



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA BÁSICA

“Caracterización de la función de la
proteína COX24 en mitocondrias de
levadura”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
**LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA BÁSICA**

P R E S E N T A:

RODOLFO GARCÍA VILLEGAS

Tutora: DRA. XOCHITL PÉREZ MARTÍNEZ



MÉXICO, D.F.

AGOSTO 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

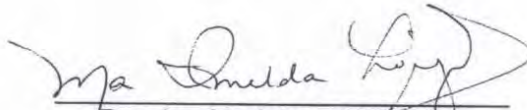


UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

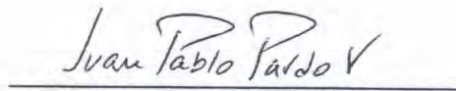
LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA
COORDINACIÓN

DR. ENRIQUE LUIS GRAUE WIECHERS
DIRECTOR
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
PRESENTE.

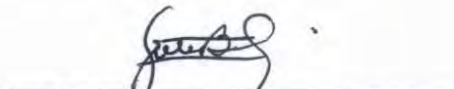
Por este conducto le informamos que la tesis titulada “**Caracterización de la función de la proteína COX24 en mitocondrias de levadura.**” que presenta el alumno **RODOLFO GARCÍA VILLEGAS**, con número de cuenta **406021436** cumple los requisitos establecidos en el Plan de Estudios de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica. Por lo tanto, los suscritos miembros del Jurado, otorgamos nuestro voto aprobatorio para que sea presentada en examen oral.


Dra. Imelda López Villaseñor


Dra. Xochitl Pérez Martínez


Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez


Dra. Leticia Rocha Zavaleta


Dra. Bertha González Pedraja

Agradecimientos y Reconocimientos.

Ésta tesis fue realizada bajo la dirección de la Dra. Xochitl Pérez Martínez en el laboratorio 204 oriente, en el departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Dra. Xochitl Pérez Martínez por su apoyo y asesoría que permitieron la conclusión exitosa de ésta tesis.

A la Dra. Yolanda Camacho Villasana por la asesoría técnica y su participación activa en este proyecto.

Se agradece al Jurado conformado por:

Dra. Imelda López Villaseñor	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dra. Leticia Rocha Zavaleta	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dra. Xochitl Pérez Martínez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez	Facultad de Medicina, UNAM
Dra. Bertha González Pedrajo	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

A mis compañeros de laboratorio por el apoyo académico y personal que siempre me ofrecieron.

A mi familia y amigos que siempre están a mi lado en todos los proyectos que me propongo realizar, muchas gracias.

Durante la elaboración de la tesis fui apoyado por una beca de elaboración de Tesis otorgada por PAPIIT (IN201805) y por una beca de elaboración de Tesis otorgada por la Fundación Telmex.

Contenido.

Abreviaturas.	1
Resumen.	2
Introducción.	4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudio.	4
La mitocondria.	4
El genoma mitocondrial.	5
Organización y mantenimiento del DNAm ^t en <i>S. cerevisiae</i> .	7
La cadena respiratoria.	7
La citocromo c oxidasa.	9
Biogénesis de la citocromo c oxidasa.	10
Activadores traduccionales.	12
Cox24.	15
Justificación.	17
Hipótesis.	18
Objetivos.	18
Materiales y métodos.	19
Cepas y medios.	19
Eliminación de <i>COX24</i> .	20
Generación de las cepas RGV5, RGV6 y RGV7 y experimento fenotipo de una mutante <i>cox24Δ</i> .	21
Obtención de mutante sensibles a temperatura de <i>cox24</i> .	23
Clonación de los ortólogos de Cox24.	25
Diluciones seriadas 1/10.	25

Cuantificación de la estabilidad del DNAm _t (cepas ρ^+).	26
Transformación de levaduras.	26
Determinación de proteínas por Lowry modificado.	27
Geles de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE).	27
Inmunoréplicas por Western Blot.	28
Obtención de la fracción mitocondrial cruda.	29
Traducción <i>in vivo</i> de proteínas mitocondriales a partir de células completas.	31
Traducción <i>in organello</i> a partir de mitocondrias crudas	32
Resultados.	33
Estabilidad del DNAm _t en mutantes <i>cox24</i> Δ .	33
Fenotipo de mutantes nulas <i>cox24</i> .	34
La síntesis de Mss51 no es afectada en las mutantes <i>cox24</i> Δ .	40
Generación de mutantes sensibles a temperatura de <i>cox24</i> .	42
Las mutantes TScox24 tienen defectos en la síntesis de Cox2.	45
Los ortólogos de Cox24 de <i>Y. lipolytica</i> y <i>A. thaliana</i> complementan parcialmente una mutante <i>cox24</i> Δ .	47
Discusión.	50
Conclusiones.	60
Perspectivas.	60
Apéndices.	61
Referencias.	68

Abreviaturas.

- 5'UTR Región no traducida del extremo 5' del RNAm
- 5-FoA Siglas en inglés de 5-Fluoroorotic acid
- ρ^0 Cepas sin DNAm
- ρ^- Cepas con grandes eliminaciones en el DNAm
- ρ^+ Cepas con DNAm
- DNAm DNA mitocondrial
- *ARG8^m* Gen de la acetil ornitín transferasa, codificado en la mitocondria
- RNAm Ácido ribonucléico mensajero
- *ATP6* Gen de la subunidad 6 de la ATP sintasa
- *ATP8* Gen de la subunidad 8 de la ATP sintasa
- *ATP9* Gen de la subunidad 9 de la ATP sintasa
- BSA Siglas en inglés de bovine serum albumin
- *COB* Gen del citocromo *b*
- Cob Citocromo *b*
- CcO Citocromo *c* oxidasa
- *COX1* Gen de la subunidad 1 de la CcO
- Cox1 Subunidad 1 de la CcO
- *COX1 I⁰* Gen de la subunidad 1 de la CcO sin intrones.
- *COX2* Gen de la subunidad 2 de la CcO
- Cox2 Subunidad 2 de la CcO
- *COX3* Gen de la subunidad 3 de la CcO
- Cox3 Subunidad 3 de la CcO
- DTT Siglas en inglés de dithiothreitol
- EDTA Siglas en inglés de ethylenediaminetetraacetic acid
- HEPES Siglas en inglés de 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl] ethanesulfonic acid
- PMSF Siglas en inglés de phenylmethylsulfonyl fluoride
- TEMED Siglas en inglés de N, N, N',N'-tetramethyl-ethano-1,2-diamina
- TLCK Siglas en inglés de Na-Tosyl-Lys choromethyl ketone, Hydrochloride

Resumen.

La mitocondria es el principal productor de ATP de las células, el cual es sintetizado gracias a la generación de un gradiente electroquímico producido por la cadena respiratoria. La CcO es la enzima encargada de reducir el O₂ molecular a agua, lo cual se encuentra acoplado al bombeo de protones al espacio intramembranal.

En *Saccharomyces cerevisiae* la CcO está formada por 11 subunidades, de las cuales Cox1, Cox2 y Cox3 son codificadas en el DNAm_t y constituyen el núcleo catalítico de la enzima. La traducción de estas subunidades es activada específicamente por proteínas conocidas como activadores traduccionales. Cox1 es la subunidad más grande de la CcO, cruza 12 veces la membrana y es el núcleo a partir del cual la CcO se ensambla. La expresión de *COX1* es un proceso altamente regulado, siendo uno de los pasos más importantes a nivel traduccional. Cox24 es una proteína que ha sido implicada en el procesamiento del RNAm de *COX1*, sin embargo existen evidencias de que podría participar también en su traducción. En este trabajo estudiamos la función de la proteína Cox24 sobre la síntesis de Cox1.

Cuando eliminamos a Cox24 las levaduras pierden la capacidad de crecer en medios respiratorios (etanol/glicerol). Además observamos que cepas de fondo nuclear D273-10B presentan una alta inestabilidad del DNAm_t, que no es vista en cepas de fondo nuclear W303-1B. Por esta razón decidimos hacer mutantes sensibles a temperatura de Cox24 (TS_{cox24}) para poder estudiar a Cox24 en cepas D273-10B. Las mutantes TS_{cox24} se hicieron introduciendo mutaciones puntuales aleatorias en la región codificante de *COX24* por PCR mutagénico y probando después la capacidad de las levaduras de crecer en medio respiratorio a 25°C, 30°C y 37°C. Se encontró que las mutantes obtenidas sintetizan deficientemente a Cox1, pero sobre todo a Cox2.

Nuestros datos sugieren que una cepa *cox24*Δ presenta un fenotipo similar al de una mutante *mss51*Δ. *Mss51* es otro factor involucrado en la síntesis de Cox1. Ambos genes se encuentran muy cercanos en el genoma. En este trabajo

se demostró que los niveles de Mss51 en la mutante *cox24Δ* no se afectaron y demostramos que la sobreexpresión de Mss51 no puede compensar la ausencia de Cox24, De igual manera la sobreexpresión de Cox24 no compensó la ausencia de Mss51. Por lo cual descartamos la redundancia de funciones entre ambas proteínas.

Adicionalmente comprobamos que los ortólogos de Cox24 de *Yarrowia lipolytica* y *Arabidopsis thaliana* pueden complementar una mutante *cox24Δ*. Los ortólogos de Cox24 no presentan gran similitud con la proteína de *S. cerevisiae*, con excepción de la región carboxilo terminal. Apoyados en este dato y en el hecho de que muchas de las mutaciones encontradas en *cox24* de las mutantes *TScox24*, ocurren en la región carboxilo terminal proponemos que esta región es muy importante para la función de Cox24.

Los datos obtenidos en este estudio apoyan que Cox24 podría funcionar como un activador traduccional del RNAm *COX1*. Esto lo comprobamos por medio del uso del gen reportero de la traducción *ARG8^m*, ya que una mutante *cox24Δ* no es capaz de crecer en medio sin Arginina, indicando que el gen reportero no se traduce. Adicionalmente encontramos que Cox24 podría ser un factor que promueve la síntesis de Cox2.

Introducción.

***Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudio.**

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo que ha sido utilizado ampliamente como modelo de estudio. Esto se debe principalmente a la facilidad con que se mantiene en el laboratorio y la rapidez a la cual prolifera. *S. cerevisiae* es un organismo facultativo capaz de crecer en condiciones aerobias y anaerobias, por lo cual es ideal para el estudio de la mitocondria y sus funciones, principalmente la respiración. Además de que se cuenta con la secuencia completa de su genoma nuclear y su genoma mitocondrial (Sherman, 1991).

Una de las principales ventajas que ofrece este modelo es la capacidad de realizar mutaciones en ambos genomas por recombinación homóloga de una manera sencilla, en comparación con otros organismos. De esta manera se pueden obtener mutantes que afecten su capacidad respiratoria, pero no su viabilidad (Sherman, 1991; Bonnefoy and Fox, 2007).

En la actualidad existen muchas cepas de *S. cerevisiae* que son usadas en la investigación, éstas varían principalmente en los marcadores que pueden ser utilizados para verificar las mutaciones de interés. No obstante, se sabe que muchas veces el fenotipo observado en una cepa puede variar con respecto a otras sin que se sepa la causa de este fenómeno (Sherman, 1991; Contamine and Picard 2000).

La mitocondria.

La mitocondria es un organelo celular de entre 0.5-1 μ m de diámetro, se encuentra en el citoplasma y es el principal productor de adenosín trifosfato (ATP) en la mayoría de las células eucariotes. *In vivo* las mitocondrias forman una red mitocondrial muy dinámica, donde constantemente se fusionan y dividen (Alberts *et al.* 2002).

La mitocondria está formada por dos membranas, la externa (MEM) y la interna (MIM). Entre estas 2 membranas se localiza el espacio intermembranal (EIM) y encapsulada por la MIM se encuentra la matriz mitocondrial. La MEM es

permeable a moléculas menores de 5000 daltones, mientras que la MIM es impermeable a casi todas las moléculas (Alberts *et al.* 2002).

En la MIM se encuentran embebidos los complejos de la cadena respiratoria, la ATP sintasa y muchas proteínas de transporte que la hacen altamente selectiva; además posee invaginaciones hacia la matriz que forman estructuras conocidas como crestas, que son muy importantes para la fosforilación oxidativa. En la matriz mitocondrial se encuentran una gran cantidad de enzimas necesarias para el metabolismo celular como: la β -oxidación de ácidos grasos, el catabolismo de algunos aminoácidos, el ciclo de la urea y todas las enzimas del ciclo de Krebs (Nelson and Cox, 2004).

El genoma mitocondrial.

Se cree que la mitocondria surgió por un evento de endosimbiosis en el que una α -proteobacteria, capaz de realizar la fosforilación oxidativa, fue endocitada por una célula nucleada. Posteriormente la α -proteobacteria perdió su capacidad de vida libre y la mayoría de su genoma fue transferido al núcleo o se perdió, eventos que permitieron que se transformara en la mitocondria moderna (Gray *et al.*, 1999). Sin embargo, las mitocondrias aún conservan parte del material genético que no pudo ser transferido al núcleo y como consecuencia de esto cuentan con toda la maquinaria necesaria para su replicación, transcripción y traducción (Contamine and Picard, 2000).

El DNAm de *S. cerevisiae* tiene un tamaño de entre 75-85 kilobases, dependiendo de la cepa (Figura 1). En éste se encuentran codificadas ocho proteínas, de las cuales siete forman parte de los complejos de la cadena respiratoria: Cox1, Cox2 y Cox3 son subunidades de la Citocromo c oxidasa (CcO), Cob del complejo bc_1 y Atp6, Atp8, Atp9 de la ATP sintasa. Var1 forma parte de la subunidad chica del ribosoma mitocondrial. El DNAm también codifica para 24 tRNAs, los rRNAs 15S y 21S, además de un RNA 9S componente de la enzima RNasa tipo P, encargada del procesamiento de los tRNAs (Lipinski *et al.*, 2010).

El tamaño del DNAm_t de *S. cerevisiae* varía por el número de intrones que contienen tres de sus genes. De éstos, 7 pueden estar en *COX1*, 5 en *COB* y uno en el rRNAs 21S. La presencia de los intrones parece ser opcional, ya que cepas sin intrones (*I*⁰) usadas en los laboratorios no presentan ningún fenotipo. Diez de los intrones presentes en el DNAm_t de *S. cerevisiae* tienen marcos abiertos de lectura que codifican para factores implicados en el procesamiento y movilidad de los intrones (Lipinski *et al*, 2010).

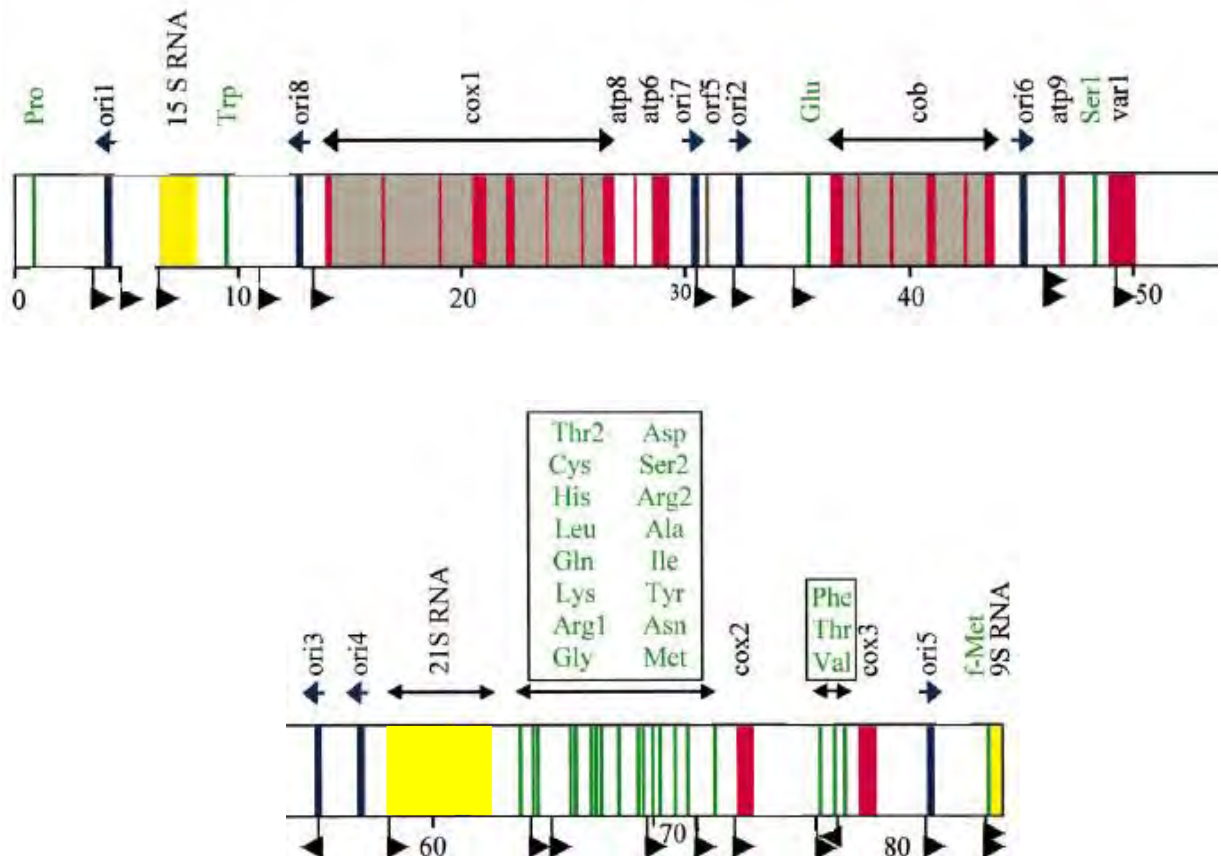


Figura 1. Mapa del DNAm_t de *S. cerevisiae* (Modificado de Foury *et al.* 1998). Representación lineal del DNAm_t de *S. cerevisiae*, los números debajo del esquema corresponden al número de kilobases. En verde se muestran los tRNAs, en amarillo los RNAs 5S, 9S y 21S, en rojo las regiones codificantes y en gris los intrones. Además se señalan los orígenes de replicación con flechas (ori1-ori8). Las banderas indican los sitios de inicio de la transcripción y la dirección de éstos.

Organización y mantenimiento del DNAm_t en *S. cerevisiae*.

El DNAm_t se encuentra organizado en estructuras conocidas como nucleoides mitocondriales (Miyakawa and Sando, 1987), los cuales se encuentran formados por varias moléculas de DNA en asociación con una gran variedad de proteínas. La relación DNA/proteína y el conjunto de proteínas asociadas al DNA se modifican de acuerdo al estado metabólico de la célula (Kucej *et al.* 2008; Chen and Butow, 2005; Contamine and Picard 2000). La proteína mayoritaria de los nucleoides mitocondriales en *S. cerevisiae* es Abf2, la cual se une de manera no específica al DNAm_t para empaquetarlo (Diffley and Stillman, 1991).

La estabilidad del DNAm_t depende de múltiples factores y se caracteriza por la ocurrencia de mutantes citoplasmáticas llamadas “petite”, las cuales se caracterizan por la ausencia de un DNAm_t funcional (cepas ρ^+), ya sea por su ausencia (cepas ρ^0) ó por la eliminación de grandes fragmentos del DNAm_t (cepas ρ^-) y su reamplificación posterior (Lipinski *et al.*, 2010).

La eliminación de genes relacionados con la replicación, transcripción y la traducción del DNAm_t ocasionan su pérdida o inestabilidad. Sin embargo, la eliminación de genes relacionados con diferentes aspectos del metabolismo celular, también ocasionan pérdida o inestabilidad del DNAm_t, sin que se comprenda la causa de este fenómeno en la mayoría de los casos reportados (Chen and Butow, 2005; Contamine and Picard 2000; Lipinski *et al.*, 2010).

La cadena respiratoria.

La β -oxidación de ácidos grasos, el ciclo de Krebs y diversos procesos catabólicos, son los generadores de las principales moléculas donadoras de electrones de la cadena respiratoria: NADH y succinato. Estas moléculas transfieren electrones a los complejos enzimáticos embebidos en la MIM, que acoplan la donación de electrones hacia el oxígeno (O_2) con el bombeo de protones a través de la MIM. Esto genera un gradiente electroquímico que se utiliza para sintetizar ATP y transportar metabolitos (Nelson y Cox, 2004; Joseph-Horne *et al.* 2000).

La cadena respiratoria de *S. cerevisiae* (Figura 2) se encuentra formada por: el complejo II o succinato deshidrogenasa, que cataliza la transferencia de electrones del succinato a la poza de ubiquinona; el complejo III o citocromo bc_1 , que cataliza la transferencia de electrones del ubiquinol al citocromo c , acoplada al bombeo de protones al EIM; el complejo IV o citocromo c oxidasa (CcO) que cataliza la transferencia de electrones del citocromo c al O_2 , acoplada al bombeo de protones al EIM. Todos estos complejos se encuentran embebidos en la MIM y contienen grupos prostéticos que se oxidan y reducen para permitir el transporte de electrones entre los mismos. El complejo V o ATP sintasa utiliza el gradiente electroquímico generado por el complejo III y el complejo IV para catalizar la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i (Nelson y Cox, 2004; Joseph-Horne *et al.* 2000).

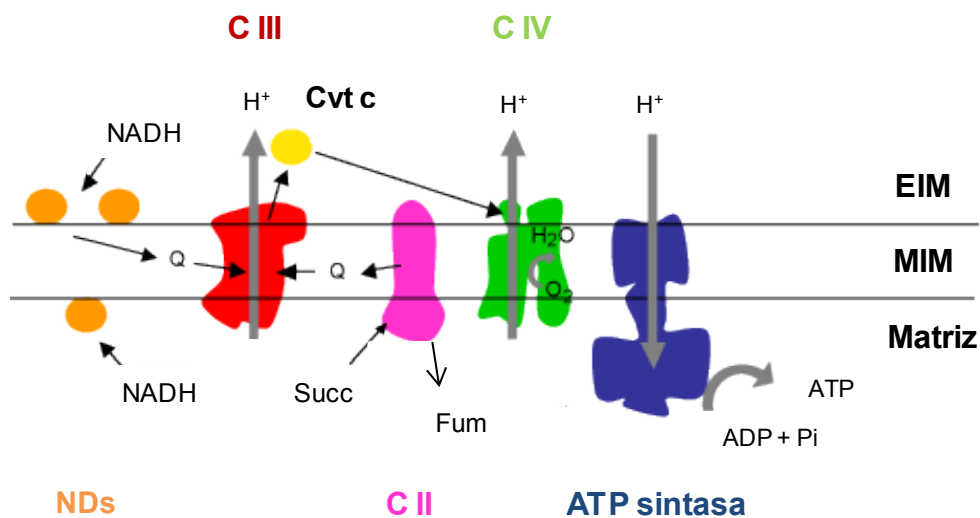


Figura 2. Cadena Respiratoria de *S. cerevisiae* (De acuerdo a Joseph-Horne *et al.* 2000). Representación esquemática de los complejos respiratorios de *S. cerevisiae*. Se muestran los sustratos y productos de las reacciones en cada complejo. Las flechas negras representan el flujo de electrones a través de los complejos respiratorios, mientras que las flechas grises representan el bombeo de protones de la matriz al EIM. Q = poza de ubiquinonas, Succ = succinato, Fum = fumarato, NDs = NADH deshidrogenasas alternas, C II = succinato deshidrogenasa, C III = complejo bc_1 , Cyt c = citocromo c , C IV = citocromo c oxidasa.

S. cerevisiae no cuenta con complejo I, pero en su lugar cuenta con dos NADH deshidrogenasas externas (asociadas a la cara externa de la MIM) y una interna (asociada a la cara interna de la MIM) que transfieren los electrones del NADH a la poza de ubiquinonas (Joseph-Horne, 2000).

La citocromo c oxidasa.

La CcO es la enzima encargada de reducir el O₂ molecular a agua, lo cual se encuentra acoplado al bombeo de protones al EIM. La CcO se encuentra formada por 11 subunidades en *S. cerevisiae* y por 13 subunidades en mamíferos; de éstas, las subunidades Cox1, Cox2 y Cox3 se codifican en el DNAmT y forman el núcleo catalítico de la enzima (Figura 3). Las otras subunidades rodean al núcleo catalítico y se codifican en el genoma nuclear, se sintetizan en el citosol y se importan hacia la mitocondria. Éstas son necesarias para la regulación, estabilidad, ensamblaje y dimerización de la CcO (Fontanesi *et al.*, 2009).

La transferencia de electrones del citocromo *c* al O₂ se lleva a cabo de la siguiente manera (Figura 3): el citocromo *c* transfiere los electrones al sitio Cu_A localizado en Cox2 y formado por 2 átomos de cobre coordinados por residuos de cisteína. De aquí los electrones se donan al hemo *a* y por último al sitio binuclear hemo *a*₃-Cu_B, donde el O₂ es reducido a agua. Éstos se encuentran localizados en Cox1 y son coordinados por residuos de histidina (Nelson and Cox, 2004; Khalimonchuk and Rödel, 2000).

Para reducir el O₂ a agua, se requiere de 4 electrones donados por el citocromo *c* y de 4 protones para formar 2 moléculas de agua. A su vez 4 protones son bombeados al EIM (Nelson and Cox, 2004; Khalimonchuk and Rödel, 2000).

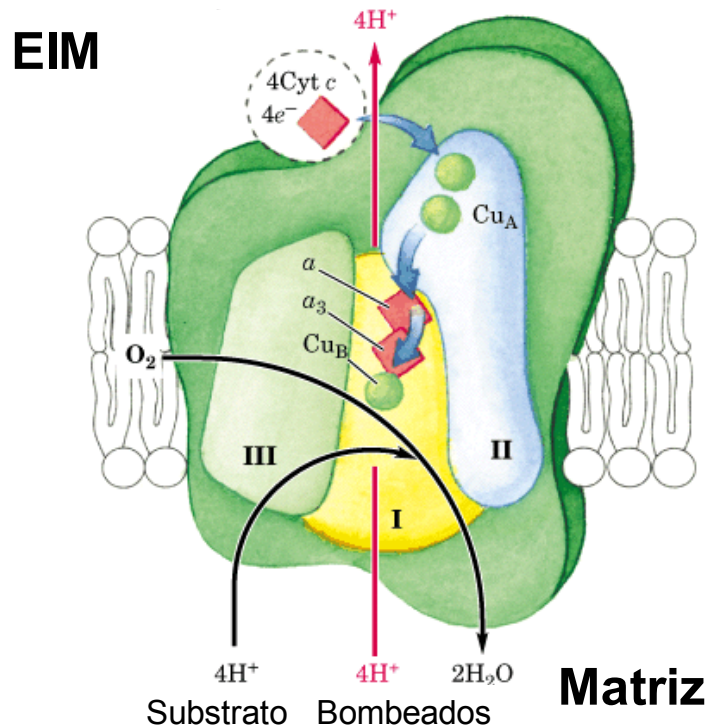


Figura 3. Representación esquemática de la citocromo c oxidasa (Modificado de Nelson and Cox, 2004). Representación esquemática de la CcO, en la cual se muestran los sitios y la transferencia de electrones por medio de flechas azules. En amarillo se muestra a Cox1, en azul se muestra a Cox2 y en verde claro a Cox3. Las flechas negras indican la reducción del O_2 y la flecha roja indica el bombeo de protones al EIM. Cyt c = citocromo c.

Biogénesis de la citocromo c oxidasa.

La biogénesis de la CcO es un proceso complicado y altamente regulado. Para que una CcO sea funcional se necesita acoplar el ensamblaje de proteínas codificadas en el genoma nuclear y el mitocondrial, además de añadir los diferentes grupos prostéticos necesarios para el funcionamiento de la enzima a proteínas altamente hidrofóbicas, que se encuentran embebidas en la MIM. El ensamblaje de la CcO se lleva a cabo de manera secuencial y la falla en alguno de los pasos de la biogénesis de la CcO se asocia a diferentes patologías en

humanos, principalmente de índole neurológica (Pérez-Martínez *et al.* 2008; Funes and Herrmann, 2005; Horan *et al.*, 2005).

Estudios realizados en la línea celular humana HeLa y en *S. cerevisiae*, han demostrado la presencia de diferentes intermediarios de ensamblaje de la CcO. De éstos, los más conservados se llaman S1, S2 y S3 (Figura 4). Por medio de la identificación de estos intermediarios, se ha podido determinar que Cox1 es la primera subunidad de la CcO en ser ensamblada, tanto en mamíferos como en levaduras. Asimismo, se observó que las subunidades Cox5 y Cox6 son de las primeras subunidades en integrarse a la enzima en levadura, al igual que sus homólogos de mamíferos. Sin embargo, no se ha podido determinar con exactitud el orden de integración de las otras subunidades a la CcO (Horan *et al.*, 2005; Nijtmans *et al.*, 1998).

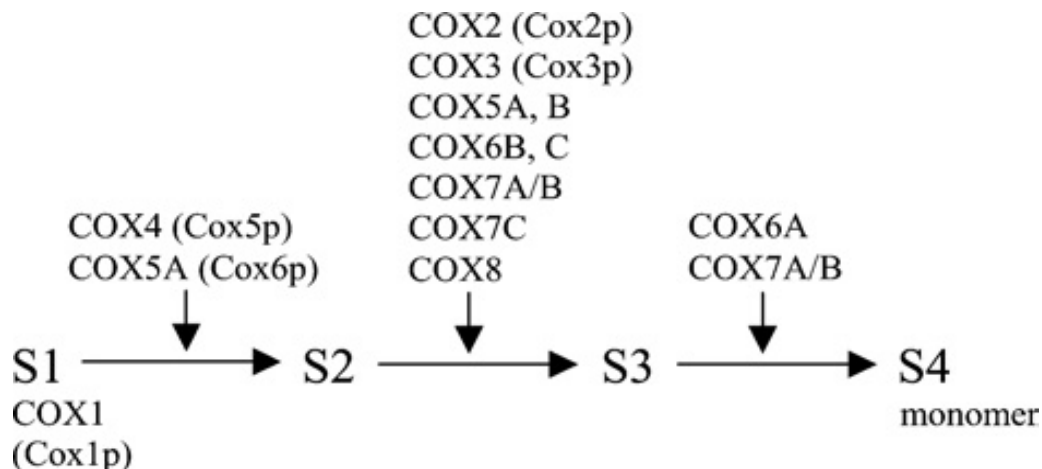


Figura 4. Ensamblaje de la citocromo c oxidasa (De acuerdo a Horan *et al.*, 2005; Nijtmans *et al.*, 1998). Se representan los intermediarios de ensamblaje S1 al S4 y se indica las subunidades de la CcO que los integran. Los nombres en mayúsculas corresponden a las subunidades de mamífero, entre paréntesis se muestran sus homólogos de levadura.

Adicionalmente a los intermediarios antes mencionados, también se han detectado intermediarios de ensamblaje de la CcO que contienen proteínas que no

constituyen parte final de la enzima, pero que son necesarias para la estabilidad o maduración de las subunidades que forman a la CcO (Funes and Herrmann, 2005).

Hasta el momento se han identificado al menos 30 factores de origen nuclear que son necesarios para la formación de una enzima funcional. Estos factores llevan a cabo diversas funciones como: la inserción de los grupos prostéticos a las subunidades catalíticas, importación de las subunidades codificadas en el genoma nuclear, regulación de la traducción de las subunidades codificadas en el DNAm, transcripción y maduración de los RNAm de las subunidades mitocondriales, entre otras funciones. Además, se sabe que la estabilidad y el ensamblaje de la CcO se afecta por la presencia del citocromo *c* y de una ATP sintasa intacta y funcional (Fontanesi *et al.* 2009; Funes and Herrmann, 2005).

En *S. cerevisiae*, uno de los puntos de regulación de la biogénesis de la CcO más importantes y estudiados es a nivel de la traducción de las subunidades codificadas en el DNAm.

Activadores traduccionales.

Para que las proteínas codificadas en el DNAm puedan ser traducidas por los ribosomas mitocondriales, se necesita de proteínas asociadas a la MIM conocidas como “activadores traduccionales”. Los activadores traduccionales son codificados en el genoma nuclear y promueven la traducción al unirse al extremo 5' no traducido (5'UTR) de los RNAm de manera específica (Figura 5; Costanzo and Fox, 1990; Pérez-Martínez *et al.*, 2008). Sin embargo, no se sabe cómo actúan exactamente y se cree podrían ser importantes para el reclutamiento y posicionamiento de los ribosomas (Carr and Winge, 2003).

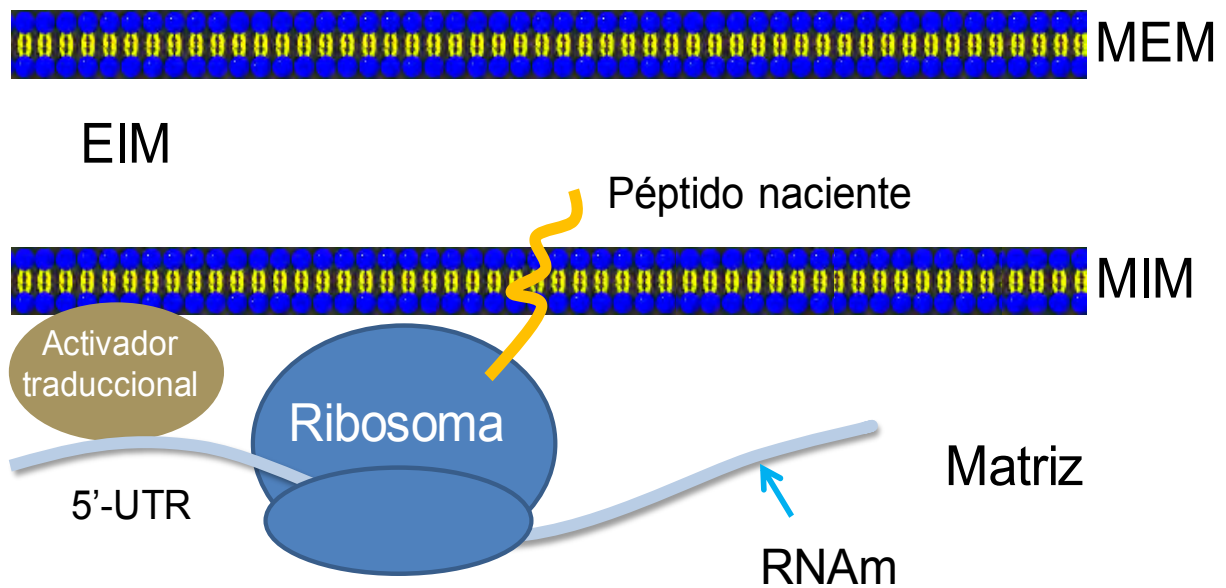


Figura 5. Representación esquemática de la función de los activadores traduccionales. Se representa a los activadores traduccionales de los RNAm de las proteínas sintetizadas en la mitocondria y como actúan sobre la región 5'UTR de éstos. También se representa su asociación a la MIM.

Los activadores traduccionales pueden ser proteínas integrales de membrana o asociadas de manera periférica a la MIM (Tabla 1). La asociación de los activadores a la MIM sugiere su participación en el acoplamiento de la traducción de las proteínas codificadas en el DNAm y su inserción en la membrana (Costanzo and Fox, 1990). Se ha propuesto que la inserción cotraduccional de las proteínas altamente hidrofóbicas de los complejos respiratorios en la membrana facilitaría su ensamblaje en los complejos respiratorios (Naithani *et al.* 2003; Chacińska and Boguta, 2000).

La eliminación de los activadores traduccionales ocasiona la pérdida de la traducción de su RNAm específico y por lo tanto de la capacidad respiratoria. Además se sabe que los activadores traduccionales de *COX2*, *COX3* y *COX1* se encuentran en niveles limitantes para la expresión de su gen blanco (Steele *et al.* 1996; Green-Willms *et al.* 2001; Pérez-Martínez *et al.* 2009).

RNAm	Activador Traduccional	Asociación a la membrana	Referencias
<i>COX1</i>	Pet309	Periférica	Tavares-Carreon <i>et al.</i> , 2008
	Mss51	Periférica	Siep <i>et al.</i> , 2000
<i>COX2</i>	Pet111	Integral	Green-Willms <i>et al.</i> , 2001
<i>COX3</i>	Pet54	Periférica	McMullin and Fox, 1993
	Pet494	Integral	McMullin and Fox, 1993
	Pet122	Integral	Michaelis <i>et al.</i> , 1991
<i>COB</i>	Cbs1	Integral	Kruase <i>et al.</i> 2000
	Cbs2	Periférica	Kruase Buchholz <i>et al.</i> 2004
	Cbp1	Periférica	Kruase Buchholz <i>et al.</i> 2005
	Cbp6	—	Dieckmann <i>et al.</i> 1985
<i>ATP6</i>	Nac3	—	Pélissier <i>et al.</i> 1995
	Atp122	—	Zeng <i>et al.</i> 2007
<i>ATP8</i>	Nac2	—	Camougrand, <i>et al.</i> 1995
<i>ATP9</i>	Aep1	—	Payne, <i>et al.</i> 1993
	Aep2	—	Finnegan <i>et al.</i> 1991
<i>VAR1</i>	—	—	—

Tabla 1. Activadores traduccionales de las proteínas sintetizadas en la mitocondria.

Se nombran los activadores traduccionales conocidos y su forma de asociación a la membrana. Las referencias indican el trabajo en el que se describió el tipo de asociación a la membrana.

No todos los activadores traduccionales actúan únicamente en el extremo 5'UTR de su RNAm blanco, como es el caso de los activadores Mss51 (*COX1*) y Cbp6 (*COB*), ya que la traducción de su RNAm blanco en mutantes nulas de alguno de éstos, no puede ser restituida por el intercambio de la región 5'UTR de

otro RNAm mitocondrial (Perez-Martínez *et al.* 2003; Dieckmann and Tzagaloff, 1985), lo cual sí ocurre en el caso del activador traduccional de *COX1*, Pet309 (Manthey and McEwen, 1995) y de los activadores traduccionales de *COB*, Cbs1 y Cbs2 (Rödel, 1986). Esto sugiere una función adicional de Mss51 y Cbp6 a la traducción de sus RNAm blanco.

La asociación entre los activadores y el ribosoma, se apoya por interacciones genéticas entre Pet122 (activador de *COX3*) y la subunidad pequeña del ribosoma mitocondrial (Haffer and Fox, 1992; McMullin *et al.*, 1990). También se sabe que Cbs2 (activador *COB*) interactúa físicamente con el ribosoma intacto (Krause-Buchholz *et al.*, 2004; Krause-Buchholz *et al.*, 2005). A la par, se ha demostrado por experimentos de doble híbrido la interacción de los activadores traduccionales de *COX3* (Pet122, Pet54 y Pet494, Brown *et al.* 1994). También se ha demostrado la asociación entre los diferentes activadores traduccionales de *COX1*, *COX2* y *COX3* (Naithani *et al.* 2003) por medio de experimentos de inmunoprecipitación y doble híbrido. Sin embargo, la asociación de los activadores traduccionales, parece no ser necesaria para que éstos lleven a cabo su función (Fox, 1996).

Cox24.

Las proteínas que se sabe participan en la regulación de la traducción del RNAm de *COX1* son: Pet309, necesaria para la traducción y la estabilidad del RNAm de *COX1* (Manthey and McEwen, 1995); Mss51, necesaria para la traducción del RNAm y al interactuar con el péptido nascente de Cox1 promueve la regulación entre la síntesis y el ensamblaje de esta subunidad en la CcO (Pérez Martínez *et al.* 2003); y Cox14 que participa junto con Mss51 en la regulación de la traducción de *COX1* (Barrientos *et al.* 2004; Pérez-Martínez *et al.* 2009).

Cox24 es una proteína de 111 aminoácidos, fuertemente asociada a la MIM y codificada en el núcleo (Simon *et al.* 1992, Barros *et al.* 2006). La eliminación de Cox24 en *S. cerevisiae* ocasiona un fenotipo no respiratorio de la cepa, causado por la ausencia de una CcO funcional, lo cual se debe a la falla en la síntesis de Cox1 que impide el ensamblaje de la CcO. Se ha propuesto que la falla en la

síntesis de Cox1 se debe a que Cox24 participa en el procesamiento de los intrones del RNAm de COX1, ya que su eliminación ocasiona la acumulación de intermediarios parcialmente procesados de este RNAm. Sin embargo, hay evidencias que apuntan a un segundo papel de esta proteína posiblemente en la traducción del RNAm de COX1, ya que cepas con un DNAm sin intrones (I^0) sólo recuperan parcialmente el fenotipo respiratorio de mutantes nulas de *cox24* (*cox24Δ*, Barros *et al.* 2006).

MSS51 y *COX24* se encuentran codificados en el cromosoma XII de *S. cerevisiae*, en un arreglo conocido como “cabeza-cabeza” (Figura 6); por lo cual, son transcritos en direcciones contrarias. Los codones de inicio de ambas proteínas están separados por 310 pares de bases y en esta región hay sitios de unión a ABF1 (activador transcripcional nuclear), lo cual sugiere la coregulación de la expresión de ambas proteínas (Simon *et al.* 1992).



Figura 6. Representación esquemática del arreglo en el cromosoma XII de COX24 y MSS51. Se indica el número de pares de bases (pb) que separan los codones de inicio de MSS51 y COX24, y la dirección de transcripción de los genes.

En este trabajo queremos estudiar la posible función de Cox24 en la traducción del RNAm de COX1, lo cual haremos por medio de un gen reportero de la traducción y la generación de mutantes sensibles a la temperatura que nos permitirán estudiar la función de Cox24, ya que datos previos del laboratorio indican que la mutante *cox24Δ* presenta inestabilidad del DNAm.

Justificación.

La biogénesis de Cox1 es altamente regulada y compleja, requiere la acción de diversas proteínas codificadas en el genoma nuclear para eventos como: su transcripción, maduración del RNAm, traducción del RNAm, inserción en la membrana, adición de grupos prostéticos y su ensamblaje en la CcO (Fontanesi *et al.* 2006; Funes and Herrmann, 2005; Costanzo and Fox, 1990; Khalimonchuk and Rödel, 2000). Una regulación tan compleja en la expresión de *COX1*, sustenta la importancia de Cox1, ya que constituye el núcleo catalítico (junto a Cox2) y de ensamblaje de la CcO. Uno de los pasos más importantes de esta regulación es a nivel de traducción del RNAm de *COX1*.

Cox24 es una proteína que se ha propuesto participa en el procesamiento del RNAm de *COX1* y se ha sugerido su participación en la traducción de éste (Barros *et al.* 2006), sin embargo, esta función no ha sido estudiada en detalle. Por lo que en este trabajo nos interesa caracterizar la función de Cox24 en la biogénesis de la CcO y, en particular, de Cox1.

Hipótesis.

Cox24 es un factor que participa como activador traduccional del RNAm de COX1.

Objetivo general.

Caracterizar la función de Cox24 en la biogénesis de Cox1.

Objetivos particulares.

- Caracterizar el fenotipo de mutantes *cox24Δ* en cepas con diferentes DNAm^t y de diferentes fondos nucleares.
- Determinar si la eliminación de *cox24* afecta la síntesis de Mss51.
- Analizar si Cox24 y Mss51, tienen funciones redundantes.
- Generar y caracterizar mutantes sensibles a temperatura de Cox24.
- Investigar, con el gen reportero mitocondrial *ARG8^m*, que Cox24 es un activador traduccional del RNAm de COX1.
- Investigar el nivel de conservación funcional de Cox24.

Materiales y métodos.

La composición de las soluciones necesarias para todas las técnicas utilizadas, los plásmidos y oligonucleótidos utilizados en la elaboración del estudio se listan detalladamente en el apéndice.

Cepas y medios

Durante la elaboración de este trabajo se usaron cepas de los fondos nucleares: D273-10B (número de catalogo ATCC: 24657), W303 (número de catalogo ATCC: 200060) y MCC123rho(o) (número de catalogo ATCC: 201442). Las levaduras se incubaron en medio fermentativo completo con 2% glucosa (YPD) o 2% galactosa (YPGal) y medio respiratorio completo con 3% etanol y 3% glicerol (YPEG). Para seleccionar crecimiento por auxotrofia, las levaduras se cultivaron en medio mínimo suplementado con aminoácidos (La composición de los medios utilizados se describe en los apéndices). En la tabla 2 se muestra la lista de cepas usadas y su genotipo.

Nombre de la cepa.	Genotipo nuclear (Mitocondrial)	Referencia
NB40-36A [^]	<i>MATa, ura3-52, leu2-3,112, lys2, arg8::hisG</i> (ρ^+)	Pérez-Martínez <i>et al.</i> (2003)
XPM274 [^]	<i>MATa ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG</i> <i>MSS51-3xHA</i> (ρ^+)	Pérez-Martínez <i>et al.</i> (2003)
XPM309 [^]	<i>MATa ura3-52 lys2 arg8::hisG</i> <i>cox24Δ::LEU2</i> (ρ^0)	Éste estudio.
XPM274 ρ^0 [^]	<i>MATa ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG</i> <i>MSS51-3xHA</i> (ρ^0)	Éste estudio.
XPM33 ⁺	<i>MATa, ura3-52, ade2-101, kar1-1, arg8::hisG</i> (ρ^+)	Pérez-Martínez <i>et al.</i> (2003)
YC48 ⁺	<i>MATa, ura3-52, ade2-101, kar1-1, arg8::hisG</i> (ρ^+, l^0)	Éste estudio.
XPM166a ⁺	<i>MATa, ura3-52, ade2-101, kar1-1, arg8::hisG</i> (ρ^+ , COX1 Ectópico)	Pérez-Martínez <i>et al.</i> (2003)
RGV5 [^]	<i>MATa ura3-52 lys2 arg8::hisG</i> <i>cox24Δ::LEU2</i> (ρ^+)	Éste estudio.
RGV6 [^]	<i>MATa ura3-52 lys2 arg8::hisG</i> <i>cox24Δ::LEU2</i> (ρ^+, l^0)	Éste estudio.
RGV7 [^]	<i>MATa ura3-52 lys2 arg8::hisG, cox24Δ::LEU2</i> (ρ^+ , COX1 Ectópico)	Éste estudio.
XPM47 [^]	<i>MATa ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG, mss51Δ::LEU2</i> (ρ^+)	Pérez-Martínez <i>et al.</i> (2003)
W303-1B [*]	<i>MATa ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i> (ρ^+)	Barros M. H. <i>et al</i> (2006)
W303ΔCOX24 [*]	<i>MATa ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i> <i>cox24Δ::HIS3</i> (ρ^+)	Barros M. H. <i>et al</i> (2006)

Nombre de la cepa.	Genotipo nuclear (Mitocondrial)	Referencia
TScox24-9*	<i>MATa ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 cox24Δ::HIS3 (p⁺)</i>	Éste estudio.
TScox24-21*	<i>MATa ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 cox24Δ::HIS3 (p⁺)</i>	Éste estudio.
TScox24-25*	<i>MATa ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 cox24Δ::HIS3 (p⁺)</i>	Éste estudio.

Tabla 2. Cepas. En la tabla se muestran las cepas usadas en la realización del trabajo, se indica su genotipo nuclear y mitocondrial más relevante. El símbolo * indica que las cepas son de fondo nuclear W303-1B. El símbolo + indica que las cepas son de fondo nuclear MCC123rho(o). El símbolo ^ indica que las cepas son de fondo nuclear D273-10B.

En la tabla 3 se muestran los plásmidos que contienen algunas de las cepas de la tabla 2. Para mayor información de los plásmidos ver la tabla de plásmidos en el apéndice.

Cepa	Plásmido	Inserto
RGV5	pXP121	COX24
RGV6	pXP121	COX24
RGV7	pXP121	COX24
TScox24-9	pTScox24-9	<i>cox24-9</i>
TScox24-21	pTScox24-21	<i>cox24-21</i>
TScox24-25	pTScox24-25	<i>cox24-25</i>

Tabla 3. Cepas con plásmidos. En la tabla se muestran los plásmidos que contienen las cepas indicadas. Se muestra el nombre y el inserto relevante que contiene el plásmido.

Eliminación de **COX24** (Jonhstan *et al.* 2002).

El casete de eliminación *cox24Δ::LEU2* se amplificó por PCR, a partir de DNA genómico (Strathern and Higgins, 2002) de la cepa NB40-36A con los oligonucleótidos COX24LEU2F y COX24LEU2R. El casete de eliminación purificado se transformó en la cepa XPM201, incubando a las levaduras 30 minutos a 30°C y posteriormente por 30 minutos a 42°C en mezcla de transformación (ver transformación de levaduras).

Transcurrido el tiempo las células se centrifugaron y se eliminó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 1mL de medio YPD y se incubaron por 2 horas a 30°C en agitación. Pasado el tiempo de recuperación, las células se centrifugaron y se eliminó parcialmente el sobrenadante. Con el medio sobrante se resuspendió el botón de células y se plaquearon en medio selectivo – LEU. Las cajas se incubaron por 4 días a 30°C y a las transformantes positivas se les confirmó la eliminación de *COX24* por PCR usando los oligonucleótidos COX24F6 y COX24R8.

Generación de las cepas RGV5, RGV6 y RGV7 y experimento fenotipo de una mutante *cox24Δ*.

Dado que las mutantes *cox24Δ* en cepas D273-10B presentan alta inestabilidad del DNAm, no es posible verificar el fenotipo respiratorio de estas cepas. Por lo cual se transfirieron mitocondrias con diferentes genotipos mitocondriales a una mutante *cox24Δ*, en presencia de un plásmido que tuviera el gen *COX24* silvestre y el marcador de auxotrofia *URA3* para que conservaran el DNAm.

Las cepas RGV5, RGV6 y RGV7 se generaron a partir de la cepa aceptora XPM309, por medio de citoinducción de las cepas donadoras XPM33 (*COX1* con intrones), YC48 (*COX1* sin intrones o I^0) y XPM166a (*COX1* ectópico) respectivamente. Estas cepas tienen una mutación (*kar1-1*) que impide la fusión de sus núcleos cuando son apareadas con una levadura de sexo opuesto, por lo cual pueden generarse levaduras con citoplasma mixto y mitocondrias fusionadas, pero con el núcleo original de alguna de las levadura apareadas (Conde and Fink, 1976). Este experimento se usó para transferir mitocondrias con diferentes genotipos (XPM33, YC48 y XPM166a) a una cepa *cox24Δ* (XPM309), que tiene mitocondrias sin DNAm (p^0).

Antes de citoinducirlas en XPM309, las cepas XPM33, YC48 y XPM166a se transformaron con el plásmido pXP120 que contiene una copia silvestre de *COX24* en un vector de alto número de copias. La citoinducción se realizó de la siguiente manera:

- Cultivar en medio YPD la cepa XPM309 (acceptora) y en medio –URA las cepas XPM33, YC48 y XPM166a (donadoras) por toda la noche a 30°C.
- Tomar 500 µL de cultivo de XPM309 y mezclar con 500 µL de cultivo de cada una de las cepas en tubos eppendorf independientemente.
- Centrifugar y remover la mayor cantidad de medio posible, con el sobrante resuspender las células y colocar una gota en una caja de YPD.
- Incubar las cajas de YPD por 4 horas a 30°C.
- Transcurrido el tiempo verificar en el microscopio la formación de cigotos y de células apareándose.
- Resuspender en 2 mL de YPD una pequeña cantidad de levaduras e incubar 3 horas a 30°C.
- Hacer una dilución 10^{-2} de las células y plaquear 100 µL de la dilución en medio –URA –ADE, para seleccionar contra las cepas donadoras (XPM33, YC48 y XPM166a).
- Incubar a 30°C de 2 a 4 días.
- Realizar réplicas para seleccionar las colonias con el fondo nuclear y mitocondrial deseado:
 - En medio –URA –LYS (selección contra cepa recipiente XPM309) sólo las células diploides crecen.
 - En medio –URA –ADE (selección contra cepas donadoras XPM33, YC48 y XPM166a), sólo células diploides y recipientes (XPM309) haploides crecen.
 - En medio YPEG sólo las células con DNAm_t crecen, para la citoinducción de la cepa donadora XPM166a, realizar réplicas en medio –ARG.
- Seleccionadas las colonias con el fenotipo esperado, éstas son purificadas y se comprueba el fenotipo en los medios antes descritos.

Las cepas RGV5, RGV6 y RGV7 se estriaron en medio –URA, después de dejarlas crecer se realizaron réplicas en medio –URA y medio con 5-FoA al 0.1%. Este reactivo es tóxico para las células que tienen el gen *URA3*. El objetivo de

incubar las células en medio con 5-FoA es que éstas pierdan el plásmido pXP120 (COX24). Posteriormente se realizan réplicas en YPD, YPEG, -ARG y en un césped con una cepa ρ^0 para asegurarnos que conserven el DNAm_t. De esta forma podemos comprobar el fenotipo respiratorio y la expresión del gen reportero *ARG8^m* en una mutante *cox24Δ*.

Obtención de mutantes sensibles a temperatura de *cox24* (TS*cox24*).

Se introdujeron mutaciones puntuales aleatorias en *COX24* por PCR, utilizando como templado al plásmido pXP121, que tiene la versión silvestre de *COX24* en un plásmido de bajo número de copias. Los siguientes cambios se realizaron para hacer el PCR mutagénico (Modificado de Cormack and Castaño, 2002):

1. Utilizar 3 mM de MgCl₂ (estabilizar pares no complementarios)
2. Utilizar 0.35 mM de MnCl₂ (disminuir la especificidad de la Taq polimerasa por templado)
3. Utilizar una mezcla de desoxinucleótidos trifosfato con: 1 mM de dGTP, dTTP, dCTP y 200 μM de dATP (promover incorporaciones erróneas)

El PCR se realizó con las siguientes condiciones:

3'	94°C	} 35 ciclos.
45''	94°C	
1'	51°C	
90''	72°C	
5'	72°C	

El producto de la PCR se purificó y cotransformó con el producto de la digestión del plásmido pRS416 con las enzimas *Bam*HI-*Hind*III en la cepa W303Δ*COX24*, posteriormente se seleccionaron transformantes positivas en medio -URA y se hicieron réplicas en medio -URA y en medio EG -URA, las réplicas en medio EG -URA se incubaron por 2 días a 25°C, 30°C y 37°C y se

buscaron colonias que no fueran capaces de crecer a alguna de las temperaturas usadas o lo hicieran parcialmente (Figura 7).

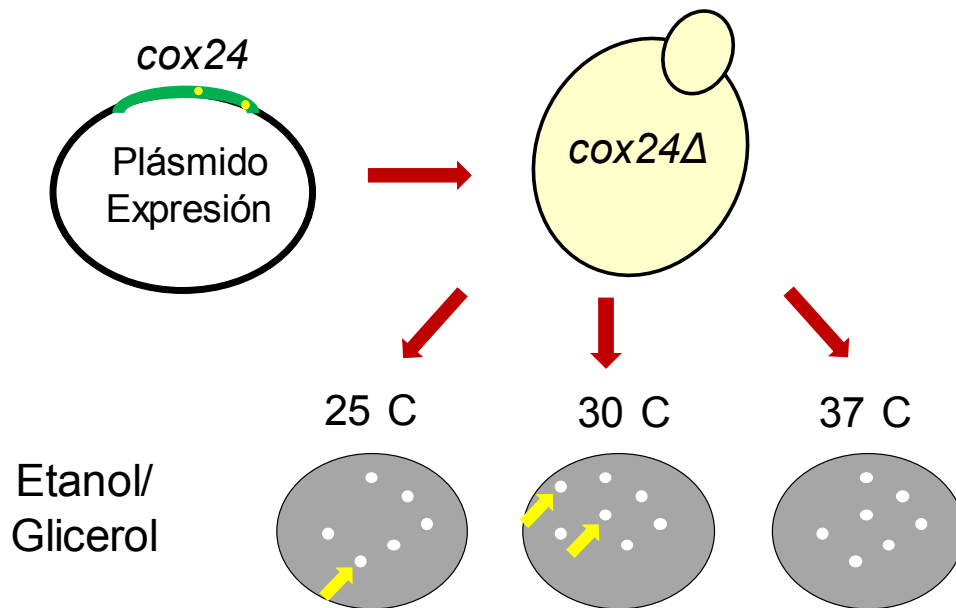


Figura 7. Representación esquemática de la búsqueda de mutantes sensibles a temperatura de *cox24*. El plásmido con *cox24* mutado se transformó en una mutante *cox24Δ*. Las mutantes TSc $ox24$ se buscaron al incubar las cajas de medio respiratorio (Etanol/Glicerol) por 2 días a las temperaturas indicadas.

Las mutantes TSc $ox24$ encontradas se purificaron al estriar y comprobar el fenotipo respiratorio en medio EG -URA a las diferentes temperaturas elegidas. También se comprobó que conservaran su DNAm t (ρ^+), apareándolas con una cepa ρ^0 de sexo contrario y verificando su crecimiento en EG -URA a la temperatura permisible de crecimiento. El crecimiento respiratorio de las TSc $ox24$ se comparó por diluciones seriadas en EG -URA, como controles se usó a la cepa W303 Δ COX24 transformada con el vector vacío pRS416 (control negativo) o con el plásmido pXP121 que contiene a COX24 (control positivo).

De las mutantes TSc $ox24$ -9, 21 y 25 (Figura 10) se recuperó el plásmido por extracción total de DNA de las levaduras (Jeffrey and Strathern, 2002) y éste se transformó por electroporación en células DH5 α . Las células se plaquearon en medio LB Amp para seleccionar transformantes positivas. Las transformantes

positivas se incubaron en medio LB^{Amp} líquido por toda la noche y se recuperó el plásmido con el QIAprep[®] Spin Miniprep kit (Qiagen) siguiendo las indicaciones del fabricante. El plásmido recuperado se digirió con *Bam*HI y *Hind*III, para comprobar la presencia del inserto deseado.

Los plásmidos recuperados se nombraron pTScox24-9, pTScox24-21 y pTScox24-25 indicando de esta manera de que mutante TScox24 proceden. Estos plásmidos se mandaron a secuenciar con el oligonucleótido pBS-F a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, para identificar las mutaciones en la región codificante de *cox24*.

Clonación de los ortólogos de Cox24.

Los ortólogos de Cox24 se amplificaron por PCR, usando como templado DNA genómico de *Yarrowia lipolytica* (*Y. lipolytica*) y *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) con los oligonucleótidos COX24atF1 y R1 para *A. thaliana* y COX24yIF1 y R1 para *Y. lipolytica*. Estos plásmidos tienen un sitio de *Not*I. Posteriormente los productos de PCR se digirieron con *Not*I y se ligaron al plásmido pDB20 digerido con *Not*I con T4 DNA ligasa (Promega) a 16°C por toda la noche. La ligación se transformó por electroporación en células DH5α y seleccionamos transformantes positivos en medio LB^{Amp}.

Las transformantes positivas se incubaron en medio LB^{Amp} líquido por toda la noche y se recuperó el plásmido con el QIAprep[®] Spin Miniprep kit (Qiagen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los plásmidos recuperados se digirieron con *Not*I, para comprobar la presencia del inserto deseado. Los plásmidos recuperados se nombraron pXP123 (*COX24* de *Y. lipolytica*) y pXP122 (*COX24* de *A. thaliana*) y se mandaron a secuenciar con el oligonucleótido pDB20-F a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, para comprobar la orientación del inserto.

Diluciones seriadas 1/10.

Incubar a 30°C toda la noche 2 mL de cultivo de la cepa deseada en el medio requerido. Al día siguiente centrifugar 0.5-1 mL de medio y eliminar el

sobrenadante y agregar la cantidad de agua estéril necesaria para que el cultivo quede a 0.01 g/mL.

En una placa de 96 pozos transferir 150 μ L de cultivo a 0.01 g/mL a un pozo; de este transferir 15 μ L al pozo adyacente que contiene 135 μ L de agua estéril. Repetir el paso anterior 5 veces agregando 15 μ L de cada dilución hecha a la siguiente, con lo cual creamos diluciones de 10^1 a 10^{-6} . Posteriormente las diluciones seriadas se imprimen en medio selectivo con un replicador y se incuban por 4 días a 25°C, 30°C y 37°C.

Cuantificación de la estabilidad del DNAm^t (cepas ρ^+).

- Crecer 3 cultivos de 2 ml en YPD toda la noche provenientes de 3 colonias ρ^+ de la misma cepa.
- Centrifugar 1 ml de cultivo y normalizar el peso húmedo de las células con agua estéril a 0.01 g/mL.
- Transferir 150 μ L del concentrado a una placa de 96 pozos y realizar diluciones seriadas hasta 10^{-4} .
- Se toman los 150 μ L de la dilución 10^{-4} y se plaquea todo en una caja de YPD.
- Al día siguiente se hacen réplicas en los medios necesarios (generalmente YPD, YPEG, césped contra NB40-3C ρ^0 y en medio selectivo para las células diploides -ADE -LYS).
- Contar el número de células diploides capaces de crecer en medio YPEG y normalizar contra el número total de células diploides.

Transformación de levaduras (Ito *et al.* 1983).

Incubar a 30°C toda la noche 2 mL de cultivo de la cepa deseada en el medio requerido (los medios deben estar en la fase exponencial de crecimiento al día siguiente), centrifugar 0.35-1 mL de cultivo y eliminar el sobrenadante agregar 52 μ L de la mezcla de transformación (40 μ L de PEG 3350 al 50%, 5 μ L acetato de litio 2 M, 5 μ L de DTT 2M y 2.5 μ L de DNA de esperma de salmón

desnaturalizado). A la mezcla anterior se le agrega el DNA deseado (100 ng) y se incuba en hielo durante 10 minutos y después incubar 30 min a 42°C. Posteriormente se plaquea en el medio selectivo requerido y se incuban las cajas a 30°C por 2 días.

Determinación de proteínas por Lowry modificado. (Markwell, 1978).

Curva de calibración: Usar una solución de albúmina de 1 mg/ml. Preparar soluciones de albúmina con 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 µl de la solución de albúmina. Llevar a 1 ml con agua como indica el paso 1.

- Ajustar la muestra con agua a 1 ml.
- Adicionar 3 ml de solución C y mezclar en vortex. Incubar 10 min a TA.
- Adicionar 300 µl de solución D y mezclar en vortex e incubar 30 min a TA.
- Medir absorbancia a 740nm.

Geles de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

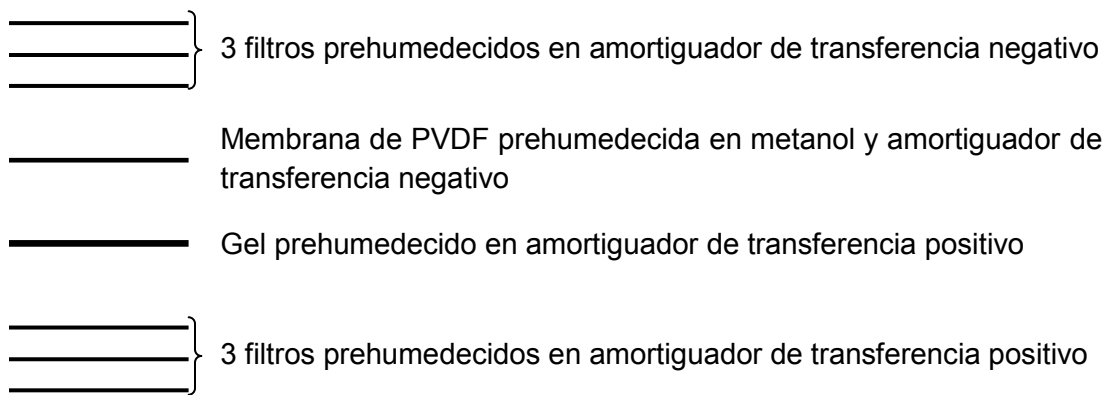
Soluciones.	Gel separador 12%	Gel apilador 4%	Gel separador 16%*	Gel apilador 5%*
Acrilamida 30%/ Bisacrilamida 0.8%	6 mL	0.65 mL	9 mL ⁺	0.83 mL ⁺
Tris 2 M pH 8.8	2.81 mL	-	3.28 mL	-
Tris 2 M pH 6.8	-	312.5 µL	-	150 µL
SDS 20%	75 µL	25 µL	84 µL	25 µL
H ₂ O	6 mL	3.95 mL	4.5 mL	4 mL
APS 10%	75 µL	50 µL	100 µL	50 µL
TEMED	7.5 µL	5 µL	10 µL	5 µL

Tabla 4. Composición de los geles para SDS-PAGE. El signo * indica la composición de los geles usados para separar las muestras de la traducción *in vivo* e *in organello*. El signo ⁺ señala que la solución de acrilamida/Bisacrilamida se usa al 30%/0.3%.

Las muestras para el SDS-PAGE se resuspenden en el amortiguador de cargado y se calientan por 5 minutos a 65°C. La electroforesis se inicia a 80 V por 30 minutos y posteriormente, aumentar el voltaje a 130 V por 60 minutos.

Inmunorélicas por Western Blot.

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore) mediante un método semi-seco usando la cámara de transferencia de FischerBiotech, de la siguiente manera:



Transferir de 1 a 2 horas a 1.5 mA/cm², cuidando que no pase de 10 V.

- La membrana con las proteínas se bloquea toda la noche a 4°C o 2 h a temperatura ambiente con solución de bloqueo.
- Incubar la membrana con solución de blot, la cual contiene el anticuerpo anti-HA (Roche) acoplado a peroxidasa de rábano, durante 1 h a temperatura ambiente.
- Lavar la membrana con solución de lavado por 10 minutos, repetir el lavado 2 veces más.
- Revelar la presencia del anticuerpo unido a la proteína Mss51-3xHA siguiendo las indicaciones del Kit Pierce ECL Western blot (Pierce).
- Tomar autoradiografía con la película BioMAx XAR Film (Kodak) exponiendo durante 1 min.

- Eliminar el anticuerpo unido a las proteínas de la membrana incubando con la solución de eliminación de anticuerpo por 30 minutos a 50°C
- Bloquear nuevamente con solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C
- Incubar la membrana con la solución de blot, la cual contiene el anticuerpo contra Citrato Sintasa, durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Lavar la membrana con la solución de lavado por 10 minutos, repetir el lavado 2 veces más.
- Incubar la membrana con la solución de blot, la cual contiene el anticuerpo secundario anti-Conejo (Sigma) acoplados a peroxidasa de rábano, durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Lavar la membrana con solución de lavado por 10 minutos, repetir el lavado 2 veces más.
- Revelar la presencia del anticuerpo siguiendo las indicaciones del Kit Pierce ECL Western blot (Pierce).
- Tomar autoradiografía con la película BioMAX XAR Film (Kodak). Exponiendo durante 30 segundos.
- Repetir con los anticuerpos necesarios.

Obtención de la fracción mitocondrial cruda (Modificado de Diekert *et al.* 2001).

- Crecer 2 ó 3 colonias de células en 2 mL de medio YPGal o –URA Gal a 30°C hasta saturación.
- Tomar 500 µL del medio anterior e inocular en 25 mL de medio YPGal o –URA Gal, incubar a 30°C toda la noche.
- Inocular 500 mL de medio YPGal o –UraGal, con los 25 mL del medio anterior e incubar hasta fase exponencial.
- Centrifugar a 4000 rpm por 10 min. a 4°C en el rotor GS3 (todas las centrifugaciones siguientes se hacen en este rotor, hasta que se indique lo contrario).

- Lavar el botón con agua fría desionizada y reunir todos los botones en un tubo de centrifuga previamente pesado.
- Centrifugar a 4000 rpm por 10 min. a 4°C. Eliminar el sobrenadante y pesar.
- Resuspender el botón en el amortiguador TD (2 mL/g de peso húmedo).
- Agitar 10 min. a 30°C a 250 rpm.
- Centrifugar a 3300 rpm por 5 min a 4°C.
- Lavar el botón con el amortiguador MP2 sin Zimoliasa (7 mL/g de peso húmedo).
- Centrifugar a 3300 rpm por 5 min a 4°C.
- Resuspender el botón con el amortiguador MP2 con zimoliasa-20T (3 mg/g de peso húmedo).
- Agitar 60 min. a 30°C a 250 rpm.

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

- Centrifugar a 2500 rpm por 5 min a 4°C.
- Resuspender en 60 mL de amortiguador Dounce.
- Homogenizar 10 veces usando el homogenizador y el pistilo de vidrio.
- Centrifugar a 3300 rpm por 5 min a 4°C y recuperar el sobrenadante.
- Centrifugar a 3300 rpm por 5 min a 4°C y recuperar el sobrenadante.
- Centrifugar a 12000 rpm por 12 min a 4°C en el rotor SS-34 (este rotor se usa en lo que resta del método), para recuperar las mitocondrias crudas en el botón.
- Resuspender el botón en 10 mL de amortiguador SH, primero resuspender en un volumen pequeño con la punta de la micropipeta cortada.
- Centrifugar a 4000 rpm por 5 min a 4°C y recuperar el sobrenadante.
- Centrifugar a 4000 rpm por 5 min a 4°C y recuperar el sobrenadante.
- Centrifugar a 12000 rpm por 12 min a 4°C.
- Resuspender el botón de mitocondrias crudas en 300 µL de amortiguador SH (con la punta de la micropipeta cortada).

Traducción *in vivo* de proteínas mitocondriales a partir de células completas

(Bonney et al. 2001).

- Crecer 2 ó 3 colonias de células en 2 mL de YPGal a 30°C toda la noche.
- Inocular 100 µL del medio anterior en 10 mL de YPGal, incubar a 30°C toda la noche.
- Cuando los cultivos alcancen una DO_{600nm} de 0.8-1, tomar la cantidad necesaria para tener una DO_{600nm} de 2.5 y centrifugar 1min a 13000 rpm.
- Resuspender el botón en 1.5mL de medio –MET e incubar 10 min. a 30°C con agitación.
- Adicionar 5 µL de cicloheximida (10 mg/mL, disuelta en etanol al 100%). Incubar máximo 5 min. a 30°C con agitación.
- Adicionar 5 µCi de S^{35} -Metionina e incubar por 30 min a 30°C con agitación.
- Inmediatamente enfriar en hielo 5 min. y adicionar 10 µL de metionina (200 mM) no radioactiva.
- Centrifugar a 13000 rpm por 1 min. a 4°C. Eliminar sobrenadante.

A partir de 0.12g de células:

- Lavar el pellet con 200 µL de amortiguador SHP frío, con inhibidor de proteasas de Sigma (3.3 µL/10mL)
- Resuspender el pellet en 200 µL de amortiguador SHP frío, con inhibidor de proteasas de Sigma (3.3 µL/10mL)
- Adicionar un volumen de perlas de vidrio, previamente enfriadas a -20°C.
- Agitar 30 segundos en vortex a velocidad máxima e incubar 30 segundos en hielo.
- Repetir dos veces el paso anterior.
- Centrifugar a 600 g por 5 min. a 4°C.
- Recuperar el sobrenadante y centrifugar a 13000 rpm por 10 min. a 4°C.
- Eliminar el sobrenadante y adicionar 40 µL de amortiguador de carga 1X.
- Calentar a 65°C por 5 min.
- Cargar 5 µL en gel de poliacrilamida/SDS al 16%, el resto guardarlo a -70°C. Correr el gel a 27 mA constantes a 7 cm de la interfase del gel.

- Secar el gel por 1 hora a 80°C en un secador de geles o transferir a membrana de PVDF (Millipore).
- Exponer el gel seco o la membrana de PVDF seca a la pantalla de fósforo por toda la noche.
- Escanear la emisión radioactiva de la pantalla de fósforo en: Thypoon 8600 Phosphoimager (Molecular Dynamics).

Traducción *in organello* a partir de mitocondrias crudas (Westermann *et al.* 2001; Hell *et al.* 2001).

- Preparar 1 mL de amortiguador 1.5X de *ioTL* con 0.2% de piruvato cinasa.
- Descongelar en hielo las mitocondrias crudas y tomar la cantidad necesaria para tener 50 µg de proteína mitocondrial. Ajustar el volumen a 5 µL con amortiguador SH.
- Adicionar 11 µL de amortiguador 1.5X de *ioTL*.
- Incubar 25 min a 30°C ó a 4°C.
- Adicionar 5 µCi de S³⁵-Metionina e incubar 20 min. a 30°C.
- Adicionar 1 mL de amortiguador SH y centrifugar a 1200 rpm por 10 min. a 4°C.
- Eliminar sobrenadante y resuspender el botón (mitocondrias) en 20 µL de amortiguador de cargado 1X.
- Cargar los 20 µL en gel de poliacrilamida/SDS al 16%. Correr el gel a 27 mA constantes a 7 cm de la interface del gel.
- Secar el gel por 1 hora a 55°C en un secador de geles o transferir a membrana de PVDF (Millipore).
- Exponer el gel seco o la membrana de PVDF seca, a la pantalla de fósforo por toda la noche.
- Escanear la emisión radioactiva de la pantalla de fósforo en: Thypoon 8600 Phosphoimager (Molecular Dynamics)

Resultados.

Estabilidad del DNAm^t en mutantes *cox24Δ*.

Para estudiar detalladamente la función de Cox24 en la traducción del RNAm de *COX1*, decidimos usar cepas de fondo nuclear D273-10B (cepa usada principalmente en el laboratorio). De esta manera podríamos utilizar diferentes construcciones de DNAm^t para evaluar las regiones en las cuales podría estar actuando Cox24, para promover la traducción del RNAm de *COX1*.

Cuando eliminamos a *COX24* en cepas de fondo nuclear D273-10B, éstas presentaron una alta inestabilidad del DNAm^t. Este fenotipo parece ser específico de esta cepa, ya que en cepas de fondo nuclear W303 no se reportó inestabilidad del DNAm^t en mutantes *cox24Δ* (Barros *et al.* 2006). Para probar si la alta inestabilidad del DNAm^t en mutantes *cox24Δ* en cepas D273-10B era específica, examinamos la estabilidad del DNAm^t en mutantes *cox24Δ* de ambos fondos nucleares.

La estabilidad del DNAm^t se analizó por la capacidad de una mutante *cox24Δ* de crecer en medio respiratorio (etanol/glicerol), después de ser apareada con una cepa silvestre ρ^0 . De esta manera podemos identificar las células de la mutante *cox24Δ* que conservaran el DNAm^t, ya que las células diploides sólo podrán crecer en un medio respiratorio si la mutante *cox24Δ* tiene un DNAm^t funcional. Como control se usó una cepa silvestre y una mutante nula *mss51* (*mss51Δ*), la cual no es capaz de crecer en medio respiratorio (Pérez-Martínez *et al.* 2003), pero no presenta inestabilidad del DNAm^t (Figura 8).

Como podemos observar en la Figura 8, en cepas de fondo nuclear W303 las dos mutantes y la cepa silvestre presentan un porcentaje similar de levaduras con DNAm^t (cepas ρ^+), lo cual indica estabilidad del DNAm^t. Sin embargo, en cepas de fondo nuclear D273-10B la mutante *mss51Δ* y la cepa silvestre tienen un porcentaje comparable de levaduras ρ^+ , lo cual indica estabilidad del DNAm^t. En contraste, la mutante *cox24Δ* no tiene levaduras ρ^+ , indicativo de la alta inestabilidad del DNAm^t de esta cepa.

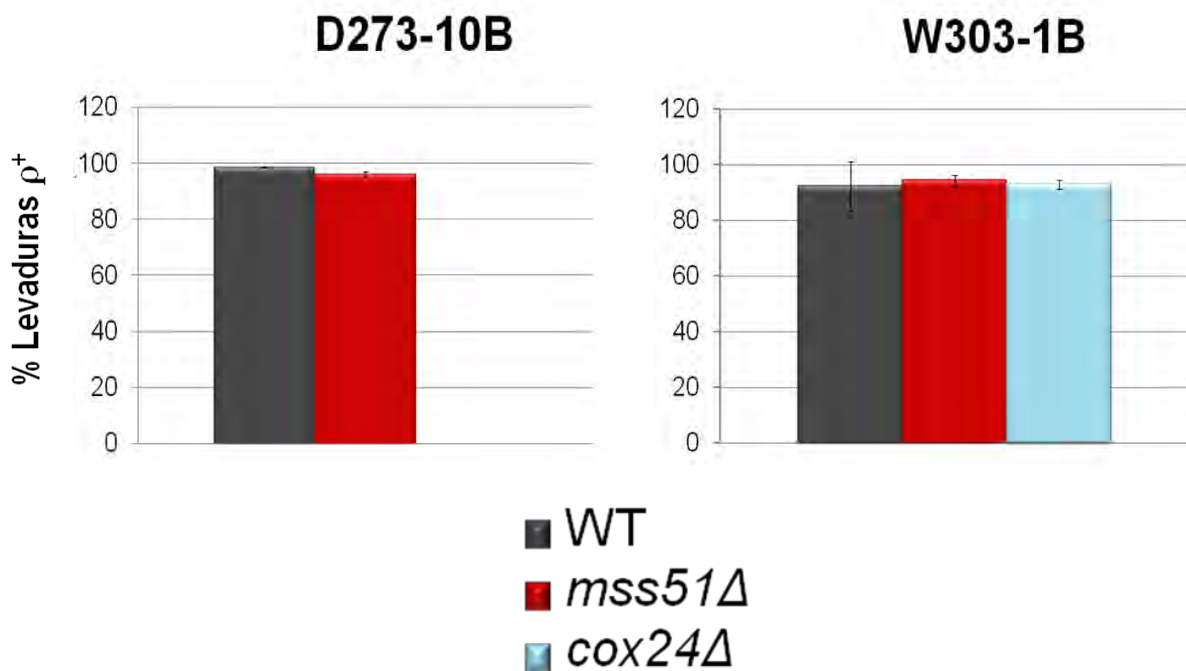


Figura 8. Estabilidad del DNAm_t en mutantes *cox24Δ*. Se graficó el porcentaje de levaduras ρ^+ . Como control se usó una cepa silvestre y una mutante *mss51Δ*.

Estos resultados indican que la gran inestabilidad del DNAm_t en las mutantes *cox24Δ* es específica para la cepa D273-10B, aunque se desconocen las causas de este fenotipo. Creemos que la diferencia en la estabilidad del DNAm_t se debe al fondo nuclear de cada tipo de cepa usada. La mayoría de los experimentos sucesivos se realizaron en cepas W303-1B que no presenta inestabilidad del DNAm_t, a menos que se indique lo contrario.

Fenotipo de mutantes nulas *cox24*.

Como ya hemos demostrado mutantes *cox24Δ* en cepas D273-10B presentan una gran inestabilidad del DNAm_t, por lo que no es posible verificar el fenotipo respiratorio de estas cepas directamente. Sin embargo, datos preliminares obtenidos en mutantes *cox24Δ* antes de que perdieran el DNAm_t, sugieren un fenotipo similar al de mutantes *mss51Δ* (Pérez-Martínez *et al.* 2003), lo cual nos sugirió un papel de Cox24 similar al de Mss51. Mss51 es una proteína

necesaria para la traducción del RNAm de *COX1*. Esta función la realiza actuando sobre 2 regiones del RNAm: actúa sobre la región 5' no traducida del RNAm de *COX1* y de manera independiente, sobre la región codificante del mismo (Pérez-Martínez *et al.* 2003).

Para corroborar si las mutantes *cox24Δ* y *mss51Δ* tienen un fenotipo similar, se generaron por citoinducción (ver materiales y métodos) mutantes *cox24Δ* que tuvieran diferentes genotipos mitocondriales en cepas D273-10B. Lo anterior se hizo en presencia de un plásmido que expresara una versión silvestre de *COX24* para evitar la pérdida del DNAm_t en estas cepas. Como controles se usaron cepas silvestres D273-10B, que tuvieran los mismos genotipos mitocondriales.

Las construcciones que se utilizaron para estudiar la función de Cox24 en la traducción del RNAm de *COX1* (Figura 9), son las siguientes:

- Un DNAm_t con el gen *COX1* con intrones (Figura 9A), para comprobar que la ausencia de Cox24 ocasiona la falta de la capacidad respiratoria (Barros *et al.* 2006)
- Un DNAm_t con el gen *COX1* sin intrones (*COX1* ^{l⁰}, Figura 9B), para comprobar si la ausencia de intrones recupera parcialmente la capacidad respiratoria de una mutante *cox24Δ* (Barros *et al.*, 2006)
- Un DNAm_t con la construcción de *COX1* ectópico (Figura 9C), en la cual *ARG8^m* reemplaza la región codificante de *COX1*, pero se encuentra bajo el control de las regiones 5' y 3' UTR de *COX1*, por lo cual su expresión depende de los activadores traduccionales de *COX1* y puede ser utilizado como gen reportero de la traducción. Con esta parte podremos ver efectos de Cox24 en la traducción del RNAm de *COX1*, sobre sus regiones UTR's (Figura 9C, flechas rojas). Adicionalmente, la región codificante de *COX1* se encuentra en otra parte del DNAm_t bajo el control de las regiones 5' y 3' de *COX2*, por lo cual su expresión depende de los activadores traduccionales de *COX2*. Con esta parte podremos ver efectos de Cox24 en la traducción del RNAm de *COX1*, sobre la región

codificante del RNAm de COX1 (Figura 9C, flecha negra) (Pérez-Martínez *et al.* 2003).

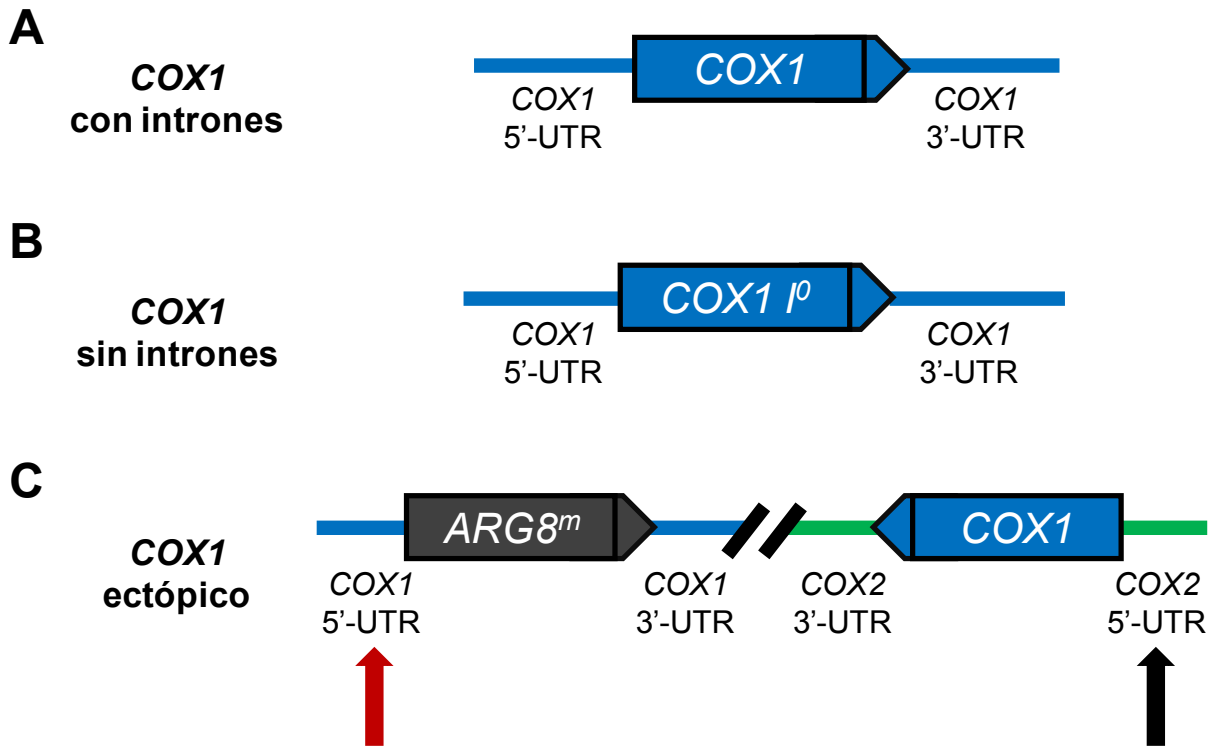


Figura 9. Representación esquemática de COX1, de las construcciones de DNAmt citoinducidos en la mutante *cox24Δ*. (A) COX1 con intrones, en azul se muestra el gen COX1, las líneas delgadas corresponden a las regiones UTR's y la caja con bordes negros a la región codificante. El mismo patrón de coloración de COX1 se conserva en B y C. (B) COX1 ρ^0 . (C) COX1 ectópico, la caja gris con bordes negros corresponde a la región codificante de ARG8^m. Las líneas verdes representan las regiones UTR's de COX2. Las flechas rojas y negras indican posibles sitios de acción de Cox24.

Para que las cepas perdieran el plásmido, se incubaron en medio con 5-FoA al 0.1%. El 5-FoA es tóxico para las levaduras cuando tienen el gen *URA3*, que es el marcador de selección que tiene el plásmido que expresa a COX24 silvestre. Después se realizaron réplicas en los medio adecuados para comprobar el fenotipo respiratorio de una mutante *cox24Δ* y también nos aseguramos que las cepas mantuvieran el DNAmt apareando con un césped de una cepa ρ^0 .

Adicionalmente se hizo una réplica en medio –URA, para asegurarnos que las levaduras no fueran capaces de crecer en este medio, indicando que habían perdido el plásmido (Figura 10A).

Como se ha reportado previamente, las mutantes *cox24Δ* no son capaces de crecer en un medio respiratorio (Barros *et al.* 2006; Figura 10A, panel superior), sin embargo la eliminación de los intrones de *COX1* en cepas D273-10B no recupera el crecimiento respiratorio de mutantes *cox24Δ* (Figura 10A, panel intermedio). La mutante *cox24Δ* con la construcción de *COX1* ectópico es incapaz de crecer en medio –ARG (Figura 10A, panel inferior), lo cual sugiere que el sitio de acción de Cox24 podría ser la región 5'-UTR de *COX1* para promover la traducción del gen reportero *ARG8^m*, al igual que Mss51 (Pérez-Martínez *et al.*, 2009). La mutante tampoco es capaz de crecer en medio respiratorio (Figura 10A, panel inferior), lo que sugiere la acción de Cox24 sobre la región codificante de *COX1* para promover su traducción. Como era de esperarse las cepas control son capaces de crecer en medio respiratorio y en el caso de la cepa control con *COX1* ectópico, también es capaz de crecer en –ARG.

El fenotipo observado en mutantes *cox24Δ* es similar al descrito en mutantes *mss51Δ* (Pérez-Martínez *et al.* 2003). Para poder comparar el fenotipo de ambas mutantes, se analizó el fenotipo de la mutante *mss51Δ* en cepas D273-10B, con los mismos genotipos mitocondriales (Figura 10B). Esta mutante es incapaz de crecer en medio respiratorio (Figura 10B, panel superior) y la ausencia de intrones en *COX1* no recupera la capacidad respiratoria de la cepa (Figura 10B, panel intermedio). La mutante *mss51Δ* tampoco es capaz de crecer en medio –ARG, ni en medio respiratorio con la construcción con *COX1* ectópico (Figura 10B, panel inferior). El fenotipo de la mutante *mss51Δ*, es ocasionado por el requerimiento de la acción de Mss51 sobre la región 5'-UTR y la región codificante de *COX1* (Pérez- Martínez *et al.*, 2005; Pérez- Martínez *et al.*, 2009).

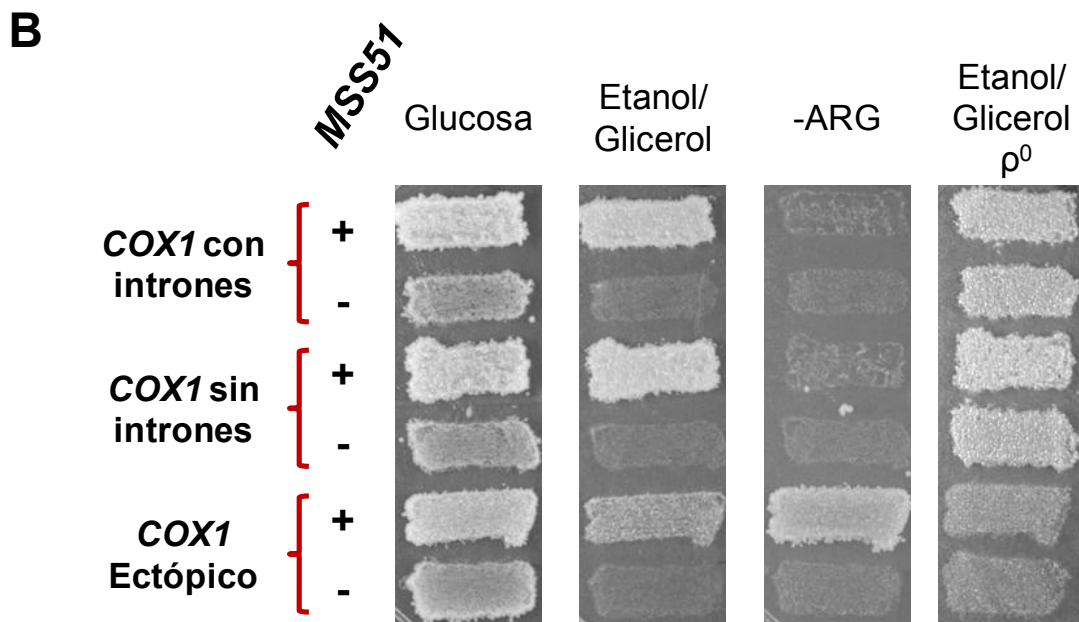
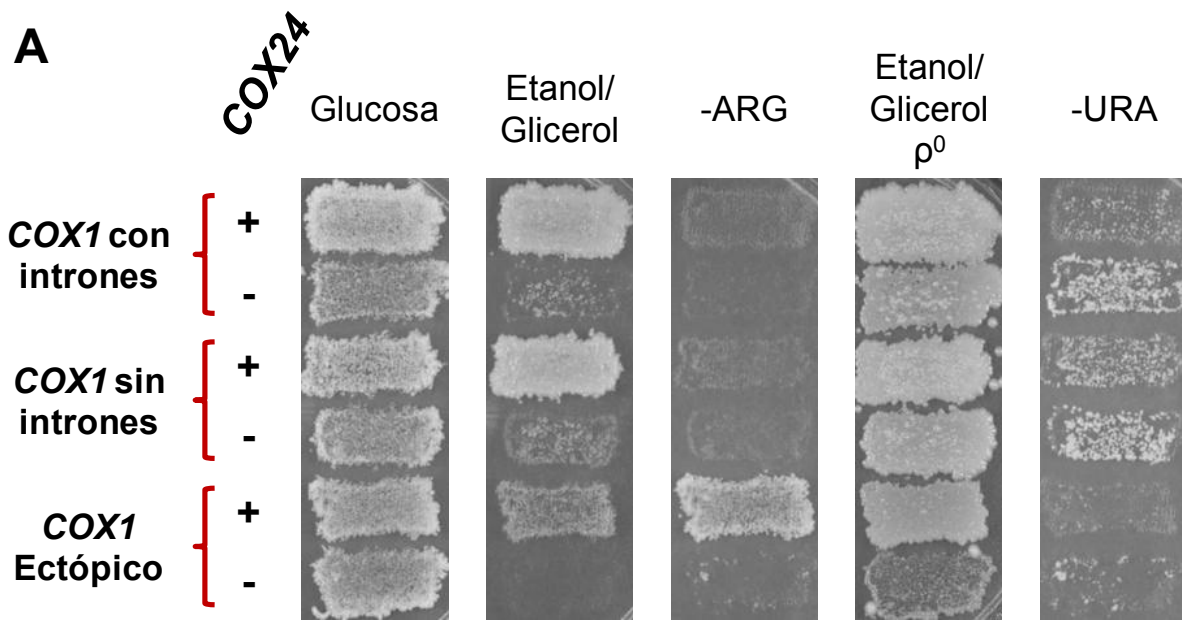


Figura 10. Fenotipo de la mutante *cox24Δ* (A) Fenotipo de crecimiento de una mutante *cox24Δ* con los diferentes genotipos mitocondriales indicados a la izquierda. (B) Fenotipo de crecimiento de una mutante *mss51Δ* con los diferentes genotipos mitocondriales indicados a la izquierda. *ARG8^m* es utilizado como gen reportero de la traducción. El signo + indica la presencia del gen silvestre, el signo – indica la ausencia del gen silvestre. El etanol/glicerol ρ^0 indica la presencia del DNAm^t en las mutantes *cox24Δ*. El experimento se realizó con las cepas de fondo nuclear D273-10B.

El requerimiento de Cox24 para la síntesis de COX1 se comprobó por marcaje con S³⁵-Metionina de las proteínas sintetizadas en la mitocondria (Figura 11). En este experimento podemos observar que la incorporación S³⁵-Metionina en Cox1 y Cox2 se ve afectada en una mutante *cox24Δ* comparada con una cepa silvestre, siendo el efecto más marcado sobre Cox1. Como era de esperarse, la transformación de una mutante *cox24Δ* con un plásmido que expresa a COX24 silvestre recupera la incorporación de S³⁵-Metionina en Cox1 y Cox2 a un nivel similar el de la cepa silvestre.

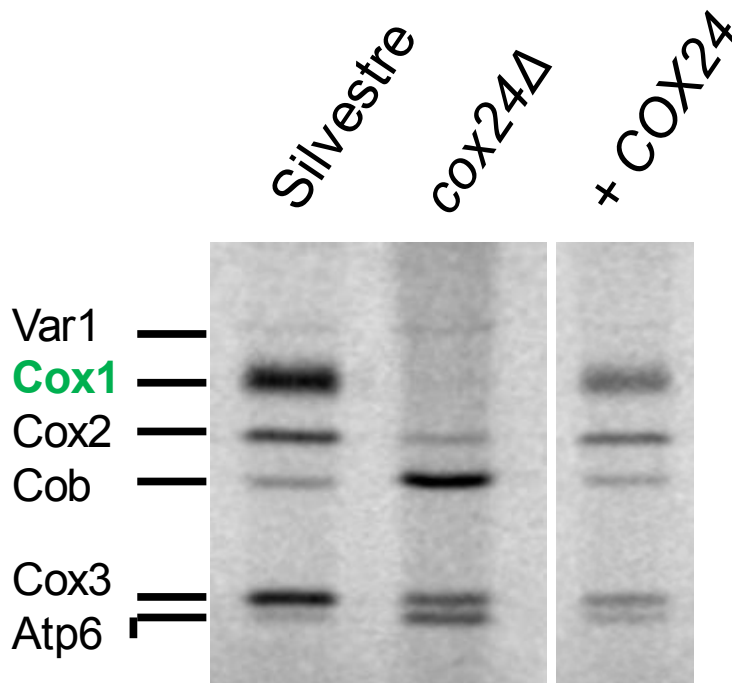


Figura 11. Síntesis de proteínas codificadas en el DNAmT en una mutante *cox24Δ*. Marcaje de proteínas sintetizadas en la mitocondria con S³⁵-Metionina. + COX24 indica una mutante *cox24Δ* transformada con un plásmido que expresa una copia silvestre de COX24. Experimento hecho en cepas W303.

Estos experimentos apoyan la idea de que Cox24 podría promover la síntesis de Cox1 de manera similar a Mss51. No obstante existen diferencias importantes entre el fenotipo de la mutantes nulas de ambas proteínas, siendo las más importantes la diferencia en el marcaje de Cox2 con S³⁵-Metionina y la

inestabilidad del DNAm^t (al menos en cepas de fondo nuclear D273-10B) observada en mutantes *cox24Δ*.

La síntesis de Mss51 no se afecta en las mutantes *cox24Δ*.

Dada la cercanía de *COX24* y *MSS51* en el cromosoma y la posibilidad de que ambos genes tengan un perfil de expresión semejante (Simon *et al.* 1992), el fenotipo no respiratorio de las mutantes *cox24Δ* podría deberse a la alteración de la expresión de *MSS51* por la eliminación de *cox24*. Para descartar esta posibilidad, se verificó la presencia de la proteína Mss51 en mutantes *cox24Δ*, en comparación con una cepa silvestre.

Para ello se usó una cepa en la cual *MSS51* en el cromosoma tiene un triple epítotope de hemaglutinina en su extremo carboxilo terminal (Mss51-3xHA, Pérez-Martínez *et al.* 2003). Este experimento se realizó en cepas de fondo nuclear D273-10B, donde se observó la similitud de fenotipos entre las cepas *cox24Δ* y *mss51Δ*. Se aislaron extractos celulares de la cepa silvestre y *cox24Δ*, las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF. Ésta se incubó con anticuerpos anti-HA y se detectó la presencia de Mss51-3xHA por quimioluminiscencia (Figura 12).

De esta manera observamos que la cepa silvestre y la mutante *cox24Δ* tienen niveles equivalentes de la proteína Mss51-3xHA. También analizamos una cepa silvestre ρ^0 para estudiar si la ausencia de DNAm^t afecta la síntesis de Mss51-3xHA, sin que observáramos cambios en los niveles de la proteína Mss51-3xHA (Figura 12). Este resultado indicó que la síntesis de Mss51 no se afecta por la eliminación de *cox24*, ni por la pérdida del DNAm^t que presentan las mutantes *cox24Δ*.

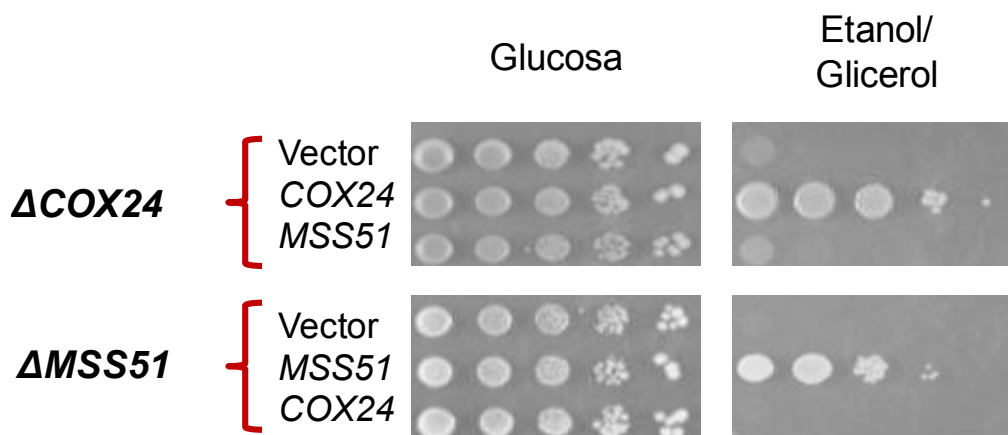


Figura 13. La expresión de *MSS51* en una cepa nula *cox24* no recupera la capacidad respiratoria. Diluciones seriadas 1/10 de las transformantes de los plásmidos de alto número de copias (con el origen de replicación del plásmido 2 μ) de *COX24*, *MSS51* y el vector vacío. Se incubaron por 4 días a 30°C.

Con los resultados obtenidos en los experimentos anteriores, concluimos que el fenotipo no respiratorio de la cepa nula *cox24* se debe a la eliminación de *COX24* y no a la alteración de la expresión de *MSS51* (Figura 12). También comprobamos que la sobreexpresión de *MSS51* no es capaz de compensar la falta de *COX24* ó viceversa (Figura 13). Esto indica que cada proteína es esencial en la función que realiza, aun cuando pudieran participar en una vía común para promover la síntesis de Cox1.

Generación de mutantes sensibles a temperatura de *cox24*.

Debido a que las mutantes *cox24* Δ del fondo nuclear D273-10B generan alta inestabilidad del DNAm_t, decidimos buscar mutantes de *cox24* sensibles a temperatura (TSc_{cox24}). Para obtener TSc_{cox24} realizamos un PCR mutagénico (ver materiales y métodos) que introduce mutaciones puntuales aleatorias en *COX24*; los productos del PCR mutagénico se transformaron en una mutante *cox24* Δ de fondo nuclear W303-1B. Posteriormente se buscaron colonias aisladas sensibles a temperatura, en medio EG -URA. Las temperaturas usadas para la búsqueda de TSc_{cox24} fueron 25°C, 30°C y 37°C.

De 12,000 colonias analizadas, se lograron aislar 27 mutantes TScox24 con un fenotipo no respiratorio parcial. Posteriormente se comparó el crecimiento respiratorio de las mutantes TScox24 por diluciones seriadas contra una cepa con COX24 silvestre a 25°C, 30°C y 37°C (datos no mostrados). De esta manera se escogieron las mutantes TScox24-9, 21 y 25 que presentaron el crecimiento respiratorio sensible a temperatura más evidente, para análisis posteriores (Figura 14).

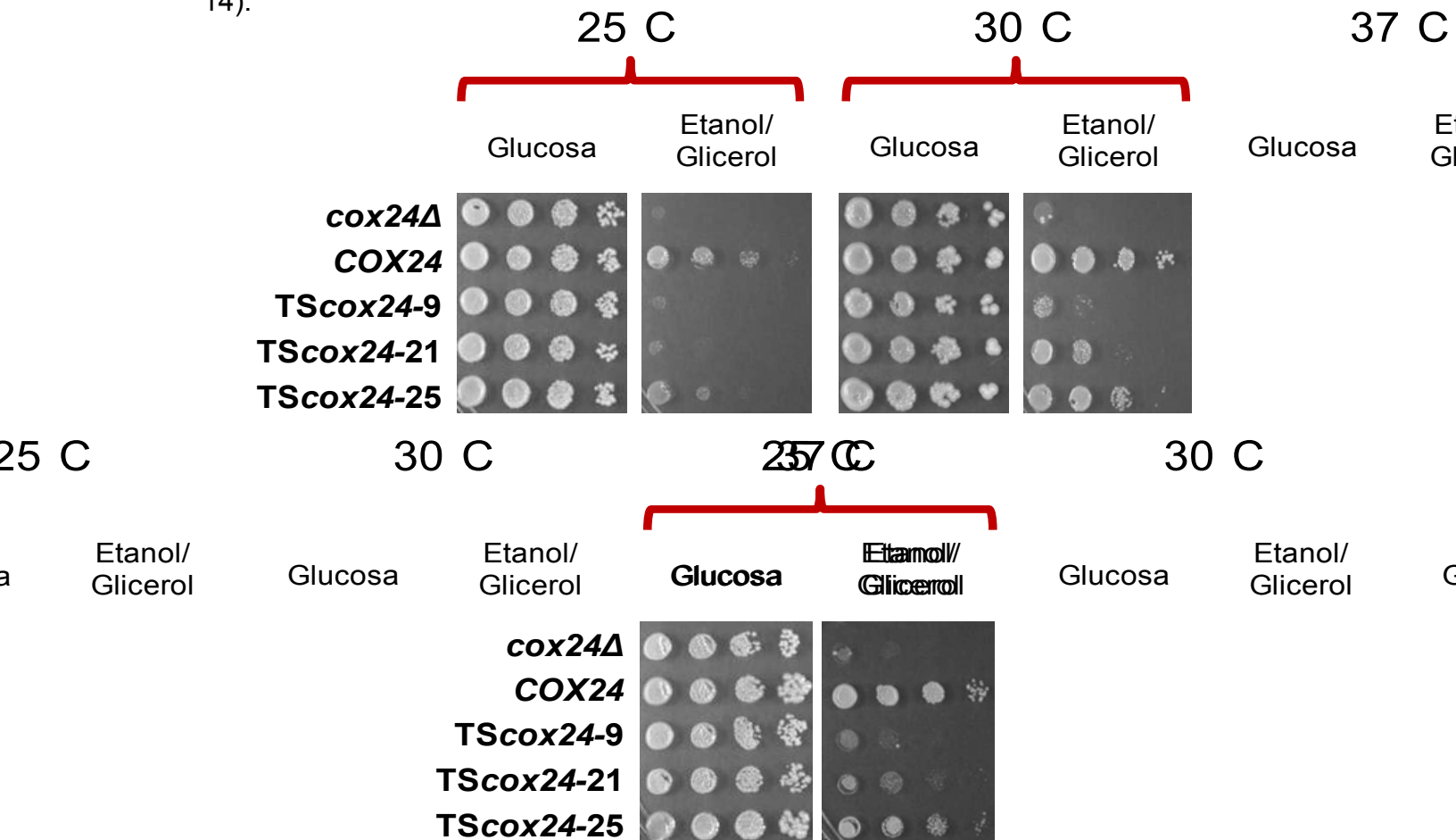


Figura 14. Fenotipo respiratorio de mutantes sensibles a temperatura de *cox24* (TScox24). Se hicieron diluciones seriadas (1/10) de las mutantes TScox24-9, 21 y 25. Las cajas se incubaron por 3 días a las temperaturas indicadas. Además se incluye la mutante *cox24Δ* transformada con el plásmido vacío como control negativo (vector) y con plásmido de bajo número de copias con *COX24* como control positivo de respiración. El experimento se realizó en cepas de fondo nuclear W303-1B, que tienen un DNAm_t con intrones.

Las mutantes TScox24 analizadas presentaron un amplio espectro de crecimiento respiratorio, sin que se viera afectado el crecimiento en medios fermentativos. La mutante más afectada fue la mutante TScox24-9, seguida de la mutante TScox24-21 y, finalmente, la menos afectada fue la mutante TScox24-25. En general la temperatura permisible de crecimiento de las mutantes TScox24 fue de 30°C y la temperatura no permisible fue de 25°C (a 37°C también se encuentran afectadas aunque en menor medida). Cabe mencionar que todas las mutantes presentaron un crecimiento menor a la cepa con COX24 silvestre en las temperaturas probadas.

De las mutantes TScox24 seleccionadas se recuperó el plásmido de las células de levadura y por secuenciación se identificaron las mutaciones puntuales en la región codificante de *cox24* (ver materiales y métodos). En la Tabla 5 se muestran las mutaciones que resultaron en un cambio de aminoácido en las mutantes TScox24-9, 21 y 25. Las mutaciones están presentes en toda la proteína, sin embargo, hay una tendencia de acumulación en la región del extremo carboxilo terminal (principalmente de los aminoácidos 83 al 115), que es una región con una gran cantidad de residuos cargados positivamente. Esta región es la más conservada entre los posibles ortólogos de Cox24, en especial en hongos (ver discusión). Además se ha propuesto que pudiera unir ácidos nucleicos (Simon *et al* 1992).

pTScox24	Mutaciones
9	T33A, M52K, <u>K90E</u> , <u>K92I</u> , <u>K101E</u>
21	C23R, Q32R, <u>L93P</u> , <u>K95R</u>
25	M42T, <u>K83E</u> , <u>Paro112Q</u>

Tabla 5. Mutaciones puntuales en la región codificante de *cox24* de los plásmidos de las mutantes sensibles a temperatura. Se encuentran subrayadas las mutaciones que se localizan en la región carboxilo terminal de *cox24*.

Para comprobar que el fenotipo de respiración sensible a temperatura se debía a la presencia de *cox24* con mutaciones puntuales, los plásmidos recuperados se retransformaron en una cepa *cox24Δ*. La presencia de los plásmidos recuperados de las mutantes sensibles a temperatura de *cox24* (pTSc $ox24$) fue suficiente para reproducir el fenotipo de respiración sensible a temperatura en una cepa *cox24Δ* (datos no mostrados).

Las mutantes TSc $ox24$ tienen defectos principalmente en la síntesis de Cox2.

Para investigar la causa del fenotipo respiratorio de las mutantes TSc $ox24$, realizamos un marcaje con S³⁵-Metionina de las proteínas sintetizadas en las mitocondrias aisladas (Figura 15). Las mitocondrias aisladas de las TSc $ox24$ -9, 21 y 25 se preincubaron por 25 min a 4°C (temperatura no permisible) o a 30°C (temperatura permisible), previamente a la adición de S³⁵-Metionina (Hell *et al.* 2001).

Cuando preincubamos a las mitocondrias a 30°C por 25 min, la incorporación de S³⁵-Metionina a Cox1, en las mutantes TSc $ox24$ -9, 21 y 25 es menor comparada a la observada para mitocondrias de una cepa con Cox24 silvestre. El mismo efecto se observó en Cox2 a 30°C (Figura 15). Esto indica que las mutantes TSc $ox24$ -9, 21 y 25 sintetizan menos Cox1 y Cox2, lo cual concuerda con el crecimiento respiratorio de las TSc $ox24$ a 30°C, ya que ninguna es capaz de crecer en un medio respiratorio como una cepa con Cox24 silvestre (Figura 14).

Cuando preincubamos las mitocondrias a 4°C por 25 min para simular la temperatura de crecimiento respiratorio no permisible, la incorporación de S³⁵-Metionina a Cox1, en las mutantes TSc $ox24$ -9, 21 y 25, es muy similar a la observada en estas mutantes a 30°C. En cambio se observó una incorporación deficiente de S³⁵-Metionina a Cox2, en las TSc $ox24$ -9, 21 y 25, si la comparamos con la observada en estas mutantes a 30°C. La reducción parece ser específica, ya que las mitocondrias de la cepa con COX24 silvestre preincubadas a 30°C y 4°C, presentan una incorporación de S³⁵-Metionina en Cox1 y Cox2 similar, por lo

que descartamos un efecto inespecífico de la temperatura de preincubación (Figura 15).

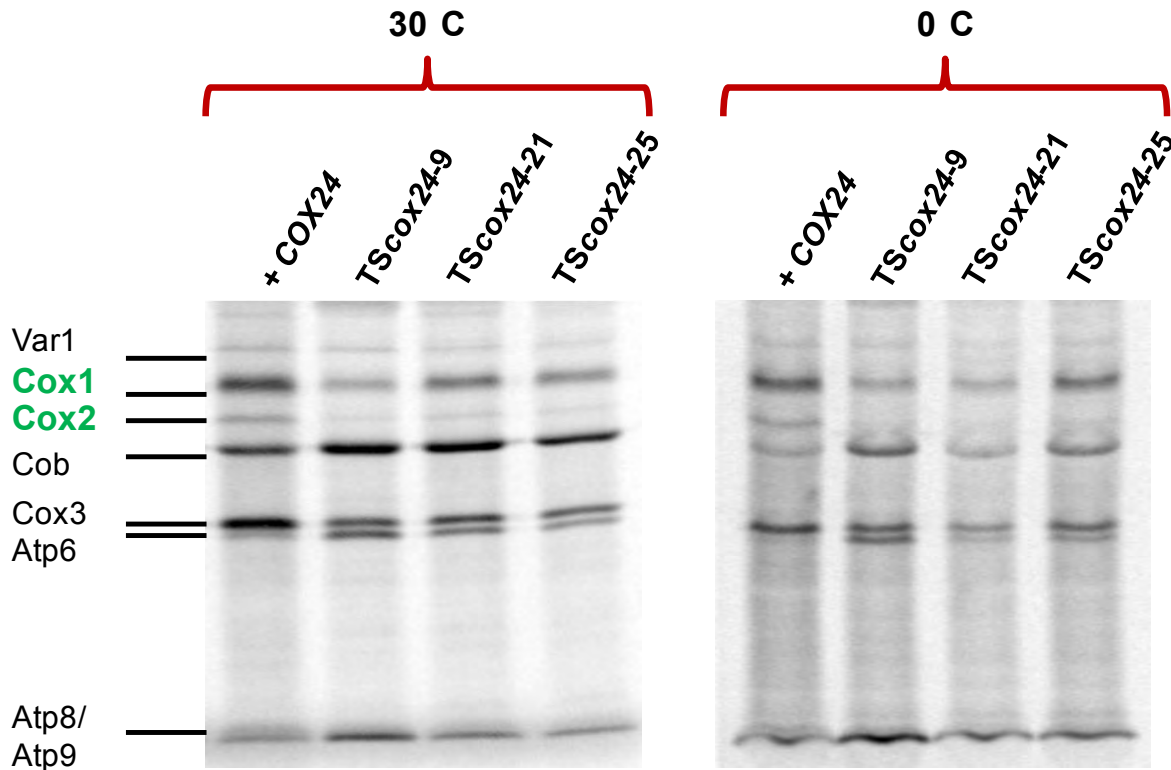


Figura 15. Perfil de síntesis de proteínas mitocondriales en las TScox24. Marcaje de proteínas sintetizadas en la mitocondria con S³⁵-Metionina a partir de mitocondrias crudas de las TScox24. Las mitocondrias se preincubaron a 4°C o a 30°C, antes de la adición de S³⁵-Metionina. + COX24 indica mitocondrias de una cepa *cox24Δ*, transformada con un plásmido que expresa una versión de COX24 silvestre, la cual se usó como control. En verde se indican Cox1 y Cox2. Experimento realizado en cepas W303 con un DNAmT con intrones.

Este resultado indica que el efecto de crecimiento respiratorio sensible a temperatura de las mutantes TScox24-9, 21 y 25 se debe principalmente a la falta de síntesis de Cox2 y no de Cox1; ya que la síntesis de Cox1 (aunque menor que en una cepa con Cox24 silvestre) es equivalente a 0°C y 30°C. Sin embargo con este experimento no se puede descartar que la ausencia de Cox2 se deba a otros

factores como rápida degradación de la proteína o la menor estabilidad del RNAm de COX2.

Los ortólogos de Cox24 de *Yarrowia lipolytica* y *Arabidopsis thaliana* complementan parcialmente una mutante *cox24Δ*.

Para seguir caracterizando a Cox24 se buscaron ortólogos de la proteína, por medio de alineamientos en la base de datos Uniprot (<http://www.uniprot.org/>). De esta manera se pudieron identificar posibles ortólogos en hongos y plantas, por lo cual decidimos clonar a un ortólogo de Cox24 de hongos *Yarrowia lipolytica* (*Y. lipolytica*) y uno de plantas *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*), para investigar si éstos podían complementar una mutante *cox24Δ* de *S. cerevisiae* y probar si la función de Cox24 se encuentra conservada.

El posible ortólogo de Cox24 de *Y. lipolytica* (COX24 (Y)) es una proteína de 229 aminoácidos (nombre proteína: YALI0B22836p) que se encuentra codificada en el cromosoma B de este hongo. En *A. thaliana* (COX24 (A)) se encontró, como posible ortólogo, a una proteína de 138 aminoácidos y se encuentra codificada en el cromosoma 5 (nombre proteína: At5g63150) de esta planta. La evidencia de la existencia de ambas proteínas es a nivel teórico por análisis de los genomas de ambos organismos. Se decidió clonar los ortólogos de estas especies por la posibilidad de obtener muestras de DNA genómico de ambas.

COX24 (A) y COX24 (Y) se clonaron en un vector de expresión de levadura de alto número de copias, bajo control del promotor de la alcohol deshidrogenasa (*ADH1*) de *S. cerevisiae* (ver materiales y métodos). Estos plásmidos se transformaron en una mutante *cox24Δ* y se analizó su capacidad para recuperar el crecimiento respiratorio de la cepa (Figura 16A). COX24 (A) y COX24 (Y) también se transformaron en una mutante *mss51Δ*, para demostrar que el efecto de los ortólogos de Cox24 en una mutante *cox24Δ* no son inespecíficos (Figura 16B).

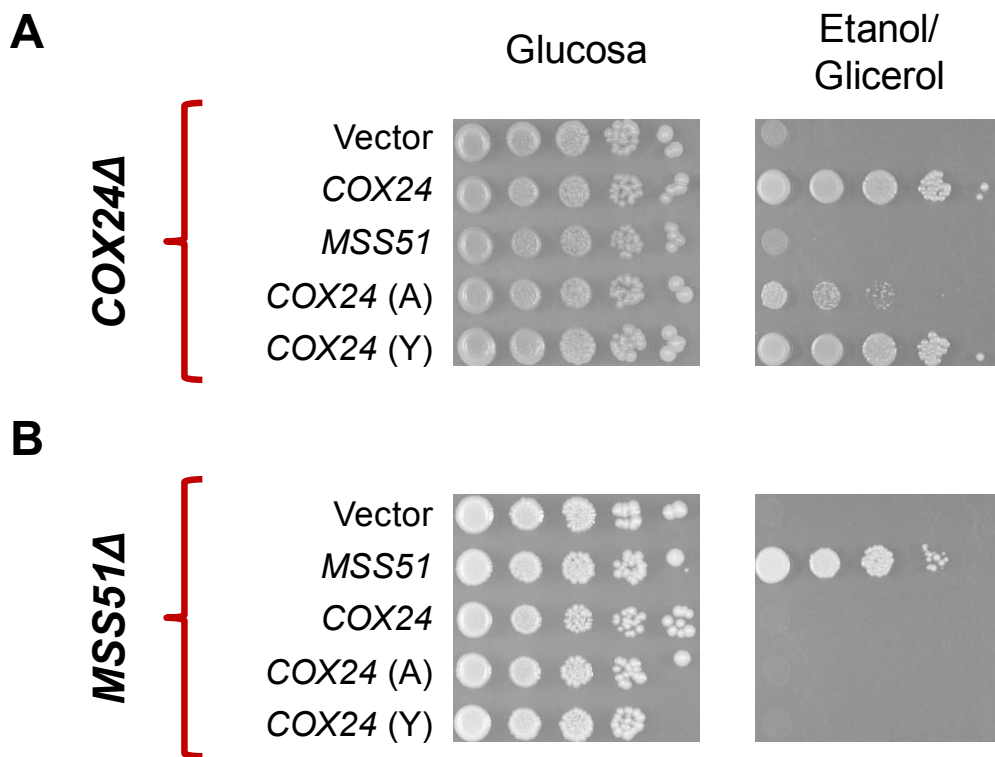


Figura 16. Complementación de una mutante *cox24Δ* por los ortólogos *COX24* (A) y *COX24* (Y). (A) Diluciones seriadas 1/10 de la mutante *cox24Δ* transformada con los plásmidos que tienen al posible ortólogo de Cox24 de *Y. lipolytica* y *A. thaliana*. (B) Diluciones seriadas 1/10 de la mutante *mss51Δ* transformada con los plásmidos que tienen al posible ortólogo de Cox24 de *Y. lipolytica* y *A. thaliana*. Las cajas se incubaron por 5 días a 30°C. Experimento realizado en cepas de fondo nuclear W303-1B

Como podemos observar, ambos ortólogos pueden complementar la función de Cox24, ya que la mutante *cox24Δ* recupera parcialmente la capacidad de crecer en medios respiratorios aunque sea parcialmente (Figura 16A). La complementación es un efecto específico ya que una mutante *mss51Δ* no recupera la capacidad respiratoria con ninguno de los ortólogos de Cox24 (Figura 16B).

La complementación de la mutante *cox24Δ* es mayor con el ortólogo de COX24 (Y) que con el de COX24 (A), esto puede deberse a la cercanía evolutiva que existe entre ambos hongos, si la comparamos con *A. thaliana*. No obstante es interesante el hecho de que una proteína de *A. thaliana* pueda ser sintetizada e importada a la mitocondria de *S. cerevisiae* para suplir la función de Cox24; lo cual indica que al menos en plantas y hongos Cox24 se encuentra conservada y realiza funciones similares, a pesar de la baja identidad a nivel de secuencia de aminoácidos.

Discusión.

La regulación de la síntesis de Cox1 es muy compleja y está altamente regulada. Los niveles de regulación van desde la transcripción del RNAm, hasta el nivel de ensamblaje de Cox1 en la CcO (Funes and Herrmann, 2005; Fontanesi *et al.* 2008). En este trabajo proponemos que Cox24 es un factor que participa en la síntesis de Cox1 y posiblemente también en la síntesis de Cox2.

Cox24 ha sido implicado en el procesamiento de algunos de los intrones del RNAm de *COX1* y se ha reportado que su eliminación causa la pérdida de la capacidad respiratoria de la levadura. Esta capacidad respiratoria de la cepa se recupera parcialmente con la eliminación de los intrones del gen *COX1* (Barros *et al.* 2005). Cabe mencionar que el estudio antes mencionado se realizó en cepas de fondo nuclear W303. Nuestros resultados concuerdan parcialmente con los encontrados previamente: en el fondo nuclear D273-10B observamos que una mutante *cox24Δ* con *COX1* con intrones no es capaz de crecer en medios respiratorios, sin embargo la eliminación de los intrones de *COX1* no recupera esta capacidad en este fondo nuclear (Figura 10A).

Adicionalmente observamos que la mutante *cox24Δ* (con fondo nuclear D273-10B), tiene un fenotipo similar a la mutante *mss51Δ*, cuando tiene la construcción del DNAm con *COX1* ectópico (Figura 10A y 10B, paneles inferiores). Con esta construcción podemos observar que ambas mutantes son incapaces de crecer en medio –ARG, indicando que podrían actuar sobre la región 5' no traducida del RNAm de *COX1* para promover su traducción (Figura 17, flecha roja). No obstante, las mutantes tampoco son capaces de crecer en un medio respiratorio, lo cual sugiere que también es necesaria su acción en la región codificante del mismo RNAm, para que pueda ser traducido (Figura 17, flecha negra). En el caso de Mss51, se sabe que sí actúa sobre las regiones del RNAm de *COX1* antes mencionadas (Pérez-Martínez *et al.* 2003; Pérez-Martínez *et al.* 2009).

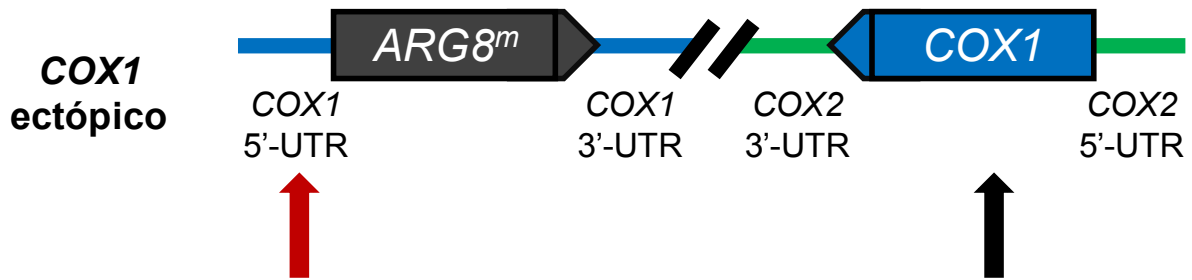


Figura 17. Probables sitios de acción Cox24 sobre el RNAm de COX1 ectópico. La flecha roja indica la acción sobre la región 5'-UTR del RNAm de COX1 y la flecha negra indica sobre la región codificante.

El marcaje con S³⁵-Metionina de proteínas codificadas en la mitocondria de una mutante *cox24Δ* reforzó la idea del papel de Cox24 en la traducción del RNAm de COX1. En la mutante *cox24Δ* la marca correspondiente a Cox1 no se detecta y la transformación con un plásmido que expresa a COX24 silvestre recupera la incorporación de S³⁵-Metionina a Cox1 (Figura 11). Estos resultados nos sugirieron un papel en la traducción del RNAm de COX1 de Cox24, posiblemente en conjunto con Mss51.

Los genes que codifican para *MSS51* y *COX24* se encuentran adyacentes en el cromosoma y comparten regiones regulatorias (Simon *et al.* 1992). Por lo cual, era importante probar que el fenotipo similar entre mutantes *cox24Δ* y *mss51Δ* no se debiera a la alteración de la síntesis de Mss51. Nuestros resultados confirman que la síntesis de Mss51 en mutantes *cox24Δ* es similar a las cepas silvestres y no es afectada por la pérdida del DNAm observada en mutantes *cox24Δ* (Figura 12). Por lo tanto, la eliminación de COX24 es responsable de la falta de capacidad respiratoria en mutantes *cox24Δ*.

Existe una posibilidad de coexpresión de COX24 y MSS51 por compartir regiones regulatorias. Sin embargo después de analizar diferentes bases de datos de expresión génica de *S. cerevisiae* en la página web SGD (<http://www.yeastgenome.org/>), no encontramos patrones de expresión parecidos

entre ambos genes. Sólo se encontró un perfil de expresión similar de ambos genes, cuando las levaduras pasaron de condiciones de crecimiento en anoxia a reoxigenación en glucosa o galactosa (Lai *et al.* 2006).

La falta de coexpresión de *COX24* y *MSS51* en la mayoría de las condiciones usadas parece ser una condición general de pares adyacentes de genes en levadura (Tsai *et al.* 2007). En un estudio realizado por Tsai y *col.*, donde analizaron la co-expresión de pares adyacentes de genes en diferentes especies de levadura, encontraron que la coexpresión de pares de genes conservados y no conservados entre éstas era muy similar y que tampoco dependía de que compartieran elementos reguladores comunes; por lo cual concluyeron que la coexpresión de pares adyacentes de genes en levadura depende en mayor medida a otros factores no dependientes de elementos reguladores comunes o su cercanía en el cromosoma.

También analizamos si la sobreexpresión de *Mss51* podía compensar la ausencia de *Cox24* y viceversa (Figura 13). Por medio del análisis del crecimiento respiratorio, comprobamos que la sobreexpresión de *Mss51* no puede restablecer la capacidad respiratoria de una mutante *cox24Δ* y viceversa. Esto sugiere que es necesario que ambas proteínas estén presentes para que la síntesis de *Cox1* pueda llevarse a cabo correctamente en la mitocondria.

Una característica muy importante de la mutante *cox24Δ* es que, en un marcaje con S^{35} -Metionina de proteínas mitocondriales, la marca correspondiente a *Cox2* se disminuye considerablemente en comparación con una cepa silvestre (Figura 11). Esta observación podría deberse a la baja estabilidad de *Cox2* por la ausencia de *Cox1* en la mutante *cox24Δ* o por un posible papel de *Cox24* en la síntesis de *Cox2*. El estudio de las mutantes *TScox24* apoya la noción de *Cox24* como un factor implicado en la síntesis de *Cox2*, ya que las mutantes *TScox24-9*, *21* y *25* presentan un fenotipo respiratorio sensible a temperatura causado por la falta de síntesis de *Cox2* y no de *Cox1* como esperábamos, que a pesar de encontrarse reducida en las mutantes *TScox24*, no es muy diferente entre la temperatura permisible y la no permisible de crecimiento (Figura 15). Aunque no

podemos descartar una baja estabilidad de Cox2 debido a la ausencia de Cox1 en la mutante *cox24Δ*.

Lo anterior nos sugirió que el fenotipo similar entre las mutantes *cox24Δ* y *mss51Δ* podría ser un artefacto causado por la construcción del DNAm con *COX1* ectópico. En esta construcción *ARG8^m* reemplaza la región codificante de *COX1*, por lo que se encuentra bajo el control de las regiones 5' y 3' UTR de *COX1*. Adicionalmente, la región codificante de *COX1* se encuentra en otra parte del DNAm bajo el control de las regiones 5' y 3' de *COX2*, por lo que su expresión depende de los activadores traduccionales de *COX2* (Pérez-Martínez *et al.* 2003). Si Cox24 es un factor que participa en la traducción del RNAm de *COX2*, en una mutante *cox24Δ* con *COX1* ectópico, la traducción del RNAm de *COX1* no se llevaría a cabo, ya que se necesitaría la acción de Cox24 sobre la región 5'-UTR del RNAm de *COX2* para promover su traducción (Figura 18, flecha negra) y consecuentemente, la mutante *cox24Δ* no podría crecer en un medio respiratorio (Figura 10A, panel inferior). Por lo tanto el fenotipo similar entre las mutantes *cox24Δ* y *mss51Δ*, podría ser ocasionado por la acción de Cox24 en la región 5'-UTR del RNAm *COX1* y de *COX2* (Figura18).

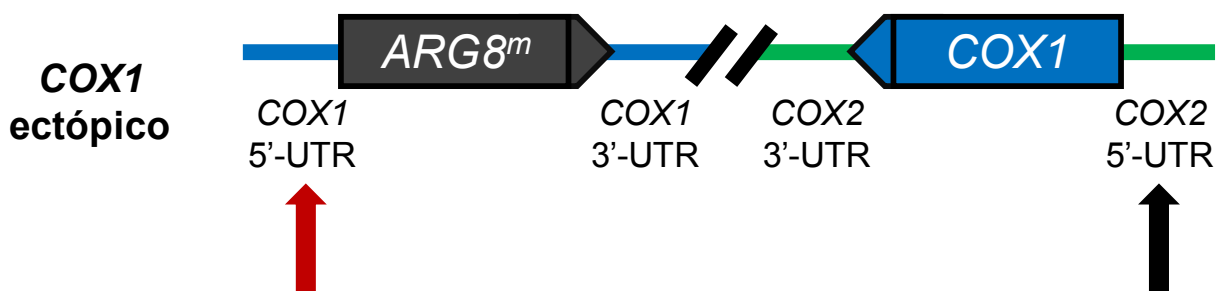


Figura 18. Cox24 podría participar en la traducción del RNAm de COX2. Se muestra la construcción de *COX1* ectópico y los sitios de acción de Cox24 si participa en la traducción del mRNA de *COX2*. La flecha roja indica el probable sitio de acción de Cox24 sobre el 5'-UTR del RNAm de *COX1*. La flecha negra indica el probable sitio de acción de Cox24 sobre el 5'-UTR del RNAm de *COX1*

Hasta el momento no podemos saber si Cox24 promueve la traducción del RNAm de COX1 como lo hace Mss51 (Figura 17). Sin embargo, sabemos que Cox24 es un factor que promueve la traducción del RNAm de COX1 al actuar probablemente sobre la región 5'-UTR del RNAm de COX1. Adicionalmente Cox24 podría promover la traducción del RNAm de COX2 (Figura 18); no obstante, falta comprobarlo por medio de un gen reportero de la traducción. Cabe mencionar que también existe la posibilidad de que Cox24 promueva la traducción del RNAm de COX1 como lo hace Mss51 y al mismo tiempo promueva la traducción del RNAm de COX2.

Otra característica de la mutante *cox24Δ* es que presenta gran inestabilidad del DNAm, que es un fenotipo no observado en la mutante *mss51Δ* (Pérez-Martínez *et al.* 2003) y que resultó ser un fenotipo específico para cepas de fondo nuclear D273-10B (Figura 8). La especificidad de este fenotipo, dependiendo de la cepa de *S. cerevisiae* usada, es un fenómeno que no se puede explicar fácilmente. Es bien conocido que las cepas de *S. cerevisiae* usadas en el laboratorio no son isogénicas, por lo cual los fenotipos observados pueden variar dependiendo del fondo genético. Conjuntamente los métodos de transformación usados para eliminar genes son altamente mutagénicos, lo cual podría inducir mutaciones supresoras que enmascaren el fenotipo de la mutante deseada (Contamine and Picard, 2000).

Existen ejemplos de la especificidad de fenotipos dependiendo de la cepa de *S. cerevisiae* usada, como en el caso de mutantes *mss51Δ*. En una mutante con un DNAm de la cepa W303 se puede detectar la presencia del péptido mp15, que es una versión trunca de Cox1. Sin embargo la presencia de mp15 en mutantes *mss51Δ* con un ADMmt de la cepa D273-10B, no puede ser detectado por marcaje con S³⁵-Metionina (Zambrano *et al.* 2007). Un ejemplo relacionado con la estabilidad del DNAm dependiendo de la cepa de levadura usada es el del gen *YFH1*, el cual se identificó por similitud de secuencia a la proteína humana frataxina. Mutaciones en el gen *FDRA* que la codifica son responsables de la ataxia de Friedreich's, una enfermedad autosómica recesiva (Campuzano *et al.*, 1996). Independientemente se encontró como un supresor multicopia de una

mutante incapaz de crecer en bajos niveles de hierro (Babcock *et al*, 1997). La función exacta de la proteína Yfh1 no se conoce, sin embargo su eliminación ocasiona la pérdida del DNAm, fenotipo que es altamente dependiente de la cepa de *S. cerevisiae* usada (Foury and Cazzalini, 1997).

La estabilidad del DNAm en levaduras depende de múltiples factores. Se ha reportado que la eliminación de factores implicados en la traducción de las proteínas mitocondriales ocasiona la eliminación de amplias regiones del DNAm (Cepas ρ^- , Contamine and Picard, 2000; Lipinski *et al*, 2010; Myers *et al*. 1895). Sin embargo, este efecto sólo ha sido reportado cuando hay mutaciones que afectan la síntesis de las subunidades de la ATP sintasa que son codificadas en la mitocondria (Atp6, Atp8 y Atp9) ó que ocurren en factores generales de la traducción (Contamine and Picard, 2000; Lipinski *et al*, 2010). Aunque no se conoce el mecanismo que ocasiona la inestabilidad del DNAm en estas mutantes, una de las propuestas es que la alteración de la MIM por la ausencia de los complejos respiratorios podría alterar la importación de proteínas necesarias para el mantenimiento y replicación del DNAm (Myers *et al*. 1985). Otra posibilidad que se ha sugerido es que alguna de las subunidades de la ATP sintasa codificadas en la mitocondria pudiera unir el DNAm y participar directamente en algún proceso relacionado con su mantenimiento (Contamine and Picard, 2000).

Se ha sugerido que Cox24 podría unirse al DNAm considerando que tiene una gran cantidad de aminoácidos positivos en la región carboxilo terminal (C-terminal, Simon *et al*. 1992). No obstante en la mutante *cox24Δ* la inestabilidad del DNAm parece ser un fenotipo inespecífico, ya que no se conserva en cepas con diferentes fondos nucleares (Figura 8). Existen muchas mutantes que afectan la función de la CcO pero no causan inestabilidad del DNAm (Fontanesi *et al*, 2006). Como es el caso de Pet309 (Manthey and McEwen, 1995) y Mss51 (Pérez-Martínez *et al*, 2003) que afectan directamente la traducción del RNAm de COX1, pero su eliminación no ocasiona inestabilidad del DNAm, por lo que pensamos que Cox24 no participa en el mantenimiento o herencia del DNAm, aunque no sabemos a qué se debe la diferencia en la estabilidad del DNAm entre cepas de diferente fondo nuclear.

La mutante *cox24Δ* sería el primer reporte de acuerdo con nuestro conocimiento, de una mutante que afecte la síntesis de Cox1, probablemente de Cox2. Por el momento no podemos saber si las funciones que podría realizar Cox24 son excluyentes entre sí o tienen alguna relación.

La identificación de las mutaciones en la región codificante de Cox24, en las mutantes TScox24 (Tabla 5), y la complementación de una mutante *cox24Δ* con los posibles ortólogos de Cox24 (Figura 16), sugirió que la región C-terminal de Cox24 podría ser importante para que lleve a cabo su función. Si hacemos un alineamiento con los posibles ortólogos de Cox24 (Figura 19) de *Y. lipolytica*, *A. thaliana*, *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) y *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*), es evidente que la región C-terminal de Cox24 es la más conservada y cuenta con un gran número de aminoácidos cargados positivamente.

En las mutantes TScox24, algunas de las mutaciones identificadas afectan aminoácidos positivos que se encuentran conservados (esencialmente en hongos, Tabla 5) principalmente en la región C-terminal de Cox24. De hecho parece existir una correlación entre la sensibilidad a temperatura de las mutantes TScox24 y el número de mutaciones en estos residuos. En la mutante TScox24-9 (la más afectada en su crecimiento respiratorio a todas las temperaturas probadas, Figura 13), encontramos mutaciones en 3 lisinas (carga +) muy conservadas de la región C-terminal de Cox24, inclusive 2 de estas lisinas son remplazadas por residuos de ácido glutámico que tienen carga negativa (Tabla 5). En contraste las mutantes TScox24-21 y 25, que presentan buen crecimiento respiratorio a 30°C (Figura 13), sólo presentan la mutación de una lisina en la región C-terminal (Tabla 5). Estos resultados apoyan la idea de que la región C-terminal de Cox24, podría ser importante para su función.

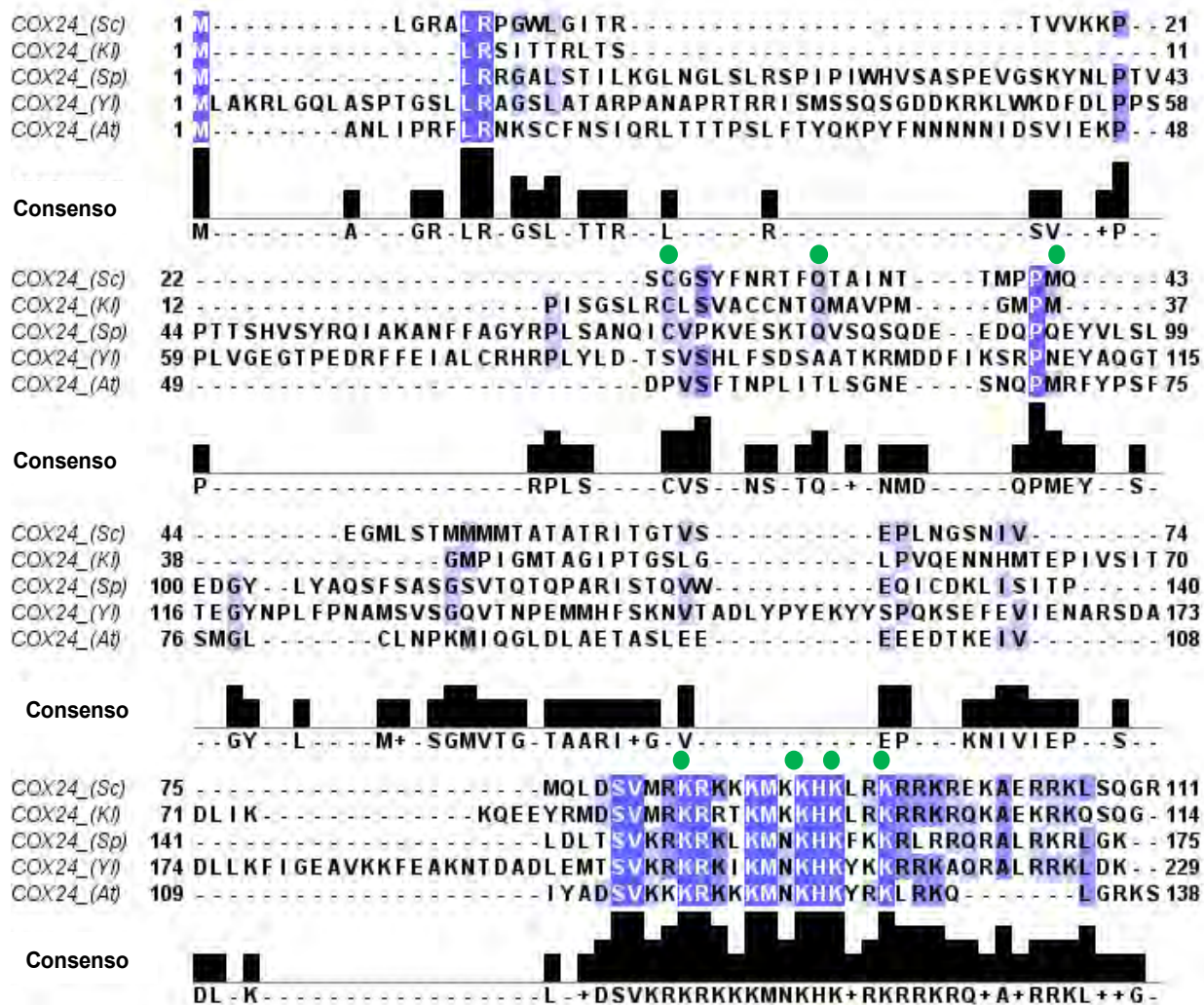


Figura 19. Alineamiento de Cox24. Se alineó a Cox24 con sus posibles ortólogos de *K. lactis* (COX24(*kl*)), *S. pombe* (COX24(*Sp*)), *Y. lipolytica* (COX24(*Yl*)) y *A. thaliana* (COX24(*At*)) con el programa de alineamientos múltiples MAFFT (<http://align.bmr.kyushu-u.ac.jp/mafft/online/server/>). El alineamiento se editó en el programa Jalview (Waterhouse *et al.* 2009), donde se obtuvo la secuencia consenso y se muestran los aminoácidos conservados en diferentes tonos de azul de acuerdo al porcentaje de identidad. Los aminoácidos en color blanco son los que se encuentran conservados en todas las proteínas. Los puntos verdes indican mutaciones encontradas en las TScox24, que se encuentran conservadas.

No obstante las mutantes *TScox24* también presentan mutaciones en regiones diferentes al C-terminal de Cox24. Al presente no conocemos la contribución de cada una de las mutaciones encontradas al fenotipo de sensibilidad a temperatura, por lo cual no podemos descartar una posible participación de alguna otra región de Cox24 en su función.

Las proteínas que se identificaron como posibles ortólogos de Cox24 en hongos y plantas no presentan una gran identidad en la secuencia ni en el número de aminoácidos con Cox24. Sólo dentro del género *Saccharomyces* de hongos, Cox24 se encuentra altamente conservada (Barros *et al.* 2006). No obstante, por medio experimentos de complementación demostramos que los posibles ortólogos de *Y. lipolytica* y *A. thaliana* pueden suplir la función de Cox24 en una mutante *cox24Δ* de *S. cerevisiae* (Figura 13), apoyando que las proteínas identificadas sí corresponden a ortólogos de Cox24 y conservan la función de ésta.

De las proteínas mostradas en el alineamiento de la Figura 16, el ortólogo de Cox24 de *S. pombe* es el único que se encuentra anotado en la base de datos de Uniprot como homólogo de Cox24 por similitud, además se sabe que es una proteína mitocondrial (Matsuyama *et al.* 2006).

Basándonos en resultados previos (Barros *et al.* 2006) y en los presentados en este trabajo proponemos que Cox24 funciona como un activador traduccional del RNAm de *COX1*. Creemos que Cox24 podría unir, por medio de su extremo C-terminal, la región 5'-UTR del RNAm de *COX1* y de esta manera ubicarlo cerca de la MIM, donde se encuentran sus otros activadores traducionales Pet309 y Mss51 (Figura 20). Sin embargo falta comprobar experimentalmente que Cox24 pueda unirse al RNAm de *COX1*.

Adicionalmente Cox24 podría funcionar como un activador traduccional del RNAm de *COX2*, no obstante falta comprobar que la acción de Cox24 sobre la síntesis de Cox2 sea a nivel traduccional.

Cox24 es un activador traduccional del ARNm de COX1

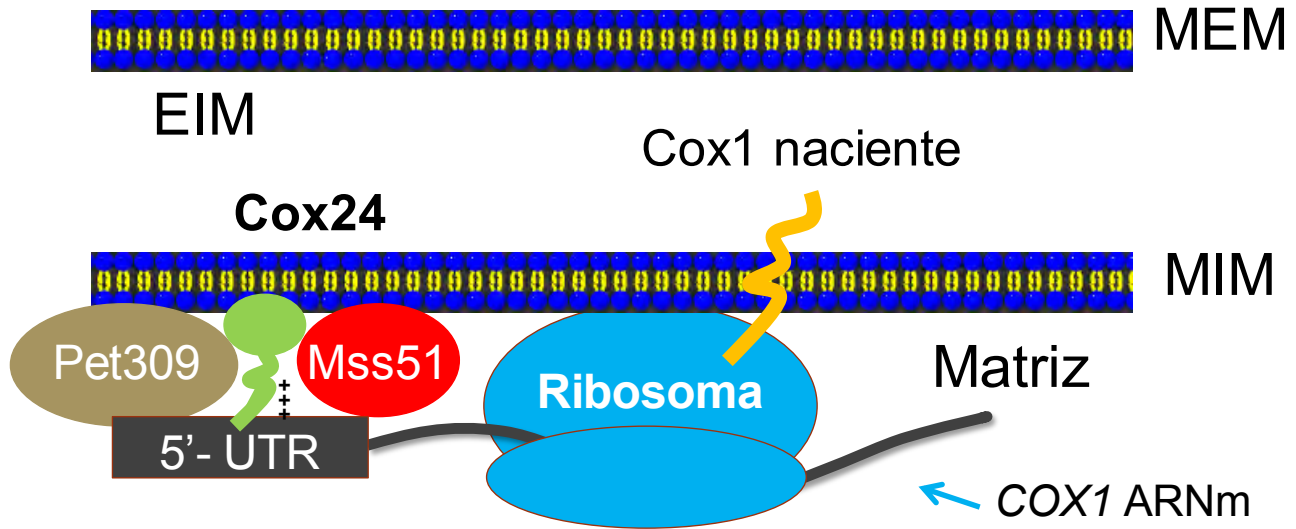


Figura 20. Modelo de acción de Cox24. Se representa esquemáticamente como Cox24 podría unir al RNAm de COX1 para ubicarlo cerca de la MIM y promover su traducción. En verde se muestra a Cox24 y los signos + representan la gran cantidad de cargas positivas encontradas en su región C-terminal.

Conclusiones.

- La eliminación de Cox24 provoca la pérdida de la capacidad respiratoria de las levaduras y ésta no se debe a la alteración de la síntesis de Mss51.
- Cox24 podría funcionar como un activador traduccional del RNAm de COX1, actuando sobre la región 5'-UTR de COX1.
- Mss51 y Cox24 no tienen funciones redundantes en la traducción del RNAm de COX1.
- Cox24 es un factor que podría promover la síntesis de Cox2.
- Las mutantes *cox24Δ* presentan inestabilidad del DNAm de forma específica en cepas de fondo nuclear D273-10B.

Perspectivas.

1. Confirmar por northern blot que los niveles de RNAm de COX1 y COX2 en una mutante *cox24Δ*, son equivalentes a los de la cepa silvestre.
2. Investigar si Cox24 funciona como un activador traduccional del RNAm de COX2.
3. Comprobar el fenotipo de las mutantes TS, en cepas de fondo nuclear D273-10B.

Apéndices.

Medios de cultivo.

Para un litro de medio de:

		<u>-URA Gal</u>	
<u>YPD</u>		Base nitrogenada	6.7 g
Extracto de levadura	10 g	sin aminoácidos	
Peptona	20 g	Galactosa	20 g
Dextrosa	20 g	Medio drop out sin uracilo	770 mg
Adenina	30 mg		
		<u>EG -URA</u>	
<u>YPEG</u>		Base nitrogenada	6.7 g
Extracto de levadura	10 g	sin aminoácidos	
Peptona	20 g	Glicerol	30 mL
Glicerol	30 mL	Etanol	30 mL
Etanol	30 mL	Medio drop out sin uracilo	770 mg
Adenina	30 mg		
		<u>-MET Gal</u>	
<u>YPGal</u>		Base nitrogenada	6.7 g
Extracto de levadura	10 g	sin aminoácidos	
Peptona	10 g	Galactosa	20 g
Galactosa	20 g	Medio drop out sin metionina	770 mg
Adenina	30 mg		
		<u>-URA -ADE</u>	
<u>-URA</u>		Base nitrogenada	6.7 g
Base nitrogenada	6.7 g	sin aminoácidos	
sin aminoácidos		Galactosa	20 g
Dextrosa	20 g	Arginina	105 mg
Medio drop out sin uracilo	770 mg	Lysina	183 mg

<u>-URA -LYS</u>		<u>CSM + 5-FoA</u>	
Base nitrogenada sin aminoácidos	6.7 g	Base nitrogenada sin aminoácidos	6.7 g
Galactosa	20 g	Dextrosa	20 g
Arginina	105 mg	BIO101 CSM	790 mg
Adenina	60 mg	5-FoA	1 g

Agregar 20g de agar si se requiere medio solido. Esterilizar por autoclave.

Amortiguadores.

Determinación de proteínas por Lowry modificado.

<u>Solución A</u>		<u>Solución C</u>	
Na ₂ CO ₃	2%	Mezclar 100 volúmenes de solución A con 1 volumen de solución B (preparar al momento)	
NaOH	0.4%		
Tartrato de sodio	0.16%		
Docecil sulfato de sodio (SDS)	1%	<u>Solución D</u>	
<u>Solución B</u>		Mezclar 1 volumen de reactivo de folin con 1 volumen de agua (preparar al momento)	
Cu ₂ SO ₄ .5H ₂ O	4%		

Geles de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE).

<u>Electroforesis 5X.</u>		<u>Cargado 2X.</u>	
Tris (0.125 M pH 8.3)	15.1 g/L	Tris-HCl pH 6.8	100 mM
Glicina (1.25 M)	94 g/L	SDS	4%
SDS (0.5%)	5 g/L	Glicerol	20%
		Azul Bromofenol	0.2%
		β-mercaptoetanol	2%

Transferencia de proteínas a membrana de PVDV.

Amortiguador de transferencia negativo.

Ácido ϵ -amino- <i>n</i> -caproico	39.4 g/L
SDS 0.05%	0.5 g/L
Ajustar pH a 8.5-8.7 con Tris.	

Amortiguador de transferencia positivo.

Tris	18.2 g/L
Tricina	9 g/L
Metanol	20%

Inmuno-réplicas por Western Blot.

Solución de bloqueo.

Leche en polvo	5 g
Tris 1M pH 7.6	2.5 ml
NaCl 5M	1.5 ml
H ₂ O	a 50 ml

Solución de blot.

Leche en polvo	0.1 g
Tris 1M pH 7.6	100 μ l
NaCl 5M	200 μ l
EDTA 500mM	20 μ l
Tween-20 al 50%	200 μ l
H ₂ O	a 10 ml

* Adicionar el anticuerpo indicado a la dilución apropiada.

Solución de lavado.

Tris 1M pH 7.6	10 ml
NaCl 5M	20 ml
EDTA 500mM	2 ml
Tween-20	1 ml
H ₂ O	a 1 L

Solución de eliminación.

β -mercaptoetanol	700 μ l
Tris 1M pH 6.8	6.25 ml
SDS 10%	20 ml
H ₂ O	a 100 ml

* Dilución de anticuerpos

Anti HA/peroxidasa (Roche)	1:2000
Anti Citrato Sintasa (Donado por Thomas D. Fox)	1:1000
Anti conejo/peroxidasa (Sigma)	1:5000

Obtención de la fracción cruda mitocondrial.

TD (Tris-DTT).

Tris-SO ₄ pH9.4	0.1 M
DTT	10 mM

MP2.

Sorbitol	1.2 M
Amortiguador de fosfatos pH 7.4	20 mM
Zimoliasa-20T (Accurate Chemical and Scientific Corporation)	3 mg/mL

Homogenización (Dounce).

Tris pH 7.4	10 mM
EDTA	1 mM
BSA (libre de ácidos grasos)	0.2%
PMSF	1 mM
(preparar en etanol al momento)	
TLCK	50 µg/mL
Sorbitol	0.6 M
<u>SH 1X.</u>	
HEPES pH 7.4	20 mM
Sorbitol	0.6 M

Traducción *in vivo* de proteína mitocondriales a partir de células completas.

SHP.

Sorbitol	0.6 M
HEPES pH 7.4	20 mM
Inhibidor de proteases (Sigma)	3.3 µg/10 mL de amortiguador.

Traducción *in organello* a partir de mitocondrias crudas.

Amortiguador *ioTL* 1.5X con 0.2% de piruvato cinasa.

Preparar a 4°C.

Adicionar 2 µl de Piruvato Cinasa, justo antes de mezclar con las mitocondrias.

Adicionar para 1 mL <i>ioTL</i> 1.5X	Solución concentrada
375 µl	Sorbitol 2.4 M
225 µl	KCl 1 M
22.5 µl	Amortiguador de fosfatos pH 7.2 1 M
30 µl	Tris-HCl pH 7.4 1 M
19 µl	Mg(SO ₄) ₂ 1 M
45 µl	BSA (libre de ácidos grasos) 100 mg/ml
30 µl	ATP ^{&} 200 mM
15 µl	GTP ^{&} 50 mM
9.1 µl	Aminoácidos (Sin Met, Tyr y Cys), 2 mg/ml de cada uno
10 µl	Cisteina 10 mM
18.2 µl	Tirosina 1 mg/ml
1.7 mg	Ácido α-cetoglutarico*
3.5 mg	Fosfoenol piruvato*

Notas

& Adicionar al final.

* Pesar y disolver en 200 µl de H₂O. Adicionar a la mezcla para tener 1 mL de volumen final.

Tabla de plásmidos.

En la siguiente tabla se indican los plásmidos usados en la realización de este trabajo. Se indica el inserto que contiene y el nivel de expresión de los plásmidos. Todos los plásmidos contienen al gen *URA3* de *S. cerevisiae* como marcador de selección y el gen de casete de resistencia a ampicilina *ampR*.

Nombre del plásmido	Inserto	Comentarios
pRS416	—	Plásmido centromérico de expresión de bajo número de copias
pXP121	<i>COX24</i>	Tiene a <i>COX24</i> clonado en pRS416
pRGV1	<i>MSS51</i>	Tiene a <i>MSS51</i> clonado en pRS416
YEp352	—	Plásmido de expresión de alto número de copias, contiene el origen de replicación 2 μ
pXPM64	<i>MSS51</i>	Tiene a <i>MSS51</i> clonado en YEp352
pXP120	<i>COX24</i>	Tiene a <i>COX24</i> clonado en YEp352
pTScox24-9	<i>cox24</i>	Recuperado de la TScox24-9. Tiene a <i>cox24</i> clonado en pRS416
pTScox24-21	<i>cox24</i>	Recuperado de la TScox24-21. Tiene a <i>cox24</i> clonado en pRS416
pTScox24-25	<i>cox24</i>	Recuperado de la TScox24-25. Tiene a <i>cox24</i> clonado en pRS416
pDB20	—	Plásmido de expresión de alto número de copias
pXP122	<i>COX24 A. thaliana</i>	Tiene al ortólogo de <i>COX24</i> de <i>A. thaliana</i> clonado en pDB20
pXP123	<i>COX24 Y. lipolytica</i>	Tiene al ortólogo de <i>COX24</i> de <i>Y. lipolytica</i> clonado en pDB20

Tabla de oligonucleótidos.

En la tabla se indica el nombre de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo. También se menciona su aplicación.

Nombre oligonucleótido.	Secuencia (5' a 3')	Comentarios
pBS-F	AACAGCTATGACCATGATTACG	Para secuenciar y verificar por PCR insertos en pRS416
pBS-R	GTA AACGACGGCCAGTGAG	Para secuenciar y verificar por PCR insertos en pRS416
COX24F6	CTACTATTGTCTCTTGTCAGACTCC	Para amplificar COX24 o sus eliminaciones
COX24R8	CCAAGAAGTAAAGAACCCAGATCGCG	Para amplificar COX24 o sus eliminaciones
COX24LEU2F	GGTTGAGTTCCAGCCAAGACGAGCACACACGACACCAGAACGAGATAAA Catgtctgc ccctaagaagatc	Para sustituir a COX24 por LEU2, en minúsculas se señala la región codificante de LEU2 y en mayúsculas la región 5'-UTR de COX24.
COX24LEU2F	GAATAGGGAAGGAAAAACAGCAGAGAA AAACATGTGAGAGGTTTTACGCCCTAtta agcaaggattttctaac	Para sustituir a COX24 por LEU2, en minúsculas se señala la región codificante de LEU2 y en mayúsculas la región 3'-UTR de COX24.
pDB20F1	GCATACAATCAACTCCAAGC	Para secuenciar y verificar por PCR insertos en pDB20
pDB20R1	CAAGCCGACAACCTTGATTGGAGAC	Para secuenciar y verificar por PCR insertos en pDB20
COX24yIF1	cgggcggccgcTCATCCCTGGCTCTGCTTTC TC	Para clonar a COX24 de <i>Y. lipolytica</i> en pDB20, en minúsculas se señala un sitio de <i>NotI</i> .
COX24yIR1	tccgcggccgcTTATTATCGAGCTTTCGTCG AAG	Para clonar a COX24 de <i>Y. lipolytica</i> en pDB20, en minúsculas se señala un sitio de <i>NotI</i> .
COX24aIF1	cgagcggccgcATGGCGAATCTAATTCCTAG ATTCC	Para clonar a COX24 de <i>A. thaliana</i> en pDB20, en minúsculas se señala un sitio de <i>NotI</i> .
COX24aIR1	ggagcggccgcCTATGACTTGCGACCAAGC TGTTTC	Para clonar a COX24 de <i>A. thaliana</i> en pDB20, en minúsculas se señala un sitio de <i>NotI</i> .

Referencias.

- Alberts B, Jonhson A, Lewis J, Farr M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science (2002).
- Babcock M, de Silva D, Oaks R, Davis-Kaplan S, Jiralerspong S, Montermini L, Pandolfo M, Kaplan J. Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. *Science*. **276**:1709–1712 (1997).
- Barrientos A, Zambrano A, Tzagoloff A. Mss51p and Cox14p jointly regulate mitochondrial Cox1p expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. **23**(17):3472-82 (2004).
- Barros MH, Myers AM, Van Driesche S, and Tzagoloff A. COX24 codes for a mitochondrial protein required for processing of the COX1 transcript. *J Biol Chem*. **281**:3743–3751 (2005).
- Bonnefoy N, Bsat N, Fox TD. Mitochondrial translation of *Saccharomyces cerevisiae* COX2 RNAm is controlled by the nucleotide sequence specifying the pre-Cox2p leader peptide. *Mol Cell Biol*. **21**(7):2359-72 (2001).
- Bonnefoy N, Fox TD. Directed alteration of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial DNA by biolistic transformation and homologous recombination. *Methods Mol Biol*. **372**:153-66 (2007).
- Brown NG, Costanzo MC, Fox TD. Interactions among three proteins that specifically activate translation of the mitochondrial COX3 RNAm in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. **14**(2):1045-53 (1994).
- Camougrand N, Pélissier P, Velours G, Guérin M. NCA2, a second nuclear gene required for the control of mitochondrial synthesis of subunits 6 and 8 of ATP synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol*. **247**(4):588-96 (1995).
- Campuzano V, Montermini L, Moltò MD, Pianese L, Cossée M, Cavalcanti F, Monros E, Rodius F, Duclos F, Monticelli A, Zara F, Cañizares J, Koutnikova H, Bidichandani SI, Gellera C, Brice A, Trouillas P, Michele GD, Filla A, Frutos RD, Palau F, Patel PI, Donato SD, Mandel J-L, Coccozza S, Koenig M, Pandolfo M. Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science*. **271**:1423–1427 (1996).
- Carr HS, Winde DR. Assembly of cytochrome c oxidase within the mitochondrion. *Acc Chem Res*. **36**:309-316 (2003).
- Chacińska A, Boguta M. Coupling of mitochondrial translation with the formation of respiratory complexes in yeast mitochondria. *Acta Biochim Pol*. **47**(4):973-91 (2000).
- Chen XJ, Butow RA. The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat Rev Genet*. **6**(11):815-25 (2006).
- Conde J, Fink GR. A mutant of *Saccharomyces cerevisiae* defective for nuclear fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **73**(10):3651-5 (1976).
- Contamine V, Picard M. Maintenance and integrity of the mitochondrial genome: a plethora of nuclear genes in the budding yeast. *Microbiol Mol Biol Rev*. **64**(2):281-315 (2000).
- Costanzo MC, Fox TD. Control of mitochondrial gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet*. **24**:91–113 (1990).
- Dieckmann CL, Tzagoloff A. Assembly of the Mitochondrial Membrane System. *CBPG*, a yeast nuclear gene necessary for synthesis of cytochrome b. *J Biol Chem*. **260**(3):1513-20 (1985).

- Dieketer K, de Kroon AI, Kispal G, Lill R. Isolation and subtraction of mitochondria from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Cell Biol.* **65**:37-51 (2001).
- Diffley JF, Stillman B. A close relative of the nuclear, chromosomal high-mobility group protein HMG1 in yeast mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**(17):7864-8 (1991).
- Fontanesi F, Soto IC, Horn D, Barrientos A. Assembly of mitochondrial cytochrome c oxidase, a complicated and highly regulated cellular process. *Am J Physiol Cell Physiol.* **291**:C1129-C1147 (2006)
- Fontanesi F, Soto IC, Barrientos A. Cytochrome c Oxidase Biogenesis: New levels of regulation. *IUBMB Life.* **60**:557-568 (2008).
- Finnegan PM, Payne MJ, Keramidaris E, Lukins HB. Characterization of a yeast nuclear gene, AEP2, required for accumulation of mitochondrial rRNA encoding subunit 9 of the ATP synthase. *Curr Genet.* **20**(1-2):53-61 (1991).
- Foury F, Cazzalini O. Deletion of the yeast homologue of the human gene associated with Friedreich's ataxia elicits iron accumulation in mitochondria. *FEBS Lett.* **411**:373-377 (1997).
- Foury F, Roganti T, Lecrenier N, Purnelle B. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **440**(3):325-31 (1998).
- Fox TD. Translational control of endogenous and recoded nuclear genes in yeast mitochondria: regulation and membrane targeting. *Experientia.* **52**(12):1130-5 (1996).
- Funes S, Herrmann JM. Biogenesis of cytochrome c oxidase – Sophisticated assembly lines in the mitochondrial inner membrane. *Gene.* **354**:43-52 (2005).
- Gray MW, Burger G, Lang BF. Mitochondrial evolution. *Science* **283**:1476-1481(1999).
- Green-Willms NS, Butler CA, Dunstan HM, Fox TD. Pet111p, an inner membrane-bound translational activator that limits expression of the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial gene COX2. *J Biol Chem.* **276**:6392-6397 (2001).
- Haffter P, Fox TD. Suppression of carboxy-terminal truncations of the yeast mitochondrial rRNA-specific translational activator PET122 by mutations in two new genes, MRP17 and PET127. *Mol Gen Genet.* **235**(1):64-73 (1992).
- Hell K, Neupert W, Stuart RA. Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA. *EMBO J.* **20**(6):1281-1288 (2001).
- Ito H, Fukuda Y, Kimura A. Transformation of intact yeast treated with alkali cations. *J Bacteriol.* **153**:163-168 (1983).
- Joseph-Horne T, Hollomon DW, Wood PM. Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochim Biophys Acta.* **1504**:179-195 (2001).
- Khalimonchuk O, Rödel G. Biogenesis of cytochrome c oxidase. *Mitochondrion.* **5**:363-388 (2005).
- Krause K, Lopes de Souza R, Roberts DG, Dieckman CL. The mitochondrial message-specific rRNA protectors Cbp1 and Pet309 are associated in a high molecular weight complex. *Mol Biol Cell.* **15**:2674-2683 (2004).
- Krause-Buchholz U, Barth K, Dombrowski C, Rödel G. *Saccharomyces cerevisiae* translational activator Cbs2p is associated with mitochondrial ribosomes. *Curr Genet.* **46**:20-28 (2004)
- Krause-Buchholz U, Schobel K, Lauffer S, Rödel G. *Saccharomyces cerevisiae* translational activator Cbs1p is associated with mitochondrial ribosomes. *Biol Chem.* **386**:407-415 (2005)

- Kucej M, Kucejova B, Subramanian R, Chen XJ, Butow RA. Mitochondrial nucleoids undergo remodeling in response to metabolic cues. *J Cell Sci.* **121**:1861-1868 (2008).
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-685 (1970).
- Lai LC, Kosorukoff AL, Burke PV, Kwast KE. Metabolic-state-dependent remodeling of the transcriptome in response to anoxia and subsequent reoxygenation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **5(9)**:1468-89 (2006).
- Lipinski KA, Kaniak-Golik A, Golik P. Maintenance and expression of the *S. cerevisiae* mitochondrial genome-From genetics to evolution and systems biology. *Biochim Biophys Acta.* (2010) doi:10.1016/j.bbabi.2009.12.019.
- Manthey GM, McEwen JE. The product of the nuclear gene PET309 is required for translation of mature rRNAs and stability or production of intron-containing rRNAs derived from the mitochondrial COX1 locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **14(16)**:4031-43 (1995).
- Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem.* **87(1)**:206-10 (1987).
- Matsuyama A, Arai R, Yashiroda Y, Shirai A, Kamata A, Sekido S, Kobayashi Y, Hashimoto A, Hamamoto M, Hiraoka Y, Horinouchi S, Yoshida M. ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Biotechnol.* **24**:841-847 (2006).
- McMullin TW, Fox TD. COX3 rRNA-specific translational activator proteins are associated with the inner membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **268**:11737-11741 (1993).
- McMullin TW, Haffter P, Fox TD. A novel small-subunit ribosomal protein of yeast mitochondria that interacts functionally with an rRNA-specific translational activator. *Mol Cell Biol.* **10(9)**:4590-5 (1990).
- Michaelis U, Korte A, Rödel G. Association of cytochrome b translational activator proteins with the mitochondrial membrane: implications for cytochrome b expression in yeast. *Mol Gen Genet.* **230**:177-185 (1991).
- Miyakawa I, Sando N. Isolation of morphologically intact mitochondrial nucleoids from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci.* **88**:431-439 (1987).
- Myers, A. M., L. K. Pape, and A. Tzagoloff. Mitochondrial protein synthesis is required for maintenance of intact mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **4**:2087-2092 (1985).
- Naithani A, Saracco SA, Butler CA, Fox TD. Interactions among COX1, COX2 and COX3 rRNA-specific Translational activator proteins on the inner surface of the mitochondrial inner membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* **14**:324-333 (2003).
- Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry.* W. H. Freeman (2004)
- Nijtmans LG, Taanman JW, Muijsers AO, Speijer D, Van den Bogert C. Assembly of cytochrome-c oxidase in cultured human cells. *Eur J Biochem.* **254(2)**:389-94 (1998).
- Pélissier E, Camougrand N, Velours G, Gudrin M. NCA3, a nuclear gene involved in the mitochondrial expression of subunits 6 and 8 of the FoF1 ATP synthase of *S. cerevisiae*. *Curr Genet.* **27**:409-416 (1995).

- Payne MJ, Finnegan PM, Smooker PM, Lukins HB. Characterization of a second nuclear gene, AEP1, required for expression of the mitochondrial OLI1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet.* **24(1-2)**:126-35 (1993).
- Perez-Martinez X, Broadley SA, Fox TD. Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p. *EMBO J.* **22(21)**:5951-61 (2003).
- Pérez-Martínez X, Funes S, Camacho-Villasana Y, Marjavaara S, Tavares-Carreón F, Shingú-Vázquez M. Protein synthesis and assembly in mitochondrial disorders. *Curr Top Med Chem.* **8(15)**:1335-50 (2008).
- Pérez-Martínez X, Butler CA, Shingú-Vázquez M, Fox TD. Dual functions of Mss51 couple synthesis of Cox1 to assembly of cytochrome c oxidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* **20**:4371-4380 (2009).
- Rödel G. Two yeast nuclear genes, CBS1 and CBS2, are required for translation of mitochondrial transcripts bearing the 5'-untranslated COB leader. *Curr Genet.* **11(1)**:41-5 (1986).
- Sherman F. Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* **194**:3-21 (1991).
- Siep M, van Oosterum K, Neufeglise H, van der Spek H, Grivell LA. Mss51p, a putative translational activator of cytochrome c oxidase subunit-1 (COX1) RNAm, is required for synthesis of Cox1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet.* **37(4)**:213-20 (2000).
- Simon M, Della FS, Sor F, Faye G. Analysis of the *MSS51* region on chromosome XII of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **8**:559-567 (1992)
- Steele DF, Butler CA, Fox TD. Expression of a recoded nuclear gene inserted into yeast mitochondrial DNA is limited by RNAm-specific translational activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**:5253-5257 (1996).
- Tsai HK, Su CP, Lu MY, Shih CH, Wang D. Co-expression of adjacent genes in yeast cannot be simply attributed to shared regulatory system. *BMC Genomics.* **8**:352 (2007).
- Tavares-Carreón F, Camacho-Villasana Y, Zamudio-Ochoa A, Shingú-Vázquez M, Torres-Larios A, Pérez-Martínez X. The pentatricopeptide repeats present in Pet309 are necessary for translation but not stability of the mitochondrial COX1 RNAm in yeast. *J Biol Chem.* **283(3)**:1472-9 (2008).
- Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton G J. "Jalview Version 2 - a multiple sequence alignment editor and analysis workbench" *Bioinformatics.* **25(9)**:1189-1191 (2009).
- Westermann B, Herrmann JM, Neupert W. Analysis of mitochondrial translation products in vivo and in organello in yeast. *Methods Cell Biol.* **65**:429-38 (2001).
- Yaffe MP. Analysis of mitochondrial function and assembly. *Methods Enzymol.* **194**:627-643 (1991).
- Zambrano A, Fontanesi F, Solans A, de Oliveira RL, Fox TD, Tzagoloff A, Barrientos A. Aberrant translation of cytochrome c oxidase subunit 1 RNAm species in the absence of Mss51p in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* **18(2)**:523-35 (2007).
- Zeng X, Hourset A, Tzagoloff A. The *Saccharomyces cerevisiae* ATP22 Gene Codes for the Mitochondrial ATPase Subunit 6-Specific Translation Factor *Genetics.* **175(1)**: 55-63 (2007).