

INTERACCIÓN ENTRE LA NADH DESHIDROGENASA EXTERNA Y LOS COMPLEJOS DE LA VÍA CITOCRÓMICA EN MITOCONDRIAS DE *YARROWIA LIPOYTICA*.

Guerrero Castillo, S, Vázquez Acevedo, M, González Halphen, D, Uribe Carvajal, S. Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Tel: (5255) 56225632, Fax: (55)56225630 e-mail: sergiog@ifc.unam.mx

En la cadena respiratoria de *Yarrowia lipolytica*, el flujo de electrones desde NADH hasta el oxígeno está ramificado por la presencia de componentes alternos, una NADH deshidrogenasa tipo II externa (NDH2e) y una oxidasa alterna (AOX)¹. Ambos componentes alternos constan de una subunidad y son proteínas periféricas, por lo tanto no son capaces de bombear protones. Hasta ahora no se tiene un esquema general de cómo participan los componentes alternos en el flujo de electrones, ni en la formación de supercomplejos. Dado que los componentes alternos no están involucrados en la conservación de energía, son considerados sistemas disipadores de energía. Por ello, en condiciones de alta demanda energética, proponemos que el flujo de electrones desde el NADH externo hasta el oxígeno mediante estas dos enzimas debe estar cuidadosamente regulado. En el presente trabajo se evalúa la participación de la NDH2e y la AOX en el transporte de electrones de mitocondrias aisladas de las cepas silvestre y Δ numb de *Y. lipolytica*. La cepa Δ numb presenta un complejo I inactivo y contiene tanto a la NDH2e nativa, como una isoforma re-dirigida a la cara matricial de la membrana interna mitocondrial². Se determinó el consumo de oxígeno en estados fosforilante y desacoplado con diferentes sustratos en presencia de inhibidores del complejo IV o de la oxidasa alterna. Mediante estos ensayos, se encontraron diferencias, con respecto a la inhibición de la respiración, entre el NADH interno y el NADH externo, es decir, las diferencias en la inhibición dependen del sustrato. Los electrones que provienen de la NDH2e no son dirigidos hacia la AOX, debido probablemente a una interacción entre la NDH2e y los complejos de la vía citocrómica. En la mutante Δ numb la NDH2e fue relocalizada hacia el lado matricial para suplir la actividad del complejo I. Con respecto a la inhibición de la respiración, en esta mutante los electrones que provienen de la NDH2 (ahora interna NDH2i) pueden donar electrones a la vía respiratoria alterna cuando la vía citocrómica está inhibida o viceversa, es decir, los electrones divergen hacia ambas vías respiratorias.

Mediante electroforesis azul nativa³ (BNE) seguida de actividad en gel y electroforesis desnaturizante de segunda dimensión, se observaron diferentes asociaciones supramoleculares entre los complejos con las siguientes estequiometrías: I-III₂, I-III₂-IV₄, I-IV, III₂-IV₂, III₂-IV₄ y V₂. Por otra parte, en geles claros nativos (CNE) y geles claros nativos de alta resolución⁴ (hrCNE), mediante ensayos de actividad en gel e inmunodetección, se observó la interacción de la NDH2e con los complejos de la vía citocrómica (III y IV), que fue confirmada por espectrometría de masas. En la cepa mutante, se observa una pérdida parcial de la interacción de la NDH2i con los complejos III-IV, debido probablemente a que la asociación es específica de la deshidrogenasa localizada en la cara intermembranal de la membrana interna mitocondrial.

Para corroborar la interacción NDH2e-III-IV, las mitocondrias fueron solubilizadas y cargadas sobre una columna de intercambio iónico (DEAE-sefarosa), se lavó y se eluyó con un gradiente de 0 a 400 mM NaCl. Las fracciones que presentaron actividad de citocromo oxidasa, también presentan actividad de NADH

deshidrogenasa, que no corresponde al complejo I. Estas fracciones se analizaron por ensayos de inmunodetección utilizando los anticuerpos antiNDH2e de *Y. lipolytica* y antiCOXIII de *S. cerevisiae*.

Con base en observaciones previas⁵ y con los resultados hasta ahora obtenidos proponemos un modelo en donde el flujo de electrones a través de los componentes alternos de la cadena respiratoria de *Y. lipolytica* está regulado por canalización mediante diferentes asociaciones supramoleculares.

Referencias

1. Joseph-Horne y cols. (2001). *Biochim Biophys Acta*. **1504**:179-95
2. Kerscher y cols. (2001). *J Cell Sci*. **114**: 3915-21
3. Schagger H. (2001). *Methods Cell Biol*. **65**: 231-44
4. Wittig y cols., (2007). *Mol. Cell Proteom*. **6**: 1215-1225
5. Krause y cols., (2004). *J. Biol. Chem*. **279** (2004) 26453-26461