiaje Isu1p-Isu2p. Se ha reportado que el factor de ensamblaje Iba57p de la maquinaria ISC interactúa con Isa1p e Isa2p. Estos resultados sugieren que se requiere del hierro unido a las proteínas Isa para la síntesis *de novo* de centros tipo cúbico [4Fe-4S] en las mitocondrias y para su inserción en apoproteínas en una reacción mediada por Iba57p. En conjunto, estos hallazgos definen Isa1p, Isa2p e Iba57p como un subsistema especializado tardío de acción de la maquinaria ISC que se

dedica específicamente a la maduración de proteínas mitocondriales tipo cúbico [4Fe-4S] (Mühlenhoff *et al*, 2011).

Biogénesis de proteínas con centros Fe-S



2. ANTECEDENTES

En un estudio previo de nuestro grupo de trabajo (Pérez-Gallardo *et al.* 2013) se reportó que en *S. cerevisiae* la producción de ERO inducida por etanol incrementa cuando la maquinaria ISC es disfuncional. Se observó que las mutantes de la maquinaria ISC más sensibles a etanol fueron *ssq1Δ*, *isa1Δ* e *iba57Δ* y esto se asoció con una mayor producción de ERO en dichas mutantes, siendo *iba57Δ* la mutante que produjo la mayor cantidad de ERO. Además, las mutantes *ssq1Δ*, *isa1Δ* e *iba57Δ* presentaron una mayor cantidad de citocromo *c* liberado, lo cual sugiere que estas mutaciones desencadenan apoptosis debido al malfuncionamiento de la biogénesis de proteínas dependientes de centros Fe-S.

En otro estudio de nuestro grupo de trabajo (Gómez-Gallardo tesis de maestría 2012) se observó que las cepas *iba57Δ* y *rip1Δ* presentan una excesiva producción de ERO, deficiencias en el complejo III causa altos niveles de ERO causa por la cual la mutante en *RIP1* muestra esta sobreproducción. Por consiguiente se analizó la actividad de los complejos respiratorios observando que *Iba57Δ* no presenta actividad del complejo III al igual que la cepa *rip1Δ* utilizando succinato como sustrato, lo que sugirió que la mutación de *IBA57* afecta la maduración del complejo III, posiblemente por la incompleta maduración de la proteína Rip1p la única subunidad con centro [2Fe-2S] del complejo.

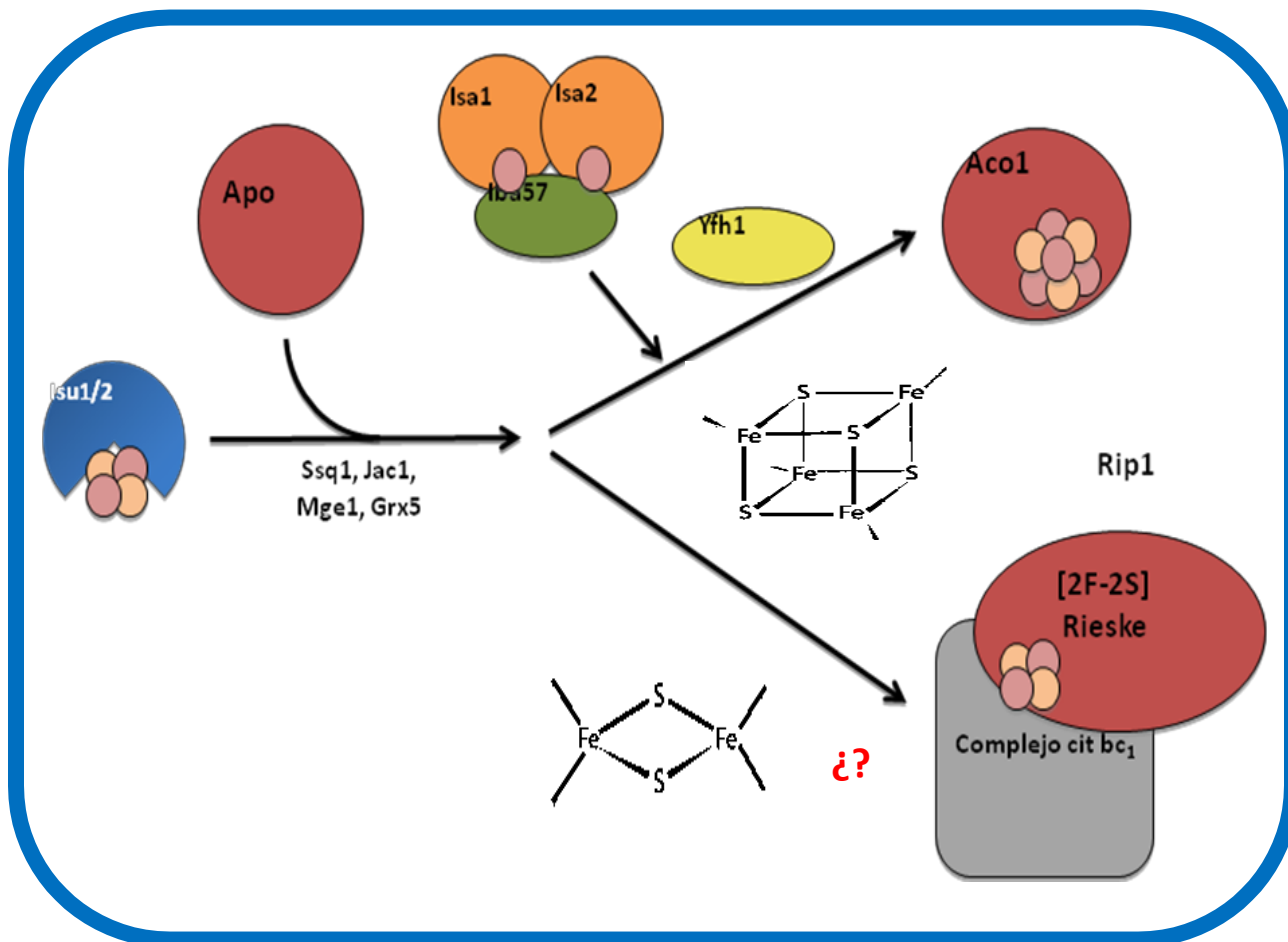
3. JUSTIFICACIÓN

Hasta el momento se ha descrito que *Iba57p* en conjunto con *Isa1p/Isa2p* transfieren los centros Fe-S del tipo [4Fe-4S] a apoproteínas tales como la aconitasa, la lipoato sintasa, la succinato deshidrogenasa, entre otras. Se encontró que las ERO en la mutante en *IBA57* fueron similares a una mutante en la proteína Rieske (*Rip1p*) y que ambas cepas presentaron disfuncionalidad en la actividad del complejo III utilizando succinato como sustrato, lo que sugiere una posible dependencia molecular. Por lo que es importante conocer la función de la proteína de ensamblaje *Iba57p* sobre la proteína Rieske del complejo III de la CTE.

4. HIPÓTESIS

En *Saccharomyces cerevisiae* la proteína Iba57p está implicada en la transferencia del centro [2Fe-2S] a la proteína de Rieske del complejo III de la CTE.

Figura 7. Modelo hipotético de la función de Iba57p



5. OBJETIVO GENERAL

Determinar la participación de la proteína Iba57p en el ensamblaje del centro Fe-S en la subunidad de Rieske del complejo III de la CTE de *S. cerevisiae*.

Objetivos particulares

- Determinar el efecto de agentes oxidantes como H₂O₂, menadiona y etanol en las cepas mutantes de *S. cerevisiae* en los genes *IBA57* y *RIP1*.
- Determinar el efecto de las mutaciones en los genes *IBA57* y *RIP1* en la funcionalidad de la cadena transportadora de electrones de *S. cerevisiae*.
- Determinar a nivel molecular el efecto de la mutación de la proteína Iba57p en el ensamblaje de la subunidad Rieske del complejo III y de los supercomplejos respiratorios de la CTE de *S. cerevisiae*.

6. MATERIALES

6.1 Cepas

Tabla1. Las cepas que se utilizaron en este trabajo fueron obtenidas de Open biosystem y se obtuvieron de la cepa parental de *S. cerevisiae* BY4741 haploide mediante la interrupción de los genes *IBA57*, *SSQ1*, *GRX5* y *RIP1* con un cassette de resistencia a geneticina.

Tabla 1. Cepas

Cepas	Genotipo	Referencia
BY4741	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i>	Open biosystems
<i>iba57Δ</i>	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, iba57::kanMX4</i>	Open biosystems
<i>rip1Δ</i>	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, rip1::kanMX4</i>	Open biosystems
<i>ssq1Δ</i>	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, ssq1::kanMX4</i>	Open biosystems
<i>grx5Δ</i>	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, grx5::kanMX4</i>	Open biosystems

6.2 Medios de cultivo

Se utilizó medio para levaduras YPD (extracto de levadura 1%, peptona de caseína 2%, agar bacteriológico para medio solido 2% y dextrosa 2%). El medio se esterilizó 15 minutos a 121 °C y 15 libras de presión. Para seleccionar las cepas mutantes se adicionó el antibiótico geneticina (200 µg/ mL).

Se utilizó medio YPG 3% de glicerol con geneticina (200 µg/mL) (extracto de levadura 1%, peptona de caseína 2%, agar bacteriológico para medio solido 2% y 3% de glicerol) con la finalidad de corroborar que no hubiera contaminación, pues la cepas de *S. cerevisiae* deficientes en la CTE como son las mutantes en *IBA57*, *SSQ1* y *RIP1* no son capaces de crecer en medios con sustratos no fermentables.

6.3 Programas computacionales

Los datos que ese obtuvieron en este trabajo se registraron y se analizaron en el programa GraphPad Prism 5, realizando diferentes análisis estadísticos según el caso del experimento.

Para la determinación densitométrica de las bandas de proteína que representan los supercomplejos en los geles nativos (BN- PAGE), se usó el programa ImageJ.

7. MÉTODOS

7.1 Almacenamiento y recuperación de las cepas.

Las cepas BY4741 y sus mutantes fueron almacenadas a -80 °C en tubos Eppendorf de 1.5 ml en medio líquido YPD 2% al 20% de glicerol, al medio de las cepas mutantes se le agregó 200 µg/mL de geneticina.

Para recuperar las cepas se crecieron 50 µL de cada una de las cepas almacenadas en ultracongelación en 1 mL de medio YPD durante 12 horas a 30 °C en agitación constante, posteriormente se sembraron 500 µL de estos cultivos en agar YPD y se incubaron a 30 °C durante 12 horas. Se picaron colonias aisladas y se resembraron en agar YPD 2% con geneticina para las cepas mutantes y YPD 2% para la cepa parental BY4741, se dejaron crecer 12 horas y se almacenaron a 4 °C, se almacenan por un máximo de tres semanas, pasado este tiempo se volvieron a resembrar.

7.2 Caracterización de las cepas a agentes oxidantes

7.2.1 Cinéticas de crecimiento

Para realizar las cinéticas de crecimiento se inoculó 3 mL de medio YPD 2% con una asada de cada una de las cepas durante 8-10 horas a 30 °C en agitación constante. Después, se les midió la densidad óptica a 600 nm para inocular en matraces de 125 mL un volumen de 30 mL de medio YPD 2% con el volumen de inóculo necesario para que la cinética comenzara a 0.1 de D.O. a 600 nm.

Los matraces fueron incubados a 150 RPM a 30 °C durante 48 horas registrando la D.O. de las muestras cada 2 horas durante las primeras 12 horas; posteriormente, se registraron los

tiempos 24, 26, 28, 30 y 48 horas. Todas las determinaciones se hicieron en un espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 20.

7.2.2 Curvas dosis respuesta a agentes oxidantes

Se realizaron curvas dosis respuesta de los agentes oxidantes tanto en medio líquido como en medio sólido por diluciones en caja Petri usando diferentes concentraciones de menadiona 25, 50, 75, 100, 125, y 150 μ M; peróxido de hidrogeno 0, 1, 2, 3, 4, 6, 9, 12 mM y etanol 0, 4, 6, 8, 10 y 12 %. Se dejó crecer un inóculo durante 8-10 horas de las cepas que se utilizaron, se midió la D.O. a 600nm y se tomó el volumen necesario para que en un tubo Eppendorff con 1 mL de agua tuviera una D.O. de 0.1. Partiendo de esta solución se hicieron diluciones 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000 con volumen final de 1 mL. De cada dilución se tomaron 10 μ L y se colocaron sobre placas Petri con medio YPD 2% con sus respectivas concentraciones de los agentes oxidantes, las diluciones se colocaron en fila partiendo de la mayor concentración de células a la menor, repitiendo este procedimiento con cada cepa. Se dejaron secar las gotas en la campana de flujo laminar se sellaron con cinta parafilm y se incubaron a 30 °C durante 72 horas. Para medio líquido se utilizó el mismo inóculo realizando los cálculos necesarios para llevar un volumen de 3 mL a una D.O. de 0.1, cada cepa se inóculo por triplicado, y la batería de tubos fue incubada a 30 °C en agitación constante durante 18 horas y posteriormente se midió la D.O. a 600 nm.

7.2.3 Cinéticas de crecimiento con agentes oxidantes

Para las cinéticas con agentes oxidantes con menadiona, peróxido de hidrógeno y etanol se siguió el método descrito en el apartado 7.2.1, agregando las concentraciones de agentes oxidantes seleccionadas de las curvas dosis respuesta donde se presentaron las mayores diferencias entre las cepas.

7.3 Oximetría

Para medir el consumo de oxígeno se utilizaron cultivos de las cepas mutantes y la cepa silvestre, se usaron 25 mg de peso húmedo de células de levadura y se suspendieron en un volumen de 2.5 mL de buffer para medir consumo de oxígeno (Hepes 10 mM, KCL 100 mM, KH₂PO₄ 3 mM y MgCl₂ 3 mM a pH 7.4) se colocaron en una cámara de vidrio sellada y la

velocidad de consumo de oxígeno fue determinada a temperatura ambiente usando un electrodo tipo Clark acoplado a un monitor de oxígeno YSI 5300 y un graficador. Para comenzar la medición el consumo basal de oxígeno (estado 4) fue inducido agregando glucosa 20 mM como sustrato respiratorio, 3 minutos después de agregar el sustrato se le agrega 5 μ M de un agente desacoplante carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP) con el propósito de estimular la máxima capacidad de consumo de oxígeno (Estado U o estado desacoplado). Para eliminar el consumo de oxígeno inespecífico del citosol, la cadena de transporte de electrones fue inhibida agregando 1 μ g de antimicina A y 0.5 mM de KCN.

7.4 Análisis de la actividad del complejo III

7.4.1 Aislamiento de mitocondrias

Con un asa bacteriológica se inoculo 50 mL de medio YPD 2% y se dejó crecer durante 10 horas a 150 RPM a 30 °C. De este preinóculo, se inoculó 1 Lt de medio YPD 2% a una D.O. de 0.1 y se incubó de 10 a 12 horas en agitación constante a 150 RPM a 30 °C.

Las células fueron cosechadas y suspendidas tres veces con agua desionizada mediante centrifugación de 5 minutos a 2500 g cada lavado. Las células se pre-incubaron con el buffer SH (Tris Base 0.1 M β -mercaptoetanol 0.5 M, pH = 9.3) durante 30 minutos a 30 °C en agitación constante y moderada (70 RPM), se calculó un volumen de 20 mL de buffer por gramo de peso seco de levaduras (Peso seco = peso húmedo/4). Después, las levaduras fueron lavadas 3 veces en buffer de lavado (KCl 0.5 M, Tris base 10 mM, pH = 7) por medio de centrifugación a 2500 g por 5 minutos. Posteriormente, las células fueron resuspendidas en buffer de digestión (Sorbitol 1.35 M, EGTA 1 mM, buffer di-monofosfato 0.2 M (Fosfato disódico (Na_2HPO_4) 0.2 M, fosfato monosódico (NaH_2PO_4) 0.2 M, pH = 7.6), ácido cítrico 0.1 M, liticasa 0.5 mg/g de células, pH = 5.8, 10 mL/g de peso seco), se incubaron una hora a 30 °C en agitación moderada. Al momento de poner la liticasa, se realizó una lectura de la D.O. a 600 nm contra agua de una alícuota diluida 1:1000 ($D.O_{\text{inicial}}$). Posteriormente, se midió la D.O. de diluciones 1:100 a los 30 minutos y luego cada 10 minutos. La reacción se detuvo cuando la D.O. fue igual o semejante a la $D.O_{\text{inicial}}$.

Una vez que se obtuvieron, los esferoplastos se centrifugaron a 9000 g durante 10 minutos. A partir de este paso, todo el procedimiento restante se realizó a 4 °C. Posteriormente, se

lavaron tres veces con buffer de lavado de esferoplastos (sorbitol 0.75 M, manitol 0.4 M, tris maléico 10 mM, BSA 1%, pH 6.8) re-suspendiendo suavemente con un agitador delgado, centrifugándose 10 minutos a 9000 g en cada lavado. La pastilla de esferoplastos se cambió a un tubo potter con vástago de teflón colocando cuidadosamente la pastilla en el fondo del tubo. Se adicionó buffer de homogenización (Manitol 0.6 M, EGTA 2 mM, tris maléico 10 mM, BSA 2%, pH 6.8) en un volumen de 30 mL por cada 2.5 gramos de peso seco de esferoplastos y se homogenizó 20 veces manualmente sin sacar el tubo del hielo. La muestra se centrifugó a 1250 g durante 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 9000 g durante 10 minutos. El sobrenadante fue descartado y el precipitado fue re-suspendido en buffer de recuperación de mitocondrias (Manitol 0.6 M, EGTA 2 mM, tris maléico 10 mM, pH 6.8) en aproximadamente 30 mL utilizando un pincel de pelo fino, nuevamente se centrifugó a 1250 g durante 10 minutos, recuperando el sobrenadante y se centrifugó 10 minutos a 9000 g. Las mitocondrias precipitadas fueron suspendidas en buffer de recuperación 1-2 mL y se hicieron alícuotas de 0.1 mL en tubos Eppendorff. Por último las mitocondrias fueron congeladas en nitrógeno líquido e inmediatamente almacenadas en el ultracongelador a -80 °C.

Para los buffers que llevan sorbitol y manitol, estos se prepararon con agua destilada desionizada, la solución se desionizó con una resina DOWEX 50⁴ 20/50 μ L de BIORAD, las soluciones se prepararon con el 50% de agua destilada desionizada del volumen final, la solución se fue agregando a la resina en cantidades de 250 mL en agitación suave en periodos de 15 minutos, la resina se lavó con agua destilada y desionizada y esta se le adiciono a la solución anteriormente desionizada hasta obtener el volumen deseado.

7.4.2 Permeabilización de mitocondrias

100 μ g de proteína mitocondrial se solubilizaron en 300 μ L de buffer de solubilización (KCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM, tris base 10 mM, pH 7.5) se agitó en vortex y se dejó incubar durante 5 minutos, se centrifugó a 9500 g durante 15 minutos. Todo el proceso se llevó a cabo a 4 °C. El sobrenadante fue descartado y la pastilla fue resuspendida en 100 μ L de buffer de fosfatos (KH₂PO₄ 50 mM, pH 7.6).

7.4.3 Reducción de la decilubiquinona y actividad del complejo III

Para medir la actividad del complejo III se usó como sustrato decilubiquinol, la cual fue obtenida a partir de la reducción de la decilubiquinona. Se preparó 1 mL de solución de decilubiquinona a 10 mM en etanol acidificado (pH = 4 o menor), a esta solución se le agregaron unos pocos cristales de borohidruro de sodio como agente reductor. La reacción se completó cuando la solución cambió de color amarillo a transparente. Para retirar los restos de borohidruro de sodio, se agregó 2 mL de ciclohexano a la solución reducida y se agitó en vortex, después se transfirió la fase orgánica a un tubo limpio. Otros 2 mL de ciclohexano se agregaron a la fase inorgánica y se agitó en vortex, la fase orgánica se retiró nuevamente y se mezcló con la fase orgánica anterior. Este paso se repitió dos veces. Después la mezcla de fases orgánicas fue lavada con una solución de NaCl 2 M, se agitó en vortex y la fase superior fue pasada a un tubo limpio, el ciclohexano fue retirado con nitrógeno gas y el decilubiquinol fue re-suspendido en un mL de etanol acidificado con HCl.

En el ensayo para la determinación de la actividad del complejo III se usó un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18 UV/vis a temperatura ambiente, usando las mitocondrias de cada una de las cepas previamente solubilizadas como se indica en el párrafo 7.4.2. En una celda para espectrofotómetro se agregó 0.025 µg de proteínas mitocondriales en 1 mL de buffer de fosfatos (KH₂PO₄ 50 mM, pH 7.6), se adicionó 5 µL de KCN 0.4 M, se mezcló y se dejó incubar durante 5 minutos. Transcurridos los 5 minutos, se agregó 15 µL de citocromo *c* oxidado 0.1 M, se mezcló y se colocó la celda dentro del espectrofotómetro y comenzó la lectura a una $\lambda = 550$ nm, transcurrido un minuto se agregó 5 µL de decilubiquinol 10 mM y se dejó 1.5 minutos en el espectro registrando el trazo. Finalmente, se agregó 5 µL de antimicina A (200 µg/mL) y se terminó la lectura transcurridos tres minutos. La tasa de reducción del citocromo *c* se calculó a partir de las pendientes de absorbancia utilizando un coeficiente de extinción molar de 19.1 mM⁻¹ cm⁻¹ de citocromo *c*.

7.5 Geles azules nativos de poliacrilamida (BN-PAGE)

7.5.1 Aislamiento de mitocondrias

Para el análisis de supercomplejos se aislaron mitocondrias por el siguiente método. Las cepas fueron cultivadas en 1 litro de medio YPD 2% y cosechadas por centrifugación a 2500 *g* durante 5 minutos. Las células fueron lavadas 3 veces con agua destilada, se resuspendieron

en buffer de esferoplastos (sorbitol 1.2 M, tris base 50 mM, DTT 10 mM, liticasa 0.5 mg por gramo de peso seco, pH 7.5) y se incubó durante una hora a 30 °C en agitación constante y moderada. Los esferoplastos fueron lavados con buffer de esferoplastos sin DTT ni liticasa tres veces. Posteriormente, se suspendieron en buffer de homogenización (Hepes 20 mM, sorbitol 0.6 M, pH 7.4 ajustado con KOH) a una concentración de 0.8 gramos de células por mL, se colocaron en un tubo de vidrio para homogenizar con vástago de teflón y se procedió a homogenizar 20 veces de manera suave manualmente. La muestra fue diluida con un volumen igual de buffer de homogenización y se centrifugó a 1250 g por 10 minutos a 4 °C, se rescató el sobrenadante y la pastilla fue suspendida en 40 mL de buffer de homogenización, se centrifugó nuevamente a 1250 g por 10 minutos a 4 °C. Los dos sobrenadantes fueron combinados y centrifugados nuevamente. Se rescató el sobrenadante el cual contiene las mitocondrias y se colectaron a 9000 g durante 10 minutos a 4 °C, finalmente la pastilla fue suspendida en 1 mL de buffer de homogenización y se hicieron alícuotas de 100 µL se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron en el ultracongelador a -80 °C.

7.5.2 Solubilización de mitocondrias

400 mg de proteínas mitocondriales se homogenizaron en buffer de solubilización (NaCl 50 mM, Imidazol 50 mM, ácido aminocaproico 2 mM, EDTA 1 mM pH 7) se agregó 0.1% de dodecilmaltósido a la muestra (w/v) y se dejó incubar durante 20 minutos a 4 °C, agitando la muestra manualmente cada 5 minutos. Las muestras se centrifugaron durante 20 minutos a 20 000 x g a 4 °C, el sobrenadante se pasó a un tubo nuevo y se volvió a cuantificar la proteína solubilizada, la muestra se mezcló con 5 µL de buffer de carga (glicerol 50% v/v, azul brillante de Coomassie 5% w/v, ácido aminocapróico 0.5 M).

7.5.3 Electroforesis del gel nativo

Para la electroforesis se cargaron 100 mg de proteínas solubilizadas en un gel nativo de poliacrilamida 8% (BN-PAGE), la electroforesis comenzó con el buffer del cátodo A (tricina 50 mM, Imidazol 7.5 mM y azul brillante de Coomassie 0.002% w/v) y el buffer del ánodo (Imidazol 25 mM, pH 7 ajustado con HCl) a 40 V. Después de 30 minutos, el voltaje se subió a 80 V y se dejó correr durante 60 minutos o hasta que el frente de corrida migró hasta la mitad del gel. El buffer de cátodo A se cambió por el buffer del cátodo B (tricina 50 mM,

Imidazol 7.5 mM) y se dejó correr a 90 V durante 60 minutos o hasta que el frente de corrida llegó al final del gel.

7.5.4 Tinción del gel nativo

El gel se fijó durante 30 minutos en una solución de 40% v/v de metanol y 10% v/v de ácido acético, posteriormente se tiñó en una solución de 0.02% w/v de azul brillante de Coomassie, 30% v/v de metanol y 10% v/v de ácido acético, durante 30 minutos en agitación constante, el gel se destiñó en una solución de ácido acético al 8% en agitación constante.

7.6 Geles desnaturizantes SDS-PAGE

A partir de mitocondrias aisladas se cuantificaron las proteínas totales de los extractos, se tomaron 40 mg de proteínas las cuales fueron desnaturizadas con 35 μ L de buffer de carga SDS (Tris-HCl 0.06 M, pH 6.8, 5% de glicerol, 4% SDS, 4% β - mercaptoetanol y 0.0025% de azul de bromofenol) durante 15 minutos a 95 °C.

Las muestras fueron cargadas en un mini-gel de acrilamida desnaturizante SDS- PAGE (gel separador: buffer tris 1.5M pH 8.8, 17% de bis-acrilamida, SDS 0.1%, persulfato de amonio 0.05% y 0.009% de Temed. Gel concentrador: buffer tris 0.5 M pH 6.8, 5% de bis-acrilamida, , persulfato de amonio 0.05% y 0.009% de Temed). Se usó el sistema Bio-Rad Mini-PROTEAM Tetra System y la electroforesis se corrió a 120 V durante 2.5 horas.

7.7 Western blot

7.7.1 Transferencia de proteínas

Después de la electroforesis del gel SDS-PAGE se realizó la transferencia de proteínas usando el sistema Bio-Rad Trans-Blot SD Semy-Dry Transfer Cell. Se cortó la membrana de nitrocelulosa del tamaño del gel de acrilamida usando guantes de latex para evitar tocar la membrana con la piel, el sistema se coloca en el siguiente orden: 1. Base; 2. Papel filtro ultra-grueso; 3. Membrana de nitrocelulosa; 4. Gel de acrilamida; 5. Papel filtro ultra-grueso; 6. Tapa de l cátodo con seguros; 7. Tapa de seguridad. Antes de armar el sistema los papeles filtros se humedecieron con buffer de transferencia (Tris base 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20%), el gel fue transferido a 15 voltios por 45 minutos (NOTA: si se usa membrana

de nitrocelulosa no se debe dejar más de este tiempo puesto que se puede perder la muestra). Al finalizar la transferencia se tiñó el gel y la membrana de nitrocelulosa con azul brillante de Coomassie y rojo de Ponceau, respectivamente, para corroborar que la transferencia haya sido eficiente.

7.7.2 Inmuno-detección

En un recipiente se colocó la membrana teñida y se puso a desteñir con 20 mL de TBS-T (Tris-HCL 10 mM; NaCl 0.9%; tween 0.1% pH 7.8) durante 30 minutos en agitación constante a temperatura ambiente, se desechó el TBS-T y se cambió por TBS-T con leche de bloqueo 5% y se puso a bloquear durante una hora en agitación constante a temperatura ambiente. Después del bloqueo, la membrana fue lavada con 15 mL de TBS-T tres veces en agitación constante durante 5 minutos cada lavado. Se diluyó el anticuerpo primario anti-Rip1 en TBS-T con leche en proporción 1:20,000 y se agregó a la membrana incubándose 12-14 horas en agitación suave a 4 °C. Transcurrido este tiempo se recuperó el anticuerpo y se almacenó a -20 °C, la membrana se lavó con TBS-T durante 10 minutos 3 veces a temperatura ambiente. Después se diluyó el anticuerpo secundario IgG anti-mouse en TBS-T en proporción 1:5000 y se incubó con la membrana durante 3-4 horas en agitación suave a 4 °C. Se recuperó el anticuerpo y se guardó a -20 °C, la membrana fue lavada con TBS-T por periodos de 15 minutos durante tres veces y una vez con TBS durante 5 minutos.

7.7.3 Revelado

En un recipiente se mezclaron las soluciones de luminol y peróxido de hidrógeno en proporción 1:1, se colocó la membrana sobre esta mezcla y se agitó manualmente durante 5 minutos, se retiró la membrana y se escurrió en una toalla de papel, la membrana fue colocada en un cassette, y se colocó una película radiográfica sobre la membrana, se cerró el cassette y se dejó exponer durante 10 minutos, se retiró la película del cassette y se colocó en solución reveladora durante un minuto agitándose manualmente. Después, se cambió la película a la solución fijadora y se mantuvo durante un minuto con agitación manual. Finalmente, la película fue lavada con agua durante dos minutos.

7.8 Determinación de la concentración de proteínas

Para la determinación de la concentración de proteínas se utilizó el método de Bradford. Se realizó una curva de calibración con un stock de proteína BSA 1 mg/ml, en tubos eppendorff se colocó 0, 5, 10, 15 y 20 μL del stock de proteína aforando a 100 μL con solución salina 0.15 M de NaCl. Para la cuantificación de las muestras, se tomó 2 μL de cada una y se aforo a 100 μL con solución salina, se agregó 500 μL de agua destilada y 400 μL de reactivo azul brillante de Coomassie, se mezcló y se dejó incubar 5 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia de las muestras fue leída en un espectrofotómetro a una λ de 595 nm. Se graficó la curva de calibración graficando la absorbencia contra la concentración de proteína. Las absorbencias de las muestras fueron extrapoladas a esta curva de calibración para la determinación de su concentración proteica.

8. RESULTADOS

8.1 Cinética de crecimiento

Con el fin de evaluar si las mutaciones en *IBA57* y *RIP1* afectan *per se* la velocidad de crecimiento en comparación con la cepa parental. En la Figura 8 se observa que tanto la cepa *iba57* Δ como *rip1* Δ crecen con un patrón similar que el de la cepa parental ($P > 0.05$), lo que indica que las mutaciones no afectan la velocidad de crecimiento en medio YPD2 %.

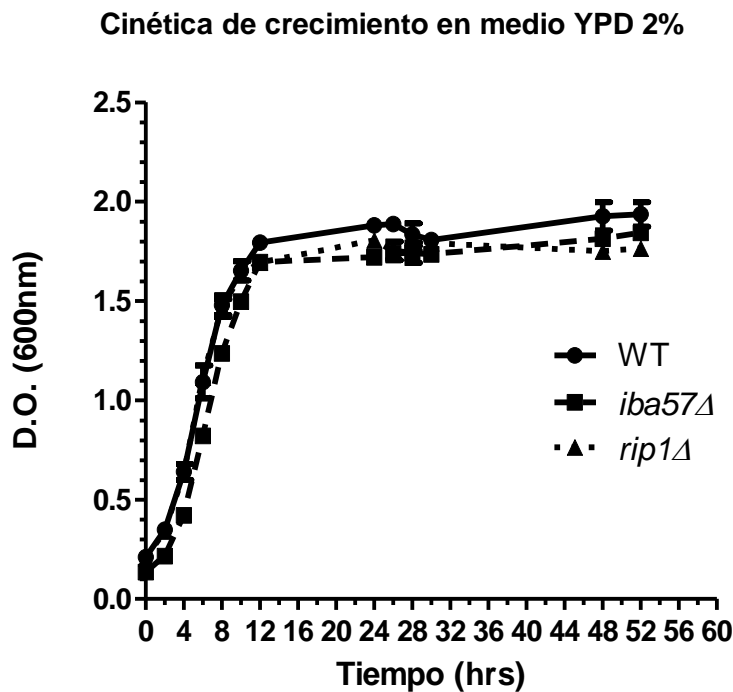


Figura 8. Las cepas mutantes de *S. cerevisiae* *iba57* Δ , *rip1* Δ y su cepa parental BY4741 fueron crecidas a 30°C en agitación constante y el crecimiento se determinó por D.O. a 600 nm. Los resultados se expresan como el promedio de $n=3 \pm$ error estándar.

8.2 Curvas dosis respuesta a agentes oxidantes y etanol

Para la caracterización fenotípica de las cepas en respuesta a estrés oxidativo y etanol, se realizaron curvas dosis respuesta en medio líquido y medio sólido usando dos distintos agentes oxidantes (peróxido de hidrógeno y menadiona) a diferentes concentraciones con la finalidad de determinar la tolerancia de las cepas mutantes al estrés generado por estos

agentes.

8.2.1 Curva de tolerancia a etanol en medio líquido.

La Figura 9 muestra la curva dosis respuesta a etanol, donde se observó que la mutante *iba57* Δ es más sensible que *rip1* Δ a partir de un 6% de etanol, mientras que a un 8%, de etanol, las cepas mutantes fueron 70% más sensibles que su cepa parental ($P>0.05$). En contraste, la sensibilidad al etanol es la misma para las mutantes y la cepa control por arriba de 10% de etanol. Lo anterior indica que la mutación en *RIP1* causa un efecto semejante al provocado por la mutación en *IBA57* a pesar de que esta última genera deficiencias en una amplia variedad de proteínas, sugiriendo que posiblemente las deficiencias en el complejo III sea el fenómeno causante de la baja tolerancia a etanol por parte de las cepas mutantes.

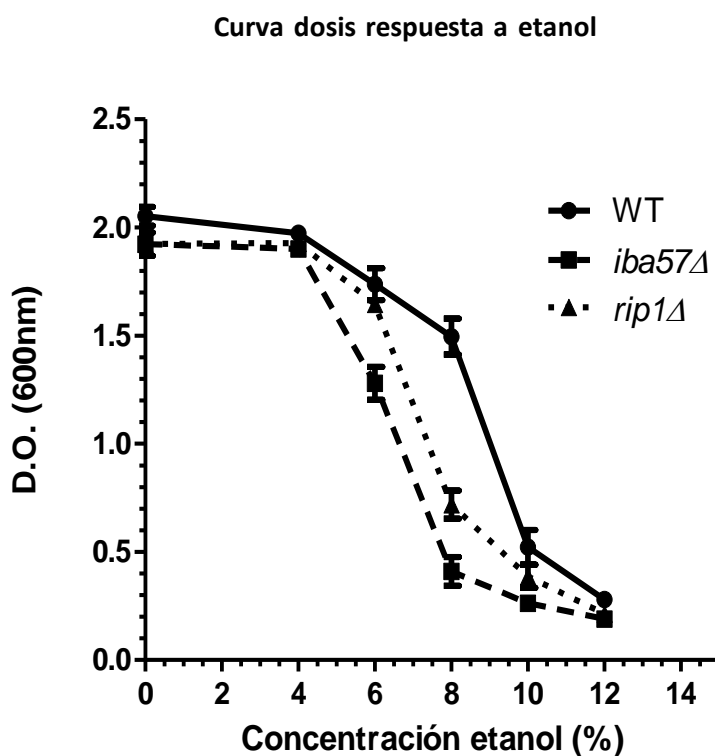


Figura 9. Las cepas mutantes de *S. cerevisiae* *iba57* Δ y *rip1* Δ así como su cepa parental BY4741 fueron crecidas en medio YPD a diferentes concentraciones de etanol (0, 4, 6, 8, 10 y 12 %) e incubadas a 30°C con agitación constante durante 18 horas, el crecimiento se determinó por D.O. a 600 nm de absorbencia. Los resultados se expresan como el promedio de $n=3 \pm$ error estándar.

8.2.2 Curva de tolerancia a etanol en medio sólido

Otra manera de evaluar el efecto de un agente tóxico sobre un microorganismo consiste en cultivarlos en medio sólido en presencia del agente a probar, en este caso se adicionó etanol a diferentes concentraciones. En la Figura 10 se observan las diluciones en caja podemos observar que a 4% de etanol las mutaciones no afectan el crecimiento de las levaduras sin embargo a concentraciones de 6% en adelante se observa que la mutación en *IBA57* afecta el desarrollo de las células, mientras que la cepa *rip1Δ* presenta mayor tolerancia al etanol pues se presenta un efecto negativo en el crecimiento hasta 8% de etanol. Estos resultados concuerdan con la gráfica de la Figura 9, reafirmando que ambas mutaciones afectan el crecimiento en presencia de etanol.

Dosis respuesta en medio sólido con etanol

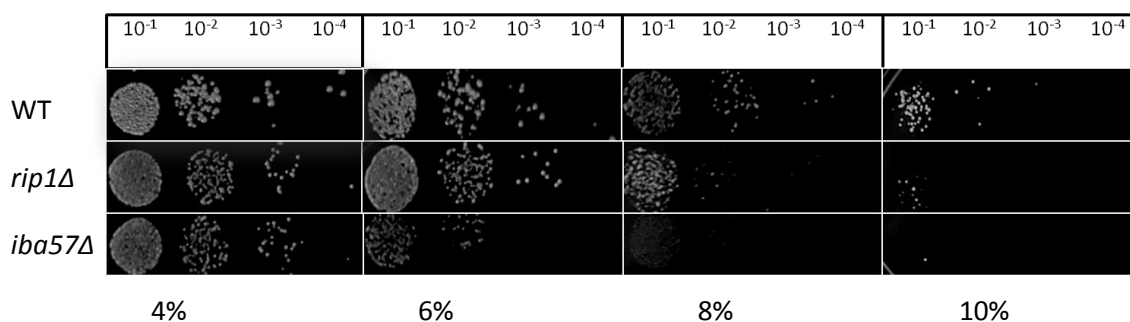


Figura 10. Las cepas mutantes de *S. cerevisiae* *iba57Δ* y *rip1Δ* así como su cepa parental se inocularon en cajas Petri con medio YPD sólido adicionado con diferentes concentraciones de etanol, se muestran diluciones de 10⁻¹ a 10⁻⁴ las placas se incubaron a 30°C durante 72 horas.

8.2.3 Curva de tolerancia a H₂O₂

La Figura 11 muestra la curva de tolerancia a H₂O₂ en concentraciones crecientes de 0 a 12 mM. Se observa que la cepa *iba57Δ* presenta un efecto negativo sobre el crecimiento disminuyendo un 15% respecto a la cepa control no siendo así para la cepa *rip1Δ* la cual crece de igual manera a dicha concentración. Un efecto mayor se observa a 3 mM donde *rip1Δ* e *iba57Δ* presenta una disminución del 65% y 80% en el crecimiento respectivamente. Concentraciones por arriba de 4mM son tóxicas para las cepas mutantes, mientras que la cepa parental resiste 4mM de H₂O₂, indicando que la

disfuncionalidad del complejo III provocada por la mutación de *RIP1* afecta de manera similar que la mutación en *IBA57* el desarrollo celular en condiciones de estrés inducido por H_2O_2 .

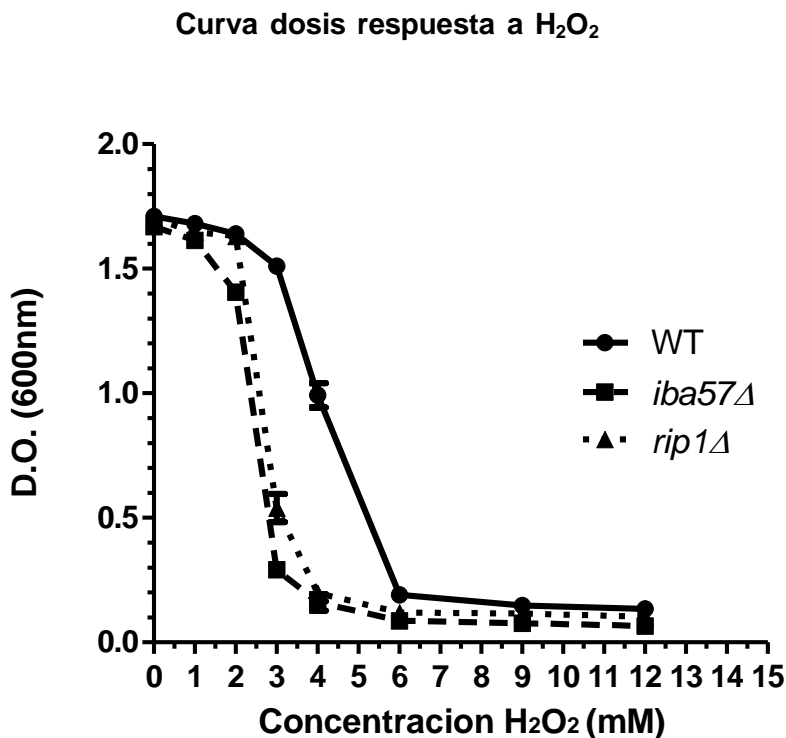


Figura 11. Las cepas mutantes de *S. cerevisiae* *iba57Δ* y *rip1Δ* junto con la cepa parental fueron crecidas en medio YPD a diferentes concentraciones de peróxido (0, 1, 2, 3, 4, 6, 9 y 12 mM) e incubadas a 30°C en agitación constante durante 18 horas, el crecimiento se determinó por D.O. a 600 nm de absorbencia. Los resultados se expresan como el promedio de $n=3 \pm$ error estándar.

8.2.4 Curva de tolerancia a H_2O_2 en medio sólido

Además como en el caso anterior de la susceptibilidad a etanol en medio sólido, se procedió a realizar un experimento similar en presencia de H_2O_2 , en la Figura 12 se muestran las fotografías representativas de las diluciones en caja con H_2O_2 . Se observa que a partir de 4 mM de H_2O_2 las cepas mutantes son incapaces de crecer, mientras que a concentraciones menores a 3 mM las cepas son capaces de sobrevivir a diferencia de la gráfica anterior (Figura 11) donde las cepas mutantes presentan una baja tasa de crecimiento, sin embargo; las

diluciones en caja se dejaron incubando durante tres días, mientras que en medio líquido solo 18 horas de incubación, estos resultados nos indican que a 3 mM de H₂O₂ las levaduras mutantes son capaces de sobrevivir disminuyendo su velocidad de crecimiento a diferencia de la concentración de 4 mM en el cual ambos experimentos muestran inhibición de las células mutantes, no siendo así para la cepa control la cual llega a crecer en medio sólido en todas las concentraciones de H₂O₂ utilizadas en este ensayo, disminuyendo su crecimiento conforme aumenta la concentración de H₂O₂.

Dosis respuesta en medio sólido

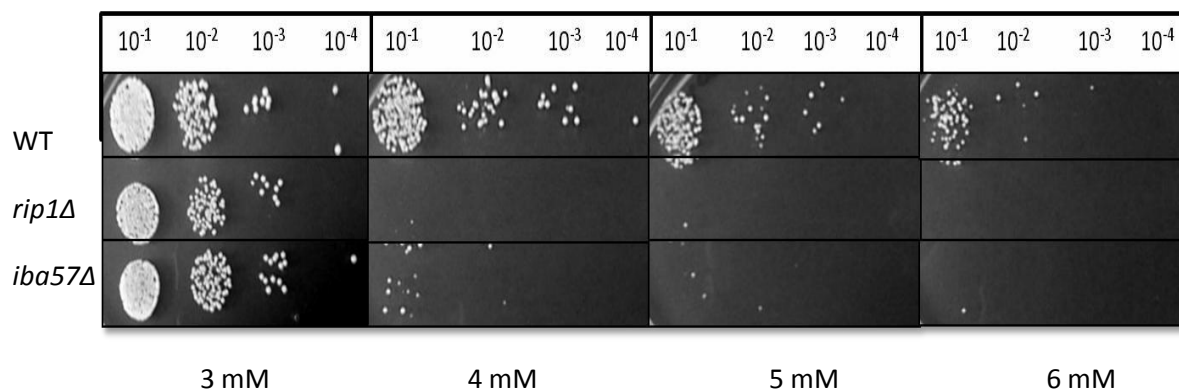


Figura 12. Las cepas mutantes de *S. cerevisiae* *iba57Δ* y *rip1Δ* junto con la cepa parental BY4741 se inocularon en cajas Petri con medio YPD sólido adicionado con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno, se muestran diluciones de 10⁻¹ a 10⁻⁴ las placas se incubaron a 30°C durante 72 horas.

8.2.5 Curva de tolerancia con menadiona

La Figura 13 muestra la curva dosis respuesta a menadiona. Observándose que la cepa mutante *rip1Δ* se comporta de manera similar a la cepa parental Wt BY4741, puesto que no presenta ninguna diferencia significativa en su crecimiento en ninguna condición respecto a la cepa Wt. En contraste, el crecimiento de la cepa *iba57Δ*, se inhibe totalmente respecto a las otras dos cepas a la concentración de 75 μM de menadiona.

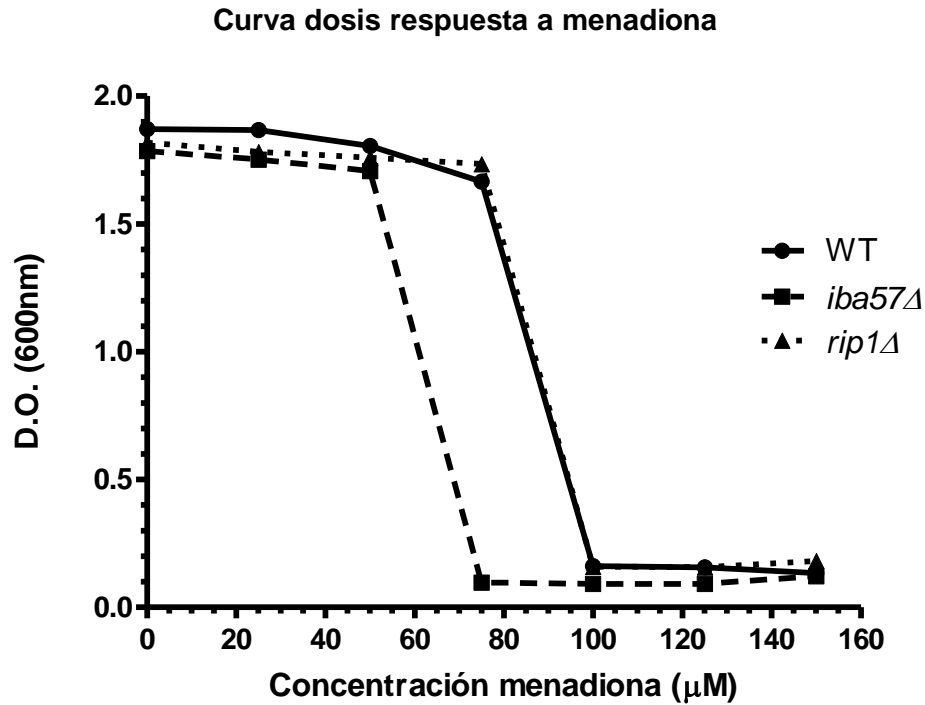


Figura 13. Las cepas mutantes de *S. cerevisiae* *iba57Δ* y *rip1Δ* así como la cepa parental BY4741 fueron crecidas en medio YPD a diferentes concentraciones de menadiona (0, 25, 50, 75, 100, 125 y 150 μM) e incubadas a 30°C en agitación constante durante 18 horas, el crecimiento se determinó por D.O. a 600 nm de absorbencia. Los resultados se expresan como el promedio de $n=3 \pm$ error estándar.

8.2.6 Curva de tolerancia a menadiona en medio sólido

En la Figura 14 se muestra el ensayo en medio sólido YPD 2% glucosa con diferentes concentraciones de menadiona. Todas las cepas fueron igual de sensibles a las concentraciones de 25 y 50 μM de menadiona, mientras que a 75 μM de menadiona; las cepas se ven más reprimidas en el crecimiento, siendo la mutante *iba57Δ* la más afectada.

Dosis respuesta en medio sólido con menadiona

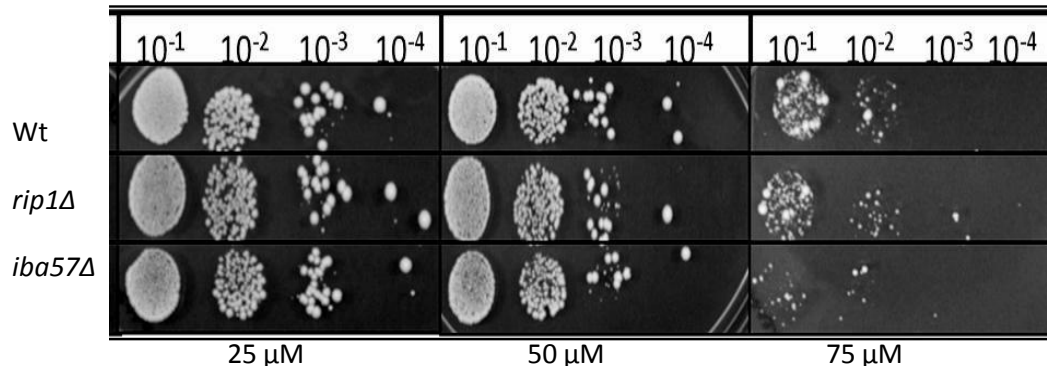


Figura 14. Las cepas mutantes de *S. cerevisiae* *iba57Δ* y *rip1Δ* así como su sepa parental se inocularon en cajas Petri con medio YPD sólido adicionado con diferentes concentraciones de menadiona, se muestran diluciones de 10^{-1} a 10^{-4} las placas se incubaron a 30°C durante 72 horas.

8.2.7 Determinación de la dosis Letal 50 a agentes oxidantes

Se calculó la dosis inhibitoria 50 (DL50) para cada una de las curvas dosis respuesta de los experimentos mostrados en las Figuras 9, 11, 13, los resultados se muestran en la Tabla 2. La cepa mutante *iba57Δ* muestra los valores de DL50 más bajos, lo que indica que es la cepa con menor tolerancia al estrés oxidativo y al etanol. De similar manera que *iba57Δ*, la cepa mutante *rip1Δ* también presenta valores bajos de DL50, Comparado con la cepa silvestre, las mutaciones analizadas en este trabajo presentan la misma tendencia de tolerancia al etanol y al peróxido de hidrógeno, mientras que en el tratamiento con menadiona solamente la cepa *iba57Δ* presento baja tolerancia en la mayoría de las concentraciones utilizadas.

Tabla 2. Dosis inhibitoria 50

	ETANOL %	H ₂ O ₂ mM	MENADIONA μM
WT	9.1±1.0	4.5±0.6	87±2.3
<i>iba57Δ</i>	6.8±0.9	2.7±0.5	64±1.3
<i>rip1Δ</i>	7.4± 1.1	3±0.8	87±2.2

8.3 Cinéticas de crecimiento

Para determinar la velocidad de crecimiento de las cepas de *S. cerevisiae* ante diferentes agentes causantes de estrés oxidativo se realizaron cinéticas de crecimiento.

8.3.1 Cinéticas de crecimiento a etanol

La Figura 15 representa las cinéticas de crecimiento con medio YPD y etanol al 8% y 10% v/v, se observa que las cepas mutantes tienen una menor velocidad de crecimiento en la concentración de 8% de etanol, mientras que en la cinética de 10% de etanol, sólo la cepa silvestre es capaz de crecer. Estos resultados fueron consistentes con los resultados obtenidos en los experimentos de dosis respuesta y se corrobora la sensibilidad de ambas cepas mutantes al etanol, dando indicio que las proteínas Iba57p y Rip1p son esenciales para la tolerancia al estrés producido por el etanol.

Cinéticas de crecimiento con etanol

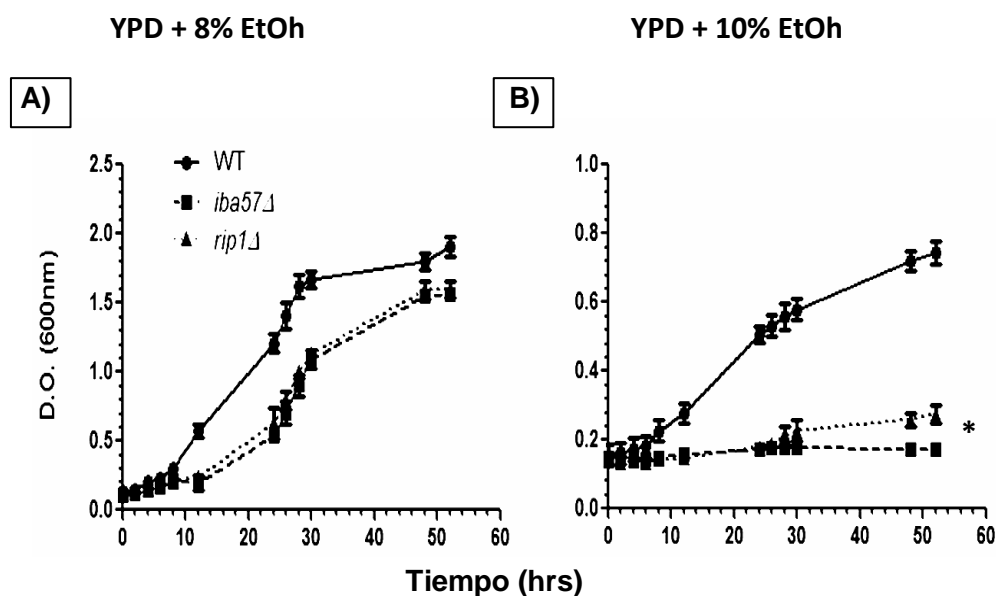


Figura 15. las cepas de *S. cerevisiae* BY4741 y las cepas mutantes *iba57*Δ y *rip1*Δ fueron crecidas en medio YPD + 8% de etanol (A), y YPD + 10% de etanol (B). Se incubaron a 30°C en agitación constante y se tomaron muestras a diferentes tiempos para medir su D.O. a 600 nm. n= 3 las barras representan el error estándar. Las diferencias significativas ($P < 0.05$) son indicadas (*).

8.3.2 Cinéticas de crecimiento con H_2O_2

En la Figura 16 se muestran las cinéticas de crecimiento en medio YPD en presencia de H_2O_2 , a concentraciones de 2, 4 y 6 mM. A la concentración de 2mM las cepas mutantes son capaces de crecer de forma similar a la cepa Wt, sin embargo se observó que las cepas mutantes presentan una menor velocidad de crecimiento, pues presentan una fase lag más prolongada que la cepa Wt a 4 mM de H_2O_2 , mientras que las cepas mutantes no crecieron a 6 mM la cepa Wt disminuyó la velocidad de crecimiento. Las cinéticas de crecimiento en presencia de H_2O_2 concuerdan con los resultados de los experimentos dosis respuesta a este mismo agente oxidante, por lo que se concluye que la mutación de las proteínas Iba57p y Rip1p incrementan la sensibilidad al peróxido de hidrógeno.

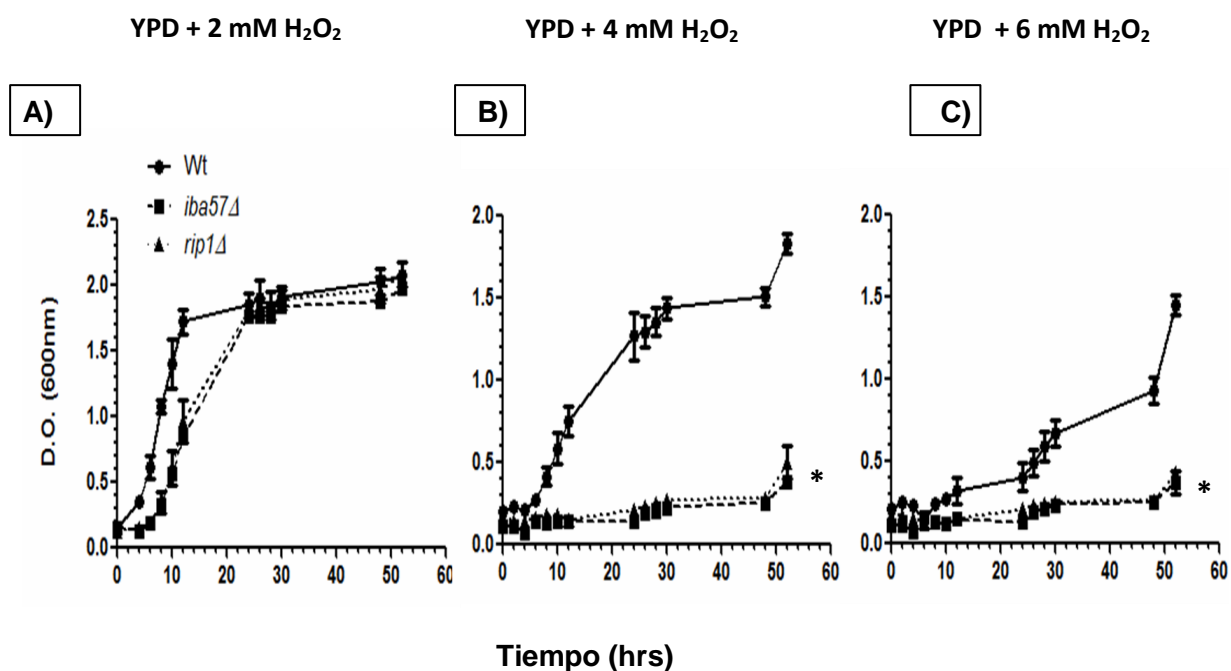
Cinéticas de crecimiento con H_2O_2 

Figura 16. Las cepas de *S. cerevisiae* BY4741 y las cepas mutantes *iba57Δ* y *rip1Δ* fueron crecidas en medio YPD + 2 mM (A), YPD + 4 mM (B) y YPD + 6 mM (C) de peróxido de hidrógeno. Se incubaron a 30°C en agitación constante y se tomaron muestras a diferentes tiempos para medir su D.O. a600 nm. n= 3 las barras representan el error estándar. Las diferencias significativas (P < 0.05) son indicadas (*).

8.3.3 Cinéticas de crecimiento en presencia de menadiona

La Figura 17 muestra las gráficas de las cinéticas de crecimiento en medio YPD más diferentes concentraciones de menadiona, una quinona que produce O_2^{\cdot} , una ERO que desencadena la formación de otras ERO. Se usaron concentraciones de 50, 100 y 150 μ M de menadiona en medio YPD para la realización de las cinéticas. En el panel A de la Figura 17 se muestra la cinética de crecimiento con 50 μ M de menadiona, donde se observa que esta concentración no afectó diferencialmente la velocidad de crecimiento de las tres cepas. En la Figura 17B se observa un comportamiento diferente al que se había observado en los experimentos con etanol y H_2O_2 por parte de la cepa mutante *rip1* Δ , ya que ésta presentó un comportamiento similar a la cepa silvestre, mientras que para la cepa mutante *iba57* Δ , la concentración de 100 μ M fue letal. En la cinética con 150 μ M de menadiona se observa que la cepa silvestre se ve afectada drásticamente en su velocidad de crecimiento pues la fase lag o de adaptación se prolonga hasta las 30 horas de incubación, siendo esta concentración tóxica para las cepas mutantes (Figura 17C).

Cinéticas de crecimiento con menadiona

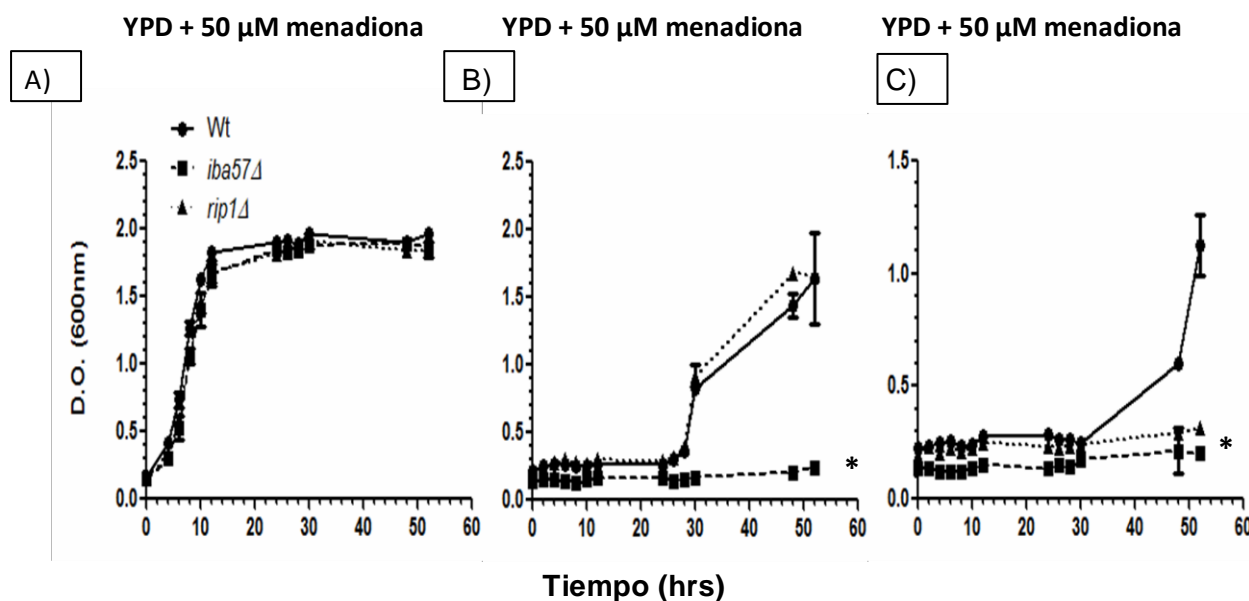


Figura 17. Las cepas de *S. cerevisiae* BY4741 y las cepas mutantes *iba57* Δ y *rip1* Δ fueron crecidas en medio YPD + 50 μ M (A), YPD + 100 μ M (B) y YPD + 150 μ M (C) de menadiona. Se incubaron a 30°C en agitación constante y se tomaron muestras a diferentes tiempos para medir su D.O. a 600 nm. n= 3 las barras representan el error estándar. Las diferencias significativas ($P < 0.05$) son indicadas (*).

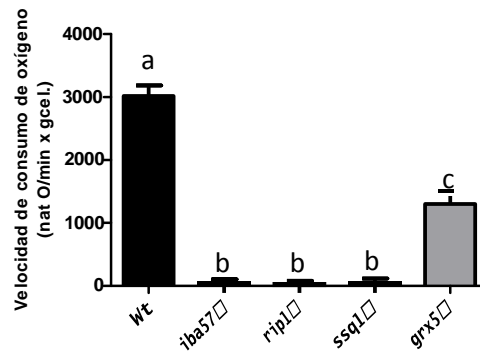
Con estos experimentos se puede afirmar que las mutaciones en *Iba57Δ* y *Rip1Δ* disminuyen la tolerancia a agentes oxidantes como lo es la menadiona, el H_2O_2 y el etanol.

8.4 Determinación del consumo de oxígeno

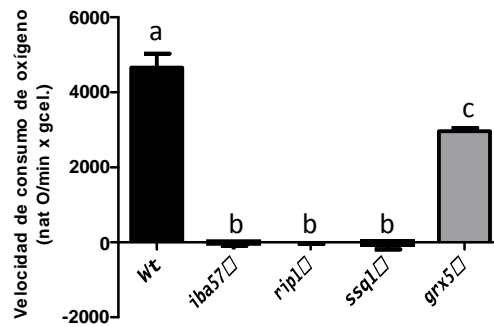
Se determinó el consumo de oxígeno en células intactas de levadura con el fin de evaluar si la CTE es funcional o no en las cepas mutantes *iba57Δ* y *rip1Δ* e investigar si la mayor sensibilidad al etanol u oxidantes está relacionada con defectos en la respiración. Además, se utilizaron dos cepas mutantes de la maquinaria ISC como controles, *ssq1Δ* y *grx5Δ*, negativo y positivo, respectivamente, esto debido a la relevancia de las proteínas Ssq1 y Grx5 en la maduración de las proteínas con centros Fe-S de la CTE. La respiración basal con glucosa como sustrato fue similar en las cepas Wt y *grx5Δ*. (Figura 18 A). Respecto al estado desacoplado (estado U), donde se estimula la máxima actividad de la CTE con el desacoplante CCCP (Figura 18 B), se observó que la respiración se incrementó en las cepas Wt y *grx5Δ* en un 50% aproximadamente, mientras que la respiración fue nula en las demás cepas mutantes. Cuando se agregó el inhibidor del complejo III antimicina A (figura 18 C), se observó disminución drástica del consumo de oxígeno en las cepas que habían presentado actividad respiratoria. Por el contrario, las mutantes que no consumían oxígeno, mostraron un fenómeno de producción de oxígeno.

Consumo de oxígeno de las diferentes cepas mutantes

A)



B)



C)

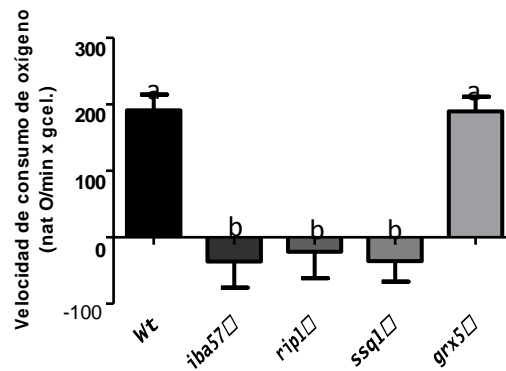


Figura 18. Evaluación del consumo de oxígeno de las cepas mutantes *iba57*Δ, *rip1*Δ, *ssq1*Δ, *grx5*Δ y la cepa silvestre BY4741. Cultivos de células crecidas en medio YPD 2%, fueron cosechadas en fase exponencial tardía y se resuspendieron en buffer para medir consumo de oxígeno, se colocaron en una cámara de vidrio sellada y la velocidad de consumo de oxígeno fue determinada usando un electrodo tipo Clark acoplado a un monitor de oxígeno YSI 5300. Se graficaron los datos en estado basal A), desacoplado B) y en presencia de antimicina A C). n=3. Las barras indican el error estándar, se usó análisis de varianza de una vía con la prueba Bonferroni.

8.5 Actividad del complejo III

Se determinó la actividad del complejo III usando mitocondrias aisladas de cultivos de levadura crecidas en medio YPD hasta la fase exponencial tardía. Este experimento se realizó para comprobar si el complejo III se ve afectado con la mutación en *IBA57* y descartar que los ensayos donde se utilizó el succinato como sustrato fueran un efecto de la disfuncionalidad del complejo II. En la figura 19 observamos que las cepas *ssq1Δ* e *iba57Δ* presentan nula actividad del complejo al igual que la cepa control *rip1Δ*, mientras que la cepa *grx5Δ* disminuye un 90% la actividad del complejo comparándose con la cepa parental, estos resultados indican que *Iba57p* al igual que *Ssq1p* son esenciales para que el complejo III sea funcional.

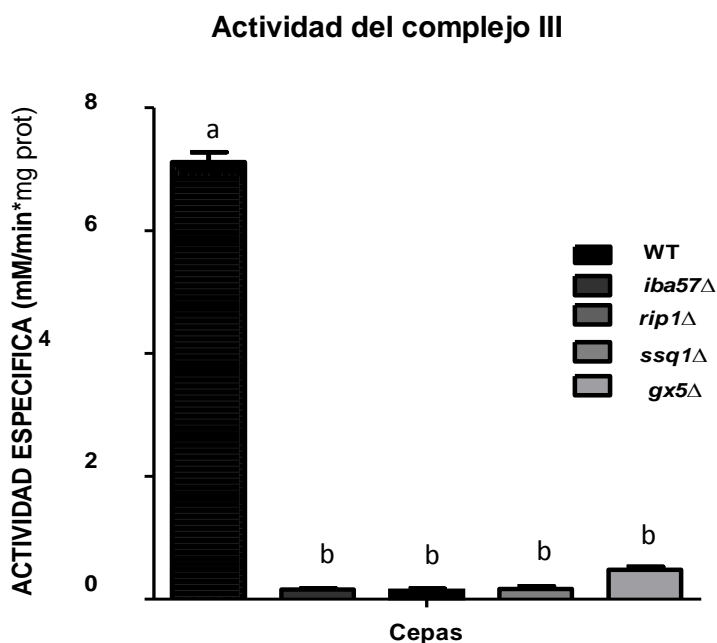


Figura 19. Análisis de la funcionalidad del complejo III de la cadena de transporte de electrones en las cepas de *S. cerevisiae*. Mitocondrias aisladas de cultivos crecidos hasta la fase exponencial tardía en medio YPD 2%, las mitocondrias fueron aisladas como se indica en la sección de métodos. n=3. Las barras indican el error estándar, se usó análisis de varianza de una vía con la prueba Bonferroni.

8.6 Actividad de la enzima Lactato-citocromo-c-oxidoreductasa

La enzima Lactato-citocromo-c-oxidoreductasa o citocromo *b2* es una proteína soluble del espacio intermembranal de la mitocondria, esta enzima respiratoria puede utilizar el citocromo *c* como aceptor de electrones usando como sustrato el L (+)-lactato. Se observa que las cepas mutantes mostraron una baja actividad enzimática disminuida comparadas con la cepa control (Figura 20). Con este experimento no se puede relacionar directamente si *Iba57p* está implicada en la maduración de la subunidad *Rip1p*. La mutación en *GRX5* no presentó una producción excesiva de ERO, sin embargo también se disminuyó la actividad del citocromo *b2*.

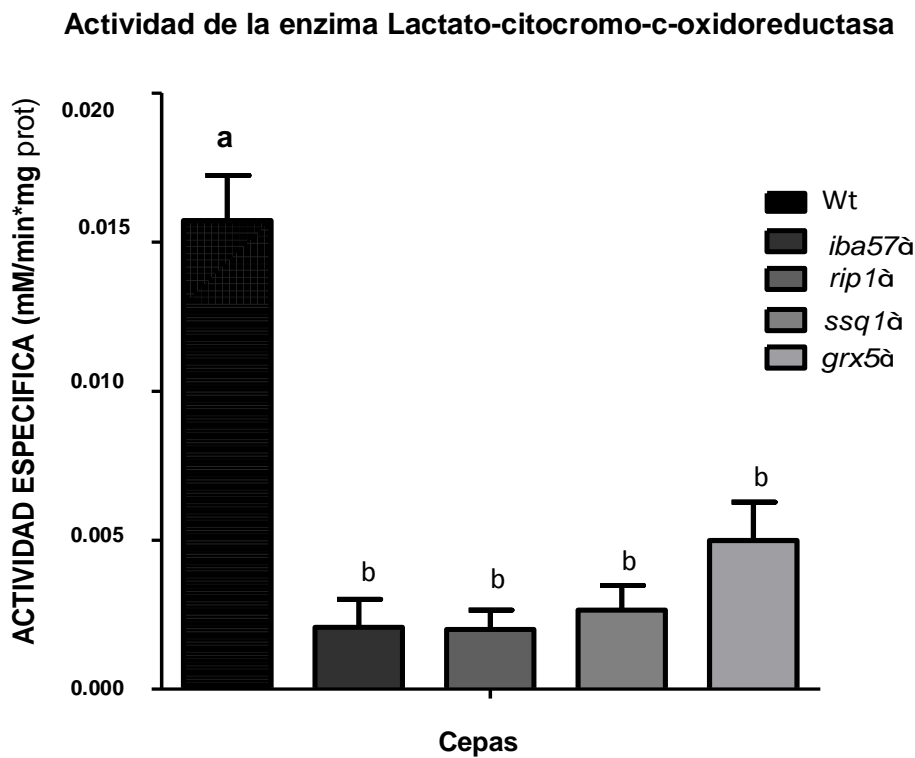


Figura 20. Análisis de la actividad de la enzima lactato-citocromo-c-oxidoreductasa en las cepas de *S. cerevisiae*. Mitocondrias aisladas de cultivos crecidos hasta la fase exponencial tardía en medio YPD2%, las mitocondrias fueron aisladas como se indica en la sección de métodos. $n=3$. Las barras indican el error estándar, se usó análisis de varianza de una vía con la prueba Bonferroni.

8.7 Análisis de los supercomplejos de la CTE

Las proteínas solubilizadas de mitocondrias de las cepas mutantes *iba57* Δ , *rip1* Δ , *ssq1* Δ , *grx5 iba57* Δ y la cepa control Wt BY4741 fueron sometidas a electroforesis en un gel BN-PAGE (Figura 21A). El perfil de proteínas la cepa Wt muestra las bandas correspondientes a los diferentes supercomplejos (carril 1); el perfil de la cepa mutante *iba57* Δ muestra que dos bandas desaparecen de manera evidente (carril 2) correspondientes a los supercomplejos formados por los complejos III y IV. En el carril 3 correspondiente a la mutante *rip1* Δ el perfil es similar al carril de la cepa silvestre, mientras en el carril 4 correspondiente a la cepa *ssq1* Δ se observa un perfil similar al de la cepa *iba57* Δ . Por último se muestra el perfil de la cepa *grx5* Δ y se observa que tiene un perfil similar que la cepa silvestre y *rip1* Δ . Comparando los geles nativos con los ya reportados por Schagger *et al*, 2000, Zara *et al*, 2007. Arnol *et al*, 1998 y Stames *et al*, 2013, se asignaron las identidades de los supercomplejos a las diferentes bandas del gel nativo: B1, correspondiente al dímero del complejo V, B2 al supercomplejo formado por un dímero del complejo III y un dímero del complejo IV, B3 al supercomplejo integrado por un dímero del complejo III y un monómero del complejo IV, B4 corresponde al monómero del complejo V, B5 corresponde al dímero del complejo III y por último la banda B6 corresponde al monómero del complejo II.

Para discernir si los perfiles de la cepa *rip1* Δ , *grx5* Δ y la cepa control son cuantitativamente iguales, se cuantificó la intensidad de las bandas utilizando el software ImageJ. En la figura 21 B se observa que existen diferencias de intensidad, ya que en las bandas B1, B2, B3 y B5 la cepa silvestre presentó mayor intensidad, de aproximadamente el 50% comparando con la cepa *rip1* Δ . Se ha reportado que el complejo III puede llegar a conformarse en ausencia de la subunidad Rip1p. Sin embargo este complejo es disfuncional y las interacciones con otros complejos son débiles, es por esto que se observa baja intensidad de las bandas de los complejos donde participa el complejo III y siendo similares en intensidad para otras bandas protéicas, p.ej. las bandas B4 y B6. La cepa *grx5* Δ , por el contrario, mostró un perfil similar a la cepa Wt, sin embargo, también presentó diferencias en cuanto a las intensidades de las bandas.

Análisis de la formación de supercomplejos de la CTE de *S. cerevisiae*

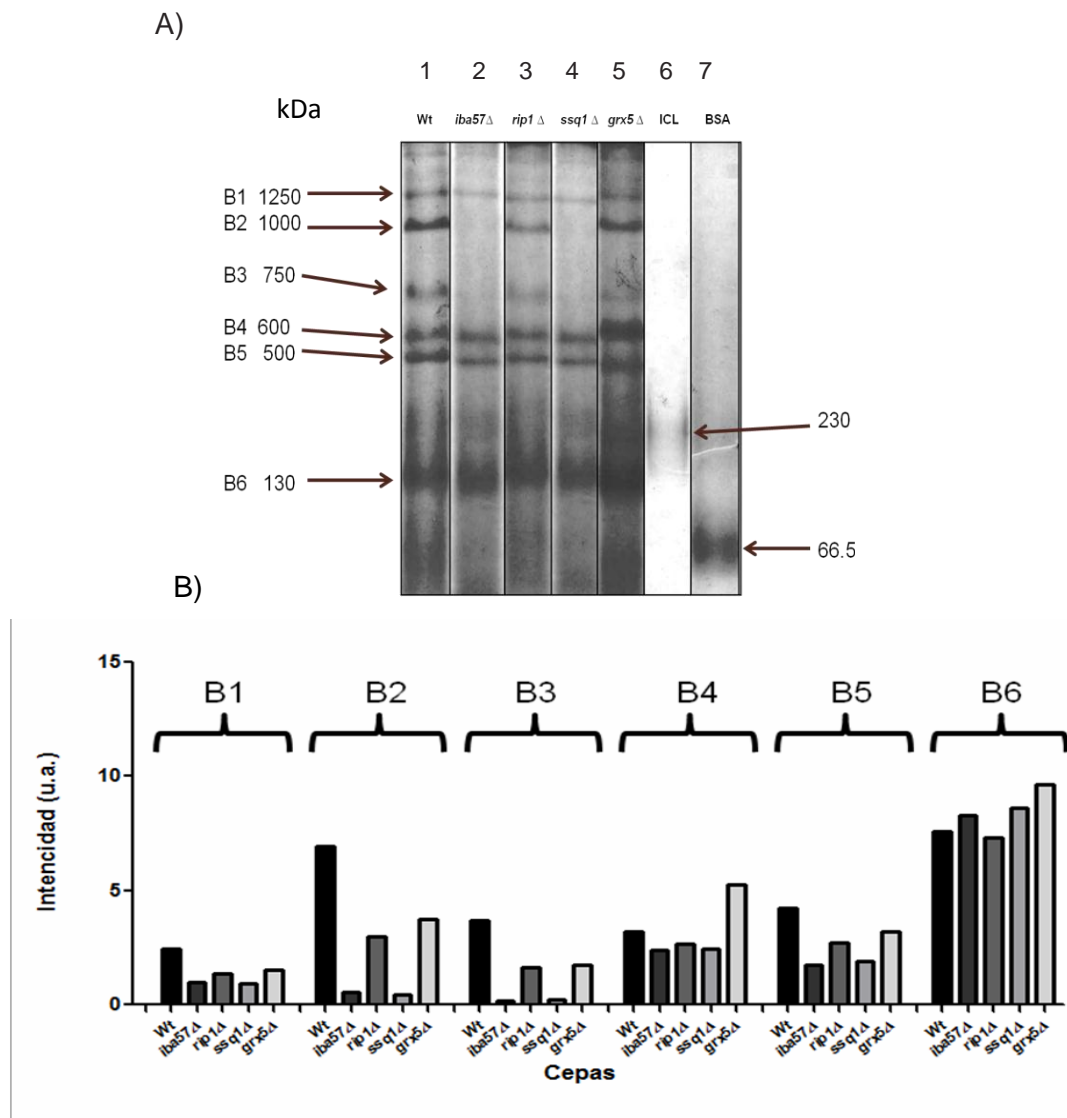


Figura 21. Análisis de la formación de supercomplejos mitocondriales de las cepas de *S. cerevisiae* *iba57*Δ *rip1*Δ, *ssq1*Δ, *grx5*Δ . Mitocondrias fueron aisladas y solubilizadas de cultivos crecidos hasta la fase exponencial tardía como se describe en la sección de métodos. A) Muestra un gel nativo de acrilamida (BN-PAGE) carril 1, Wt; carril 2, *iba57*Δ; carril 3, *rip1*Δ; carril 4, *ssq1*Δ; carril 5, *grx5*Δ; carril 6, proteína isocitrato liasa de *Pseudomonas auriginosa* (ICL); carril 7, albumina de suero bovino (BSA). A la derecha de los carriles se muestra el peso molecular de los suercomplejos: B1, complejo V₂; B2, complejo III₂ IV₂; B3, complejo III₂IV₁; B4 complejo V₁; B5, complejo III₂; B6, complejo II₁. B) Análisis densitométrico de cada banda del gel nativo, se usó el programa ImageJ para el análisis

8.8 Inmuno-detección de la proteína Rip1p

Las proteínas mitocondriales fueron corridas en un gel de acrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), para posteriormente transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa y detectar la presencia de la proteína Rip1p.

La figura 22 muestra la identificación de la proteína Rip1p. En el panel de la derecha se observa la membrana de nitrocelulosa con las proteínas transferidas de un gel de acrilamida. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular, en el segundo la muestra correspondiente a la cepa silvestre, en el tercer carril se muestra la cepa *iba57Δ* en el cuarto carril la cepa *rip1Δ*, y en el quinto y sexto carril las cepas *ssq1Δ* y *grx5Δ* respectivamente. En el segundo panel se observa la inmunodetección de la proteína Rip1p con el anticuerpo monoclonal anti-Rip1 de *S. cerevisiae*. Se observa que solo el carril de la cepa silvestre y la cepa *grx5Δ* fueron donde se detectó una señal. Acorde a lo que se esperaba, en la cepa *rip1Δ* no se detectó señal en el peso correspondiente a la proteína. Las cepas *ssq1Δ* e *iba57Δ* tampoco presentaron señal, indicando que carecen de la proteína Rip1p.

Inmuno detección de la proteína Rip1p en las cepas de *S. cerevisiae*

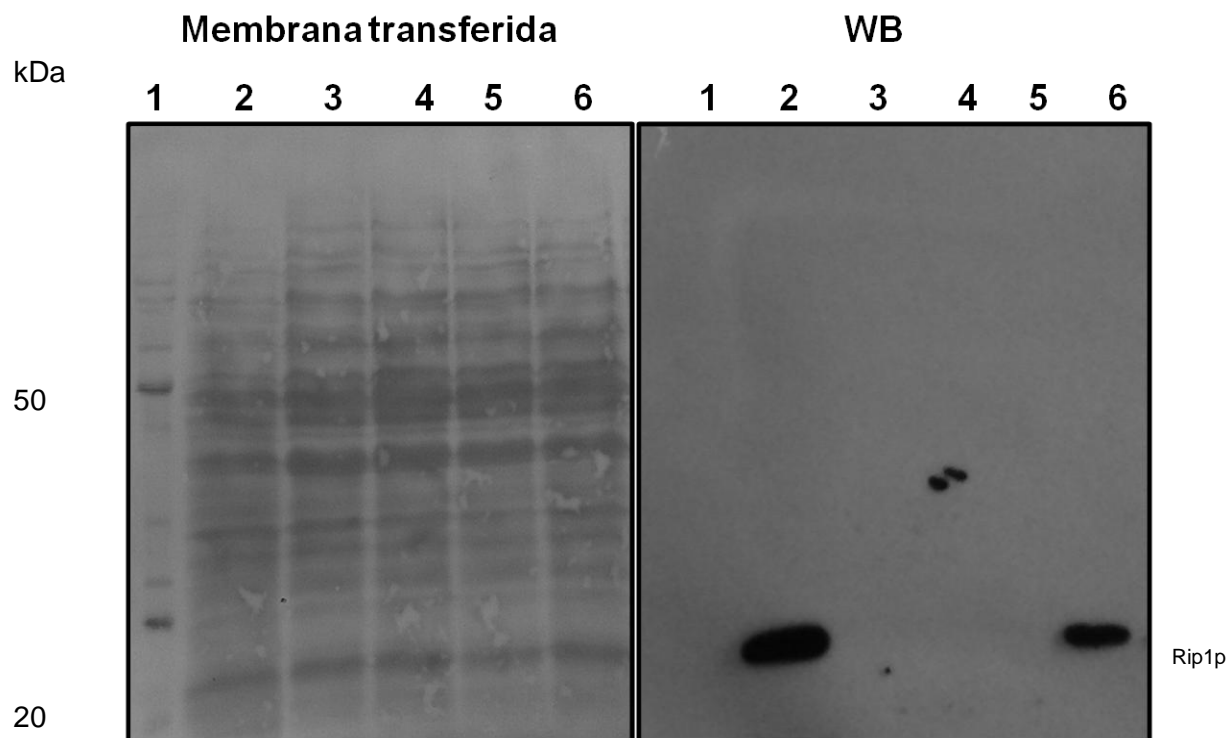


Figura 22. Extractos totales de mitocondrias fueron obtenidos de cultivos crecidos en medio YPD, las muestras se cargaron en un gel de acrilamida 17% y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para la identificación de la proteína Rip1p. Se uso el anticuerpo monoclonal anti-Rip1 como anticuerpo primario y como anticuerpo secundario el anticuerpo anti-mouse IgG HRP. El orden de los carriles es el siguiente: carril 1 marcador de peso molecular; carril 2 Wt; carril 3 *iba57Δ*; carril 4 *rip1Δ*, carril 5 *ssq1Δ*; carril 6 *grx5Δ*.

9. DISCUSIÓN

Las mitocondrias son orgánulos muy versátiles involucrados en procesos celulares esenciales como la apoptosis, la regulación del ciclo celular, la regulación retrógrada de genes, la eliminación del N tóxico a través del ciclo de la urea, la biosíntesis de grupos hemo, la β -oxidación de los ácidos grasos, el ciclo del ácido cítrico, la generación de ATP por medio de la fosforilación oxidativa y la formación de centros Fe-S (Muller *et al*, 2014). Este último es un proceso parcialmente descrito. Por lo cual es de gran relevancia su completa dilucidación (Lill, 2009). El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la mutación de *IBA57* sobre la maduración y funcionalidad de la subunidad Rip1p del complejo III de la cadena de transporte de electrones de *S. cerevisiae*. Iba57p forma parte de un subgrupo de la maquinaria de la biogénesis de centros Fe-S pues se ha reportado que interacciona con las proteínas Isa1p e Isa2p para la inserción de los centros [4Fe-4S] en *S. cerevisiae* (Gelling *et al*, 2008). Este subgrupo de proteínas no se ha relacionado con el ensamble centros [2Fe-2S], como del que depende la subunidad Rip1p para su función. En un estudio previo de nuestro grupo de trabajo, se observó que, la mutación de *RIP1* en *S. cerevisiae* incrementa la producción de ERO, comportamiento similar al reportado para la mutación en *IBA57* (Perez-Gallardo *et al*, 2013), lo que sugiere que Iba57p podría estar involucrada en la inserción del centro [2Fe-2S] de Rip1p.

Se realizó una curva de crecimiento en medio YPD (2%) con el fin de observar si las mutaciones en *IBA57* y *RIP1* afectaban el crecimiento de las levaduras. Se observó que las mutantes crecen de manera similar sin presentar diferencias estadísticas significativas en dicho medio. *S. cerevisiae* es un organismo muy versátil en cuanto a su metabolismo, aun con defectos en el metabolismo respiratorio es capaz de crecer utilizando la vía fermentativa, a pesar de esto *S. cerevisiae*, también posee genes esenciales para su supervivencia un claro ejemplo es *JAC1* el cual codifica para una co-chaperona que interacciona con Ssq1p para la transferencia de centros Fe-S (Voisine *et al*, 2001). Por este motivo, se decidió realizar la curva de crecimiento en YPD (2%) y descartar que las mutaciones *per se* pudieran afectar el desarrollo de las levaduras. Sin embargo, los genes mutados de las cepas que se usaron en este trabajo no son esenciales en las condiciones ensayadas y pueden ser caracterizadas fenotípicamente en diferentes condiciones.

Las cepas *iba57Δ* y *rip1Δ* tienen como característica en común una sobre-producción de ERO (Gomez-Gallardo, 2012). Se ha documentado que la mayor producción de ERO son producidas durante la reducción parcial de la ubiquinona por el complejo III en el proceso de la respiración (Trumpower, 2002). También se conoce que levaduras deficientes del complejo III son mayormente sensibles a estrés oxidativo. La importancia de las funciones mitocondriales durante el estrés oxidativo se ha demostrado en una gran variedad de estudios donde células de levadura petite (células que no tienen mitocondrias funcionales) son sensibles al estrés causado por el H_2O_2 y el radical O_2^{\cdot} , además células de levadura mutantes en genes nucleares que codifican componentes de la cadena de transporte de electrones y cepas silvestres tratadas con inhibidores de la vía respiratoria también son sensibles a los radicales libres (Collinson y Dawes, 1992; Grant *et al*, 1997; Jamieson, 1992; Flattery-O'Brien *et al*, 1993 ; Lee *et al*, 2001). Por lo que se decidió caracterizar las cepas de interés con diferentes agentes oxidantes, H_2O_2 , menadiona y etanol. Los resultados presentados en los experimentos de dosis respuesta y cinéticas de crecimiento con estos agentes oxidantes indican que ambas cepas muestran una mayor sensibilidad al estrés oxidativo en comparación con la cepa parental, *rip1Δ* como control negativo confirma los antecedentes de las cepas sensibles al estrés oxidativo debido a la deficiencia del complejo III mientras que *iba57Δ* posiblemente muestre sensibilidad debido a una disfuncionalidad de las proteínas dependientes de los centros [4Fe-4S].

Debido a la sensibilidad mostrada de las cepas a agentes oxidantes se analizó la funcionalidad de la CTE mediante la medición del consumo de oxígeno de la cepa parental BY4741 y de las cepas mutantes *iba57Δ* y *rip1Δ*, además de las cepas *ssq1Δ* y *grx5Δ* las cuales se usaron como controles negativo y positivo, respectivamente.

Se ha establecido que la mutante *ssq1Δ* muestra sensibilidad a agentes oxidantes y no presentó actividad de la CTE, mientras que la cepa *grx5Δ* si presenta actividad de la misma comparándose con la cepa Wt BY4741 (Gómez *et al*, 2014). Se muestra que la cepa *rip1Δ* no consume oxígeno debido a la disfuncionalidad del complejo III, las cepas *iba57Δ* y *ssq1Δ* tampoco mostraron consumo de oxígeno, indicando que la CTE en estas cepas se encuentra dañada, debido a la dependencia de los centros Fe-S presentes en los complejos respiratorios II y III. Las tres cepas que no presentaron consumo de oxígeno, muestran

producción de este, comportamiento atribuido a la acción de las peroxidases y catalasas usadas por la célula para la desintoxicación por los radicales libres producidos por las mutaciones mencionadas. En un estudio previo (Gómez-Gallardo, Tesis de Maestría, 2012), observó que la cepa *iba57Δ* no presenta actividad de succinato deshidrogenasa ni de succinato:citocromo oxidoreductasa usando succinato como sustrato. En el presente trabajo se utilizó decilubiquinol como sustrato del complejo III para descartar que la nula actividad del complejo III fuera un efecto de la disfuncionalidad del complejo II. En el ensayo se observa que el complejo III es disfuncional en las cepas *ssq1Δ* e *iba57Δ*, así como en el control negativo *rip1Δ*. Se esperaba que los controles negativos *rip1Δ* y *ssq1Δ* no presentaran actividad, sin embargo también se observa que la mutación en *IBA57* afecta la actividad de dicho complejo. La mutante *grx5Δ* muestra una actividad reducida del complejo debido a que esta glutaredoxina ayuda a la transferencia de los centros Fe-S (Lill *et al*, 2009) indicando que en la ausencia de esta proteína, el complejo III puede ser parcialmente funcional. Con estos resultados se demuestra que en la ausencia de *Iba57p* y *Ssq1p* se daña la función del complejo III de la CTE y que *Iba57p* podría estar implicada en la transferencia del único centro Fe-S presente en este complejo. Además, también se analizó la actividad del complejo *b₂*, una proteína soluble que se encuentra en el espacio intermembranal de la mitocondria (Guiard, 1985) capaz de transferir electrones al oxígeno vía la citocromo *c* oxidasa usando como sustrato L-lactato. Esta enzima tiene en sus amino terminal un dominio de unión a un grupo hemo y en su carboxilo terminal un dominio flavodeshidrogenasa (FDH) el cual une un flavín mononucleotido (FMN). En cada ciclo catalítico de esta enzima el L-lactato dona dos electrones al FMN, el cual transfiere los electrones univalentemente al grupo hemo de la enzima, el cual a su vez se oxida por el citocromo *c* (Lederer, 1991). En la Figura 20 se observa como disminuye la actividad de esta enzima en las cepas mutantes comparadas con la robusta actividad que presentó la cepa BY4741, estos resultados concuerdan con los resultados anteriores y el daño a esta enzima se atribuye a la producción de ERO por la disfuncionalidad de la CTE de cada una de las mutantes siendo nuevamente *rip1Δ*, *iba57Δ*, y *ssq1Δ* las que presentaron menor actividad.

Se analizó la formación de supercomplejos de la cadena de transporte de electrones de las diferentes cepas mediante electroforesis en BN-PAGE, se aislaron y se solubilizaron mitocondrias las cepas *rip1Δ*, *iba57Δ*, *ssq1Δ* y *grx5Δ* así como de la cepa Wt BY4741, las

proteínas solubilizadas se sometieron a electroforesis y se asignaron los pesos moleculares a las diferentes bandas de proteínas. según Shagger y Pfeiffer, 2000 y Stames y O'Toole, 2013. Se puede observar que las bandas de los supercomplejos formados por el complejo III y complejo IV están ausentes en los perfiles de las cepas *iba57Δ* y *ssq1Δ* asimismo se aprecia una reducción de la intensidad de las mismas bandas en el perfil de la cepa mutante en *RIP1*. Estos resultados concuerdan con el análisis bioquímico de consumo de oxígeno y actividad del complejo III donde estas tres cepas resultaron con nula actividad. Trouillard *et al*, 2011 cuestionó el rol funcional de los supercomplejos mitocondriales usando una levadura deficiente en la síntesis de cardiolipina un fosfolípido esencial para la formación de supercomplejos (Zhang *et al*, 2002 y 2005); ellos observaron cinéticas similares de oxidación del citocromo *c* poniendo en duda la funcionalidad de los supercomplejos, sin embargo, ellos no presentan un análisis del estatus real del estado de los supercomplejos bajo las condiciones que utilizaron a diferencia del análisis presentado. En este trabajo donde se expone que la ausencia de los supercomplejos daña la respiración mitocondrial concordando con la teoría de que la CTE de levaduras se comporta como una unidad funcional (Boumans *et al*, 1998).

La funcionalidad del complejo III depende principalmente de sus subunidades catalíticas citocromo *c* y *b* y la subunidad Rip1p, en el proceso de maduración de dicho complejo los citocromos son ensamblados en los primeros pasos con las diferentes subunidades mientras que Rip1p y Qcr10p completan la maduración del complejo. Si Rip1p no presenta su centro Fe-S esta proteína es propensa a degradación por proteasas (Conte y Zara, 2011; Conte *et al*, 2015), debido a esta información se analizó la presencia de Rip1 mediante inmunodetección, se observa en el Western Blot donde se detecta la presencia de la proteína Rip1p en las muestras de la cepa BY4741 y la cepa mutante *grx5Δ* esta última en menor proporción. También observamos que al igual que en la cepa control *rip1Δ*, en las cepas *iba57Δ* y *ssq1Δ* no se detectó señal indicando que el proceso de maduración no se completó lo que da lugar a un complejo III no funcional por lo tanto se explica la sensibilidad a la ERO que presentan las mutantes en las cinéticas de crecimiento y las curvas dosis respuesta a agentes oxidantes, así también como la disfuncionalidad de la cadena de transporte de electrones. Estas pruebas junto con los bajos niveles de proteína mediante inmunodetección de Rip1p en la mutante *ISA1* (Gomez *et al*, 2014) apuntan a que el subgrupo de la biogénesis de proteínas con centros Fe-S conformado por las proteínas Isa1, Isa2 e Iba57p están involucradas en la inserción del centro

Fe-S de la subunidad Rip1.

10. CONCLUSIÓN

La proteína Iba57p está involucrada en el ensamble del centro Fe-S de la proteína Rieske y en la formación de supercomplejos respiratorios.

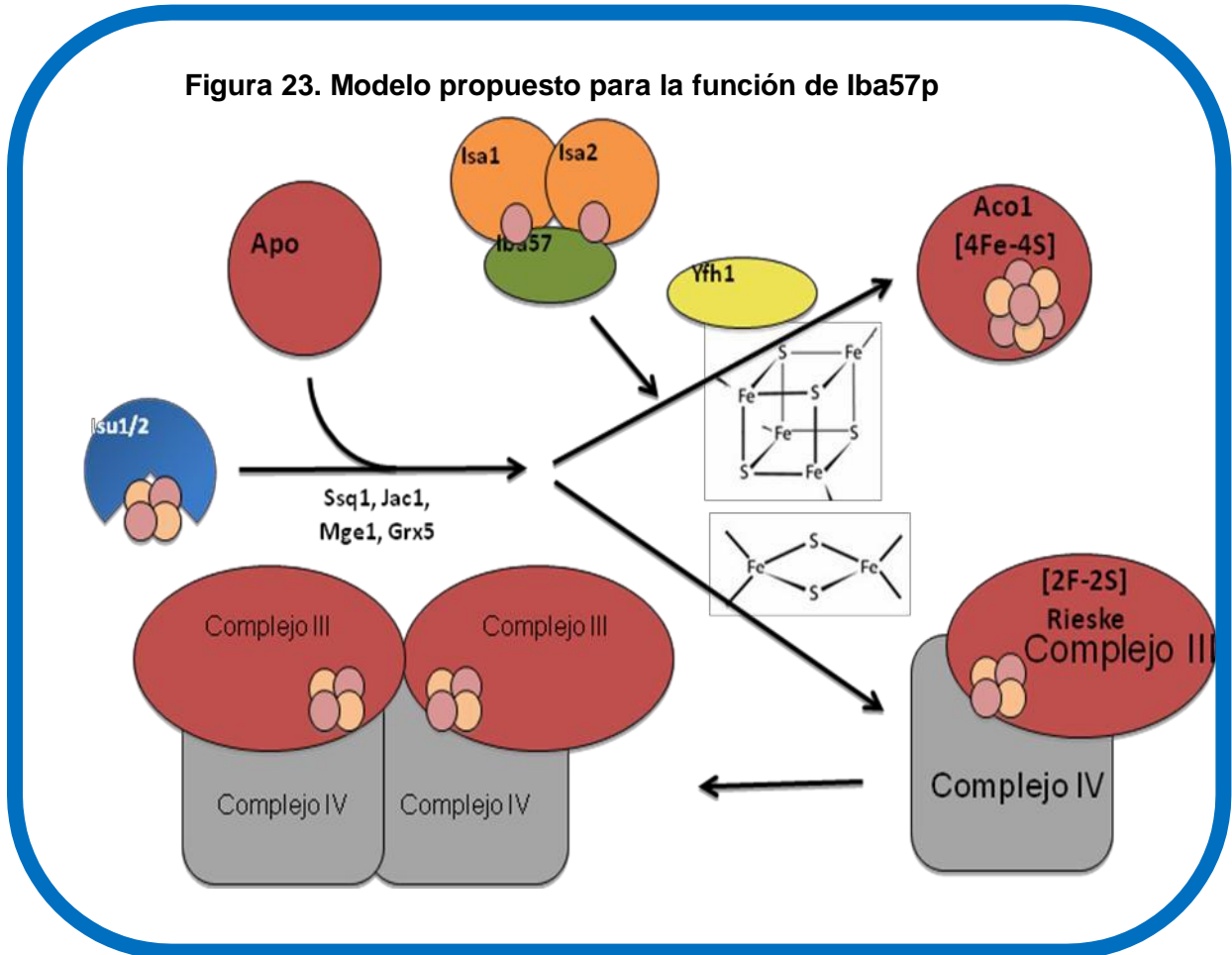


Figura 23. Modelo propuesto donde Iba57p en conjunto con Isa1p e Isa2p participan en la maduración de Rip1p integrando un centro Fe-S tipo rómbico a dicha proteína, lo que conlleva a la completa maduración del complejo III y su posterior fusión con el complejo IV para la formación de supercomplejos.

11. PERSPECTIVAS

Análisis de la formación de supercomplejos respiratorios mediante ensayos de actividad en gel, así como Análisis de la integridad del ADN mitocondrial.

Dilucidar como Iba57p transfiere el centro Fe-S mediante un análisis *in vitro*.

Análisis de los citocromos implicados en el proceso de la respiración de las mutantes en la maquinaria ISC para determinar una posible dependencia de Iba57p o de cualquier otra proteína de la maquinaria ISC para la integración de citocromos en las proteínas que dependen de estos funcionalmente.

Análisis de los fosfolípidos que ayudan a la estabilización de los supercomplejos respiratorios por ejemplo la cardiolipina, utilizando membranas aisladas de las diferentes mutantes.

12. LITERATURA CITADA

- Andreyev A.Y., Kushnareva Y.E., Starkov A.A. (2005). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)*, 70, 200–214.
- Aung-Htut M.T., Ayer A., Breitenbach M., Dawes I.W. (2012). Oxidative stresses and ageing In: *Aging Research in Yeast*, ed. M Breitenbach, SM Jazwinski, and P Laun, Dordrecht, Netherlands: Springer, 13–54.
- Bermingham-McDonogh O., Gralla E.B., Valentine J.S. (1988). The copper, zinc- superoxide dismutase gene of *Saccharomyces cerevisiae*: cloning, sequencing, and biological activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85, 4789–4793.
- Boveris A., Cadenas E., Stoppani A.O. (1976). Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem J.*, 156, 435–444.
- Boumans H.‡, Grivell L. A., and Berden J. A. (1998). The Respiratory Chain in Yeast Behaves as a Single Functional Unit. *J. Biol. Chem.*, Vol. 273, No. 9, 4872–4877
- Brown L. A., and Baker A. (2003). Peroxisome biogenesis and the role of protein import. *J Cell Mol Med.*, 7, 388-400.
- Buettner G.R. (1993). The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys*, 300, 535–543.
- Cadenas E., Boveris A., Ragan C.I., Stoppani A.O. (1977). Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol- cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys.*, 180, 248–257.
- Conte □. and Zara V. (2011). The Rieske Iron-Sulfur Protein: Import and Assembly into the Cytochrome bc1 Complex of Yeast Mitochondria. *Bioinorg Chem Appl.*, ID 363941.

- Conte A., Papa B., Ferramosca A., Zara V. (2015). The dimerization of the yeast cytochrome bc₁ complex is an early event and is independent of Rip1. *Biochim Biophys Acta*.1853:987-995.
- Cruciat C.M., Hell K., Folsch H., Neupert W., Stuart R.A. 1999. Bcs1, an AAA-family member, is a chaperone for the assembly of the cytochrome bc₁ complex, *EMBO J.*, 18 5226–5233.
- Collinson L.P., Dawes I.W. (1992). Inducibility of the response of yeast cells to peroxide stress. *J Gen Microbiol.*, 138, 329–335.
- Diêp Lê K. H., Lederer F. and Golinelli-Pimpaneau B. (2010). Structural Evidence for the Functional Importance of the Heme Domain Mobility in Flavocytochrome b₂. *J Mol Biol.*, 400:518-30.
- Dietrich F. S., Voegeli S., Brachat S., Lerch A., Gates K., Steiner S., Mohr C., Pohlmann R., Luedi P., Choi S.(2004). The *Ashbya gossypii* genome as a tool for mapping the ancient *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Science*, 304, 304-307.
- Berry E.A., Guergova-Kuras M., Huang L.S., Crofts A.R. (2000). Structure and function of cytochrome bc complexes. *Annu. Rev. Biochem.*, 69 1005–1075.
- Gutierrez-Cirlos E.B., Merbitz-Zahradnik T., Trumpower B.L.(2002). Failure to insert the iron–sulfur cluster into the Rieske iron–sulfur protein impairs both center N and center P of the cytochrome bc₁ complex. *J. Biol. Chem.*, 277 50703–50709.
- Flattery-O'Brien J., Collinson L.P., Dawes I.W. (1993). *Saccharomyces cerevisiae* has an inducible response to menadione which differs from that to hydrogen peroxide. *J Gen Microbiol.*, 139, 501–507.
- Díaz F., Garcia S., Padgett K. R. y Moraes C.T. (2012). A defect in the mitochondrial complex III, but not complex IV, triggers early ROS-dependent damage in defined brain regions. *Human Molecular Genetics*, 23 5066–5077.
- Forsburg S. L., and Nurse P. (1991). Cell cycle regulation in the yeasts

Saccharomyces cerevisiae and *Schizosaccharomyces pombe*. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 7, 227-256.

- Forsburg S. L. (2005). The yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*: models for cell biology research. *Gravit Space Biol Bull.*18:3-10.
- Gelling C., Dawes I.W., Richhardt N., Lill R., Mühlenhoff U. (2008). Mitochondrial Iba57p is required for Fe/S cluster formation on aconitase and activation of radical SAM enzymes. *Mol Cell Biol.*, 28:1851-61.
- Gille G., Sigler K. (1995). Oxidative stress and living cells. *Folia Microbiol (Praha)*, 40: 131-52.
- Goffeau A., Barrell B. G., Bussey H., Davis R. W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J. D., Jacq C., Johnston M. (1996). Life with 6000 genes. *Science*, 274, 546-567.
- Gómez-Gallardo M. (2012). Evaluación de la participación de las proteínas Aco1p, Lip5p, Sdh2p y Rip1p en la toxicidad generada por etanol en *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de maestría. IIQB. UMSNH.
- Gralla E.B., Kosman D.J. (1992). Molecular genetics of superoxide dismutases in yeasts and related fungi. *Adv Genet.*, 30, 251–319.
- Grant C.M., MacIver F.H., Dawes I.W. (1997). Mitochondrial function is required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, 410, 219-222.
- Green D.E., Tzagoloff A. (1966). The mitochondrial electron transfer chain. *Arch Biochem Biophys.*, 116: 293–304.
- Hagman A., Säll T., and Piškur j. (2014). Analysis on yeast short-term Crabtree effect and its origin *FEBS J.*, doi: 10.1111-febs.13019.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1989). *Free Radicals in Biology and Medicine*, London: Clarendon Press.

- Halliwell B., Gutteridge J.M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*, 186, 1–85.
- Hall M. N., and Linder P., (1993). *The Early Days of Yeast Genetics*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Heinemeyer J., Braun H. P., Boekema E. J., and Kouril R. (2007) A structural model of the cytochrome *c* reductase/oxidase supercomplex from yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 282, 12240–12248.
- Jamieson D.J. (1992). *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. *J Bacteriol.*, 174, 6678–6681.
- Kellis M., Birren B. W., and Lander E. S. (2004). Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 428, 617-624.
- Lambert A.J., Brand M.D. (2004). Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Biol Chem.*, 279, 39414–39420.
- Lazarow P. B. (2003). Peroxisome biogenesis: advances and conundrums. *Curr Opin Cell Biol.*, 15, 489-497.
- Lederer F. (1991). Flavocytochrome b2. In *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes* CRC Press, Boca Raton, FL, vol. 2, 153–242.
- Lee J.C., Straffon M.J., Jang T.Y., Higgins V.J., Grant C.M., Dawes I.W. (2001). The essential and ancillary role of glutathione in *Saccharomyces cerevisiae* analysed using a grande *gsh1* disruptant strain. *FEMS Yeast Res.*, 1, 57–65.
- Lenaz G., Genova M.L. (2010). Structure and organization of mitochondrial respiratory complexes: a new understanding of an old subject. *Antioxid Redox Signal.*, 12: 961– 1008.
- Lenaz G., Genova M.L. (2012). Supramolecular organisation of the

mitochondrial respiratory chain: a new challenge for the mechanism and control of oxidative phosphorylation. *Adv Exp Med Biol.*, 748: 107–144.

- Lin M.T. and Beal M.F. (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 443, 787–795.
- Marín-Buera L., García-Bartolomé A., Morán M., López- Bernardo E., Cadenas S., Hidalgo B., Sánchez R., Seneca S., Arenas J, Martín M. A., Ugalde C. (2015). Differential proteomic profiling unveils new molecular mechanisms associated with mitochondrial complex III deficiency. *Journal of Proteomics*, 113, 38–56.
- Magri S., Fracasso V., Rimoldi M., Taroni F. (2010). Preparation of yeast mitochondria and in vitro assay of respiratory chain complex activities. *Nature. Protocol Exchange*.
- Mathews C. K., Van Holde K. E., Ahern K. G. (2003). *Bioquímica. Tercera edición*. Addison Wesley.
- Trouillard M., Brigitte M., y Rappaport F. (2011). Questioning the functional relevance of mitochondrial supercomplexes by time-resolved analysis of the respiratory chain. *PNAS*, 108, 45 E1027–E1034
- Mulkidjanian A. Y. (2005). Ubiquinol oxidation in the cytochrome bc1 complex: Reaction mechanism and prevention of short-circuiting. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1709 5 – 34.
- Wagener N., Ackermann M., Funes S., Neupert W. (2011). A pathway of protein translocation in mitochondria mediated by the AAA-ATPase Bcs1, *Mol. Cell.*, 44 191–202
- O'Brien K.M., Dirmeier R., Engle M., Poyton R.O. (2004). Mitochondrial protein oxidation in yeast mutants lacking manganese-(MnSOD) or copper- and zinc- containing superoxide dismutase (CuZnSOD): evidence that MnSOD and CuZnSOD have both unique and overlapping functions in protecting mitochondrial proteins from oxidative damage. *J Biol Chem.*, 279, 51817–51827.

- Pfeiffer K., Gohil V., Stuart R.A., Hunte C., Brandt U., Greenberg M.L., Schagger H. (2003). Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. *J. Biol. Chem.*, 278, 52873-52880.
- Pruyne D., Legesse-Miller A., Gao L., Dong Y., and Bretscher A. (2004). Mechanisms of polarized growth and organelle segregation in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 20, 559-591.
- Sawamura R., Ogura T., Esaki M. (2014). A conserved a helix of Bcs1, a mitochondrial AAA chaperone, is required for the Respiratory Complex III maturation. *B B R C.*, 443: 997–1002.
- Pérez-Gallardo R. V., S. Briones L., Díaz-Pérez A. L., Gutiérrez S., Rodríguez-Zavala J. S. y Campos-García J. (2013). Reactive oxygen species production induced by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* increases because of a dysfunctional mitochondrial iron–sulfur cluster assembly system. *FEMS Yeast Res.*, 804-19.
- Lill R. (2009). Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature*, 460 (7257): 831-8.
- Lill R., Hoffmann B., Molik S., Pierik A. J., Rietzschel N., Stehling O., Uzarska M. A., Weibert H., Wilbrecht C., Mühlhoff U. (2012). The role of mitochondria in cellular iron–sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochim Biophys Acta.*, 1823: 1491-1508.
- Rodrigues F., Ludovico P., y Leao C. (2006). Sugar metabolism in yeast: an overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism. *Biodiversity and ecophysiology of yeast. The yeast handbook.*, 102-121.
- Schagger H., Pfeiffer K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.*, 19:1777–1783.
- Schagger H., Pfeiffer K. (2001). The ratio of oxidative phosphorylation complexes I–V in bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem.*, 276: 37861–37867.

- Schneiter Roger (2004). *Genetics, Molecular and Cell Biology of Yeast*.
- Iwata S., Saynovits M., Link T. A., Michel H. (1996). Structure of a water soluble fragment of the ‘Rieske’ iron–sulfur protein of the bovine heart mitochondrial cytochrome bc1 complex determined by MAD phasing at 1.5 Å resolution. *Structure*, 4, 567–579.
- Sun J., Trumpower B. L. (2003). Superoxide anion generation by the cytochrome bc1 complex. *Arch Biochem Biophys.*, 419, 198–206.
- Temple M. D., Perrone G. G., Dawes I. W. (2005). Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends Cell Biol.*, 15, 319–326.
- Tie-Zhong C., Conte A., Fox J. L., Zara V., and Winge D. R. (2014). Modulation of the respiratory supercomplexes in yeast enhanced formation of cytochrome oxidase increases the stability and abundance of respiratory supercomplexes. *J. Biol. Chem.*, 289:6133-6141.
- Trumpower B. L. (1990). The protonmotive Q cycle. Energy cytochrome bc1 complex. Translocation to electron transfer by the transduction by coupling of proton. *J. Biol. Chem.*, 265:11409-11412.
- Trumpower B. L. (2002). A concerted, alternating sites mechanism of ubiquinol oxidation by the dimeric cytochrome bc1 complex. *Biochim Biophys Acta.*, 10, 166– 173.
- Turrens J. F., Alexandre A., Lehninger A. L. (1985). Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys.*, 237, 408–414.
- Turrens J. F., Boveris A. (1980). Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J.*, 191, 421–427.
- Mühlhoff U., Richter N., Pines O., Pierik A. J., and Lill R. (2011). Specialized Function of Yeast Isa1 and Isa2 Proteins in the Maturation of Mitochondrial [4Fe-4S] Proteins. *J. Biol. Chem.*, 286:41205-41216.

- Voisine C., Cheng Y. C., Ohlson M., Schilke B., Hoff K., Beinert H., Marszalek J., Craig E. A. (2001). Jac1, a mitochondrial J-type chaperone, is involved in the biogenesis of Fe/S clusters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98:1483-8.
- Wolfe K. H., and Shields, D. C. (1997). Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature*, 387, 708-713.
- Wittig I., Schagger H. (2008). Features and applications of blue-native and clear-native electrophoresis. *Proteomics*, 8: 3974–3990.
- Yagi T., Seo B., Nakamaru-Ogiso B. E., Marella M., Barber-Singh J., Yamashita T., Kao M. C., and Matsuno-Yagi A. (2006) Rejuvenation. *Res.*, 9, 191–197.
- Youngman R. J. (1984). Oxygen activation: is the hydroxyl radical always biologically relevant. *Trends Biochem Sci.*, 9, 280–283.
- Zara V., Conte L., Trumpower B. L. (2009). Evidence that the assembly of the yeast cytochrome *bc1* complex involves the formation of a large core structure in the inner mitochondrial membrane. *FEBS J.*, 276, 1900–1914.
- Zara V., Conte L., and Trumpower B. L. (2007). Identification and characterization of cytochrome *bc1* subcomplexes in mitochondria from yeast with single and double deletions of genes encoding cytochrome *bc1* subunits. *FEBS J.*, 274, 4526–4539.
- Zhang M., Mileykovskaya E., Dowhan W. (2002). Glu in the respiratory chain together cardiolipin is required for supercomplex formation in the inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.*, 277, 43553-43556.
- Zhang M., Mileykovskaya E., Dowhan W. (2005). Cardiolipin is essential for organization of complex III and IV into a supercomplex in intact mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 280, 29403-29408.