



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Intervención de factores nucleares en el ensamblaje
del complejo IV (Citocromo *c* oxidasa) de
Saccharomyces cerevisiae.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A

OLGA BEATRIZ ZURITA RENDÓN



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

TUTORA
DRA. XOCHITL PÉREZ MARTÍNEZ

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

| |
|---|
| <p>1. Datos del Alumno Zurita Rendón Olga Beatriz 55 23 11 62 95 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 404048454</p> |
| <p>2. Datos del tutor Dra Xochitl Pérez Martínez</p> |
| <p>3. Sinodal 1 Dr Diego González Halphen</p> |
| <p>4. Sinodal 2 Dr Roberto Coria Ortega</p> |
| <p>5. Sinodal 3 Dra Bertha María Josefina González Pedrajo</p> |
| <p>6. Sinodal 4 Dr Salvador Uribe Carvajal</p> |
| <p>7. Datos del trabajo escrito Intervención de factores nucleares en el ensamblaje del complejo IV (Citocromo <i>c</i> oxidasa) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 71 p 2007</p> |

Reconocimientos

A la Dra. Xochitl Pérez Martínez ya que ésta tesis se realizó bajo su tutoría en el laboratorio 204-orientado, en el Departamento de Bioquímica del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Dr. Salvador Uribe Carvajal y laboratorio por su asesoría y apoyo en la realización de las oximetrías y espectros.

A la Dra. Yolanda Camacho Villasana, del Departamento de Bioquímica del Instituto de Fisiología Celular, por su asesoría técnica.

Al jurado constituido por:

| | | |
|------------|---|--|
| Presidente | Dr. Diego González Halphen | Instituto de Fisiología Celular, UNAM. |
| Vocal | Dr. Roberto Coria Ortega | Instituto de Fisiología Celular, UNAM. |
| Secretario | Dra. Xochitl Pérez Martínez | Instituto de Fisiología Celular, UNAM. |
| Suplente | Dr. Salvador Uribe Carvajal | Instituto de Fisiología Celular, UNAM. |
| Suplente | Dra. Bertha María Josefina González Pedrajo | Instituto de Fisiología Celular, UNAM. |

Durante la tesis fui apoyada por una beca de CONACYT (47514) y por PAPITT (IN201805)

Agradecimientos

A la Dr. Xochitl Pérez Martínez por ser una excelente investigadora y asesora. Gracias por todo el tiempo invertido y por la confianza otorgada.

A mi familia, en especial a mi madre por enseñarme que los éxitos se logran con voluntad y entrega.

A mi hermano, por su apoyo moral y económico durante toda la licenciatura.

A Yolanda Camacho Villasana y Miguel A. Shingú Vázquez por su apoyo en el laboratorio como científicos y como amigos.

A mis amigos por ser un factor muy importante en mi desempeño como bióloga y persona.

Índice

| | |
|--|-------|
| • Resumen..... | 5-6 |
| • Introducción | |
| ○ Generalidades..... | 7-11 |
| ○ Shy1p..... | 11-13 |
| ○ Cox14p..... | 13-14 |
| • Justificación..... | 15 |
| • Objetivos..... | 16 |
| • Método | |
| ○ Medios de crecimiento..... | 16 |
| ○ Tabla de cepas..... | 16 |
| ○ Métodos de Biología Molecular..... | 18-19 |
| ▪ Purificación de DNA total | |
| ▪ Amplificación de casete por PCR | |
| ▪ Geles de agarosa | |
| ▪ Purificación de casete | |
| ○ Transformación de levadura..... | 19-20 |
| ○ Diluciones seriadas..... | 20 |
| ○ Obtención de mitocondrias..... | 20-22 |
| ○ Cuantificación de proteínas (Lowry)..... | 22-23 |
| ○ Inmunorélicas tipo Western..... | 23-25 |
| ○ Oximetrías..... | 25-26 |
| ○ Espectros UV-visible..... | 26-27 |
| ○ Síntesis in organelo..... | 27-28 |
| ○ Inmunoprecipitación..... | 28-30 |
| • Resultados..... | 31-54 |
| • Discusión..... | 55-59 |
| • Conclusión..... | 60 |
| • Apéndice I..... | 61-67 |
| • Apéndice II..... | 68 |
| • Referencias..... | 69-71 |

Resumen

El complejo IV o citocromo *c* oxidasa (COX) de *Saccharomyces cerevisiae*, es un complejo enzimático de 12 subunidades, que forma parte de la cadena respiratoria. Las subunidades I, II y III (Cox1p, Cox2p, Cox3p) forman el centro catalítico de la citocromo *c* oxidasa, son codificadas por el genoma mitocondrial y sintetizadas en la mitocondria. El resto de las subunidades son importadas del citosol. Dada la complejidad estructural de la citocromo *c* oxidasa, se han reconocido poco más de 20 factores nucleares que intervienen tanto en su biogénesis como en su estabilidad. A pesar de que los estudios para entender los mecanismos del ensamblaje de la COX en *S. cerevisiae* han sido amplios, poco se entiende a la fecha.

Se ha visto que mutantes de genes que intervienen en el ensamblaje de la COX, se encuentran relacionados a enfermedades neurodegenerativas en humanos.

A nosotros nos interesa estudiar dos factores que afectan el ensamblaje de COX, Shy1p y Cox14p. Se piensa que ambos factores intervienen en las primeras etapas de ensamblaje, y posiblemente actúan sobre Cox1p.

SHY1 es el homólogo de levadura de *SURF-1*, un cofactor nuclear presente en humanos, que está relacionado con deficiencias en la COX; *COX14* es otro factor nuclear que se sabe interviene en el ensamblaje de la COX y posiblemente en la regulación de la síntesis de Cox1p. Para entender la manera en que intervienen *SHY1* y *COX14* en la biogénesis y estabilidad de la citocromo *c* oxidasa, se generaron mutantes nulas $\Delta shy1$ y $\Delta cox14$. Con la finalidad de poder detectar a la subunidad Cox1p, las mutantes se generaron en una cepa, que contiene un triple epítipo de hemaglutinina (3xHA) fusionado al extremo carboxilo terminal de la subunidad Cox1p. Se encontró que la presencia del triple epítipo en Cox1p no afecta el fenotipo respiratorio de la cepa ni la actividad de citocromo *c* oxidasa.

Tanto la mutante nula de $\Delta shy1$ como la de $\Delta cox14$ presentan un defecto en su crecimiento respiratorio. $\Delta shy1$ respira parcialmente mientras que $\Delta cox14$ es incapaz de respirar. Cox1p, Cox2p y Cox3p son sintetizadas en ambas cepas, sin embargo la concentración estacionaria de Cox1p y Cox2p disminuye, mientras que la de Cox3p aumenta, este patrón se observa tanto en las cepa $\Delta shy1$ como en la cepa $\Delta cox14$. Con esto concluimos que el efecto de ambos factores nucleares es a nivel post-traduccional.

Introducción

Generalidades

Las mitocondrias son organelos celulares que ocupan una porción sustancial del volumen citoplásmico de las células eucariontes. Han sido esenciales en la evolución de animales complejos. En las mitocondrias se lleva a cabo la fosforilación oxidativa, en donde se degrada por completo la glucosa a H_2O y CO_2 obteniéndose una ganancia energética (en forma de ATP) 15 veces mayor a la obtenida vía glucolítica.

Las mitocondrias están provistas de dos membranas: una membrana externa que delimita al organelo, y una membrana interna que se proyecta hacia el interior en forma de pliegues o "crestas mitocondriales". El espacio entre ambas membranas es el espacio intermembranal, mientras que el espacio delimitado por la membrana interna corresponde a la matriz mitocondrial. Las membranas externa e interna establecen contacto entre sí en ciertas regiones o sitios de contacto, lo cual es importante para la fisiología del organelo.

La membrana externa contiene proteínas de transporte especializadas que permiten el paso de moléculas desde el citosol hacia el interior del espacio intermembranal y después a la matriz mitocondrial. En la membrana interna existen abundantes complejos proteicos entre los que se encuentran los de la cadena respiratoria (complejo I o NADH deshidrogenasa, II o succinato deshidrogenasa, complejo III o citocromo *bc1*, y el complejo IV o citocromo *c* oxidasa). En el caso de *Saccharomyces cerevisiae* el complejo I no está presente.

El flujo de electrones a través de los complejos I, III y IV tiene como resultado el bombeo de protones (iones H^+) a través de la membrana interna mitocondrial, generando de esta manera un ambiente alcalino en la matriz mitocondrial con respecto al espacio intermembranal. El gradiente de protones provee la energía para la síntesis de ATP.

Además de llevarse a cabo la síntesis de ATP, en la mitocondria también se sintetizan aminoácidos, grupos hemo y otros metabolitos (Schatz, 1994).

La teoría endosimbiótica de la evolución propone que el origen de las células eucariontes fue posible gracias a la fusión de distintos organismos procariontes. La mitocondria funge como evidencia para esta teoría, ya que presenta una doble membrana, lo que sustenta el mecanismo mediante el cual bacterias aeróbicas fueron fagocitadas; además las mitocondrias presentan un genoma de tipo procarionte.

La mitocondria contiene toda la maquinaria enzimática necesaria para llevar a cabo la transcripción y traducción de su genoma. En *S. cerevisiae* el DNA mitocondrial contiene ocho genes que codifican para proteínas: *COX1*, *COX2*, *COX3*, *ATP6*, *ATP8*, *ATP9*, *Cyt b* y *VAR1*. Codifica también para genes de las subunidades 21S y 15S del ARNr, 25 tARNs, y el componente 9S de la RNasa P. *COX1*, *COX2* y *COX3* codifican para las tres principales subunidades de la citocromo *c* oxidasa: Cox1p, Cox2p y Cox3p, respectivamente. *ATP6*, *ATP8*, *ATP9* codifican para subunidades de la ATPsintasa. *CYT b* codifica para el citocromo *b*, que se encuentra en el Complejo III y *VAR1* codifica para una proteína de la subunidad chica de los ribosomas mitocondriales (Figura 1).

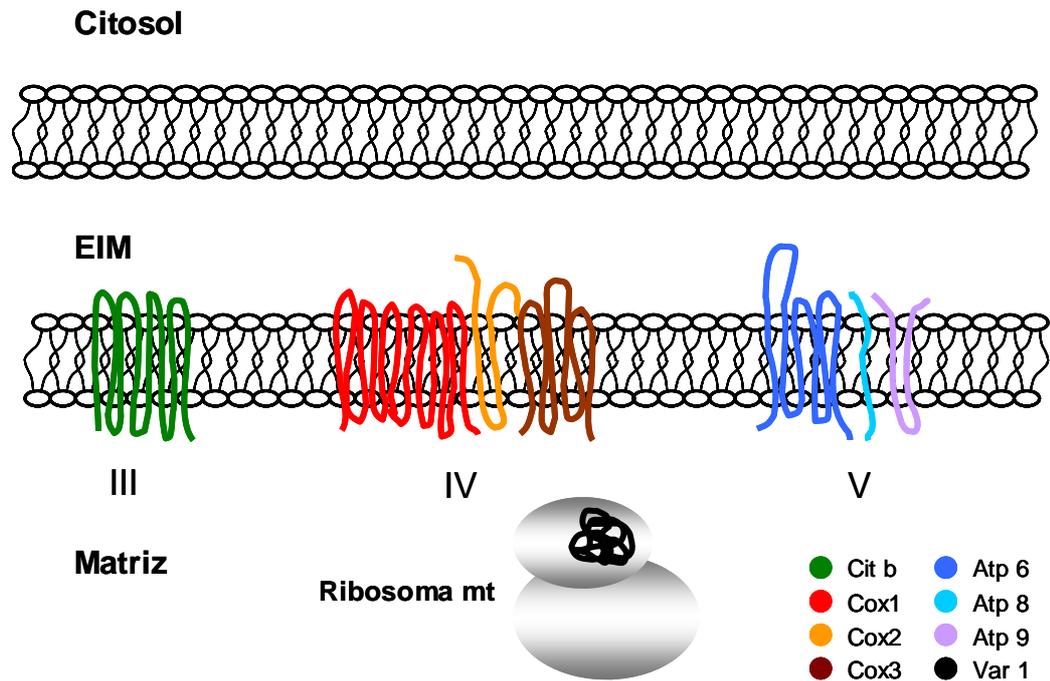


Fig. 1. Ubicación y topología de las proteínas sintetizadas en la mitocondria de levadura. III: Complejo III (Ubiquinol-citocromo *c* oxidoreductasa); IV: Complejo IV (Citocromo *c* oxidasa); V: (ATP sintasa); Ribosoma mt: Ribosoma mitocondrial. EIM: El extremo amino terminal de las proteínas transmembranales está dibujado del lado izquierdo (Westermann y col. *Methods in cell biology*, vol. 65).

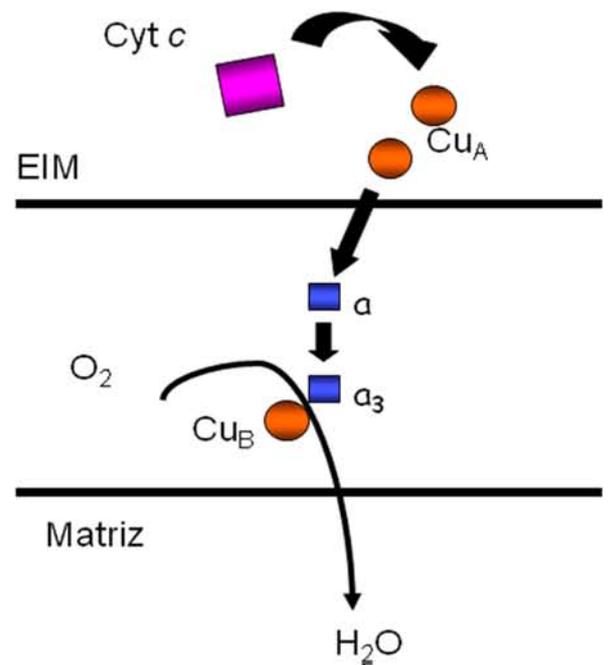
La función del complejo IV (citocromo *c* oxidasa) de la cadena respiratoria es transportar los electrones del citocromo *c* al oxígeno molecular, reduciéndolo a H₂O. Además es una bomba de protones que contribuye a la generación del gradiente de protones en la membrana interna mitocondrial.

En *S. cerevisiae*, el complejo IV está compuesto por 12 subunidades, de las cuales tres subunidades forman el núcleo catalítico del complejo. Estas tres subunidades (Cox1p, Cox2p y Cox3p) están altamente conservadas tanto en procariontes como en

eucariontes. Son codificadas por el genoma mitocondrial, sintetizadas en la mitocondria e insertadas en la membrana interna mitocondrial.

Las subunidades adicionales se codifican por genes nucleares y se importan a la mitocondria. Éstas son poco conservadas en su secuencia entre distintas especies de eucariontes (Herrmann y Funes, 2005). Por ello se propone que son proteínas adquiridas durante la evolución de la célula eucariótica.

Figura 2. Flujo de electrones del citocromo c soluble en el espacio intermembranal, hacia los grupos prostéticos en las subunidades I y II en la membrana interna mitocondrial de la citocromo c oxidasa.



Cox1p es una proteína altamente hidrofóbica, contiene 12 cruces transmembranales que se unen por pequeñas asas hidrofílicas. Entre los dominios transmembranales se encuentran un hemo α de bajo espín y un sitio bimetálico compuesto por el hemo α_3 y un centro de cobre denominado Cu_B en donde se reduce el oxígeno. El centro binuclear de cobre Cu_A en la subunidad Cox2p constituye el sitio de entrada de electrones, los cuales son canalizados a través de la cadena respiratoria (Khalimonchuk y col. 2005) (Figura 2).

S. cerevisiae es hasta ahora una de las pocas especies en la cual se puede manipular el genoma nuclear y mitocondrial de manera fácil y eficiente vía recombinación homóloga. Este hecho hace de *S.*

cerevisae un modelo adecuado para generar mutaciones de genes que intervienen en la respiración, ya que cepas mutantes son viables debido a su capacidad de fermentar.

El ensamblaje de la citocromo *c* oxidasa (COX) requiere de la presencia de por lo menos 20 proteínas nucleares (McEwen y col. 1986, Tzagoloff y Dieckmann, 1990). Estas proteínas actúan en todos los niveles de expresión de los genes mitocondriales. Estos incluyen: procesamiento (Sephin y col. 1989) y la traducción de los ARNm mitocondriales (Costanzo y Fox, 1993) de las subunidades I, II y III, la inserción en la membrana de estas subunidades hidrofóbicas (Hell y col. 2001) y la maduración de los centros de hierro y cobre (Glerum y col. 1996, Barros y col. 2001, Herrmann y Funes, 2005).

A pesar de que los estudios enfocados a entender el ensamblaje de la COX han sido amplios, aún no se entiende el orden preciso de eventos y la actividad específica de los factores de ensamblaje en la biogénesis de la COX.

En años recientes se han podido detectar una gran cantidad de mutaciones en genes nucleares que intervienen en la cadena respiratoria relacionados a enfermedades neurodegenerativas. Ejemplos típicos son el síndrome de Leigh, la miopatía fatal infantil y la miopatía benigna infantil. Los tres síndromes están asociados a deficiencias en la citocromo *c* oxidasa (Di Mauro y col. 1998, Antonicka y col. 2003).

Shy1p

Shy1p es la proteína de levadura de 45 kDa, homóloga de Surf1p, la cual se requiere para la completa expresión de COX (Mashkevich y col. 1997; Barrientos y col. 2002). El alineamiento de

los genes de *SHY1* Y *SURF1* (FASTA34 versión 2004) muestra un valor de 57.3 % de identidad, lo cual sustenta su homología. Sin embargo esta similitud se centra a ciertas regiones de las proteínas. Una región de Shy1p inicia en el residuo 81 y termina en el 191 (región central de la proteína) y la otra región se encuentra cercana al extremo carboxilo terminal con 12 identidades en una sección de 23 residuos (Nitjtmans y col. 2001).

El entender la función de esta proteína es de gran interés dado que se ha encontrado que mutaciones en Surf1p son responsables de varios casos del síndrome de Leigh (Tiranti y col, 1998, Zhu y col. 1998), una enfermedad neuromuscular que presenta deficiencias en COX (DiMauro y De Vivo, 1996).

En mutantes de *shy1*, se observa una deficiencia parcial en COX (disminuye en un 80% con respecto a una cepa silvestre) (Barrientos y col. 2002), un aumento en la concentración del citocromo *c* y de la actividad del complejo III. Estas alteraciones se ven reflejadas en la capacidad de las mutantes nulas de *shy1* para crecer en medios no fermentables como YPEG, ya que son cepas que respiran parcialmente.

Shy1p ha sido localizada en la mitocondria asociada de manera estable a la membrana interna mitocondrial con parte de su estructura viendo hacia el espacio intermembranal. Su estructura primaria sugiere la presencia de dos secuencias hidrofóbicas de suficiente longitud para actuar como dominios de anclaje a la membrana interna mitocondrial. Estos dominios se encuentran en los extremos amino y carboxilo terminal de la proteína (Mashkevich y col. 1997).

Shy1p presenta dos dominios funcionales, ya que en mutantes donde se expresan separadamente los extremos amino y carboxilo terminal, la función de Shy1p se restaura, sin embargo ambos dominios son necesarios para la función (Mashkevich y col. 1997).

A la fecha no se entiende cuál es la función de Shy1p pero se ha sugerido que participa en la biogénesis de Cox1p (Barrientos y col. 2002).

Cox14p

Cox14p es una proteína de origen nuclear importada por la mitocondria. Su peso molecular es de 7.9 kDa. Mutantes de *cox14* son incapaces de crecer en fuentes de carbono no fermentables (Glerum y col. 1995). El fenotipo de las mutantes nulas de *cox14* sugiere que Cox14p es requerida en el ensamblaje de COX.

El análisis espectral muestra un patrón característico de las cepas mutantes con deficiencias en COX (carece de citocromo *a* y *a3*, pero presenta las bandas de absorción correspondientes a las citocromos *b*, *c* y *c1*) (Glerum y col. 1995).

En mutantes de *cox14*, Cox1p sí se sintetiza pero su estabilidad es muy baja (Glerum y col. 1995), por lo que se entiende que la función de Cox14 es postraducciona, posiblemente tiene que ver con la inserción y/o translocación de Cox1p en la membrana interna mitocondrial.

Cox14 es una proteína periférica de la membrana interna mitocondrial orientada hacia la matriz mitocondrial (Barrientos y col. 2004).

Por los fenotipos observados en mutantes nulas de *cox14* se ha sugerido que su función es regular negativamente la expresión de Cox1p (Barrientos y col. 2004).

El modelo sugerido sobre la función de Cox14p es que éste previene que factores específicos de *COX1* promuevan la traducción del ARNm de COX1 en mutantes incapaces de completar el ensamblaje de una citocromo *c* oxidasa funcional (Barrientos y col. 2004). Sin embargo este modelo aún no es claro y lo único que se sabe con certeza es que Cox14p interactúa físicamente con Cox1p recién sintetizada y con Mss51p (Barrientos y col. 2004), una proteína que se requiere para la síntesis de Cox1p (Siep y col. 2000; Pérez-Martínez y col. 2003).

Justificación

En *S. cerevisiae*, la citocromo *c* oxidasa es un complejo enzimático formado por 12 subunidades, tres de las cuales son codificadas por el genoma mitocondrial y sintetizadas en la mitocondria; estas tres subunidades (Cox1p, Cox2p y Cox3p) forman el centro catalítico de la enzima, y es aquí donde se encuentran los distintos grupos prostéticos. El resto de las subunidades son importadas del núcleo. Por todas estas características la biogénesis de la citocromo *c* oxidasa, es altamente compleja; a la fecha se han identificado alrededor de 20 factores nucleares que intervienen en su ensamblaje y estabilidad. Sin embargo, poco se entiende sobre su mecanismo de acción.

Cox1p juega un papel muy importante en la biogénesis de la citocromo *c* oxidasa, ya que se ha visto que forma parte de los primeros intermediarios en el proceso de ensamblaje (Nijtmans y col. 1998).

Cox1p es una proteína altamente conservada y muy hidrofóbica, por lo cual es muy poco antigénica. Por ello no se cuenta con anticuerpos eficientes que permitan la detección de niveles bajos de Cox1p, o que permitan llevar a cabo inmunoprecipitaciones para detectar intermediarios del ensamblaje de COX. Esto se debe a que en mutantes del ensamblaje, las subunidades de la COX son muy inestables.

A nosotros nos interesa estudiar dos genes (*SHY1* y *COX14*) que se cree participan en las primeras etapas de la biogénesis de la COX, y que muy probablemente actúan sobre Cox1p. Por ello en nuestro trabajo se utilizó una cepa en la que Cox1p tiene fusionado un triple epítipo de hemaglutinina (3xHA) en su extremo carboxilo

terminal lo cual permitirá detectar a Cox1p con eficiencia utilizando un anticuerpo comercial contra este epítotope, aún en mutantes que afectan el ensamblaje de la citocromo *c* oxidasa.

Objetivo

El objetivo general de este trabajo es contribuir al estudio del mecanismo mediante el cual factores nucleares como Shy1p y Cox14p intervienen en el ensamblaje de la COX.

Los objetivos particulares bajo los cuales se sustenta el desarrollo de este trabajo son:

- Demostrar que la función de la COX no se altera por la presencia del 3xHA fusionado al extremo carboxilo terminal de Cox1p.
- Generar mutantes nulas de *shy1* y *cox14* en una cepa que contenga el gen *COX1-3xHA*.
- Caracterizar a las mutantes nulas de *shy1* y *cox14*.

Métodos

(*Para amortiguadores, soluciones y medios ver apéndices)

Medios de crecimiento

Se prepararon soluciones, amortiguadores y medios de cultivo según Sherman F. 1991. Los medios de cultivo sólidos preparados fueron YPAEG* y YPAD*. Todos los medios se prepararon con agua desionizada y se esterilizaron por 45 minutos a 120°C para evitar la contaminación de otros hongos o bacterias. Los medios de cultivo líquido preparados fueron YPAD* y YPA-rafinosa*.

Tabla de cepas

| Cepas empleadas | Genotipo |
|---|--|
| XPM60 | MATa, <i>arg8::hisG, leu2-3, 112, lys2, ura3-52, shy1-delta::URA3 [p+]</i> |
| XPM211 | MATa, <i>arg8::hisG, leu2-3, 112, lys2, ura3-52 [p+, COX1-3XHA]</i> |
| XPM201 | MATa, <i>arg8::hisG, leu2-3, 112, lys2, ura3-52 [p+, COX1]</i> |
| AFC115a | MATa, <i>ura3-52, trp1-63, leu2delta1::tTA::LEU2, kanMX4-tet07::PET111, cox14-delta::URA3 [p+]</i> |
| NB40-3c | MATa, <i>arg8::hisG, leu2-3, 112, lys2, ura3-52, his3-deltaHinDIII [p⁰]</i> |
| Cepas generadas | |
| OZ1 | MATa, <i>arg8::hisG, leu2-3, 112, lys2, ura3-52, shy1-delta::URA3 [p+, COX1-3XHA]</i> |
| OZ2 | MATa, <i>arg8::hisG, leu2-3, 112, lys2, ura3-52, shy1-delta::URA3 [p+, COX1]</i> |
| OZ3 | MATa, <i>arg8::hisG, leu2-3, 112, lys2, ura3-5, cox14-delta::URA3 [p+, COX1-3XHA]</i> |
| OZ4 | MATa, <i>arg8::hisG, leu2-3, 112, lys2, ura3-52, cox14-delta::URA3 [p+, COX1]</i> |
| Las cepas madre (XPM201 y XPM211) con las que se generaron las mutantes de los diferentes genes ($\Delta shy1$, $\Delta cox14$) no presentan intrones en COX1. | |

Tabla 1. Genotipo de las cepas empleadas en este estudio. Entre corchetes se indica el genotipo mitocondrial.

Métodos de biología molecular

Purificación de DNA total

1. Crecer en 2 ml de medio líquido YPAD toda la noche a 30 °C.
2. Centrifugar los 2 ml, por 1 minuto a 14 000 rpm a temperatura ambiente. Eliminar el sobrenadante en ambas centrifugaciones.
3. Resuspender la pastilla
4. en 400 µl de QTP* y 400 µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). Agitar en vortex 3 minutos.
5. Centrifugar 5 minutos a 14 000 rpm, 4°C y extraer el sobrenadante.
6. Precipitar el DNA con 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5.3* y con 3 volúmenes de etanol.
7. Incubar por 10 minutos a -20 °C.
8. Centrifugar por 5 minutos a 14 000 rpm. Eliminar el sobrenadante.
9. Lavar con etanol al 70%
10. Dejar secar por aproximadamente 15 minutos.
11. Resuspender en 50 µl de agua estéril.
12. Guardar a -20 °C.

Métodos de biología molecular según Sambrook y col. 2001.

Amplificación por PCR

1. Preparar mezcla de reacción* para tubos con 50 µl. (Utilizar los desoxioligonucleótido correspondientes a una concentración de 10 mM cada uno) en hielo.
2. Agregar 1.0 µl de DNA total roto de la cepa correspondiente al tubo con la mezcla de reacción.

Se generó un programa en el termociclador como el siguiente:

| | |
|---------|-------|
| 10 min. | 94 °C |
| 45 seg. | 94 °C |
| 1 min. | 53 °C |
| 2 min. | 72 °C |
| 2 min. | 72 °C |

} 35 ciclos

Geles de agarosa

1. Preparar gel de agarosa al 1 % con TAE 1X* y 0.01 µl/ml de bromuro de etidio (10mg/ml).
2. Agregar a cada muestra solución de carga* (0.1 µl/µl).
3. Correr en una cámara de electroforesis a 100 mV por una hora.

Purificación de fragmentos de PCR

1. Cortar las bandas correspondientes al peso del DNA de interés del gel de agarosa
2. Purificar con el kit QIAGEN QIAquick, Gel extraction.
3. Correr en un gel de agarosa 2.5 µl del DNA purificado para estimar la cantidad total de DNA obtenido.

Transformación de levadura (Gietz y Schiestl, 1995)

1. Crecer XPM211 y XPM201 en 2 ml de medio líquido YPAD toda la noche a 30 °C.
2. Tomar 650 µL de cada cepa.

3. Centrifugar por 1 minuto a 14 000 rpm. Desechar el sobrenadante.
4. Centrifugar 1 minuto a 14 000 rpm. Eliminar completamente el sobrenadante.
5. Agregar a cada tubo 52.5 μ L de mezcla maestra* más 6 μ l del casete correspondiente (*shy1::URA3* o *cox14::URA3*). Agitar en vortex.
6. Incubar ambos tubos a 42 °C por 90 minutos. Cada 15 minutos agitar en vortex.
7. Plaquear en medio –URA e incubar por 4 días a 30°C.

Diluciones seriadas

1. Crecer 2 ml de YPD de cada cepa.
2. Pesar tubos eppendorf (1.5 ml) en balanza analítica.
3. Poner 1 ml de cultivo y centrifugar 1 minuto a 14 000 rpm.
4. Eliminar todo el sobrenadante. Obtener peso húmedo.
5. Diluir con agua estéril para que las células queden a 0.01 g/ml.
6. Colocar en los pozos A2, A3, A4 135 μ l de agua estéril.
7. Colocar en el primer pozo A1, B1, C1.....150 μ l de cada cepa.
8. Tomar 15 μ l del canal con cepa concentrada y transferir a los siguientes pozos, homogenizando la dilución dos veces antes de pasar a la siguiente columna de dilución.
9. Esterilizar el replicador en etanol y flamear. Dejar enfriar por segundos.
10. Imprimir en YPAD y YPEG.

Obtención de mitocondrias (Modificado de Glick and Pon, 1995)

1. Crecer una colonia de levadura en 2 ml de medio YPD Raf toda la noche a 30°C.

2. Resembrar en 25 ml de medio YPD Raf e incubar a 30°C hasta una A_{600} en la fase exponencial de crecimiento.
3. Del cultivo anterior resembrar en 1 L de medio YPD Raf e incubar toda la noche a 30°C hasta una A_{600} entre 1.4 y 1.6 (fase exponencial de crecimiento).
4. Centrifugar a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C en rotor GS3.
5. Lavar el botón una vez con agua fría, juntar todo el botón en un tubo de centrífuga previamente pesado.
6. Centrifugar a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C en rotor GS3. Eliminar el sobrenadante y pesar.
7. Resuspender el botón en amortiguador TD* (2 ml/g de peso húmedo)
8. Agitar 10 minutos a 30°C.
9. Centrifugar 5 minutos a 3300 rpm en rotor GS3.
10. Lavar el botón con amortiguador MP2* (7 ml/g de peso húmedo).
11. Centrifugar 5 minutos a 3300 rpm en rotor GS3.
12. Resuspender el botón en amortiguador MP2 (7ml/g de peso), adicionar zimoliasa-20T (3mg/g de peso húmedo).
13. Agitar de 30 a 60 minutos a 30°C, hasta que los esferoplastos se formen (Revisar la formación de esferoplastos a los 30, 45 y 60 minutos).

Para revisar la formación de esferoplastos:

Comparar 2 ml de agua contra 2 ml de sorbitol 1.2 M adicionando 50 μ l de células, agitar en vortex. Cuando se formaron los esferoplastos el tubo con agua se verá claro a comparación del tubo con sorbitol que se observará turbio debido a que la diferencia de osmolaridad romperá a los esferoplastos en agua.

A partir de este punto todo se hace a 4°C.

14. Centrifugar a 2500 rpm por 5 minutos a 4°C en rotor GS3.

15. Resuspender en 1/4 del volumen requerido de amortiguador Dounce* (13.4 ml/g).
16. Homogenizar 10 veces en 40 ml de amortiguador usando un homogenizador y pistilo de vidrio.
17. Centrifugar 5 minutos a 3300 rpm en rotor GS3 a 4°C. Recuperar el sobrenadante.
18. Centrifugar 5 minutos a 3300 rpm en rotor GS3 a 4°C. Recuperar el sobrenadante.
19. Centrifugar 12 minutos a 12000 rpm en rotor SS-34 a 4°C (en el botón se encuentran las mitocondrias crudas).
20. Resuspender el botón en 10 ml de amortiguador SEH* (Primero resuspender en 2 ml, con la punta de la micropipeta cortada).
21. Centrifugar 12 minutos a 12000 rpm en rotor SS-34 a 4 °C (en el botón se encuentran las mitocondrias crudas).
22. Resuspender el botón en 300 µl de amortiguador SEH (con la punta de la micropipeta cortada).
23. Cuantificar espectrofotométricamente de la siguiente manera: Llevar 10 µl de mitocondrias crudas a 1000 µl con SDS al 0.6 %, agitar en vortex. Calcular la cantidad de proteína considerando que Abs= 0.21 corresponde a 10mg/ml de proteína a 280 nm.
24. Congelar en nitrógeno líquido y guardar a -70 °C en alícuotas de 25 µl.

Lowry (Modificado de Markwell, 1978)

Curva de calibración

Se empleó una solución de albúmina de 1 mg/ml.

Se prepararon soluciones de albúmina con 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 µl de la solución de albúmina.

1. Ajustar la muestra con agua a 1 ml.
2. Adicionar 3 ml de solución C* y mezclar en vortex. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
3. Adicionar 300 µl de solución D* y mezclar en vortex e incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Medir absorbancia a 540 nm.

Inmunorélicas tipo Western

1. Preparar geles de poliacrilamida (30/0.8%) de separación* y apilamiento*.
2. Preparar las muestras.
 - Poner el volumen requerido de la cepa correspondiente en un tubo eppendorf y aforar a 20 µL con solución de carga 1X*.
 - Calentar las muestras a 70 °C por 5 minutos.
3. Cargar las muestras en el gel, junto con 3 µL de marcador de pesos moleculares.
4. Correr el gel 30 minutos a 50 V y 120 minutos a 80 V.
5. Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfieren a membranas de PVDF (Millipore) mediante un método semi-seco, de la siguiente manera:

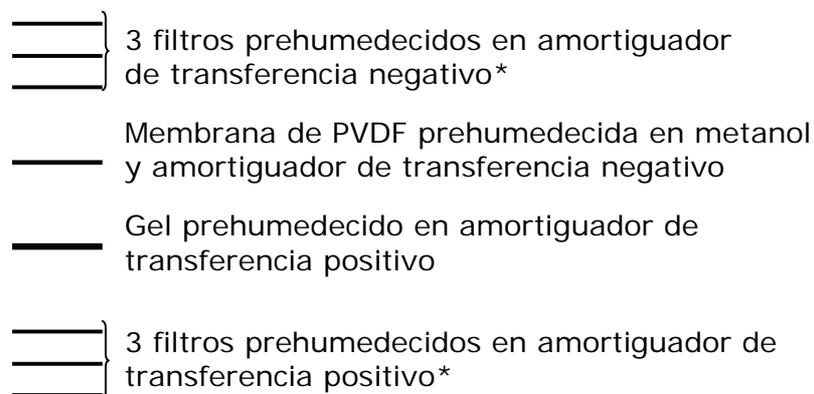


Figura 3. Esquema que explica el método de transferencia semi-seco.

6. Transferir 2 hr. a 1.5 mA/cm^2 .
7. La membrana con las proteínas se bloquea toda la noche a 4°C o 2 hrs a temperatura ambiente con solución de bloqueo*.
8. Incubar la membrana con solución de réplica*, y el anticuerpo anti-HA* acoplado a peroxidasa de rábano, durante 1 hora a temperatura ambiente.
9. Lavar la membrana con solución de lavado* por 10 minutos, repetir el lavado 2 veces más.
10. Revelar la presencia del anticuerpo unido a la proteína Cox1p-3xHA siguiendo las indicaciones del kit ECL (Amersham).
11. Tomar autoradiografía con la película BioMAX Light Film (Kodak) exponiendo durante 5 seg.
12. Eliminar el anticuerpo unido a las proteínas de la membrana incubando con la solución de eliminación* de anticuerpo por 30 minutos a 50°C .
13. Bloquear nuevamente con la solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C .
14. Incubar la membrana con la solución de bloqueo, la cual contiene el anticuerpo contra CS (citrato sintasa), durante 1 hora a temperatura ambiente.
15. Lavar la membrana con solución de lavado por 10 minutos, repetir el lavado 2 veces más.
16. Incubar la membrana con la solución de réplica la cual contiene el anticuerpo secundario anti-Conejo (Sigma) acoplado a peroxidasa de rábano, durante 1 hora a temperatura ambiente.
17. Lavar la membrana con solución de lavado por 10 minutos, repetir el lavado 2 veces más.
18. Revelar la presencia del anticuerpo siguiendo las indicaciones del kit ECL (Amersham).
19. Tomar autoradiografía con la película BioMAX Light Film (Kodak), exponiendo durante 90 segundos.

20. Repetir con los anticuerpos necesarios.

| Anticuerpo | Concentración | Anticuerpo secundario |
|----------------------------|---------------|-----------------------|
| α CS | 1:1000 | α Conejo |
| α Conejo-Peroxidasa | 1:3000 | - |
| α Cox2p | 1:500 | α RatónP |
| α Cox3p | 1:500 | α RatónP |
| α Ratón-Peroxidasa | 1:3000 | - |
| α Cox1p | 1:200 | α RatónP |
| α HA-Peroxidasa | 1:500 | - |

Tabla 2. Anticuerpos empleados en el Western. Se especifica la dilución empleada y el anticuerpo secundario.

Oximetría (Estabrook, 1997)

El consumo de oxígeno se midió con un electrodo tipo Clark inmerso en una cámara con agitación y temperatura regulada. El electrodo se conectó a un oxímetro YSI-5300.

Los valores del control respiratorio (C.R.) se obtuvieron calculando el cociente de la velocidad de consumo de oxígeno en estado III sobre el estado IV.

Para cuantificar la actividad de toda la cadena respiratoria.

1. Preparar una solución con magnesio*, etanol*, fosfato* y potasio*.
2. Aforar a 1.5 ml con amortiguador SH*.
3. Agregar 0.25 mg/ml de proteína de la cepa correspondiente.
4. Medir por 4 minutos.

5. Agregar ADP* para medir el acoplamiento.

Para cuantificar la actividad de la COX.

1. Prepara una solución con magnesio*, fosfato*, calcio*, TMPD*, ascorbato*, antimicina*
2. Aforar a 1.5 ml con amortiguador SH*.
3. Agregar 0.25 mg/ml de la cepa correspondiente.
4. Medir por 4 minutos.
5. Agregar cianuro de potasio*.

Espectro UV-visible

1. Tomar los microlitros necesarios de mitocondrias para tener una concentración de 5 mg/ml de proteína.
2. Centrifugar a 4 °C, 10 minutos 14 k rpm para obtener mitocondrias en el botón.
3. Resuspender con punta cortada en 1 ml de amortiguador de solubilización*.
4. Incubar en hielo 10 minutos.
5. Centrifugar a 4 °C, 10 minutos 14 k rpm y tomar sobrenadante.
6. Hacer por duplicado las muestras.

Para realizar el espectro uv visible de las mitocondrias se utilizó el espectrofotómetro de doble haz (modo dual amminco DW 2000):

1. Agitar en vortex las muestras.
2. Colocar un ml en cada una de las celdas
3. Leer de 400-650 nm

4. Agregar ditionita (punta de espátula) a la celda que se encuentra en la ranura **S** del espectro. Invertir dos veces.
5. Leer de 400-650 nm

Síntesis in organelo (Modificado de Herrmann y col., 1994; McKee y Poyton, 1984)

1. Preparar 1 ml de amortiguador 1.5X IOTL* a 4 °C.
2. Preparar mitocondrias (10 mg/ml) en amortiguador SH.
3. Agregar 22 µl de amortiguador 1.5X IOTL a 10 µl de mitocondrias (10 mg/ml). Resuspender suavemente. Incubar 5 minutos a 30 °C.
4. Agregar 2 µl de ³⁵S-Met (5 µCi/ µl). Incubar 30 minutos a 30 °C.
5. Agregar 1 ml de amortiguador SH a 4 °C.
6. Centrifugar 10 minutos a 14 K rpm, 4 °C. Eliminar todo el sobrenadante.
7. Resuspender el botón en 64 µl de amortiguador de carga 1X*
8. Agitar en vortex 1 minuto a temperatura ambiente.
9. Cargar 16 µl de cada muestra en un gel de poliacrilamida (30 %/ 0.15 %)*. Guardar el resto a -70 °C. Cargar 4 µl de marcador de pesos moleculares.
10. Correr a 25-27 mA constantes por 3.5 hrs.
11. Transferir el gel a membrana de nitrocelulosa (Protran BioScience) 2 hrs. a 1.5 mA/cm². Utilizar amortiguador de corrida* 1x con metanol al 20%.

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfieren mediante un método semi-seco, de la siguiente manera:

-  } 3 filtros prehumedecidos en amortiguador de corrida 1x con metanol al 20 %
-  Membrana de nitrocelulosa prehumedecida en amortiguador de transferencia 1x con metanol al 20%
-  Gel prehumedecido en amortiguador de transferencia 1x con metanol al 20 %
-  } 3 filtros prehumedecidos en amortiguador de corrida 1x con metanol al 20 %

12. Secar la membrana perfectamente bien.
13. Exponer 6-12 hrs. en pantalla de fósforo.
14. Revelar la señal en el Typhoon 8600 (Molecular Dynamics)

Inmunoprecipitación

Preparación de perlas de proteína A sefarosa sólidas (Amersham).
Todo a 4 °C y con la punta de la pipeta cortada.

1. Pesar 0.1 g de perlas y agregarles 1.5 ml de agua estéril a 4 °C.
2. Agitar en incubadora giratoria 5 minutos a 4 °C.
3. Centrifugar a 2.2 K rpm, 1 minuto a 4 °C.
4. Eliminar sobrenadante.
5. Repetir lavado 3 veces más.
6. Agregar 500 µl de etanol al 20%, 4 °C.
7. Guardar a 4 °C.

Solubilización de mitocondrias.

1. Tomar 25 µg de mitocondrias de cada cepa y agregar 20 µl de amortiguador de carga 1X* de geles. Apartar. Esta será la fracción total.
2. Tomar 250 µg de mitocondrias de cada cepa.
3. Centrifugar 1 minuto, 14 K rpm 4 °C.
4. Resuspender suavemente con punta cortada en 1 ml de amortiguador de lisis*
5. Incubar 15 minutos, 4 °C. Mezclar por inversión a los 7.5 minutos.
6. Centrifugar 10 minutos 14K rpm, 4 °C.
7. Tomar el sobrenadante en un tubo Eppendorf frío y agregar 20 µl de PAS sin acoplar.
8. Incubar 5 minutos, 4 °C, en incubadora giratoria.
9. Centrifugar 4K rpm 1 minuto, 4 °C.

10. Tomar el sobrenadante en un tubo Eppendorf frío y agregar 30 μ l de PAS acopladas a antiHA de rata. (Ver protocolo de acoplamiento de antiHA a perlas mas adelante)
11. Mezclar por inversión y mezclar en incubadora giratoria por 2 hrs. 4 °C.
12. Lavar con 500 μ l de amortiguador de lisis, para ello invertir 5 veces, y centrifugar 2.2 K rpm, 30 segundos, 4°C. Repetir una vez más.
13. Lavar con un 1 ml de Tris 20 mM pH 7.4, para ello invertir 5 veces, y centrifugar 2.2 K rpm, 30 segundos, 4°C. Repetir una vez más pero centrifugar 4 K rpm, 1 minuto.
14. Eliminar todo el sobrenadante.
15. Agregar 20 μ l de solución de carga Lammeli.
16. Vortex a temperatura ambiente 10 minutos.
17. Centrifugar 14 K rpm, 1 minuto.
18. Tomar sobrenadante con microjeringa y cargar en gel SDS-PAGE (30 %/ 0.15 %)*. Cargar 4 μ l de marcador de pesos moleculares.
19. Correr a 25-27 mA constantes en amortiguador de electroforesis 1x.
20. Teñir el gel con azul de Coomasie.

Acoplamiento de antiHA de rata a perlas de proteína A sefarosa (PAS).

Todo a 4 °C y con la punta de la pipeta cortada.

21. Tomar 50 μ l de perlas preparadas por cada muestra.
22. Lavar con 1 ml de Tris 20 mM pH 7.4, 4 °C. Para ello:
 - Invertir 5 veces.
 - Centrifugar a 2.2 K rpm, 30 segundos a 4 °C.
 - Eliminar sobrenadante
23. Repetir lavado 2 veces más.

24. Llevar al volumen inicial de perlas con Tris 20 mM pH: 7.4, 4 °C. Apartar 20 µL por cada muestra.
25. Al resto agregar 0.25 µl de antiHA rata (ROCHE, monoclonal clona 3F10) por cada µl de perlas. Mezclar por inversión.
26. Mezclar en incubadora giratoria 1-2 hrs. 4 °C.

Tinción con azul de Coomassie

1. Eliminar el gel sobrante. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente en solución fijadora* en recipiente de plástico. En agitación.
2. Incubar el gel toda la noche a temperatura ambiente en solución teñidora*. En agitación.
3. Incubar el gel toda la noche a temperatura ambiente en solución desteñidora*. En agitación.

Resultados

El crecimiento de la cepa XPM211 no se afecta por la presencia del epítipo 3xHA fusionado al extremo carboxilo terminal de Cox1p.

Para verificar que la presencia del 3xHA en Cox1p no afecta la actividad de la COX se realizaron diluciones seriadas de las cepas XPM201 y XPM211 en medio YPAEG y YPAD a distintas temperaturas (25 °C, 30 °C Y 37 °C) y se dejaron crecer por cuatro días. YPAEG es un medio no fermentable etanol/glicerol, por lo que sólo aquellas cepas capaces de respirar crecen (Figura 1).

No se presentan diferencias de crecimiento en medio YPAD o YPAEG, entre la cepa que presenta el triple epítipo de hemaglutinina en el extremo carboxilo de Cox1p (XPM211) y la que no lo presenta (XPM201). Esto se observa a tres temperaturas distintas.

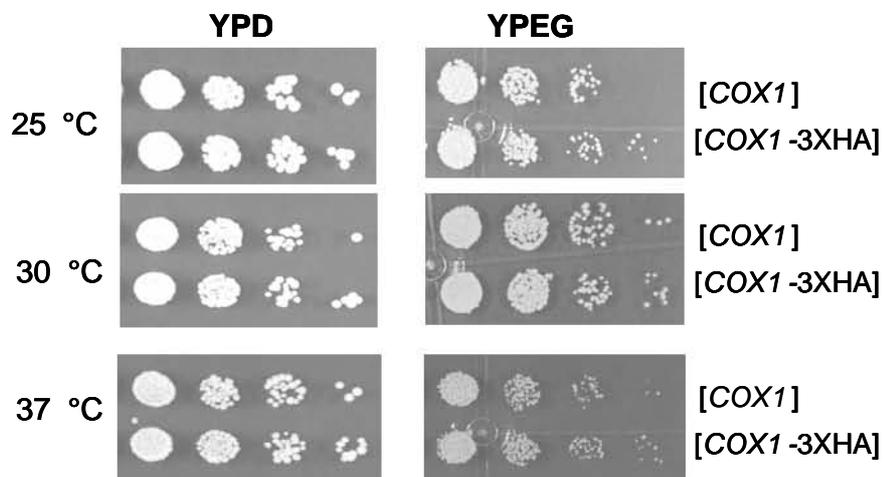


Fig. 1. Diluciones seriadas de las cepas XPM201 y XPM211 en medio YPAD y YPAEG crecidas a distintas temperaturas por cuatro días.

La acumulación del hemo a entre la cepa silvestre y la cepa con el 3xHA en Cox1p es similar.

El hemo a es uno de los grupos prostéticos de la citocromo c oxidasa, y se encuentra en Cox1p. Para comprobar que el triple epítoto de hemaglutinina en Cox1p no afecta la inserción del hemo a en Cox1p, se elaboró un espectro uv-visible desde 400 nm a 650 nm, en las cepas XPM201 y XPM211. Las mitocondrias se solubilizaron con Tritón-X100, y se redujeron con ditionita. La concentración de hemo a se obtuvo con el $\Delta\epsilon_{630-605} = 16.5$ (Griffiths y Wharton. 1961).

Se encontró que la concentración de hemo a no se ve modificada en la cepa con el 3xHA en Cox1p (0.116 nmoles/mg) con respecto a XPM201 (0.119 nmoles/mg).

Las bandas correspondientes al pico γ (430 nm) del citocromo b , al pico α (560 nm) del citocromo b y al pico α del citocromo c_1 (550 nm) son identificables en ambas cepas (Figura 2).

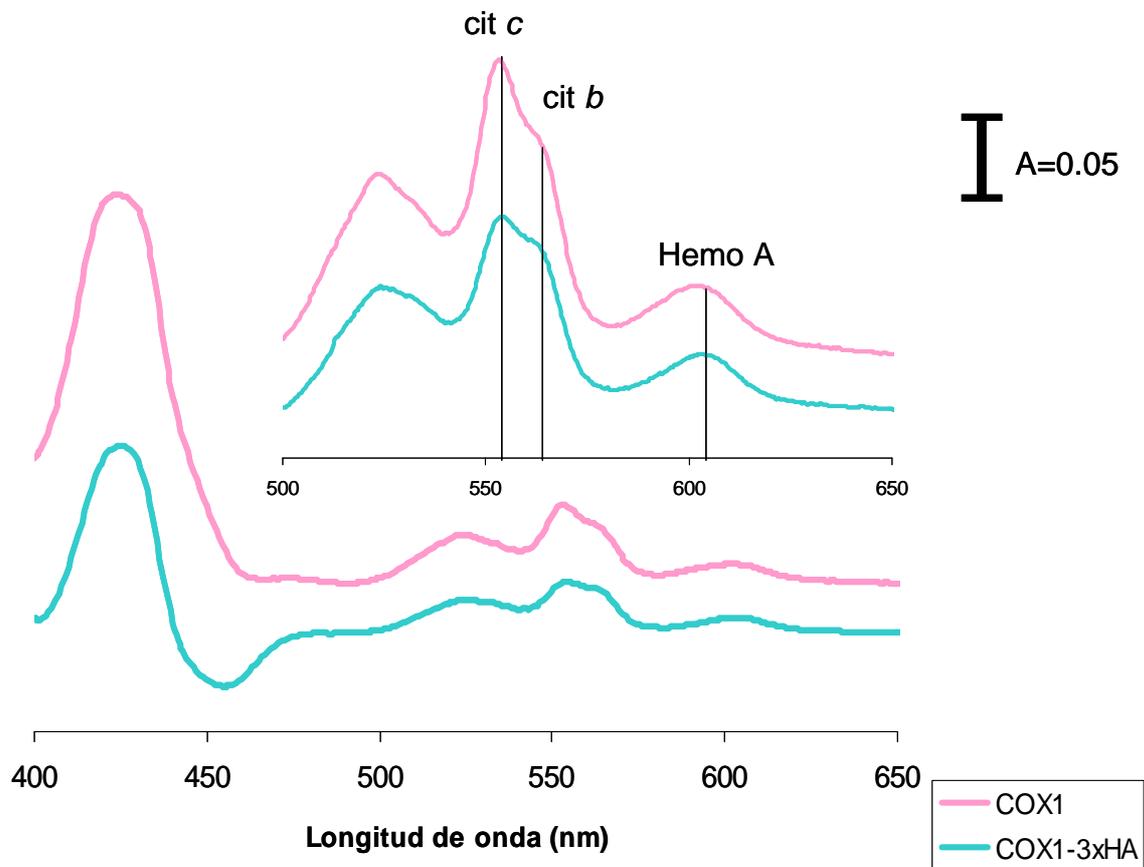


Fig. 2. Patrón espectral de las cepas XPM211 y XPM201. El espectro se realizó con 5 mg/ml de mitocondrias. Las mitocondrias se redujeron con ditionita. En la parte superior de figura se muestra un zoom de los 500 nm a los 650 nm.

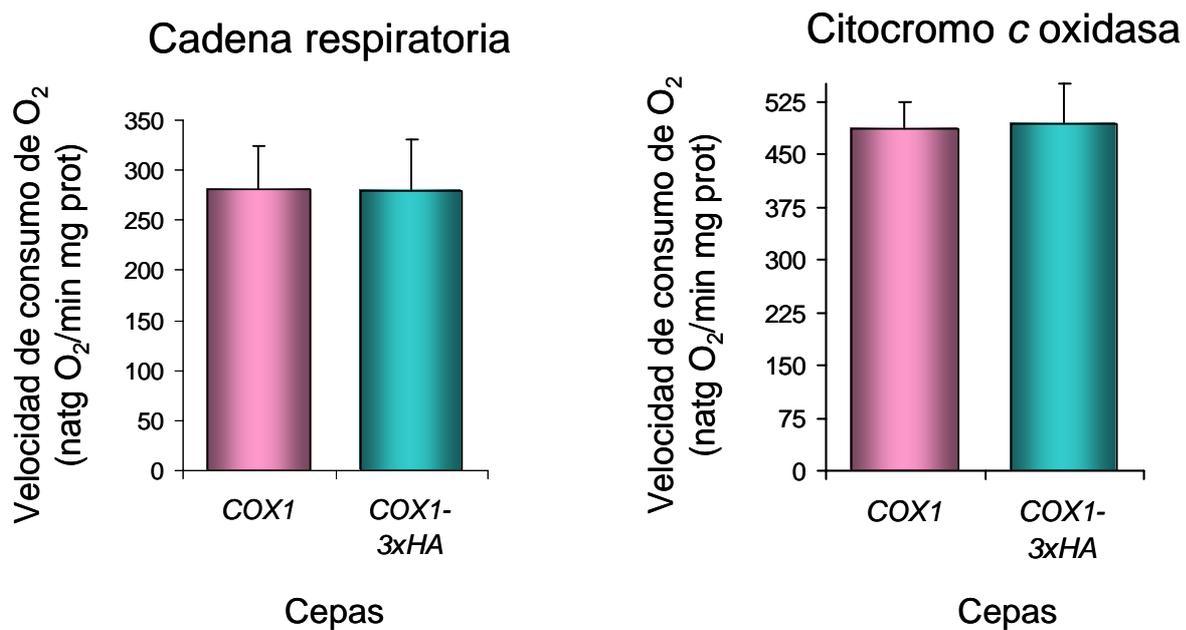
La función de la citocromo c oxidasa no se altera por la presencia del 3xHA en Cox1p.

Se comprobó que la capacidad respiratoria de la cepa XPM211 no se ve afectada por la presencia del triple epítoto de hemaglutinina en Cox1p, se midió la velocidad de consumo de oxígeno en toda la cadena respiratoria y únicamente en la COX. Para medir la actividad de toda la cadena respiratoria se utilizó etanol como sustrato. Para medir la actividad de la COX, se bloqueó al complejo III con antimicina; como donador de electrones se utilizó

TMPD/Ascorbato y cianuro de potasio como inhibidor de la COX. También se obtuvieron los valores de control respiratorio midiendo el acoplamiento con ADP.

Se encontró que la velocidad de consumo de oxígeno en toda la cadena respiratoria, con etanol como sustrato es similar entre la cepa wt silvestre y la cepa con el 3xHA en Cox1p (Figura 3A). Se observó que ambas están acopladas. El valor del control respiratorio (C.R.) en XPM201 fue de 1.69, y en XPM211 de 1.63 (Figura 3B).

A



B

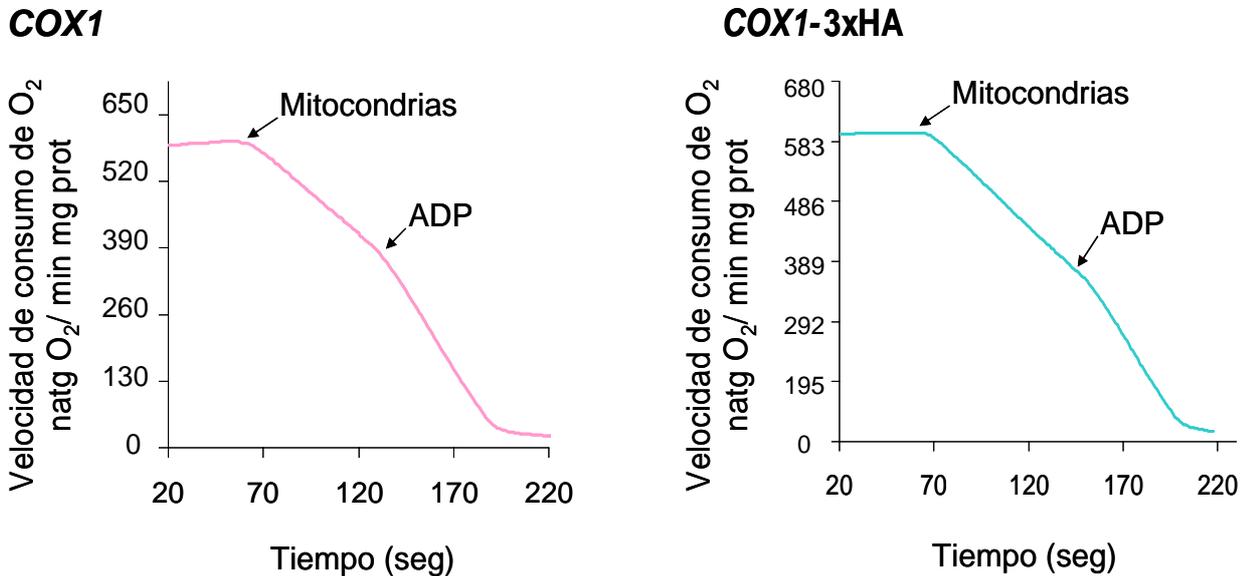


Figura 3. A) Oximetrías: Velocidad de consumo de oxígeno para toda la cadena respiratoria y para la citocromo *c* oxidasa en XPM201 y XPM211. B) Acoplamiento: Cambio en la velocidad de consumo de oxígeno debido a la adición de ADP.

Cox1p-3XHA es detectable con eficiencia mediante el anticuerpo antiHA.

Se realizó un Western blot para detectar la presencia de Cox1p en XPM211 (*COX1-3xHA*).

Para ello se utilizó un anticuerpo antiHA acoplado a peroxidasa de rábano (Roche Biochemicals). Como control de carga se empleó un anticuerpo anticitrato sintasa, ya que la citrato sintasa es una proteína soluble de la matriz mitocondrial. El control negativo es XPM201 (*COX1*) y por tanto no se detecta la señal de Cox1p. Dado que XPM211 presenta el triple epítotope de hemaglutinina en el extremo carboxilo de Cox1p fue posible detectarla claramente con un peso molecular de 59 kDa, lo cual corresponde al peso molecular esperado (58.8 kDa)(Figura 4).

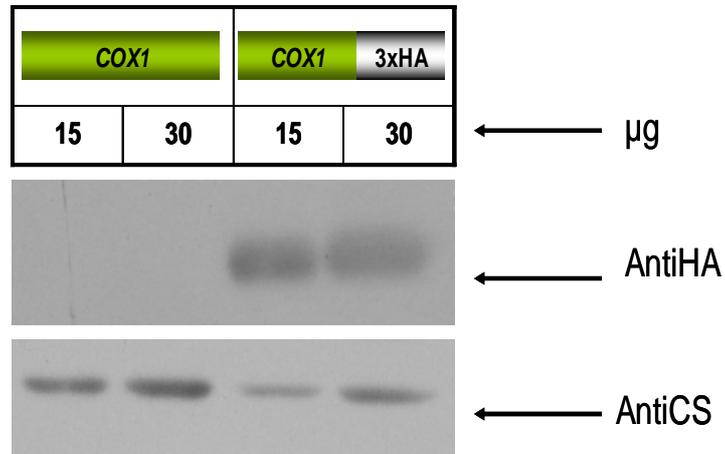


Figura 4. Gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) y Western blot. Se cargaron mitocondrias crudas de XPM201 y XPM211. Se cargaron 15 y 30 μg de proteína mitocondrial. Control de carga CS: Citrato sintasa.

Hasta este punto del trabajo, podemos concluir que la presencia del triple epítotope de hemaglutinina en el extremo carboxilo de Cox1p, no afecta la actividad de la citocromo *c* oxidasa. Y que el triple epítotope de hemaglutinina en Cox1p, funciona, ya que es posible detectar de manera eficiente a Cox1p.

Generación de mutantes nulas de *shy1* y *cox14*.

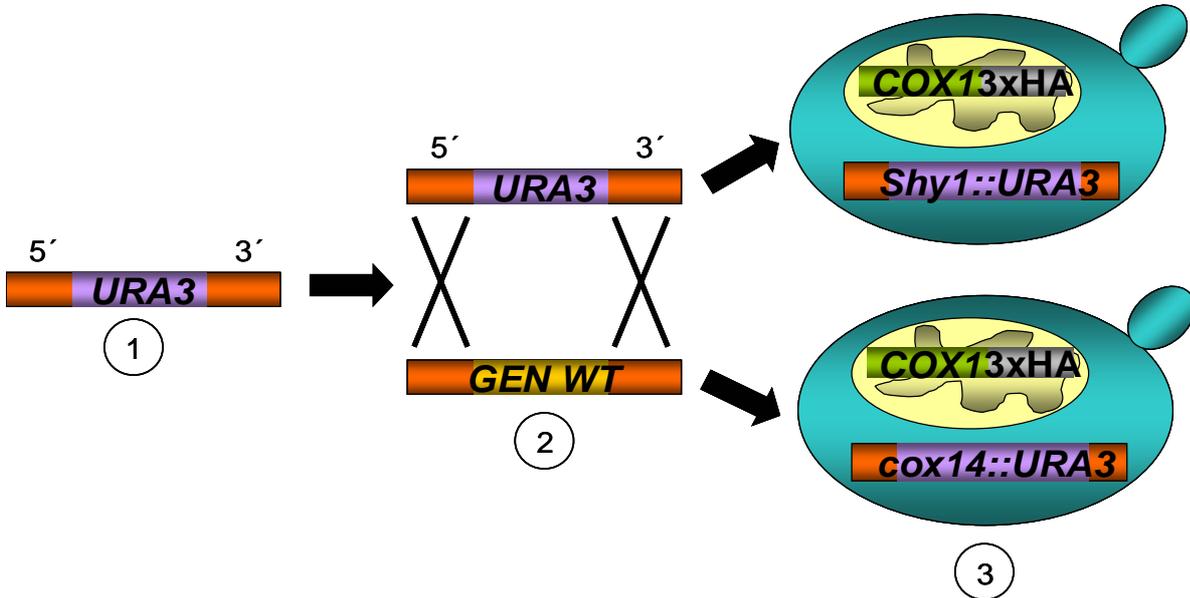


Figura 5. Esquema que muestra el mecanismo de recombinación homóloga mediante el cual se generaron las mutantes nulas de *shy1* $\Delta::URA3$ [$p+$, *COX1-3XHA*] y *cox14* $\Delta::URA3$ [$p+$, *COX1-3XHA*]. 1) Amplificación por PCR del casete de interés con los extremos 5'UTR y 3'UTR del gen a mutar. 2) Transformación de la cepa de interés con el casete. El casete se insertará en el genoma de la cepa silvestre por recombinación homóloga. 3) Crecimiento en un medio $-URA$ para seleccionar colonias transformadas.

Generación del casete *shy1Δ::URA3* y detección de mutantes nulas.

Para obtener el casete *shy1Δ::URA3*, se extrajo DNA total de la cepa XPM60, la cual contiene al casete *shy1Δ::URA3*. Se realizó un PCR con los oligonucleótidos SHY1F1*(236 nt río arriba del codón de inicio de SHY1) Y SHY1R1*(325 nt río abajo del codón de término de SHY1). Estos oligonucleótidos amplifican 236 nt río arriba y 325 nt río abajo, respectivamente sobre la secuencia no traducida del gen de *SHY1*. El tamaño del casete obtenido es de 1.6 Kb (Figura 6A)

Se transformaron las cepas XPM201 y XPM211 con este DNA (Figura 6B). Para comprobar que las cepas transformantes contuvieran el casete *shy1Δ::URA3* en la posición correcta dentro del genoma nuclear se realizó un PCR con DNA de distintas colonias transformantes, los oligonucleótido empleados fueron URA3F1*(300 nt río arriba del codón de inicio de URA3) y SHY1R1*. Aquellas cepas que no contengan al casete *shy1Δ::URA3* no podrán ser detectadas en el gel de agarosa ya que el oligonucleótido URA3F1 amplifica sobre el gen *URA3*. Las cepas que contienen el casete *shy1Δ::URA3* presentan un tamaño de 1.5 kb (Figura 6C).

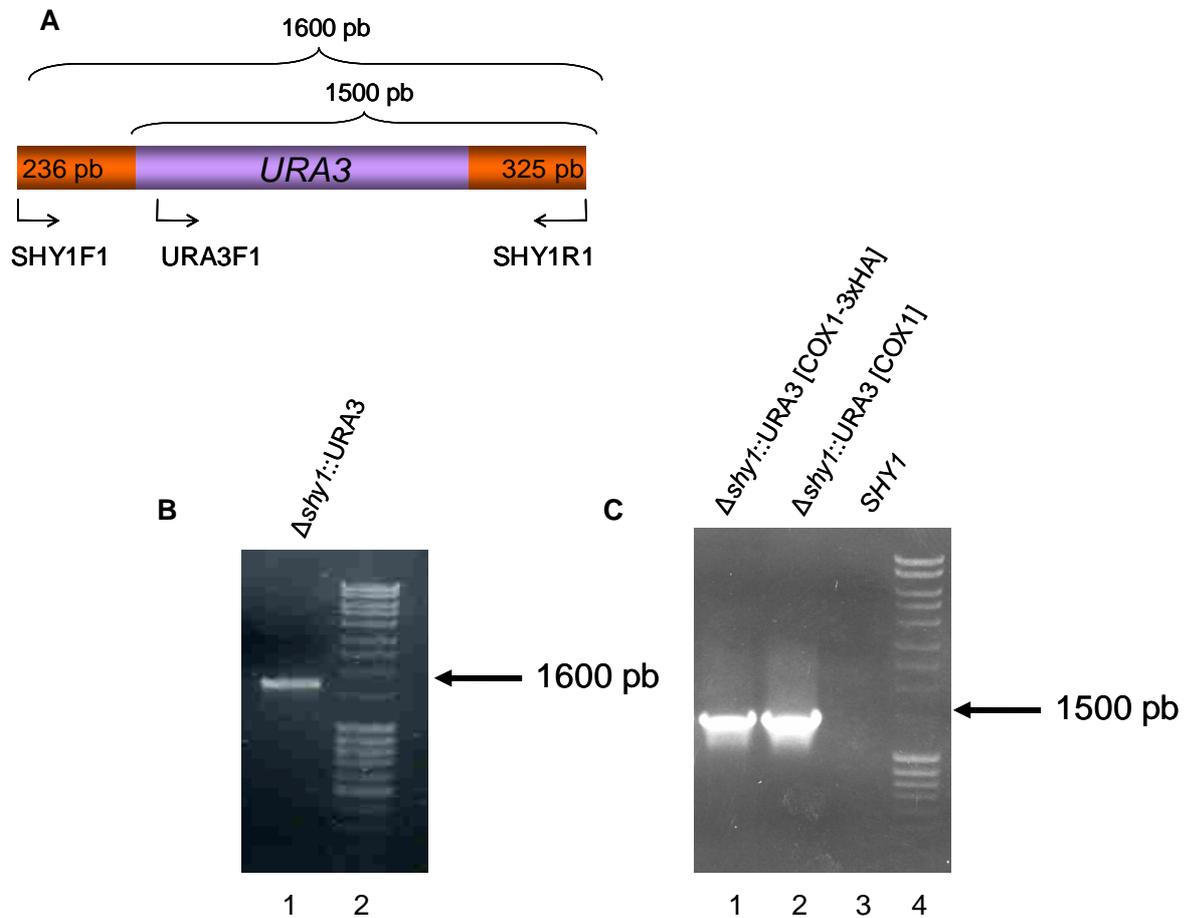


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa. A) Esquema que muestra donde amplifican los oligonucleótidos empleados para la obtención del casete y para la detección de las cepas transformantes. B) Producto de PCR con DNA total de XPM60 empleando a los oligonucleótidos SHY1F1 y SHY1R1 C) Producto de PCR con DNA total de las cepas transformadas con el casete *shy1-delta::URA3*. Como control negativo se utilizó DNA total de la cepa XPM211 (carril 3).

Las mutantes nulas de *shy1* respiran parcialmente.

Para identificar el fenotipo de las cepas transformantes de $\Delta shy1$ se realizaron diluciones seriadas a distintas temperaturas en medio YPAD y medio no fermentable etanol-glicerol. Las cepas mutantes de $\Delta shy1$ crecen

parcialmente en un medio no fermentable como el YPEG. No se observan diferencias en el crecimiento entre las cepas que presentan el 3xHA en el extremo carboxilo de Cox1p (OZ1 y XPM211) y las que no lo presentan (OZ2 y XPM201) (Figura 7). Tampoco se observó sensibilidad a la temperatura.

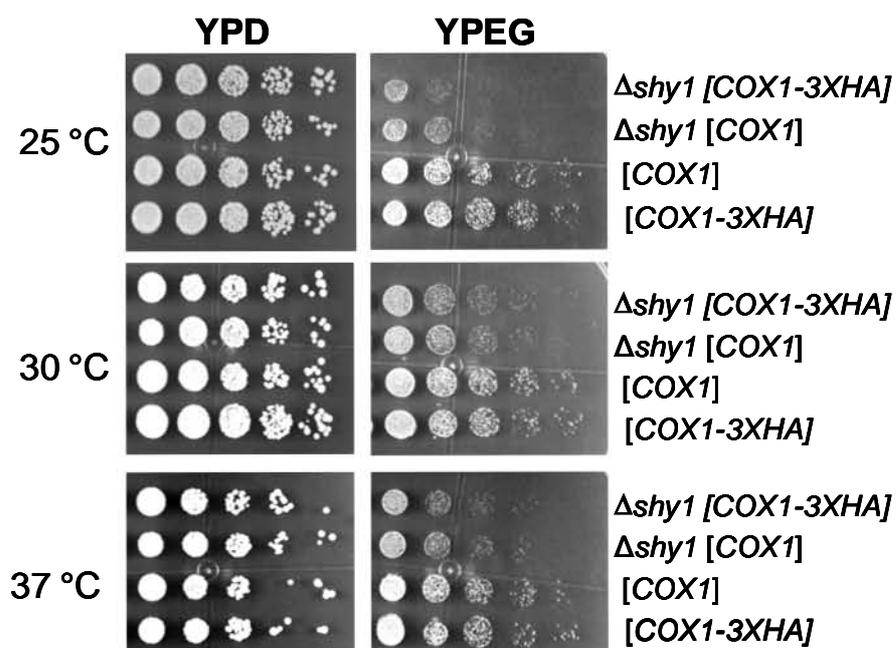


Figura 7. Diluciones seriadas de las cepas OZ1: *shy1-delta::URA3* [*p*⁺, *COX1-3XHA*], OZ2: *shy1-delta::URA3* [*p*⁺, *COX1* (delta I)], XPM201 [*p*⁺, *COX1* (delta I)], y XPM211 [*p*⁺, *COX1-3XHA*], a diferentes temperaturas en medio YPAD y YPAEG, crecidas por 4 días.

Generación del casete *cox14Δ::URA3* y detección de mutantes nulas.

Para obtener el casete *cox14Δ::URA3*, se extrajo DNA total de la cepa AFC115a, la cual es mutante nula de *COX14*. Se realizó un PCR con los oligonucleótidos COX14F1* y COX14R1*. Estos oligonucleótidos amplifican 380 nt río arriba y 300 nt río abajo, respectivamente sobre la secuencia no traducida del gen de *COX14*. De esta manera se genera un casete en donde el gen de *URA3* se encuentra flanqueado por aproximadamente 350 nt de la

secuencia no traducida de *COX14*. El tamaño del casete obtenido es de 1.6 Kb (Figura 8A).

Se transformaron las cepas XPM201 y XPM211 con este casete (Figura 8B). Para comprobar que las cepas transformantes contuvieran el casete *cox14-delta::URA3* en la posición correcta dentro del genoma nuclear se realizó un PCR con DNA de distintas colonias transformantes, los oligonucleótidos empleados fueron COX14F1* y COX14R1*. Las cepas que contienen el casete *cox14Δ::URA3* presentan un tamaño de 1.6 kb contrario a una cepa silvestre que presenta un tamaño de 0.9 kb debido a que el gen de *COX14* es más pequeño que el de *URA3* (Figura 8C).

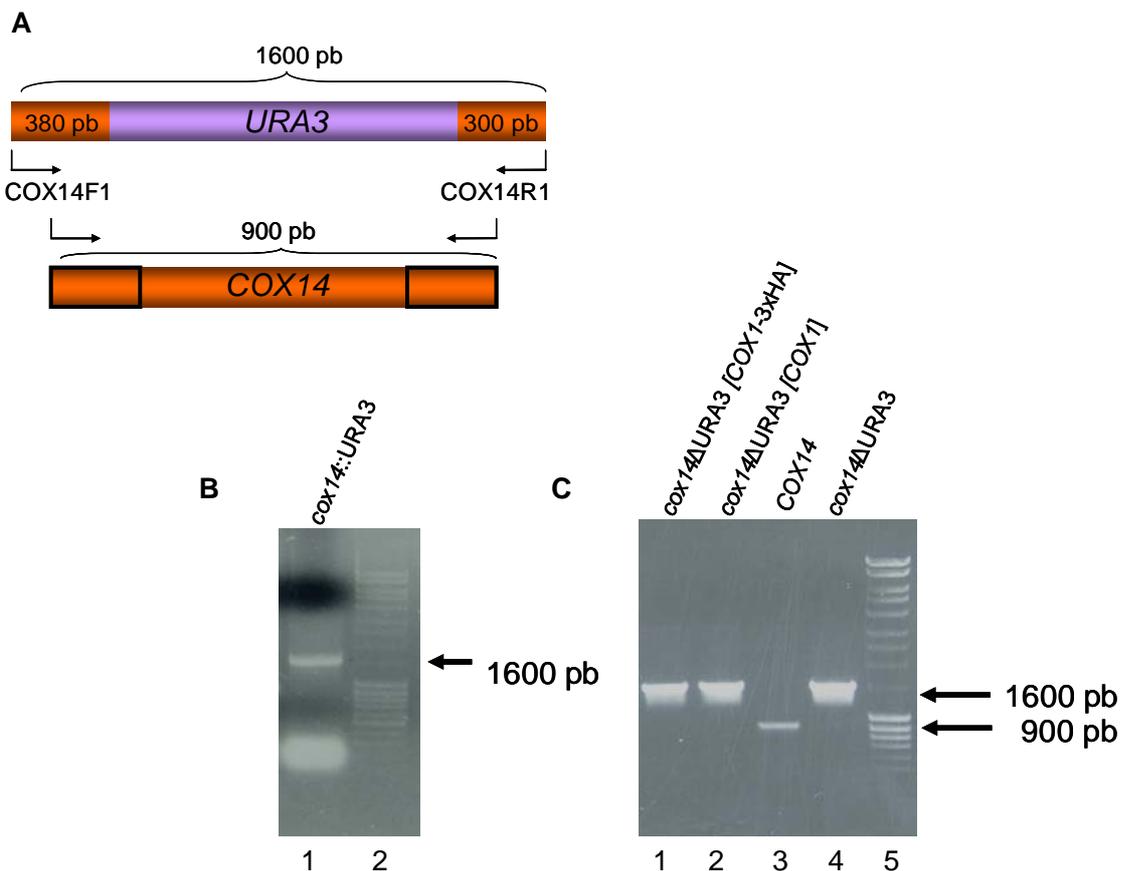


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa. A) Esquema que muestra donde amplifican los oligonucleótidos empleados para la obtención del casete y para la detección de las cepas transformantes. B) Producto de PCR con células totales de la cepa AFC115a. C) Producto de PCR con DNA total de las

cepas transformadas con el casete *cox14-delta::URA3*. Como control negativo se utilizó DNA total de la cepa XPM211 (carril 3) y como control positivo DNA total de la cepa AFC115a (carril 4).

Las mutantes nulas de *cox14* no respiran.

Para identificar el fenotipo de las cepas $\Delta cox14$ se realizaron diluciones seriadas a distintas temperaturas en medio YPAD y medio no fermentable de etanol-glicerol (Figura 9). Las cepas mutantes $\Delta cox14$ son incapaces de respirar, ya que no crecen en un medio fermentable como el YPEAG. No se observan diferencias en el crecimiento entre las cepas que presentan el 3xHA en el extremo carboxilo de Cox1p (OZ3 y XPM211) y las que no lo presentan (OZ4 y XPM201). Tampoco se observó sensibilidad a la temperatura (Figura 9).

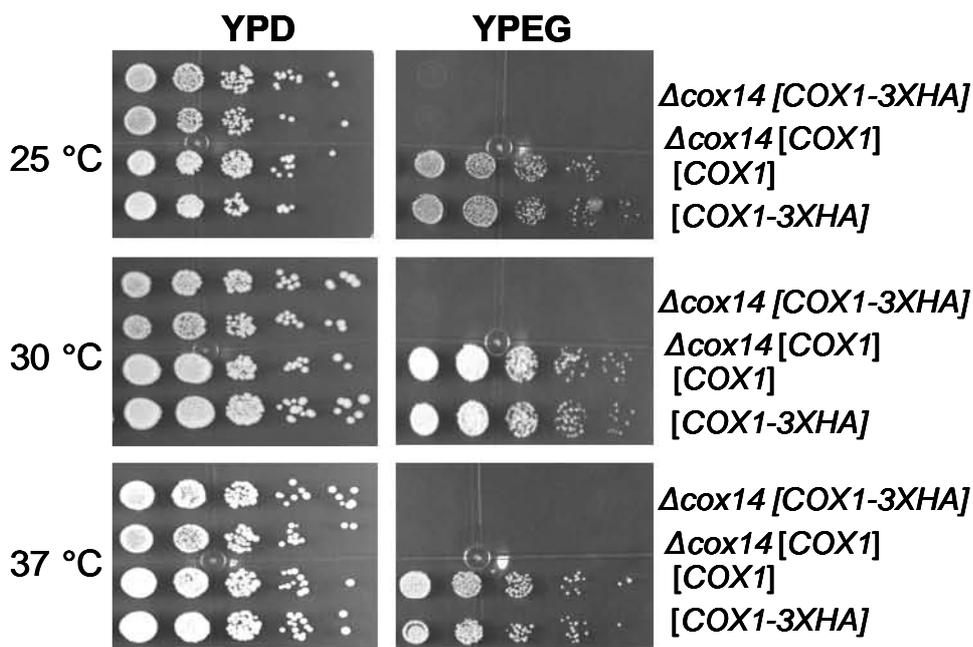


Figura 9. Diluciones seriadas de las cepas *cox14-delta::URA3* [$p+$, *COX1-3XHA*], OZ2: *cox14-delta::URA3* [$p+$, *COX1* (delta I)], XPM201 [$p+$, *COX1* (delta I)], y XPM211 [$p+$, *COX1-3XHA*] en medio YPD y YPEG a distintas temperaturas, crecidas por 4 días.

Las cepas transformantes en *cox14Δ::URA3* contienen DNA mitocondrial

Para verificar que el fenotipo no respiratorio observado en las mutantes nulas $\Delta cox14$ se debe a la mutación y no a que las cepas hayan perdido su DNA mitocondrial, se realizaron réplicas en terciopelo con distintos céspedes.

Tanto las cepas transformantes como el control crecen en YPAD ya que es un medio rico que no genera ninguna presión de selección. Dado que las colonias transformantes son mutantes nulas del gen *cox14* no son capaces de crecer en YPAEG. Se realizó un apareamiento de las cepas mutantes con la cepa AFC115a (*cox14Δ::URA3*) a través de una réplica en una caja de YPAD con un césped de AFC115a. Dado que las cepas transformantes también presentan el casete *cox14Δ::URA3* no hay complementación al aparearse y por tanto los diploides siguen siendo incapaces de crecer en YPAEG. Se realizó un césped con la cepa NB40-3c [ρ^0] (una cepa ρ^0 es aquella que no contiene DNA mitocondrial) y sobre éste se hizo una réplica de las cepas transformantes. Dado que las cepas transformantes presentan el casete *cox14Δ::URA3* y son $\rho+$, y NB40-3c [ρ^0] presenta al gen *COX14* entonces si hay complementación al aparearse y por tanto los diploides son capaces de crecer en YPAEG al igual que XPM211 (Figura 10).

De esta manera se comprobó que la incapacidad respiratoria de las mutantes en $\Delta cox14$ se debe a la mutación y no a la ausencia de DNA mitocondrial.

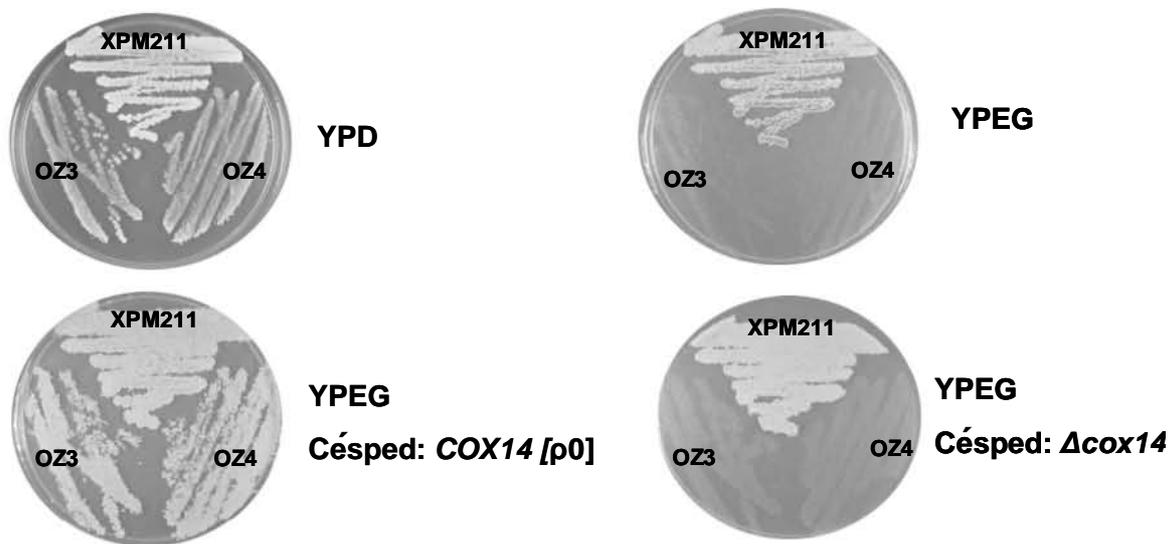


Figura 10. Fenotipo de las cepas transformantes de XPM201 y XPM211 con el casete *cox14Δ::URA3*.

La acumulación del hemo α disminuye en ambas cepas mutantes.

Para identificar el patrón espectral de las cepas mutantes se realizó un espectro entre los 400-650 nm de la luz visible en el espectrofotómetro de doble haz en las cepas XPM211 (*COX1-3xHA*) wt, OZ1 (Δ *shy1*) y OZ3 (Δ *cox14*). Las mitocondrias se solubilizaron con Tritón-X100, y se redujeron con ditionita. La concentración de hemo α se obtuvo con el $\Delta\epsilon_{630-605} = 16.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Griffiths y Wharton, 1961) (Figura 11).

El patrón espectral de las cepas mutantes muestra que los citocromo *b* y *c* se encuentran presentes a los 565 y 555 nm respectivamente. Se observa un aumento en la concentración del citocromo *c* en las mutantes con respecto al silvestre. Éste es un patrón espectral típico de mutantes con deficiencias en la COX (Mashkevich y col. 1997, Glerum y col. 1994). El hemo α de la COX se detecta en la mutante Δ *shy1* a los 605 nm, mientras que en la mutante Δ *cox14* no se puede observar el pico correspondiente. La concentración de

hemo *a* en la mutante $\Delta shy1$ es de 0.055 nmoles/mg de proteína, mientras que en XPM211 es de 0.116 nmoles/mg, lo cual indica una reducción de aproximadamente un 53 % en la acumulación de hemo *a*.

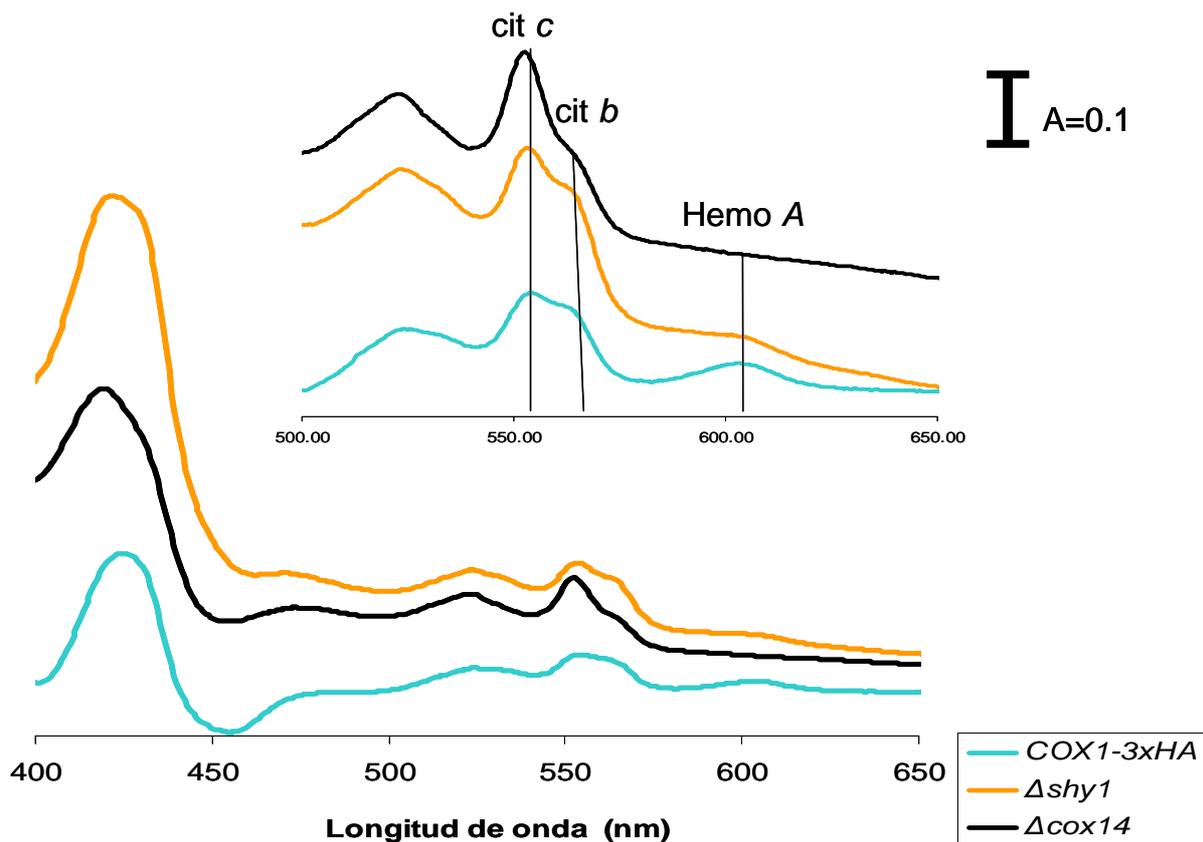


Fig. 11. Patrón espectral de mitocondrias de las cepas mutantes $\Delta shy1$ y $\Delta cox14$, como control positivo se utilizó a la cepa wt: XPM211($COX1-3xHA$). En la parte superior de figura se muestra un zoom de los 500 nm a los 650 nm.

La velocidad de consumo de oxígeno en las cepas mutantes se ve disminuida.

Para detectar qué efectos tienen los genes *SHY1* y *COX14* sobre la capacidad respiratoria de la levadura se analizó la velocidad de consumo de oxígeno en las cepas mutantes OZ1($\Delta shy1$) y OZ3($\Delta cox14$).

Se midió la velocidad de consumo de oxígeno de toda la cadena respiratoria y de la COX. Para medir la actividad de toda la cadena respiratoria se utilizó etanol como sustrato. Para medir la actividad de la COX, se bloqueó al complejo III con antimicina, como donador de electrones se utilizó TMPD/Ascorbato y como inhibidor de la COX, cianuro de potasio. También se midió el acoplamiento en ambas cepas mutantes, esto nos permite saber si la cadena respiratoria se encuentra acoplada a la síntesis de ATP.

Se encontró que la velocidad de consumo de oxígeno en toda la cadena y en la COX disminuye aproximadamente a la mitad en la mutante nula $\Delta shy1$, mientras que la mutante nula $\Delta cox14$, es totalmente incapaz de respirar. Ninguna de las dos cepas mutantes se encuentra acoplada a la síntesis de ATP, ya que una vez que se agregó ADP, la pendiente de velocidad de consumo de oxígeno no cambió.

Al agregar cianuro de potasio durante la medición de la actividad de la COX se observó que el consumo de oxígeno se hacía nulo, lo cual nos indica que la actividad de la citocromo *c* oxidasa es inhibida por el cianuro de potasio (Figura 12).

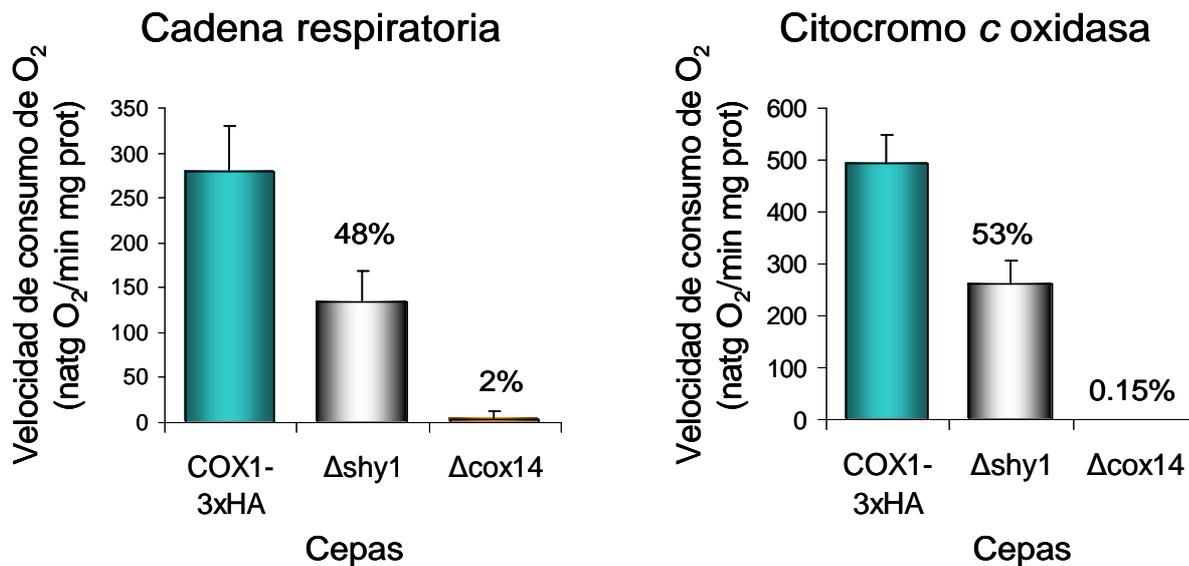


Figura 12. Oximetrías: Velocidad de consumo de oxígeno para toda la cadena respiratoria y para la citocromo *c* oxidasa en OZ1 ($\Delta shy1$) y OZ3 ($\Delta cox14$), como control se utilizó a la cepa wt: XPM211 (*COX1-3xHA*). Ambas cepas mutantes presentan *COX1-3xHA* en el genoma mitocondrial.

La acumulación de Cox1p, Cox2p y Cox3p varía entre las mutantes $\Delta shy1$ y $\Delta cox14$.

Se realizó un Western blot para detectar la presencia de Cox1p, Cox2p y Cox3p en ambas mutantes nulas.

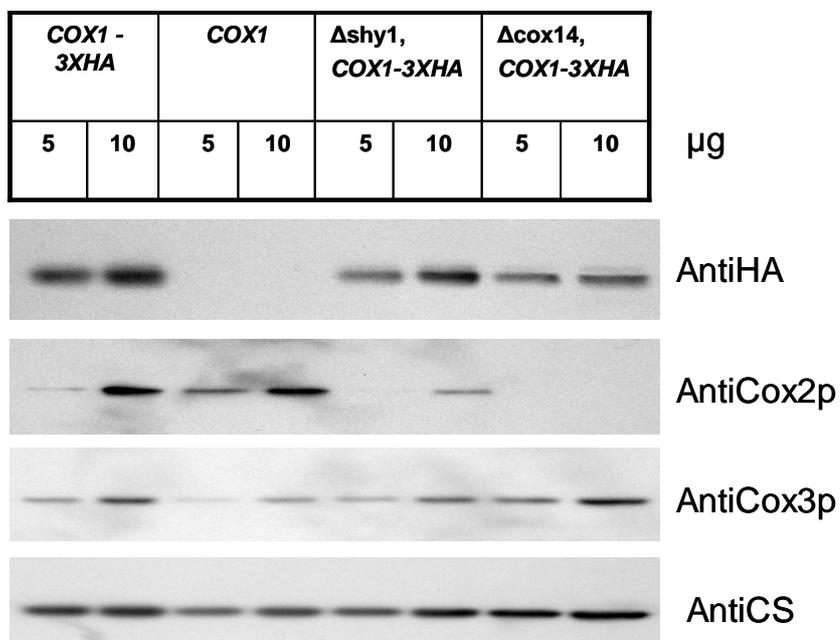
Para detectar a Cox1p se utilizó un anticuerpo antiHA acoplado a peroxidasa de rábano (Roche), para detectar a Cox2p y Cox3p se emplearon antiCox2p (Donado por el Dr. Thomas D. Fox) y antiCox3p (Molecular Probes), respectivamente. Como control de carga se empleó un anticuerpo anticitrato sintasa (Donado por el Dr. Thomas D. Fox), ya que la citrato sintasa es una proteína soluble de la matriz mitocondrial. Como control negativo se empleó XPM201 (*COX1*) y como control positivo a XPM211 (Cox1p-3xHA). Se reveló con el kit ECL (Amersham) (Figura 13A).

Para cuantificar la concentración de las subunidades mitocondriales se empleó el programa AlphaDigiDoc RT2, la concentración de cada subunidad se normalizó con respecto a la citrato sintasa, y luego se comparó con respecto a XPM211 (Figura 13B).

Se encontró que en la mutante nula $\Delta shy1$, Cox1p y Cox2p disminuyen en un 23% y 32% respectivamente, mientras que Cox3p aumentó en un 3%. En la mutante nula $\Delta cox14$, Cox1p disminuye en un 49%, y Cox2p en un 100%. Cox3p se incrementó en un 66%.

Con este experimento podemos concluir que ambas mutaciones provocan un fenotipo similar en la acumulación de las tres principales subunidades de la COX, pero que la mutante en $\Delta cox14$ genera un fenotipo más radical. Este fenotipo puede deberse a que la síntesis de las subunidades que forman el centro catalítico de la COX se ve afectada, o a que las subunidades sí se sintetizan pero son inestables y se degradan.

A



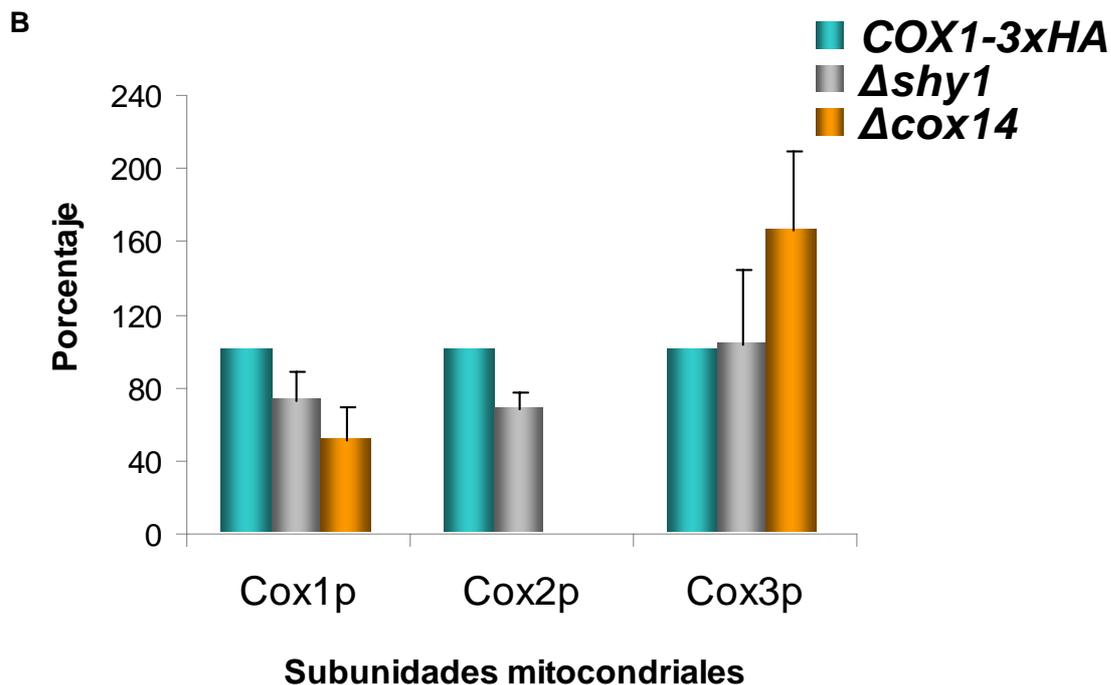


Fig. 13. A) Gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE), se cargaron 5 y 10 μL de mitocondrias de XPM201: [$\rho+$, *COX1* (delta I)], XPM211: [$\rho+$, *COX1-3XHA*], OZ1: *shy1-delta::URA3* [$\rho+$, *COX1-3XHA*] y OZ3: $\Delta\text{cox14-delta::URA3}$ [$\rho+$, *COX1-3XHA*] respectivamente. B) Gráfica que muestra la cuantificación de la acumulación estacionaria de Cox1p, Cox2p y Cox3p en Δshy1 y Δcox14 con respecto a XPM211.

La síntesis de proteínas codificadas por el DNA mitocondrial se afecta en las mutantes nulas Δshy1 y Δcox14 .

Para identificar qué genes mitocondriales se sintetizan en las cepas mutantes en Δshy1 y Δcox14 , se realizó un ensayo de síntesis in organelo. Para ello se incubaron mitocondrias de XPM211, XPM201, OZ1, OZ2, OZ3 y OZ4 con ^{35}S -Metionina por 30 minutos. Durante este tiempo se llevó a cabo la síntesis de proteínas en los ribosomas mitocondriales. Posteriormente se cargaron en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE, se transfirió a membrana de nitrocelulosa y la señal se reveló por autoradiografía (Figura 14).

Para cuantificar la cantidad de proteína sintetizada tanto en las cepas control (XPM211 y XPM201) como en las cepas mutantes (OZ1 y OZ3), se normalizó con un Western blot realizado sobre la misma membrana con la citrato sintasa (como control de carga) (Figura 15A y B).

Encontramos que tanto en las cepas con el triple epítotope de hemaglutinina en Cox1p como en las que no lo presentan, las ocho proteínas codificadas por el genoma mitocondrial son sintetizadas. Sin embargo se observa un patrón de síntesis diferente entre las cepas 3xHA y las cepas sin el epítotope.

En las cepas con el 3xHA, Cox1p se sintetiza 32% más en la mutante $\Delta shy1$ que el control mientras que en la mutante $\Delta cox14$ se sintetiza 12% menos. Cox2p se sintetiza 7% menos en $\Delta shy1$, y 39% menos en $\Delta cox14$. La síntesis de Cox3p aumenta en un 6% en la mutante de *shy1*, pero disminuye en un 60% en $\Delta cox14$.

Por otro lado en las cepas sin el 3xHA, la síntesis de las tres principales subunidades aumenta en ambas mutantes. Cox1p aumenta en $\Delta shy1$, en un 46%, en $\Delta cox14$ en un 26%. Cox2p aumenta en un 44% en $\Delta shy1$, y en un 33% en $\Delta cox14$. La síntesis de Cox3p aumenta en un 78% en la mutante de $\Delta shy1$ y en un 46% en $\Delta cox14$.

A partir de los datos obtenidos en este experimento podemos concluir que la eliminación de *SHY1* y *COX14* tienen un efecto post-traducciona, ya que Cox1p, Cox2p y Cox3p sí se sintetizan pero sus concentraciones estacionarias están alteradas, sugiriendo que las proteínas se sintetizan pero no se ensamblan y por ello son inestables. Este efecto es particularmente claro en Cox1p y Cox2p, en donde la concentración en estado estacionario disminuye en las mutantes.

Por otro lado podemos observar que la presencia del 3xHA en el extremo carboxilo de Cox1p, afecta ligeramente la síntesis de las subunidades mitocondriales de la citocromo *c* oxidasa.

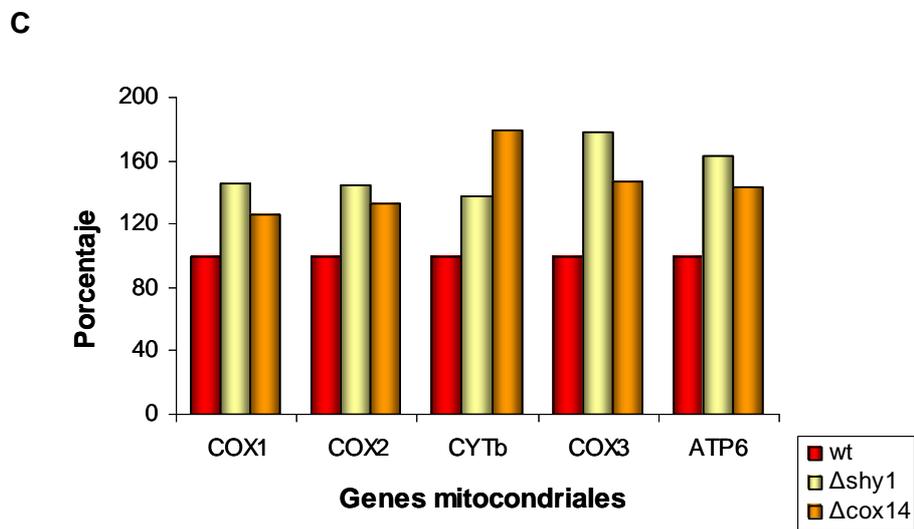
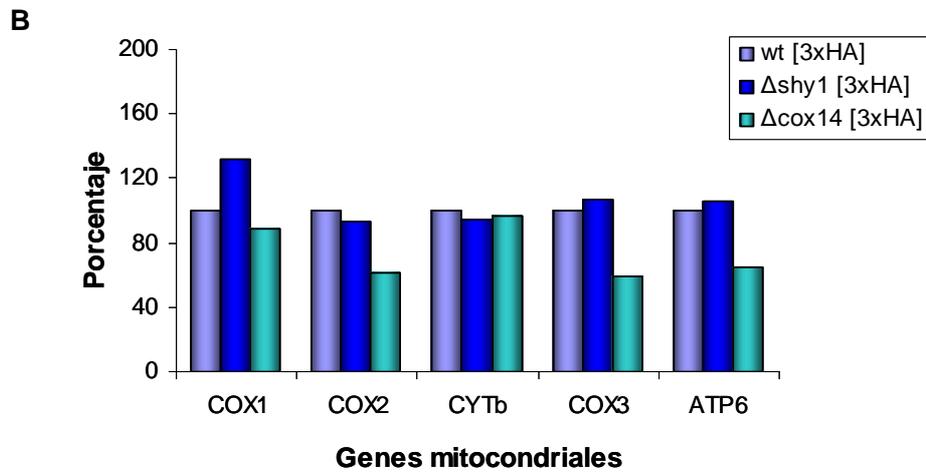


Figura 15. Gráfica que muestra la acumulación de proteínas mitocondriales recién sintetizadas en cepas mutantes de Δ shy1 y Δ cox14 con y sin 3xHA. A) Acumulación de proteínas mitocondriales en las cepas con el 3xHA. Como control se utilizó a la cepa XPM211 B) Acumulación de proteínas mitocondriales en las cepas sin el 3xHA. Como control se utilizó a la cepa XPM201. La cuantificación se realizó empleando el programa AlphaDigiDoc RT2.

Inmunoprecipitación

Una contribución importante de este trabajo es que a largo plazo se puedan hacer inmunoprecipitaciones de Cox1p en diferentes mutantes del ensamblaje. La inmunoprecipitación tiene como objetivo detectar qué subunidades de la COX y qué otros factores nucleares se encuentran presentes en mutantes de ensamblaje de la COX. Debido a que Cox1p se encuentra formando parte del primer intermediario de ensamblaje, esta estrategia nos permitirá identificar a las proteínas presentes en los primeros intermediarios del ensamblaje. Se llevaron a cabo inmunoprecipitaciones con la cepa Δcox14 . Para ello se emplearon perlas de proteína A sefarosa (PAS) acopladas a un anticuerpo antiHA (ROCHE). Estas perlas se incubaron con mitocondrias solubilizadas de las cepas XPM201, XPM211 (*COX1-3xHA*), OZ3 (Δcox14 , *COX1-3xHA*) y OZ4 (Δcox14). Las perlas se lavaron y las proteínas unidas a éstas se cargaron en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE, y el gel se tiñó con azul de Coomassie (Figura 16).

Mediante este experimento pudimos detectar varias bandas en la cepa XPM211 (*cox1-3xHA*) que suponemos corresponden a las subunidades de la COX. Sin embargo en la mutante nula de Δcox14 sólo pudo ser detectada una banda específica. Para identificar qué bandas son inespecíficas se utilizó XPM201 ó OZ4 (Cox1p silvestre) como control negativo. El paso siguiente es mejorar las condiciones de la inmunoprecipitación, e identificar a las bandas detectadas.

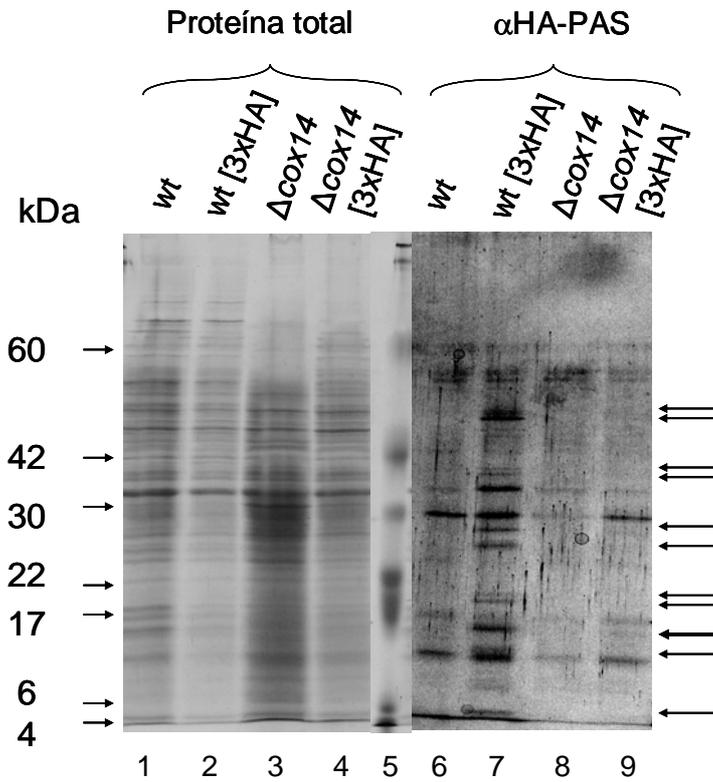


Figura 16: Inmunoprecipitación de la proteína Cox1p en mitocondrias silvestres o Δcox14 . Carriles 1-4: Proteínas totales. wt: XPM201 (Cox1p), wt: XPM211 (Cox1p-3xHA), OZ4 (Δcox14) y OZ3 (Δcox14 , [Cox1p-3xHA]). Carriles 6-9: Proteínas mitocondriales acopladas a perlas con antiHA. wt: XPM201 (Cox1p), wt: XPM211 (Cox1p-3xHA), OZ4 (Δcox14) y OZ3 (Δcox14 , [Cox1p-3xHA]). Con flechas largas se indican las bandas específicas.

Discusión

La citocromo *c* oxidasa es una enzima formada por 12 subunidades en *S. cerevisiae*. Tres de estas subunidades (Cox1p, Cox2p y Cox3p) forman el centro catalítico de la enzima, aquí se encuentran distintos grupos prostéticos como el centro binuclear Cu_A, el Cu_B, el hemo *a*, el hemo *a*₃, así como magnesio y sodio. Cox1p, Cox2p y Cox3p, son codificadas por el genoma mitocondrial, sintetizadas en la mitocondria e insertadas en la membrana interna mitocondrial. El resto de las subunidades son importadas del núcleo e insertadas en la membrana interna mitocondrial, para que finalmente pueda ensamblarse el complejo IV. De manera que el tener una enzima funcional requiere de la coordinación del genoma nuclear con el mitocondrial, así como la inserción de distintos grupos prostéticos. Estas características hacen de la biogénesis de la citocromo *c* oxidasa, un proceso bastante complejo.

Actualmente se han identificado alrededor de 20 factores nucleares que intervienen en el ensamblaje y estabilidad de la COX, sin embargo poco se entiende del mecanismo de acción de éstos.

El estudio de la biogénesis de la COX es muy importante, ya que muchas enfermedades mitocondriales en humano se asocian a defectos en la COX.

Nosotros trabajamos con *S. cerevisiae* para poder comprender cómo se llevan a cabo algunos de los procesos relacionados con el ensamblaje y estabilidad de la COX, ya que es un modelo que nos permite hacer muchas más manipulaciones genéticas que en células de humano.

Shy1p y Cox14p, son dos factores nucleares que se ha visto intervienen en los primeros intermediarios del ensamblaje de la COX, posiblemente interaccionando directamente con Cox1p.

El entender el mecanismo mediante el cual Shy1p y Cox14p participan en el correcto funcionamiento de la COX, ya sea regulando la síntesis de las subunidades que integran a COX o en el proceso de ensamblaje de las subunidades, permitirá manipular enfermedades mitocondriales asociadas a deficiencias en la COX como el síndrome de Leigh.

Cox1p es una subunidad mitocondrial de la citocromo *c* oxidasa, que juega un papel esencial tanto en la biogénesis como en la actividad de la COX.

Es una proteína integral de la membrana interna mitocondrial altamente hidrofóbica; aunado a esto se encuentra muy conservada taxonómicamente; por ello es una proteína de difícil detección en mutantes que afectan la respiración. El utilizar una cepa con el triple epítotope de hemaglutinina unido al extremo carboxilo de Cox1p es de vital importancia para los alcances de este proyecto, ya que el interés principal de este trabajo es inmunoprecipitar contra el epítotope de hemaglutinina en mutantes que afectan a la COX. De esta manera esperamos contribuir a la comprensión de los mecanismos que intervienen en la biogénesis y actividad de la citocromo *c* oxidasa.

En la primera parte del trabajo se caracterizó a la cepa wt: XPM211 [*COX1*-3xHA]. Encontramos que la presencia del triple epítotope de hemaglutinina en el extremo carboxilo de *COX1* no afecta la actividad de la COX, y que el 3xHA, nos permite detectar a Cox1p.

La caracterización de las mutantes nulas de $\Delta shy1$ [*COX1*-3xHA] y $\Delta cox14$ [*COX1*-3xHA] nos permitió detectar cualitativamente un fenotipo típico de mutantes que afectan la respiración. Ya que la

respiración disminuye parcialmente en la mutante de $\Delta shy1$ (50% de la actividad de la COX medida por oximetría) y se abate por completo en la mutante de $\Delta cox14$. Esto último nos dice que la función de Cox14p tiene efectos más drásticos sobre la respiración. Posiblemente Shy1p podría colaborar con algún otro factor no identificado que puede compensar un poco la función de Shy1p cuando esta proteína no se encuentra.

El patrón espectral de ambas mutantes nulas muestra que el pico correspondiente al hemo *a*, se ve disminuido en ambas mutantes, esto podría deberse a que de alguna forma se está afectando o la inserción del hemo *a* a la subunidad I, o la estabilidad de Cox1p. Los picos correspondientes a los citocromos *c* y *b* sí son detectables, e incluso se detectan mucho más pronunciados con respecto a la cepa silvestre; esto podría deberse a un mecanismo compensatorio debido a la disminución en el hemo *a*, lo cual se ve sustentado con trabajos anteriores en donde se ha detectado en mutantes de *shy1* un aumento en la actividad de la NADH-citocromo *c* reductasa y de la succinato *c* reductasa (Mashkevich y col. 1997).

En ambas mutantes nulas se sintetizan todas las proteínas codificadas en el genoma mitocondrial, sin embargo se observan diferencias en el patrón de la concentración de las subunidades I, II y III entre las cepas mutantes con y sin COX1-3xHA. En $\Delta shy1$ y $\Delta cox14$, la concentración de Cox1p, Cox2p y Cox3p aumenta con respecto al control XPM201. Por otro lado en la cepa mutante $\Delta shy1$ [COX1-3xHA], las concentraciones de Cox1p, Cox2p y Cox3p se mantienen más parecidas al control, mientras que en $\Delta cox14$, la concentración de las tres subunidades disminuye. Esto podría deberse a diferencias en las preparaciones mitocondriales, ya que se elaboraron en diferentes días. Alternativamente la presencia del

triple epítoto de hemaglutinina en el extremo carboxilo de Cox1p, podría estar afectando ligeramente la síntesis de las proteínas mitocondriales.

Por otro lado, las concentraciones estacionarias de Cox1p y Cox2p disminuyen, mientras que la concentración de Cox3p aumenta. Este patrón se observa tanto en la cepa $\Delta shy1$ [COX1-3xHA] como en $\Delta cox14$ [COX1-3xHA]; aunque en la cepa $\Delta cox14$ es mucho más dramático, lo cual tiene una relación directa con el fenotipo respiratorio observado tanto en la mutante de $\Delta shy1$ como en la de $\Delta cox14$.

Dado que las subunidades I y II son sintetizadas pero sus concentraciones estacionarias disminuyen en ambas mutantes, podemos concluir que la función tanto de Shy1p como de Cox14p es a nivel post-traducciona. Las proteínas Cox1p y Cox2p se sintetizan normalmente pero se degradan al no poder ser ensambladas en la citocromo *c* oxidasa.

SHY1 es el gen homólogo de levadura de *SURF1*. *SURF1* es un gen que se encuentra mutado en pacientes con el síndrome de Leigh, y en estos pacientes se observan niveles bajos de la citocromo *c* oxidasa (DiMauro y De vivo, 1996; Rahman y col. 1996; Tiranti y col. 1998; Zhu y col. 1998). Mutaciones en *SHY1* o en su homólogo en el humano, producen un fenotipo bioquímico similar (Barrientos y col. 2002).

Se ha propuesto que la deficiencia respiratoria en mutantes de *shy1* y *surf1*, se debe a que la citocromo *c* oxidasa no se ensambla bien (Tiranti y col. 1998; Zhu y col. 1998). Nuestros datos confirman una función a nivel post-traducciona, y creemos que la interacción podría ser a nivel de Cox1p. Ya que en mutantes nulas de $\Delta shy1$,

Mss51p, un activador traduccional de Cox1p, es capaz de revertir el fenotipo respiratorio casi a niveles normales (Barrientos y col. 2002).

En mutantes del ensamblaje de la COX, la síntesis de Cox1p se reduce drásticamente (Barrientos y col. 2004). A la fecha no se sabe cuál es el mecanismo de esta regulación negativa en la síntesis de Cox1p. Sin embargo, en mutantes dobles, por ejemplo: $\Delta shy1\Delta cox14$ ó $\Delta pet111\Delta cox14$ la síntesis de Cox1p se recupera (Barrientos y col. 2004). Por ello se ha propuesto que Cox14p regula negativamente la síntesis de Cox1p, en mutantes que afectan la respiración. Se ha visto que Cox14p es capaz de interactuar físicamente con Cox1p recién sintetizada, así como con la proteína Mss51p, la cual se necesita para llevar a cabo la síntesis de Cox1p (Pérez-Martínez y col. 2003, Barrientos y col. 2004). El mecanismo propuesto es que en mutantes que afectan el ensamblaje de la COX, Cox14p "recluta" a Mss51p, de manera que la traducción de Cox1p se ve disminuida (Barrientos y col. 2004). Estos datos muestran que Cox14p juega un papel esencial tanto en la traducción de Cox1p, como a nivel post-traduccional. El inmunoprecipitar a Cox1p-3xHA en mutantes nulas de $\Delta cox14$ [COX1-3xHA] nos permitirá identificar quiénes se unen a Cox1p en estas condiciones, con lo cual entenderemos mejor la función de Cox14p en el ensamblaje de la citocromo *c* oxidasa.

El comprender la dinámica del genoma mitocondrial con respecto al nuclear, además de permitirnos entender de manera más clara rutas metabólicas tan trascendentales evolutivamente como la cadena respiratoria, nos permitirá entender enfermedades genéticas neurodegenerativas y en un futuro, el desarrollo de técnicas que permitan tratarlas.

Conclusiones

- El triple epítotope de hemaglutinina en el extremo carboxilo de Cox1p, no afecta la función de la citocromo *c* oxidasa.
- Cox1p es detectable en la cepa con *COX1*-3xHA y en las mutantes nulas de *shy1* y *cox14*.
- Δ *shy1* genera un fenotipo respiratorio parcial mientras que Δ *cox14* elimina la respiración. Este efecto es específico para la citocromo *c* oxidasa.
- Shy1p y Cox14p actúan a nivel post-traducciona.

Apéndice I. Soluciones

| Medios de crecimiento (1 L) | | |
|--|--|---|
| YPAD | YAPEG | Medio Mínimo |
| Extracto de levadura 1 % Bacto peptona 2 % Dextrosa o Rafinosa (YPAD Raf) 2 % Adenina 30 mg | Extracto de levadura 1 % Bacto peptona 2 % Glicerol 3 % Etanol 3 % Adenina 30 mg | Base nitrogenada sin a.a. 0.67 % Dextrosa 2 % Medio dropout CSM con deficiencia de a.a. |
| Para medio sólido: Bacto agar 2 % | | |

| Biología molecular | |
|-----------------------------|--|
| Purificación de DNA total | |
| Acetato de sodio | 3 M, pH 5.3 |
| Etanol | 50 y 100% |
| Amortiguador QTP | Triton X-100 20 % SDS 1% NaCl 0.1 M Tris pH: 8, 10 mM EDTA pH: 8, 1 mM |
| Amplificación por PCR | |
| Mezcla de reacción de 50 µl | |
| dNTPs 10 mM | 1 µl |
| Amortiguador 10X | 5 µl |
| MgCl ₂ 50 mM | 1.5 µl |
| Primer Reverse 10 µM | 5 µl |
| Primer Forward 10 µM | 5 µl |
| Taq Polimerasa | 0.5 µl |
| Agua | 32 µl |
| Geles de agarosa | |
| TAE 50X | Tris 24.2 % Ácido acético glacial 5.71 % EDTA-Na ₂ 1.86 % |
| Amortiguador de carga 6X | Azul de bromofenol 0.25 % Xilene cianol FF 0.25 % Glicerol en agua 30 % |

Transformación de levadura

Mezcla maestra por transformación

| | |
|---|--------|
| PEG 3350 50 % | 40 ul |
| DTT 1 M | 5 ul |
| Acetato de litio 2 M | 5 ul |
| DNA de hebra sencilla de esperma de salmón 10 mg/ml. (Previamente hervido por 10 minutos y luego incubado a 4 °C) | 2.5 ul |

Obtención de mitocondrias crudas

Amortiguador TD

| | |
|------------------|-------|
| Tris-SO4 pH: 9.4 | 0.1 M |
| DTT | 10 mM |

MP2

| | |
|----------------------------------|-----------------------|
| Sorbitol | 1.2 M |
| Amortiguador de fosfatos pH: 7.4 | 20 mM |
| Zimoliasa-20T | 3 mg/g de peso húmedo |

SEH

| | |
|---------------|-------|
| HEPES pH: 7.4 | 20 mM |
| EDTA | 1 mM |
| Sorbitol | 0.6 M |

Dounce

| | |
|------------------------------|----------|
| Tris pH 7.4 | 10 mM |
| BSA (Libre de ácidos grasos) | 0.2 % |
| PMSF | 1 mM |
| TLCK | 50 µg/ml |
| Sorbitol | 0.6 M |

Cuantificación de proteínas: Lowry

Solución A

| | |
|---------------------------------|--------|
| Na ₂ CO ₃ | 2 % |
| Na ₂ tartrato | 0.4 % |
| NaOH | 0.16 % |
| SDS | 1 % |

| | |
|---|-----|
| Solución B | |
| Cu ₂ SO ₄ ·5H ₂ O | 4 % |
| Solución C | |
| Mezclar 100 volúmenes de solución A con 1 volumen de solución B (preparar al momento) | |
| Solución D | |
| Mezclar 1 volumen de reactivo de folin con 1 volumen de agua (preparar al momento) | |

Western

Geles de poliacrilamida

| | |
|----------------------------|---------|
| Amortiguador de corrida 5X | |
| Tris-HCl pH: 8.3 | 0.125 M |
| Glicina | 1.25 M |
| SDS | 0.5 % |
| Amortiguador de carga 1X | |
| Tris-HCl pH: 8.3 | 100 mM |
| Glicerol | 20 % |
| SDS | 4 % |
| β-Mercaptoetanol | 2 % |
| Azul de bromo fenol | 0.2 % |

| | Gel separador 12 % | Gel apilador 4 % |
|--|-----------------------|---------------------|
| Acrilamida 30 % Bisacrilamida 0.8 % | 4 ml | 0.65 ml |
| Tris 2M pH: 8.8 | 1.86 ml | |
| Tris 2M pH: 6.8 | | 312.4 μl |
| SDS 20 % | 100 μl | 50 μl |
| H ₂ O | 4 ml | 3.95 ml |
| APS 10 % | 50 μl | 50 μl |
| TEMED | 5 μl | 5 μl |
| Aforar a: | 5 ml | 2.5 ml |

| Transferencia | |
|--|----------|
| Amortiguador de transferencia negativo | |
| Ácido -amino-n-caproico (Sigma) pH: 8.5-8.7 (ajustar con Tris) | 39.4 g/l |
| SDS 0.05 % | 0.5 g/l |
| Amortiguador de transferencia positivo | |
| Tris | 18.2 g/l |
| Tricina | 9 g/l |
| Metanol | 20 % |
| Anticuerpos | |
| Solución de bloqueo | |
| Leche en polvo | 5 g |
| Tris 1 M pH: 7.6 | 2.5 ml |
| NaCl 5 M | 1.5 ml |
| Aforar con H ₂ O | 50 ml |
| Solución de blot | |
| Leche en polvo | 0.1 g |
| Tris 1M pH: 7.6 | 100 µl |
| NaCl ₂ 5 M | 200 µl |
| EDTA 500 mM | 20 µl |
| Tween-20 al 50% | 200 µl |
| Aforar con H ₂ O | 10 ml |
| Solución de lavado | |
| Tris 1 M pH 7.6 | 10 ml |
| NaCl 5 M | 20 ml |
| EDTA 500 mM | 2 ml |
| Tween-20 | 1 ml |
| Aforar con H ₂ O | 1 l |
| Solución de eliminación | |
| β-mercaptoetanol | 700 µl |
| Tris 1 M pH: 6.8 | 6.25 ml |
| SDS 10 % | 20 ml |
| Aforar con H ₂ O | 100 ml |

Oximetría

Toda la cadena:

Amortiguador SH

| | |
|----------|-------|
| Sorbitol | 0.6 M |
| Hepes | 20 mM |

| | |
|-----------------------------------|-------------|
| Etanol 100% | 7.5 μ l |
| KCl 2 M | 10 μ l |
| MgCl ₂ 0.1 M | 20 μ l |
| Pi 1 M | 6 μ l |
| ADP 100 mM | 3.5 μ l |
| Aforar con Amortiguador SH a 1 ml | |

Citocromo *c* oxidasa

| | |
|---|-------------------------|
| KCl 2 M | 10 μ l |
| MgCl ₂ 0.1 M | 20 μ l |
| Pi 1 M | 6 μ l |
| ADP 100 mM | 3 μ l |
| Antimicina 150 mM | 12 μ l |
| TMPD 15 mM (Disuelto en DMSO y protegido contra la luz) | 5 μ l 30 μ l |
| Ascorbato 250 mM | 15 μ l |
| KCN 50 mM | |
| Aforar con Amortiguador SH a 1 ml | |

Todas las soluciones se mantienen a 4 °C

Espectro UV-visible

Amortiguador de solubilización

| | |
|---------------------------|----------------|
| NaCl | 300 mM |
| HEPES | 20 mM, pH: 7.4 |
| PMSF (Disuelto en etanol) | 1 mM (Fresco) |
| Triton x-100 | 1 % |

Síntesis in organelo

Amortiguador 1.5x IOTL

| | |
|---------------------|--------------|
| Sorbitol 2.4 M | 375 μ l |
| KCl 1 M | 225 μ l |
| KPi 1 M pH: 7.2 | 22.5 μ l |
| Tris-HCl 1 M pH 7.4 | 30 μ l |

| | | |
|--|-----------------------|---------------------|
| MgSO ₄ 1 M | 19 µl | |
| BSA 100 mg/ml (libre de ácidos grasos) | 45 µl | |
| ATP 200 mM | 30 µl | |
| GTP 50 mM | 15 µl | |
| Aminoácidos (-Met, -Tyr, -Cys) 2 mg/ml | 9.1 µl | |
| Cisteína 10 mM | 10 µl | |
| Tirosina 1 mg/ml | 18.2 µl | |
| Ácido cetoglutárico | 1.7 µl | |
| Fosfoenol piruvato | 3.5 µl | |
| Piruvato Cinasa 0.2 % (Agregar justo antes de empezar la reacción) | 2 µl | |
| Amortiguador SH (Ver oximetría) | | |
| Gel de poliacrilamida (15%/0.15%) | | |
| Amortiguador de corrida 5X (Ver Western) | | |
| Amortiguador de carga 1X | | |
| Tris-HCl pH 8.3 | 100 mM | |
| Glicerol | 20% | |
| SDS | 4% | |
| β-Mercaptoetanol | 7.8 % | |
| Azul de bromo fenol | 0.2% | |
| | Gel separador 16 % | Gel apilador 5 % |
| Acrilamida 30 % Bisacrilamida 0.3 % | 9 ml | 0.83 ml |
| Tris 2M pH: 8.8 | 3.28 ml | - |
| Tris 2M pH: 6.8 | - | 150 µl |
| SDS 20 % | 83.5 µl | 25 µl |
| H ₂ O | 4.5 ml | 4 ml |
| APS 10 % | 100 µl | 25 µl |
| TEMED | 10 µl | 5 µl |

Inmunoprecipitación

| | | |
|---|--------|--|
| Amortiguador de lisis | | |
| Digitonina | 1 % | |
| NaCl | 100 mM | |
| Tris pH: 7.4 | 20 mM | |
| Gel de poliacrilamida SDS-PAGE (15%/ 0.15%) | | |

(Ver Síntesis in organelo)

Tinción con Coomasie

Solución fijadora

| | |
|---------------|------|
| Metanol | 50 % |
| Ácido acético | 10 % |

Solución teñidora

| | |
|----------------------------------|--------|
| Ácido acético | 10 % |
| Azul brillante de coomasie G-250 | 0.05 % |

Solución desteñidora

| | |
|---------------|------|
| Ácido acético | 10 % |
|---------------|------|

Apéndice II. Oligonucleótidos

| Nombre | Secuencia |
|---------|--------------------------------------|
| SHY1F1 | 5' GTAATAGATTGAACCTCTTCTGTGCTC 3' |
| SHY1R1 | 5' GGTGCAATTGCTGAGCTTATACG 3' |
| URA3F1 | 5' CGGCTCGAGCACCGCATAGGGTAATAACTG 3' |
| COX14F1 | 5' GATTGGGGTGTCAACGTAATGTAC 3' |
| COX14R1 | 5' CTAGATGGCGAATAGACGAC 3' |

Referencias

- Estabrook R.W. 1997. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurements of ADP: O ratios. *Methods in enzymol.* **10**:41-47
- Costanzo M.C., Fox T.D. 1993. Suppression of a defect in the 5' untranslated leader of mitochondrial *COX3* mRNA-specific translational activator protein. *Mol Cell Biol* **13**: 4806-4813
- Glick B.S., Pon L.A. 1995. Isolation of highly purified mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods enzymol* **260**: 213-223
- DiMauro S., De Vivo D.C. 1996. Genetic heterogeneity in Leigh syndrome. *Ann. Neurol.* **40**:5-7
- Rahman S., Block R.B., Dahl H.H., Danks D.M., Kirby D.M., Chow C.W., Christodoulou J., Thorburn D.R. 1996. Leigh syndrome: clinical feature and biochemical and DNA abnormalities. *Ann. Neurol.* **39**: 343-351
- McKee E.E., Poyton R.O. 1994. Mitochondrial gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. I Optimal conditions for protein synthesis in isolated mitochondria. *J. Biol. Chem.* **259**: 9320-9331
- Yao J., Shoubridge E. A. 1999. Expresión and functional análisis of *SURF1* in Leigh syndrome patients with cytochrome c oxidase deficiency. *Human Molecular Genetics.* **8**: 2541-2549
- Nitjtmans L.G.J., Sanz M. A.I, Bucko M., Farhoud M.H., Feensta M., Hakkaart G.A.J., Zeviani M., Grivell L.A. 2001. Shy1p occurs in a high molecular weight complex and is required for efficient assembly of cytochrome c oxidase in yeast. *FEBS Lett* **498**: 46-51.
- Mashkevich G., Repetto B., Glerum D.M., Jin C. Tzagoloff A. 1997. SHY1, the Yeast Homolog of the Mammalian SURF-1 Gene, Encodes a Mitochondrial Protein Required for Respiration. *J Biol Chem* **272**: 14359-14364.
- Barrientos A., Zambrano A., Tzagoloff A. 2004. Mss51p and Cox14p jointly regulate mitochondrial Cox1p expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **23**: 3472-3482.
- Khalimonchuk O., Rödel G. 2005. Biogenesis of cytochrome c oxidase. *Mitochondrion* **5**: 363-388.
- Sherman F. 1991. Getting started with Yeast. *Methods in enzymology.* **194**: 3-21.
- Alberts B., Johnson A., Lewis, J., Raff M., Roberts K., Walter, P. 1994. *Molecular biology of the cell.* 4ta. edición. Garland Science. USA. pp. 767

Bonnefoy N., Fox T.D. Genetic Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondria. En Methods in cell biology, Mitochondria. Pon A. Liza, Schon Eric A., pp. 382

Glerum D. M., Koerners T.J., Tzagoloff A., 1995. Cloning and characterization of COX14, whose product is required for assembly of yeast cytochrome oxidase. *J Biol Chem* **270**: 15585-90.

Towpik J. 2005. Regulation of mitochondrial translations in yeast. *Cel. and Mol Let.*, **10**: 571-594.

Westermann B., Herrmann J.M., Neupert W. Analisis of Mitochondrial Translation Products in Vivo and in Organello in Yeast. En Methods in cell biology, Mitochondria. Pon A. Liza, Schon Eric A., pp. 429-437

Tzagoloff A., Myers A.M. 1986. Genetics of mitochondrial biogenesis. *Ann. Rev. Biochem* **55**: 249-85

Pérez-Martínez X., Broadley S.A., Fox T.D. 2003. Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p. *EMBO J* **22**: 5951-5961

Herrmann J.M., Funes S. 2005. Biogenesis of cytochrome oxidase-Sophisticated assembly lines in the mitochondrial inner membrane. *Gene* **354**: 43-52

Zambrano A., Fontanesi F., Solans Asun., Leite de Oliveira R., Fox T.D., Tzagoloff A., Barrientos A. 2007. Aberrant translation of Cytochrome c oxidase subunit 1 mRNA species in the absence of Mss51p in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol biol of the cell* **18**: 523-535

Di mauro S., Bonilla Eduardo., Hirano Michio., Scho E.A. 1998. Mitochondria in the neuromuscular disordes. *Biochimica et biophysica acta* **1366**: 199-210

Barrientos A., Korr Daniel., Tzagoloff Alexander., 2002. Shy1p is necessary for full expression of mitochondrial COX1 in the yeast model of Leigh´s syndrome. *EMBO J* **21**: 43-52

Markwel M., Hass S., Bieber L., Tolbert N.1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal.Biochem.* **87**: 206-210

Griffiths D.E., Warthon, David. 1961. Studies of the electron transport system. - Purification and properties of cytochrome oxidase. *J biological chemistry* **236**: 1850-1856

Barros, M.H. Carlson, C.G. Glerum D.M. Tzagoloff, A. 2001. Involvemente of mitochondrial ferredoxin and Cox14p in hydroxylation of heme O. *FEBS Left.* **492**: 133-138

Hell, K. Neupert, W. Stuart, R.A. 2001. Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA. *EMBO J.* **20**: 1281-1288

Nijtmans, L.G. Taanman, J.W., Muijsers, A.O. Speijer, D. Van den Bogert, C. 1998. Assembly of cytochrome *c* oxidase in cultured human cells. *Eur. J. Biochem.* **254**: 389-394

Glerum D.M. Shtanko, A. Tzagoloff, A. 1996b. *SCO1* and *SCO2* act as high copy suppressors of a mitochondrial copper recruitment defect in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **271**: 14504-14509

McEwen J.E., Ko C., Kloeckner-Gruissem B., Poyton R.O. 1986. Nuclear functions required for cytochrome *c* oxidase biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Characterization of mutants in 34 complementations groups. *J Biol. Chem.* **261**: 11872-11879

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory manual, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
Schiestl, R.H. Gietz, R.D. 1989. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nuclei acids as a carrier. *Curr. Genet.* **16**: 339-346

Siep M., van Oosterum K., Neufeglise H., van der Spek H., Grivell L.A. 2000. Mss51p, a putative translational activator of cytochrome *c* oxidase subunit-1 (COX1) mRNA, is required for synthesis of Cox1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **37**: 213-220

Tiranti V., Hoertnagel K., Carrozzo R., Galimberti C., Munaro M., Granatiero M., Zelante L., Gasparini P., Marzella R., Rocchi M., Bayona-Bafaluy M.P., Enriquez J.A., Uziel G., Bertini E., Dionisi-Vici C., Franco B., Meitinger T., Zeviani M. 1998. Mutations of SURF-1 in Leigh disease associated with cytochrome *c* oxidase deficiency. *Am J. Hum. Genet.* **63**, 1609-1621

Tzagoloff A., Dieckmann C.L. 1999. PET genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **54**: 211-225

Zhu Z., Yao J., Johns T., Fu K., De Bie I., Macmillan C., Cuthbert A.P., Newbold R.F., Wang J., Chevrette M., Brown G.K., Brown R.M., Shoubridge E.A. 1998. SURF1, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome *c* oxidase, is mutated in Leigh syndrome. *Nat. Genet.* **20**: 337-343

Antonicka H., Leary S.C., Guercin G.H., Agar J.N., Horvath R., Kennaway N.G., Harding C.O., Jaksch M., Shoubridge E.A. 2003. Mutations in COX10 result in a defect in mitochondrial heme A biosynthesis and account for multiple, early-onset clinical phenotypes associated with isolated COX deficiency. *Hu Mol Genet*, **20**: 2693-2702