



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

Licenciatura en Investigación Biomédica Básica

Expresión alotópica de la proteína Cox3 quimérica en *Saccharomyces cerevisiae*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Licenciada en Investigación Biomédica Básica

P R E S E N T A:

Diana Rubalcava Gracia Medrano

Facultad de Medicina



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Diego González Halphen**

México D.F, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mis padres, con todo mi amor y cariño.

“From birth, man carries the weight
of gravity on his shoulders.
He is bolted to earth.
But man has only to sink beneath
the surface and he is free.”

-Jacques Yves Cousteau

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Diego González Halphen en el laboratorio 324 Norte del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

La presente tesis constituye parte del proyecto de investigación apoyado por el donativo No. 128110 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), así como por el donativo No. 203311 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA, UNAM).

Diana Rubalcava Gracia Medrano fue alumna de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica y fue apoyada por DGAPA y SNI-CONACyT (ayudante de investigador).

Agradezco a la Q.B.P. Miriam Vázquez Acevedo por la ayuda técnica y por sus valiosas contribuciones en este proyecto.

A los laboratorios de las Dras. Soledad Funes Argüello y Xóchitl Pérez Martínez, especialmente a la Dra. Fabiola Jaimes Miranda y a la Dra. Yolanda Camacho Villasana por su ayuda técnica y participación en este trabajo.

A la Dra. Laura Ongay Larios, a la M. en C. Minerva Mora Cabrera y a la Biól. Guadalupe Codíz Huerta miembros de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, por su ayuda técnica.

A Juan Manuel Barbosa Castillo e Ivette Rosas Arciniega de la Unidad de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, por el apoyo técnico brindado.

A Rosario Villaseñor Ávila y a Gabriela Valdés Silva de la Secretarías de Biología Celular y de Genética Molecular por toda su ayuda técnica.

A la Lic. Cynthia Lima Cruz y a la Lic. Maricela Tabares Muñoz por el apoyo administrativo brindado durante la licenciatura.

A los integrantes del jurado, Dra. Xóchitl Pérez Martínez, Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova, Dr. Juan Carlos Zenteno Ruíz y Dr. Roberto Hernández Fernández por la revisión de esta tesis y por sus valiosas contribuciones y sugerencias al trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá por ser mi ejemplo a seguir. Por su simpatía, inteligencia y por siempre ver el lado positivo.

A mi papá por su incondicional apoyo y por enseñarme que las metas se alcanzan trabajando.

A mis hermanos. A Daniel por su eterna sonrisa y su perseverancia. A Mariana por su alegría y por recordarme de lo que se trata la vida.

Gracias a mi abuelo Waldo[†] por creer en mí, por sus anécdotas y por apasionarse por su profesión.

A mis abuelitas, Polla y Margarita, por ser mujeres adelantadas a su época, por ser brillantes y por su fortaleza ante todo.

A mi madrinaza por toda su energía y carisma.

A mis primos por enseñarme la importancia de seguir tu camino.

A Vic, mi favorito siempre, por ser mi mejor amigo, por motivarme, por las sonrisas y por sacar lo mejor de mí. Gracias porque vivir es increíble.

A Marce por su excelente humor y contagiosa energía y a toda la familia Maldonado Figueroa por su incondicional apoyo.

A Aranza García por estar ahí siempre.

Gracias a Feri, Pao y Potri por recuerdos irremplazables y por cumplir sus metas.

A mis amigos, que son familia, Andre, C.A., Chabe, Chivo, Dani, Diana, Feri, Gaba, Julio, Memo, Natalia, Pau y Santi por la alegría cuando estamos juntos.

A mi prima Monse por ser mi amiga y por las incontables experiencias.

A mis grandes amigos. A Silvana por ser tan apasionada de prácticamente todo. A Manuel por su integridad y entusiasmo. A Mariana por su inteligencia y buen ánimo.

A Isa y Victor Montes por todo su cariño, sus conversaciones y compañía.

Al Navia por el verdadero trabajo en equipo y porque el último lugar llega a ganar tricampeonatos. A Bazzinga, por la emoción en las noches de partido. Al Sueve por toda la alegría en los juegos.

A los buzos abuzados, por acompañarme en experiencias inexplicables.

Gracias a María Villarreal por su contagiosa pasión por la ciencia.

A mis profesores de la carrera por las valiosas enseñanzas, el tiempo dedicado y su pasión por la ciencia.

En especial al Dr. Alejandro Fernández Velasco, Dra. Julieta Rubio, Dr. Alejandro Zentella Dehesa, Dr. Jesús Adolfo García-Sainz, Dra. Soledad Funes Argüello, Dr. Raúl Aguilar Roblero y a la Dra. Cristina Fernández Mejía.

A mis tutores el Dr. Luis Padilla Noriega, Dr. Enrique Ortega Soto, Dra. Victoria Chagoya Hazas y al Dr. Diego González Halphen por ser parte fundamental en mi formación y por dedicarse a hacer lo que les gusta.

A la Lic. Cynthia Lima por su amistad y eficiente ayuda.

Al Dr. Diego González Halphen por su confianza y enseñanzas. Gracias por su contagioso entusiasmo, elocuencia y calidad humana.

A Miriam Vázquez Acevedo por su paciencia, su alegría y por ayudarme con las cerezas del pastel en esta tesis.

A mis compañeros del laboratorio. Al Sr. Alfredo, Alain, Ale, Alexa, Araceli, Héctor, Lili, Lorenzo y Valentín por su amistad y porque todos participaron en este trabajo.

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	8
II. INTRODUCCIÓN.....	9
<i>La mitocondria</i>	9
<i>Cadena respiratoria</i>	9
<i>El origen de la mitocondria</i>	9
<i>Sistema de importación mitocondrial</i>	11
<i>Control de calidad de proteínas mitocondriales</i>	14
<i>Genomas mitocondriales</i>	14
<i>La citocromo c oxidasa</i>	16
<i>Localización atípica de COX3 en algas</i>	18
<i>Expresión alotópica</i>	18
<i>La levadura como organismo modelo en expresión alotópica</i>	19
<i>Implicaciones en la terapia génica</i>	20
III. HIPÓTESIS.....	21
IV. OBJETIVO GENERAL.....	22
V. OBJETIVOS PARTICULARES.....	22
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
VII. RESULTADOS.....	38
<i>Fenotipo de la delección del gen mitocondrial COX3</i>	39
<i>Análisis de hidrofobicidad de los cruces transmembranales de Cox3</i>	40
<i>Diseño de construcciones del gen COX3</i>	41
<i>Las construcciones de COX3 no recuperan la respiración en cepas Δcox3</i>	44
<i>Presencia de Cox3 en extractos totales de levadura</i>	46
<i>Migración de Cox3 a la mitocondria</i>	48
<i>Ensamblaje de Cox3 en su complejo</i>	49
<i>La proteasa del espacio intermembranal degrada a Cox3 alotópica</i>	51
<i>Cox3 alotópica disminuye en ausencia de la translocasa Oxa1</i>	53
VIII. DISCUSIÓN.....	55
IX. CONCLUSIONES.....	64
X. PERSPECTIVAS.....	65
XI. APÉNDICES.....	66
1. <i>Lista de los organismos cuyas secuencias de Cox3 se usaron en la figura 5</i>	67
2. <i>Medios de cultivo</i>	68
3. <i>Secuencias de proteínas de construcciones de Cox3</i>	70
4. <i>Secuencias de DNA de construcciones de COX3</i>	72
5. <i>Oligonucleótidos</i>	78
XII. BIBLIOGRAFÍA.....	79

ABREVIATURAS

	Siglas en Inglés	Traducción al Español
3' UTR	“3' Untranslated Region “	Región 3' no traducida
ATP	“Adenosine Triphosphate”	Adenosín trifosfato
CcO	“Cytochrome <i>c</i> Oxidase “	Citocromo <i>c</i> oxidasa
DNA	“Deoxyribonucleic Acid”	Ácido desoxiribonucleico
DNAmít	“Mitochondrial Deoxyribonucleic Acid”	Ácido desoxiribonucleico mitocondrial
IMS	“Intermembrane Space”	Espacio intermembranal
MPP	“Mitochondrial Processing Peptidase”	Peptidasa de procesamiento mitocondrial
mRNA	“messenger Ribonucleic Acid ”	Ácido ribonucleico mensajero
MTS	“Mitochondrial Targeting Sequence”	Secuencia de localización mitocondrial
RNA	“Ribonucleic Acid”	Ácido ribonucleico
TIM	“Translocase of the Inner Membrane”	Translocasa de la membrana interna
TOM	“Translocase of the Outer Membrane”	Translocasa de la membrana externa

I. RESUMEN

De acuerdo con la teoría endosimbiótica, la mayoría de los genes que originalmente estaban codificados en el genoma mitocondrial migraron al núcleo. Los genomas mitocondriales quedaron reducidos esencialmente a los mismos grupos de genes dedicados a la síntesis de proteínas o a la respiración. La citocromo *c* oxidasa (CcO) es el complejo terminal de la cadena respiratoria mitocondrial. En la mayoría de los eucariontes, las tres subunidades del núcleo catalítico de la CcO (Cox1, Cox2 y Cox3) están codificadas en la mitocondria. En el laboratorio se describió la localización atípica en el núcleo del gen *COX3* en las algas *C. reinhardtii* y *Polytomella* sp. La proteína correspondiente Cox3 adquirió una secuencia de localización mitocondrial (MTS) y exhibe una disminución en su hidrofobicidad promedio comparada con sus contrapartes mitocondriales. Pensamos que debido a que el gen *COX3* migró naturalmente al núcleo en estas algas, se podría emular la expresión de este gen desde el núcleo en otro organismo. La localización de un gen en un compartimiento distinto al original se conoce como expresión alotópica. Estudiar la importación de proteínas expresadas alotópicamente es de interés por sus implicaciones en la terapia génica de enfermedades mitocondriales.

El objetivo de este trabajo fue expresar alotópicamente a la proteína Cox3 en la levadura *S. cerevisiae*. Se utilizó una cepa donde el gen mitocondrial *COX3* está interrumpido (Δ *cox3*) y por lo tanto es incapaz de respirar. En esta cepa se expresaron diversas construcciones del cDNA del gen *COX3* de levadura fusionadas a MTSs de proteínas mitocondriales hidrofóbicas. En ningún caso, la expresión nuclear de *COX3* restauró el fenotipo respiratorio de la mutante Δ *cox3*. No obstante, para algunas construcciones se observó la presencia del precursor de la proteína Cox3 en extractos totales, o bien, Cox3 que fue editada y presentó un menor peso molecular que el de Cox3 silvestre. Estas proteínas se internalizan en la mitocondria ya que se detectó un enriquecimiento del precursor y de las proteínas editadas en la fracción mitocondrial. También, la delección de la proteasa del espacio intermembranal mitocondrial aumentó los niveles de estas proteínas. Sin embargo, las proteínas Cox3 que entran a la mitocondria no se ensamblan en el complejo de la CcO ya que no comigran con ella en geles azules nativos. En el presente trabajo observamos que la disminución en la hidrofobicidad de las proteínas alotópicas es necesaria pero no suficiente para restaurar la función mitocondrial. Se deben continuar los esfuerzos para identificar los parámetros a modificar para alcanzar la expresión alotópica exitosa.

II. INTRODUCCIÓN

La mitocondria

La mitocondria es la central energética de la célula eucarionte, contiene la maquinaria molecular para llevar a cabo distintas vías metabólicas por las cuales la energía química se convierte en ATP. Este organelo también participa en otras funciones celulares como la homeostasis iónica, el metabolismo de amino ácidos y lípidos, la biosíntesis de grupos hemo y de centros hierro-azufre, así como en la apoptosis (Burger et al. 2003). La mitocondria contiene dos membranas, la membrana externa rodea completamente a la membrana interna dejando un espacio intermembranal entre ambas y la membrana interna envuelve a la matriz mitocondrial. En la membrana externa se localizan canales y translocasas que permiten el paso de iones y moléculas al espacio intermembranal, mientras que la membrana interna es más estricta en su permeabilidad.

Cadena Respiratoria

Las mitocondrias aprovechan la energía por medio del acoplamiento quimiosmótico, que relaciona a las reacciones químicas que forman el enlace para generar ATP (“quimio”) y el transporte membranar (“osmótico”) (Mitchell 1961). Estos procesos se llevan a cabo (generalmente) por cuatro complejos proteicos en la membrana interna que conforman la cadena respiratoria y transfieren electrones a moléculas de oxígeno para formar agua (Wikström 2010). A su vez, los complejos bombean protones a través de la membrana interna hacia el espacio intermembranal generando un gradiente electroquímico que es aprovechado por otro complejo en la membrana: la ATP sintasa, la enzima responsable de la síntesis de ATP. Este gradiente de protones también activa maquinarias moleculares que acoplan el transporte activo de metabolitos desde y hacia la mitocondria (Alberts et al. 2008).

El origen de la mitocondria

La mitocondria ha sido esencial para la evolución de organismos complejos ya que, sin ella, las células dependerían sólo de la glucólisis anaeróbica para generar ATP. La

respiración aeróbica de los eucariontes se originó en un proceso endosimbiótico donde una célula eucarionte primitiva engulló a un procarionte aerobio sin destruirlo. La célula huésped llegó a depender del ambiente protector del hospedero, a su vez, el hospedero llegó a depender del procarionte ingerido para la producción de energía en forma de ATP. A lo largo del tiempo, los descendientes de la célula procarionte dieron lugar a la mitocondria y su función se volvió crítica para la evolución de los eucariontes (Sagan 1967).

De acuerdo con esta teoría endosimbiótica, la mitocondria proviene de un α -proteobacteria que ingresó a una célula eucarionte primitiva hace más de 1500 millones de años (Martin & Menten 2010). A lo largo de la evolución, la mayoría de los genes bacterianos ancestrales se perdieron completamente de la célula. Estos genes eran vitales para una bacteria de vida libre pero innecesarios para un endosimbionte permanente, como son algunos genes del metabolismo y otras funciones como la síntesis de la pared celular. Otros genes fueron directamente reemplazados por algún gen nuclear preexistente cuyo producto puede complementar a los genes mitocondriales remanentes (Adams & Palmer 2003). Por ejemplo, los componentes mitocondriales de levadura en complejos proteicos asociados con la regulación de la expresión genética, la estabilidad del mRNA y el corte y empalme o “splicing” parecen tener un origen puramente eucariótico (Karlberg et al. 2000). Otra fracción de genes se perdió de la mitocondria por que fue funcionalmente transferida al núcleo. Tras estas pérdidas, reemplazos y transferencias, una pequeña porción de genes se mantuvo en el genoma de la mitocondria (Burger et al. 2003).

El genoma mitocondrial humano codifica para 13 proteínas; el 99% restante, de un estimado de 1,100 a 1,400 proteínas mitocondriales, es codificado por genes nucleares (Calvo & Mootha 2010). El genoma mitocondrial de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* codifica para sólo 8 proteínas, de alrededor de 1,000 proteínas mitocondriales (Sickmann et al. 2003; Reinders et al. 2006; Meisinger et al. 2008).

Sistema de importación mitocondrial

Muchas de las proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo se sintetizan en ribosomas citoplásmicos en forma de precursores. Éstos poseen señales de localización que son reconocidas por receptores en la superficie mitocondrial. La información en sus secuencias dirige a los precursores a los distintos subcompartimentos mitocondriales (Bolender et al. 2008).

En la mayoría de los casos, esta información está presente como una extensión editable, usualmente de 20 a 50 residuos, en el extremo amino terminal del precursor, también llamada presecuencia o secuencia de localización mitocondrial (MTS, por sus siglas en inglés). Las MTS de las distintas proteínas mitocondriales no muestran identidad en la secuencia de aminoácidos pero tienen características fisicoquímicas similares: están enriquecidas en residuos cargados positivamente, hidroxilados e hidrofóbicos y exhiben un bajo contenido de residuos ácidos y aromáticos (Glaser et al. 1998; Pfanner 2000); los primeros residuos en el N- terminal (1-17) tienen el potencial de formar α hélices anfífilas con una cara cargada positivamente y una cara apolar (Roise & Gottfried 1988; von Heijne et al. 1989; Emanuelsson et al. 2000); frecuentemente, en el último segmento de la presecuencia se encuentran residuos de arginina alrededor de la posición -2 o -10, contando desde el sitio de corte (Schneider et al. 1998).

Generalmente, estas extensiones son removidas proteolíticamente en la matriz por la peptidasa de procesamiento mitocondrial (MPP). Sin embargo, existen precursores que no cuentan con una presecuencia, sino que contienen señales de localización internas, dentro de la proteína madura (Neupert & Herrmann 2007). Se ha sugerido en algunos casos que la localización del RNA mensajero (mRNA) a ribosomas adosados a la mitocondria es un mecanismo adicional utilizado en la importación. Tal es el caso del gen *ATP2* donde se demostró que el extremo 3' no traducido (3'UTR) contiene suficiente información para dirigir al RNA mensajero hacia ribosomas citosólicos que interaccionan con la mitocondria (Margeot et al. 2002).

La entrada a la mitocondria de virtualmente todos los precursores es por la translocasa de la membrana externa o complejo TOM. Después de atravesar este

complejo, los precursores utilizan distintas vías para llegar a sus destinos mitocondriales finales (Schmidt et al. 2010).

Importación de proteínas a la membrana interna

Los precursores de las proteínas de membrana interna son transferidos desde el complejo TOM a alguna de las dos translocasas de la membrana interna, los complejos TIM22 o TIM23:

1. Aquellas proteínas que contienen múltiples segmentos transmembranales son sintetizadas con señales internas de localización y utilizan al complejo de translocación especializado, TIM22. Para llegar desde TOM hasta TIM22, en el espacio intermembranal se encuentran las proteínas Tim pequeñas (Tim9 y Tim10) que interaccionan con estas proteínas y se piensa que protegen a los dominios hidrofóbicos. Todos los sustratos conocidos del complejo TIM22 representan proteínas con un número par de cruces transmembranales que exponen sus extremos amino y carboxilo terminal al espacio intermembranal (figura 1A).
2. Todos los precursores que cuentan con MTS son transferidos al complejo TIM23. Esta translocación requiere del potencial de membrana ($\Delta\psi$) para proveer la energía de transferencia de la presecuencia cargada positivamente hacia la matriz (que está cargada negativamente). En la matriz, la chaperona mitocondrial mtHsp70 se une a la preproteína en una reacción dependiente de ATP para prevenir que regrese hacia el espacio intermembranal. Aquellas proteínas que tienen solamente un cruce transmembranal pueden ser liberadas lateralmente hacia la membrana interna, esta ruta se denomina vía de paro y transferencia o “stop-transfer” (figura 1B). Otros precursores son completamente importados a la matriz y posteriormente insertados en la membrana interna en una reacción tipo exportación (figura 1C). Dado que la dirección de esta inserción refleja a la del ancestro procarionte de la

mitocondria, a esta ruta se le denomina vía conservada (Neupert & Herrmann 2007).

La inserción en la membrana interna desde la matriz está mediada por el complejo Oxa1 (“Oxidase Assembly”), una translocasa que tiene un amplio espectro de sustratos. Por un lado, interacciona con proteínas codificadas en el núcleo que son importadas hasta la matriz, ayudando a insertarlas en la membrana interna (figura 1C). Por otro lado, se une a productos de la traducción mitocondrial (como las subunidades de los complejos respiratorios) y cataliza su inserción a la membrana interna de manera cotraduccional (Rehling et al. 2010; Funes et al. 2011).

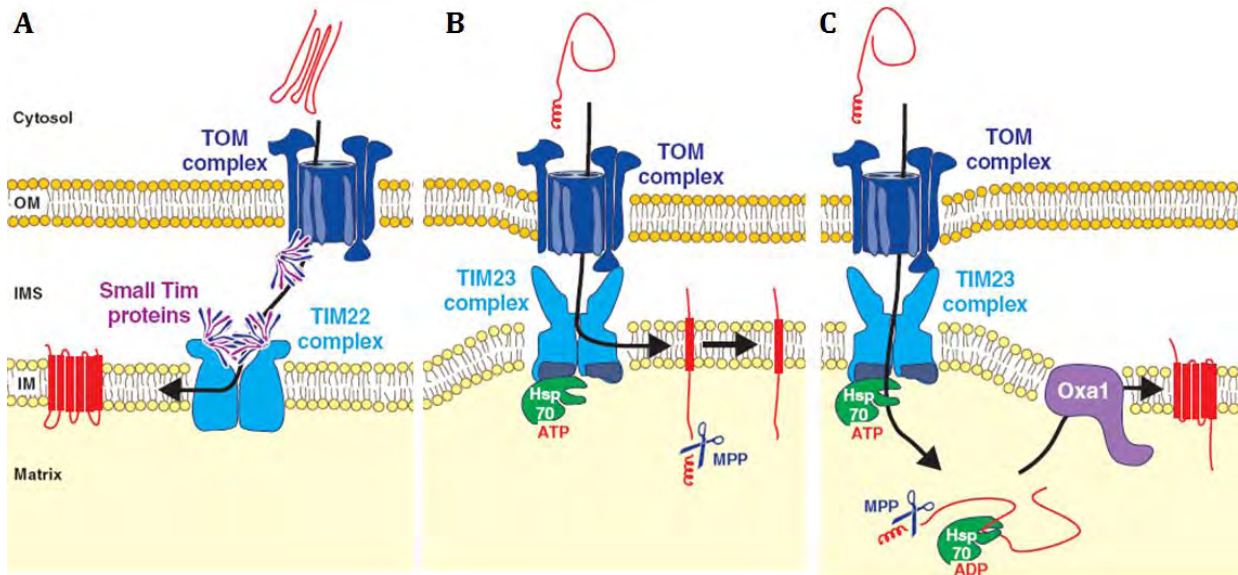


Figura 1. Vías de Inserción de Proteínas de la Membrana Interna Mitocondrial. Las proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo son traducidas en ribosomas citosólicos con información en sus secuencias que las dirigen a la mitocondria. Estos precursores atraviesan la membrana externa a través de la translocasa de la membrana externa (TOM) y son insertadas en la membrana interna por la acción de alguna de las dos translocasas de la membrana interna (TIM22 o TIM23). **A.** Los acarreadores de solutos y las subunidades hidrofóbicas de los complejos TIM son insertados en la membrana interna por la translocasa especializada TIM22. Las proteínas Tim pequeñas funcionan presuntamente como chaperonas que guían a los precursores a través del espacio intermembranal. **B.** Las proteínas que contienen sólo un cruce transmembranal son arrestadas en el complejo TIM23 y liberadas lateralmente en la membrana interna. **C.** Algunas proteínas son translocadas a través de TIM23 hasta la matriz. La inserción en la membrana ocurre desde la matriz, en la mayoría de los casos, facilitada por el complejo Oxa1 (“Oxidase assembly”). Figura modificada de Neupert & Herrmann 2007.

Control de calidad de proteínas mitocondriales

Las proteínas mitocondriales están bajo un sistema de control de calidad que tiene un papel fundamental en la biogénesis mitocondrial. Proteasas dependientes de ATP solubles o unidas a membrana se aseguran de que exista una degradación regulada de proteínas defectuosas o agregadas. Se ha identificado que el papel regulatorio de estas proteínas es esencial para la morfología de la mitocondria, el ensamblaje de la cadena respiratoria y la integridad del genoma mitocondrial (Nolden et al. 2006).

Genomas mitocondriales

Todos los genomas mitocondriales examinados contienen muchos menos genes (de 1 a 3 órdenes de magnitud) comparados con los genomas de α -proteobacterias, aun así, las mitocondrias son organelos bioquímica y metabólicamente muy activos y requieren de cientos de proteínas para funcionar correctamente. Sin embargo, en pocas instancias estas funciones cuentan con componentes codificados por el DNA mitocondrial (DNAmít), si no que la gran mayoría (hasta el 99%) de las proteínas mitocondriales son productos de genes nucleares, sintetizados en el citosol e importados al organelo.

En todas las especies estudiadas, los genomas mitocondriales quedaron reducidos a esencialmente los mismos grupos de genes especializados en la respiración o en la síntesis de proteínas. Todos los genomas mitocondriales codifican para al menos 3 proteínas respiratorias, las que son consideradas universales¹ son el citocromo *b* del complejo III de la cadena respiratoria y la subunidad 1 de la citocromo *c* oxidasa (aquí llamada CcO) o complejo IV (Adams & Palmer 2003). Entonces, los complejos de la cadena respiratoria tienen un origen genético dual, ya que se conforman de subunidades codificadas tanto en el núcleo como en la mitocondria (figura 2).

¹ Las subunidades 1, 4 y 5 de la NADH-deshidrogenasa o complejo I (nad1, nad4 y nad5) pueden ser consideradas como universales excepto por que algunas levaduras y otros organismos no tienen complejo I. Sin embargo, este complejo es reemplazado parcialmente por una enzima extrínseca de membrana codificada en el núcleo (Rasmusson et al. 1999).

El genoma mitocondrial de *S. cerevisiae* contiene los genes de las subunidades 1, 2 y 3 de la citocromo *c* oxidasa (*cox1*, *cox2* y *cox3*), las subunidades 6, 8 y 9 de la ATP sintasa (*atp6*, *atp8* y *atp9*), el apocitocromo *b* (*cytb*), una proteína ribosomal (*var1*) y varios marcos abiertos de lectura (ORFs) relacionados con intrones (Foury et al. 1998).

Se han propuesto varias hipótesis para explicar la retención de DNA en la mitocondria. Una teoría es que algunas proteínas intrínsecas de membrana tienen una hidrofobicidad tan alta que se dificulta su transporte desde el citoplasma hacia la mitocondria, así como su importación a través de las membranas mitocondriales (Popot & de Vitry 1990; Claros et al. 1995). Alternativamente, estos genes pudieron ser confinados a la mitocondria para regular su expresión dependiendo del estado redox (Allen 2003) o metabólico (Amiott & Jaehning 2006). Otra explicación es que la diferencia en el uso del código genético en las mitocondrias imposibilitó la transferencia, o bien, las proteínas correspondientes no adquirieron una MTS apropiada que las dirigiera a la mitocondria (Claros et al. 1995).

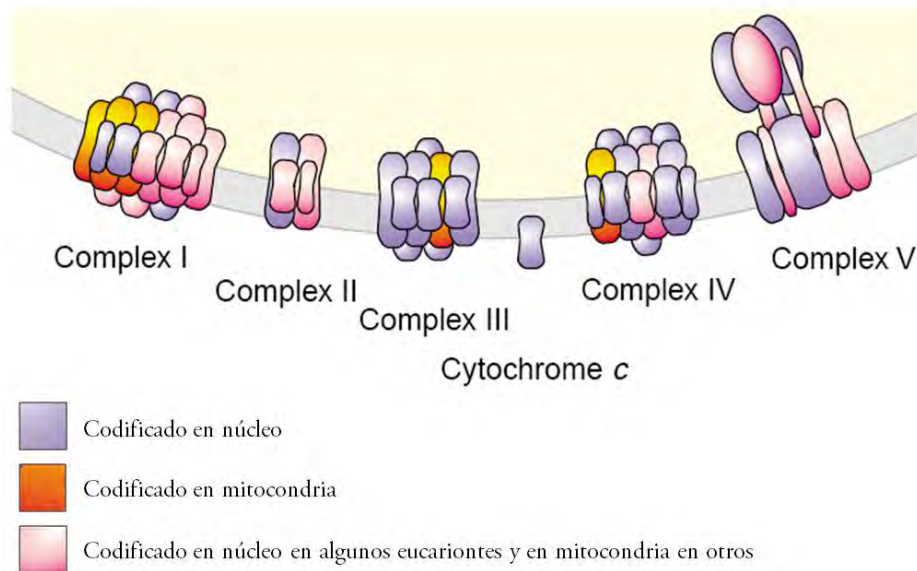


Figura 2. Origen Genético Dual de los Complejos de la Fosforilación Oxidativa. La mayoría de las subunidades de la cadena respiratoria están codificadas en el núcleo (violeta), una pequeña porción de componentes está codificado invariablemente en la mitocondria (anaranjado), mientras que las subunidades marcadas en rosa están codificadas en el DNA mitocondrial en algunos eucariontes pero en el genoma nuclear en otros. Modificado de Burger et al. 2003.

La citocromo *c* oxidasa

El complejo IV o citocromo *c* oxidasa (EC 1.9.3.1), aquí llamada CcO, es el complejo terminal de la cadena respiratoria mitocondrial encargado de oxidar el citocromo *c* soluble y reducir el oxígeno molecular a agua mientras contribuye a la formación del gradiente de protones. Todas las CcO cuentan con un núcleo catalítico de estructura casi idéntica que consiste de tres subunidades polipeptídicas (Cox1, Cox2 y Cox3) codificadas generalmente en el DNA mitocondrial (figura 2 y 3A). Estas proteínas son sintetizadas por ribosomas mitocondriales en la matriz e insertadas en la membrana interna de la mitocondria.

La subunidad I atraviesa a la membrana doce veces, contiene al centro binuclear hemo-cobre donde ocurre la unión y reducción del oxígeno (hemo $\alpha 3$ y sitio Cu_B) y el grupo hemo α . La subunidad II tiene dos hélices transmembranales y en el espacio intermembranal tiene un dominio con estructura de hojas β plegadas, justo por encima del dominio de la subunidad I que contiene a los grupos hemo. Este dominio β contiene un centro de unión a cobre llamado Cu_A (Tsukihara et al. 1996; Yoshikawa et al. 1998). Se ha propuesto que la subunidad III, de siete cruces transmembranales, tiene un papel en el almacenamiento del O₂ o constituye parte de la vía de transferencia del O₂ desde el ambiente hidrofóbico de la membrana hacia el sitio activo de la enzima. También, se ha reportado que parte de la subunidad III contribuye a la entrada del canal que conduce a los protones (Gilderson et al. 2003).

La reacción química de la CcO requiere la transferencia de electrones y protones de lados opuestos de la membrana hacia el sitio activo (figura 3B). El citocromo *c*, una hemoproteína periférica localizada en el espacio intermembranal, es el donador de electrones que se une a un sitio específico en el dominio β de la subunidad II, donde dona un electrón al centro Cu_A. Este electrón se transfiere del sitio Cu_A al hemo α de la subunidad I y subsecuentemente al centro hemo $\alpha 3$ -Cu_B. Desde el lado opuesto de la membrana, los protones entran hacia la enzima ya sea para reducir el O₂ a agua o ser transferidos a través de la membrana hacia el espacio intermembranal. Por

experimentos de mutagénesis dirigida y estructuras cristalográficas se ha propuesto que todos los protones son transferidos vía un canal en la subunidad I (Wikström 2010).

Todas las CcO estudiadas cuentan con un mínimo de 4 subunidades. En bacterias, la función de la cuarta subunidad no se conoce y no muestra similitud con subunidades de otras oxidasas (Wikström 2010). Las CcO mitocondriales contienen un mayor número de subunidades adicionales que son codificadas en el núcleo, sintetizadas en el citoplasma e importadas a la mitocondria donde atraviesan la membrana externa y el espacio intermembranal para finalmente ser insertadas en la membrana interna y ensambladas en su complejo (figura 1B y C). Las CcO tienen 13 subunidades en mamíferos y 12 subunidades en la levadura *S. cerevisiae* (Soto et al. 2011; Maréchal et al. 2012).

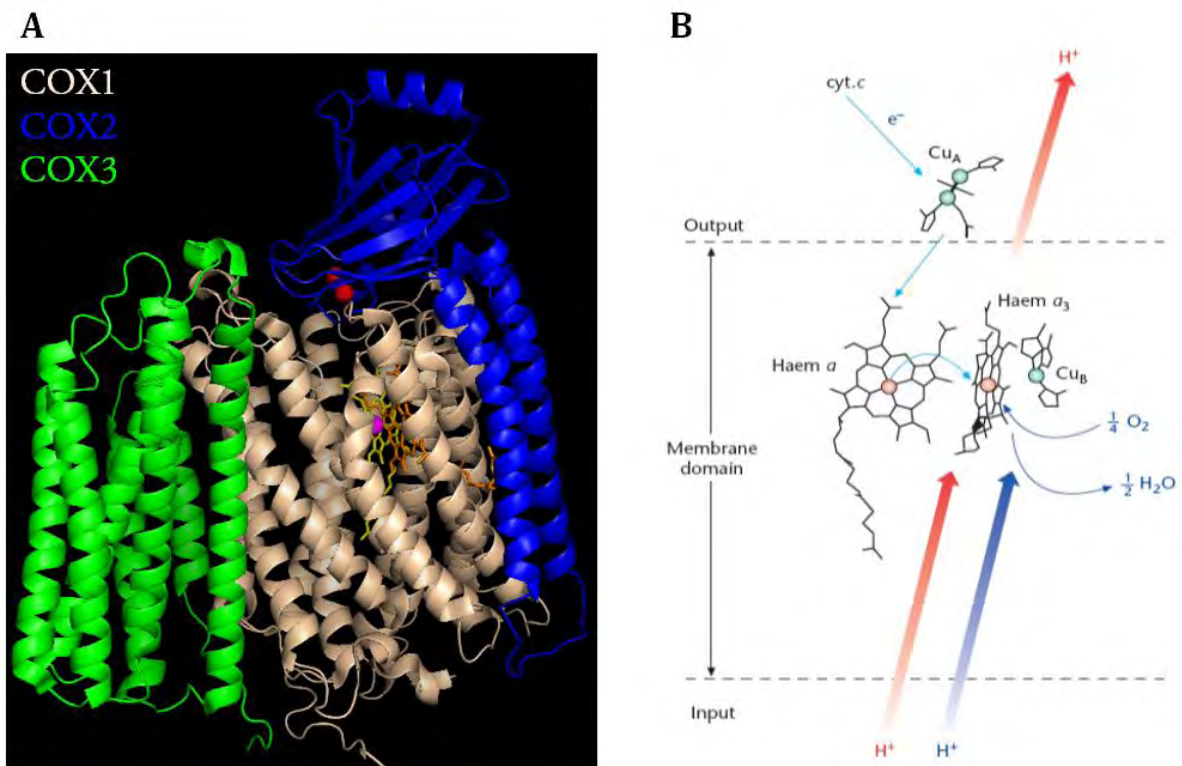


Figura 3. Núcleo catalítico de la CcO. A. Modelo cristalográfico de la interacción entre las subunidades Cox1, Cox2 y Cox3 del complejo IV de *Bos taurus* (PDB 1oco). Se muestran las subunidades Cox1 (blanco), Cox2 (azul) y Cox3 (verde). Los grupos funcionales de la subunidad Cox1: hemo α , hemo α_3 y Cu_B se muestran en amarillo, anaranjado y rosa, respectivamente. El centro Cu_A de la subunidad Cox2 se muestra en rojo. **B.** Esquema del funcionamiento de los grupos prostéticos de la CcO. Los protones consumidos en la reducción del O_2 a agua se muestran en azul y los translocados en rojo. La transferencia de electrones se muestra en azul claro.

Localización atípica de COX3 en algas

En la mayoría de las células eucariontes las tres subunidades que forman el núcleo catalítico de la CcO están codificadas en el DNA mitocondrial. En nuestro laboratorio se describió en las algas clorofitas *Clamydomonas reinhardtii* y *Polytomella* sp. (así como en *Volvox carteri*) la localización atípica en el núcleo del gen *COX3* (Pérez-Martínez et al. 2000).

Hasta la fecha, estos organismos son los únicos en los que se ha reportado una localización nuclear de *COX3*. Esta relocalización natural se ha observado para otros genes de la cadena respiratoria en estas algas como *COX2*, *ATP6*, *NAD3* y *NAD4L* (Pérez-Martínez et al. 2001; Funes et al. 2002; Cardol et al. 2006).

Estos genes adquirieron varias características que permitieron su expresión desde el núcleo y la importación de las proteínas correspondientes hacia la mitocondria: adquirieron promotores eficientes; modificaron su utilización de codones; obtuvieron señales de poliadenilación, así como de uno a varios intrones; adquirieron secuencias de localización mitocondrial con una extensión de entre 100 y 140 residuos; y exhiben una disminución en la hidrofobicidad de sus segmentos transmembranales comparados con sus contrapartes mitocondriales (Cardol et al. 2006). Probablemente, esta disminución promueve su importación a la mitocondria, aunque se ha propuesto que aquellos cruces importantes para el funcionamiento de la enzima mantienen su hidrofobicidad (Funes et al. 2002).

Expresión alotópica

Los genes antes mencionados migraron naturalmente al núcleo en las algas clorofitas. Por lo tanto, pensamos que se puede emular la expresión de un gen desde el núcleo en otro organismo eucarionte. La localización de un gen en un compartimiento distinto al original se conoce como expresión alotópica. En la tabla 1 se enlistan los cinco casos de expresión alotópica exitosa reportados utilizando como organismo modelo a la levadura *S. cerevisiae*. Tres de ellas son de proteínas que forman a los complejos de la fosforilación oxidativa (Atp8, Atp9 y Cox2).

En los casos de bI4, Var1 y Atp8, el agregar una MTS y ajustar el código genético es suficiente para la expresión alotópica funcional de estas proteínas. Para la relocalización de *COX2*, adicionalmente se substituyó un amino ácido hidrofóbico (triptófano) por uno hidrofílico (arginina) en la posición 56 del primer cruce transmembranal (W56R). En el caso de Atp9, se utilizó la versión naturalmente nuclear del hongo *Podospora anserina*.

Proteína	Descripción	<H>	TM	Cambios	Referencia
bI4	Maturasa de RNA	Hidrofílica	0	Adición de MTS y ajuste de código genético	(Banroques et al. 1986)
Var1	Subunidad del ribosoma mitocondrial	Hidrofílica	0	Adición de MTS y ajuste de código genético	(Sanchirico et al. 1995)
Atp8	Subunidad A6L de la ATP sintasa	Hidrofóbica	1	Adición de MTS y ajuste de código genético	(Nagley et al. 1988)
Cox2	Subunidad 2 de Complejo IV	Hidrofóbica	2	Adición de MTS, ajuste de código genético y sustitución de W por R en posición 56	(Supekova et al. 2010)
Atp9	Anillo de subunidades c, ATP sintasa	Hidrofóbica	2	Gen naturalmente nuclear de <i>Podospora anserina</i>	(Bietenhader et al. 2012)

Tabla 1. Ejemplos de Expresión Alotópica en Levadura. Se describen las proteínas, su hidrofobicidad <H>, el número de segmentos transmembranales (TM) y los cambios realizados para lograr su expresión alotópica.

La levadura como organismo modelo en expresión alotópica

S. cerevisiae es un organismo aerobio facultativo, lo cual es una ventaja para el estudio de la biología mitocondrial ya que permite introducir mutaciones de genes involucrados en la respiración sin perder la viabilidad del organismo. La levadura, junto con el alga *Chlamydomonas reinhardtii*, son los únicos organismos a los que se les puede hacer mutagénesis dirigida en el genoma mitocondrial (Matagne et al. 1989; Remacle et al. 2001; Remacle et al. 2006; Mileshina et al. 2011; Bonnefoy & Fox 2007). Además, su genoma nuclear y mitocondrial se encuentran totalmente secuenciados (Goffeau et al. 1996; Foury et al. 1998). Al ser un microorganismo, comparte el fácil

mantenimiento, sencillez y velocidad de crecimiento con las bacterias y hace a este modelo adecuado para utilizar metodologías bioquímicas y genéticas. Al ser eucariontes, comparten muchas propiedades de biología celular con organismos más complejos (Botstein & Fink 1988).

Implicaciones en la terapia génica

El estudio de la importación de proteínas expresadas alotópicamente es de interés por sus implicaciones en la terapia génica de enfermedades mitocondriales. En humanos, todas las proteínas codificadas en el mtDNA son esenciales para la cadena de fosforilación oxidativa. Por lo tanto, mutaciones en este genoma resultan en una gran variedad de desórdenes con manifestaciones clínicas multisistémicas que causan defectos crónicos y progresivos en músculo y sistema nervioso (Kyriakouli et al. 2008).

A la fecha, no existe una terapia efectiva para estas enfermedades. Una aproximación es el rescate del defecto utilizando ingeniería genética para expresar alotópicamente la versión silvestre del gen mutado. Las características de aquellos genes que se localizan naturalmente en el núcleo en algunos organismos pueden proporcionar información para incrementar la eficiencia de la expresión alotópica (González-Halphen et al. 2004).

III. HIPÓTESIS

La adición de una MTS adecuada y la disminución en la hidrofobicidad favorecerán la expresión alotópica y la internalización en la mitocondria de la proteína Cox3 en *S. cerevisiae*.

IV. OBJETIVO GENERAL

Expresar desde el núcleo al gen *COX3* en una mutante Δcox3 para observar si hay crecimiento de la levadura transformada en condiciones respiratorias y poder evaluar si la expresión alotópica restaura la respiración.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

- i. Clonar y expresar en *S. cerevisiae* diversas construcciones de *COX3*.
- ii. Probar el fenotipo respiratorio al observar crecimiento o ausencia de éste en medios respiratorios.
- iii. Determinar la expresión de la proteína Cox3 en extractos celulares totales.
- iv. Evaluar la internalización de la proteína Cox3 en la mitocondria.
- v. Analizar el ensamblaje de la proteína Cox3 en el complejo citocromo *c* oxidasa.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

i. Biología Molecular

Preparación de células competentes

Se utilizaron dos protocolos para la preparación de células competentes:

1. Se inocularon bacterias *E. coli* DH5 α en 2 ml de medio LB líquido (apéndice 2). Se incubó a 37 °C toda la noche en agitación. Se inoculó 1 ml del pre cultivo en 100 ml de medio LB (matraz de 500 ml). Se agitó a 37 °C hasta alcanzar una D.O._{λ600nm} de ~0.25-0.3 (1.5-2 h). Se enfrió en hielo por 15 min, se decantó en tubos de 50 ml y se centrifugó a 3300xg por 10 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla gentilmente en 30-40 ml de CaCl₂ 0.1 M frío. Se incubó en hielo por 30 min y se centrifugó a 3300xg por 10 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 6 ml de CaCl₂ 0.1 M conteniendo glicerol al 15%. Se hicieron alícuotas de 200 μ l en tubos estériles de 600 μ l. Se guardaron a -70 °C.
2. Se inocularon bacterias *E. coli* DH5 α en 4 ml de medio LB líquido. Se incubó a 37 °C toda la noche en agitación. Se inocularon 300 μ l del precultivo en 20 ml de medio LB, se adicionaron 200 μ l de una solución de MgCl₂ 1 M y MgSO₄ 1 M y se incubó a 20 °C toda la noche en agitación hasta alcanzar una D.O._{λ600nm} de 0.5 (aprox. 24 h). Se decantó en tubos de 50 ml y se centrifugó a 3500 rpm (Rotor Beckman JA-25.5) por 10 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante, se resuspendió la pastilla en 5 ml de TB estéril y se incubó 10 min en hielo. Nuevamente, se centrifugó a 3500 rpm por 10 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante, se resuspendió en 5 ml de TB estéril y se incubó 10 min en hielo. Finalmente, se centrifugó a 3500 rpm por 10 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 2 ml de TB estéril. Se agregaron 140 μ l de DMSO, se resuspendió y se hicieron alícuotas de 200 μ l en tubos estériles de 600 μ l. Se sumergieron 1 min en N₂ líquido y se guardaron a -70 °C.

TB 100ml

Pipes 0.3 g

CaCl₂·2H₂O 0.22 g

KCl 1.86 g

Se ajustó el pH a 6.7 con KOH 1 N

Se agregaron 1.09 g de MnCl₂

Se filtró la solución con una membrana de 0.22 µm y se guardó a 4 °C.

Extracción de plásmido

Las preparaciones rápidas se realizaron en 10 minutos con cultivos de *E. coli* DH5α de toda la noche de 1.5 ml, se centrifugó por 10 seg, se decantó suavemente el sobrenadante, dejando 50-100 µl junto con la pastilla y se resuspendió completamente usando un vortex. Se agregaron 300 µl de amortiguador TENS y 3 µl de RNasa (10 mg/ml), se mezcló con vortex 2-5 seg hasta que la mezcla se volvió viscosa. Se agregaron 150 µl de acetato de sodio 3 M, pH 5.2 y se mezcló completamente con vortex 2-5 seg. Se centrifugó 2 min para bajar los restos celulares y el DNA cromosomal y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio, se mezcló bien con 0.9 ml de EtOH 100% (enfriado a -20 °C) y se centrifugó 2 min para obtener el DNA plasmídico. Se descartó el sobrenadante, se lavó la pastilla dos veces con 1 ml de EtOH 70% y se secó la pastilla por 5-10 min al vacío. Se resuspendió la pastilla en 40-100 µl H₂O.

TE

Tris 10 mM

EDTA 1 mM

Se ajustó el pH a 8.5

TENS

TE 1X

NaOH 0.1 N

SDS 0.5 %

Las “minipreps” se realizaron utilizando el sistema de Promega “Wizard PLUS SV Minipreps DNA Purification System” (#cat: A1460) de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

Las “midipreps” se realizaron utilizando el sistema de QIAGEN (#cat: 12145) de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

Digestión de plásmidos

En el siguiente orden se agregó:

H₂O c.b.p. volumen final de 20-50µl

SDB 10x 2-5 µl

DNA ~400 ng

Enzima 1-5U/µg DNA

Se incubó 1h a 37° C.

<u>SDB (Super Duper Buffer)</u>		Stock	<u>10X</u>
Tris-Acetato pH8.3	33 mM	1 M	3.3 ml
Potasio-Acetato	62.5 mM	5 M	1.25 ml
Magnesio-Acetato	10 mM	1 M	1 ml
Espermidina	4 mM	0.1 M	4 ml
Ditioeritrol	0.5 mM	0.1 M	<u>0.5 ml</u>
			10.05 ml

Este amortiguador funciona muy bien con todas las enzimas de restricción, pero también para reacciones de ligación (+ATP), de fosforilación (+5 µl 1 M Tris-HCl pH 8.4 en 50 µl) y reacciones del fragmento Klenow (+dNTPs).

Geles de agarosa y preparación de muestras

Se disolvió agarosa al 0.8 % en amortiguador TAE 1x en el horno de microondas. Se dejó enfriar a ~55 °C, se vertió en el molde y se agregó 0.5-1 µg/ml de bromuro de etidio (solución madre de 10 mg/ml), se homogenizó usando el peine y se colocó a ~1 cm del lado del electrodo negativo. Las muestras se prepararon agregando

amortiguador de carga de DNA 6X. El gel se corrió a 5V/cm de distancia entre los electrodos (~70 V).

<u>TAE 50X</u>	<u>1 L</u>
Trizma Base	242 g
Ácido Acético Glacial	57.2 mL
EDTA 0.5 M (pH 8)	100 mL

Amortiguador de Carga DNA 6X

Azul de Bromofenol	0.25 %
Xilén-cianol FF	0.25 %
Glicerol	30 %

Transformación de bacterias

Se descongelaron en hielo células DH5 α competentes. Se agregó DNA (máximo 1/10 del volumen de las células competentes), se homogenizó suavemente y se incubó en hielo por 30 min. Se dio un choque térmico de 42 °C por 1.5-2 min, se incubó en hielo 2 min, se agregaron al menos 4 volúmenes (4-10) de medio LB (apéndice 2) y se incubó una hora a 37 °C a 300 rpm. Se centrifugó 1 min a 18400xg, se retiró el exceso de sobrenadante y se resuspendió en poco volumen (~50 μ l). Se sembró en cajas LB + amp y se incubaron a 37 °C toda la noche.

DNA de Construcciones de COX3

Las construcciones quiméricas de *COX3* (*OXA1_COX3q* y *SU9_COX3q*) fueron diseñadas y sintetizadas por el M. en C. Alaín Macedo Márquez en el laboratorio (Macedo-Márquez 2010). Las versiones nucleares de *COX3* de *S. cerevisiae* (*OXA1_ScCOX3*) y las versiones naturalmente nucleares de las algas *Polytomella* sp. (*OXA1_PsCOX3*) y *C. reinhardtii* (*OXA1_CrCOX3*) se sintetizaron en GenScript USA Inc. (apéndices 3 y 4).

Clonación a pFL61

Los DNAs de las construcciones de *COX3* se clonaron en el vector de expresión de levadura pFL61 (Minet et al. 1992) (ATCC#: 77215) que contiene el origen de

replicación del plásmido 2μ de levadura, el gen *URA3* y el promotor y terminador del gen fosfoglicerato cinasa (*PGK*). Los insertos ($\sim 8 \mu\text{g}$) se obtuvieron digiriendo con la enzima NotI y se corrieron en geles de agarosa. Se cortaron las bandas del gel correspondientes a *OXA1_COX3q* (1300 bp), *SU9_COX3q* (1500), *OXA1_ScCOX3* (1000 bp), *OXA1_PsCOX3* (1000 bp) y *OXA1_CrCOX3* (1000 bp). Se purificó el DNA del gel utilizando el sistema de purificación de gel de QIAGEN “QIAquick Gel Extraction Kit” (#cat. 28704). El plásmido pFL61 se digirió con la enzima NotI durante 1 h a 37°C y posteriormente se inactivó la enzima a 65°C durante 20 min. Se incubó con $1 \mu\text{l}$ de fosfatasa alcalina por 30 min a 37°C . Se purificó la reacción de fosfatasa alcalina con el sistema de purificación de gel de QIAGEN. Se cuantificaron el plásmido y los insertos utilizando un espectrofotómetro “NanoDrop” y se hicieron las cuentas para ligación con tasas de 3:1 y 5:1 (inserto:vector) usando la formula:

$$\frac{\text{ng de vector} \times \text{tamaño del inserto en kb}}{\text{tamaño del vector en kb}} \times \text{tasa molar inserto : vector} = \text{ng de inserto}$$

La reacción de ligación se hizo con la ligasa y amortiguador de NEB (#cat. M0202L) a 16°C durante toda la noche. Se transformaron bacterias DH5 α con $5 \mu\text{l}$ de la reacción de ligación y se analizaron las transformantes por extracción del plásmido y secuenciación (oligonucleótidos utilizados en el apéndice 5).

ii. Levaduras

Cepas de levadura

Se utilizaron las siguientes cepas de *S. cerevisiae*. Se crecieron a 30 °C en los medios especificados en el apéndice 2.

Nombre	Genotipo	Nuclear	Genotipo Mitocondrial	Alias	Referencia
NB40-36a	<i>Mat α; ura3-52; arg8::hisG; leu2-3,112; lys2</i>		Silvestre	Silvestre	(Bonnefoy & Fox 2000)
DF189	<i>Mat α; ura3-52; arg8::hisG; leu2-3,112; lys2; his3-ΔHindIII</i>		<i>cox3::ARG8m</i>	<i>Δcox3</i>	(Steele et al. 1996)
BY4741	<i>Mat α; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura 3Δ0</i>		Silvestre	Silvestre	ATCC#:201388 (Brachmann et al. 1998)
BY4741 Δoxa1::hph	<i>Mat α; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura 3Δ0, Δoxa1::hph</i>		Silvestre	<i>Δoxa1</i>	Funes S. IFC, UNAM
BY4741 Δyme1::kanMX	<i>Mat α; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura 3Δ0; Δyme1::kanMX</i>		Silvestre	<i>Δyme1</i>	Funes S. IFC, UNAM

Tabla 2. Cepas de *S. cerevisiae*. En el genotipo nuclear se especifican los marcadores de auxotrofia.

Transformación de levaduras

Las transformaciones con DNA plasmídico se realizaron con el método de acetato de litio (modificado de Gietz & Schiestl 2007). Se crecieron de 2 a 3 colonias de una caja recién sembrada en 2 ml de YPD toda la noche (13-14 h). Se tomaron ~100 µl del cultivo y se centrifugó 30 seg a 18400xg. Se mezclaron las células con 52.5 µl de la mezcla de transformación (se puede hacer una mezcla maestra para todas las transformaciones). Se mezcló en el orden que sigue:

PEG 3350	50%	40 μ l
DTT	1 M	5 μ l
CH ₃ Li	1 M	5 μ l
DNA de esperma de salmón (10 mg/ml)*		2.5 μ l

*Desnaturalizar a 95 °C por 10 min y colocar el tubo inmediatamente en hielo.

La selección de transformantes se hizo en cajas de medio mínimo sintético con glucosa (apéndice 2).

Diluciones por goteo

Se inocularon cultivos de 2 ml de las cepas a analizar en medio mínimo sintético durante toda la noche. Se prepararon 6 tubos de 1.5 ml por cepa: fila 1, sin H₂O; fila 2, 50 μ l de H₂O; filas 3 a 5, 90 μ l de H₂O. Se incubó hasta que los cultivos alcanzaron una D.O.₆₀₀ de 1.0-2.0. Se tomó la cantidad apropiada de cultivo para una suspensión de células con D.O.₆₀₀ de 1.0 para los tubos de la fila 1, se centrifugaron a 18400xg por 1.5 min, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron en 1 ml de H₂O “Milli-Q” estéril. Se mezclaron con vortex, se tomaron 50 μ l y se mezclaron con los 50 μ l de H₂O de los tubos de la fila 2. Se hicieron diluciones seriadas 1:10 en los tubos de las siguientes filas transfiriendo 10 μ l de la suspensión de células a los 90 μ l de H₂O de la siguiente fila, siempre asegurándose de que la suspensión está bien mezclada. Se tomaron 3 μ l de las filas 2 a 5 y se gotearon en las cajas a probar. Se incubó a 30 °C y se tomaron fotografías a 2, 3 o 5 días.

Extracto total de levaduras

A partir de un cultivo de 10 ml de toda la noche se centrifugaron las células, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de H₂O. Se adicionó 150 μ l de NaOH 1.85 M/ β -mercaptoetanol 7.4% (para 1 ml: 926 μ l de NaOH 2 M y 74 μ l de β -mercaptoetanol). Se incubó 15 min en hielo y se agregó 150 μ l de ácido tricloroacético al 50%, se mezcló invirtiendo y se incubó 15 min en hielo. Se centrifugó 10 min a 18400xg, se lavó la pastilla con 1.5 ml de acetona fría y se resuspendió con vortex. Se centrifugó 5 min a 18400xg, se decantó el sobrenadante y se secó ~5 min a 40 °C. Se

resuspendió con SDS 5% (~80 µl/muestra) y se cuantificó utilizando un espectrofotómetro “NanoDrop”.

Obtención de mitocondrias

Se cosecharon células en un litro de medio mínimo con galactosa (apéndice 2) centrifugando 6 min a 6000 rpm en un rotor Beckman Coulter JA-10. Se puede interrumpir el protocolo en este punto congelando la pastilla a -70 °C en medio de extracción sin albúmina. Se lavaron las células en H₂O destilada fría (llenando los tubos ~3/4 de su volumen) por centrifugación y se descartó el sobrenadante. Se resuspendieron en medio de extracción y se rompieron las células utilizando un homogenizador con una camisa de hielo (Bead-beater Biospec Products, U.S.A) y perlas de vidrio de 0.45 mm de diámetro mediante tres pulsos de 20 seg con 40 seg de descanso entre cada uno (Uribe et al. 1985). Se aislaron las mitocondrias del homogenado por centrifugación diferencial en un rotor Beckman Coulter JA-25.5 a 4 °C (Peña et al. 1977): 2500 rpm por 5 min y el sobrenadante a 9500 rpm durante 10 min. El sedimento se resuspendió con un pincel fino en medio de extracción con poco volumen primero y ya resuspendido se añadió más amortiguador de extracción. Se centrifugó a 5500 rpm por 5 min y el sobrenadante se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min. Se resuspendió el sedimento con 2 o 3 gotas de medio de extracción sin albúmina, obteniendo una suspensión de mitocondrias. Se determinó la concentración de proteínas utilizando un espectrofotómetro “NanoDrop”.

<u>Medio de Extracción</u>		Stock
Manitol	0.6M	0.8 M (4 °C)
Ác. Maléico (pH 6.8 con tris)	10 mM	500 mM
Albúmina Sérica Bovina (Fracción V)	0.1 %	

iii. Proteínas

Geles de Poliacrilamida (SDS-PAGE) de Von Jagow

Se prepararon geles de acrilamida al 14% de 8.5 cm x 6 cm y 1.5 mm de grosor, el gel separador se dejó polimerizar al menos 30 min y el concentrador 15 min. Los geles se pueden guardar envueltos en "Ega-Pack" por 2 días a 4 °C. Las muestras se prepararon agregando amortiguador de muestra 6x, se cargaron y se corrieron a 50 V hasta que alcanzaron el gel separador y posteriormente se corrieron a 75-80 V.

2 Geles	Separador	Concentrador
Acrilamida 30%/ Bis-acrilamida 0.98%	7.5 ml	800 µl
Amortiguador Electroforético	6 ml	1.5 ml
Glicerol 79.5%	2 ml	-
H ₂ O	-	3.7 ml
Persulfato de Amonio 10%	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl

<u>Amortiguador electroforético</u>		<u>500 ml</u>
Tris	3 M	181.7 g
HCl	1 N	40.3 ml
SDS	0.3%	1.5 g

<u>Amortiguador de muestra 6x</u>		<u>10 ml</u>
Tris-HCl pH 6.8	375 mM	0.591 g
SDS	6%	0.6 g
Glicerol	48%	4.8 ml
Mercaptoetanol	9%	0.9 ml
Azul de Bromofenol	0.03%	3 mg
<u>Amortiguador de cátodo (superior)</u>		<u>3 L</u>
Tris	0.1 M	36.3 g
Tricina	0.1M	53.8 g
SDS	0.1%	3 g
<u>Amortiguador de ánodo (inferior)</u>		<u>3 L</u>
Tris-HCl pH 8.9	0.2 M	72.7 g

Geles Azules Nativos (BN-PAGE)

Se preparó un gradiente del 5% al 15% para cámaras de electroforesis Gibco BRL Vertical (17.5 cm x 15 cm x 1.5 mm). Se utilizó un formador de gradientes con dos cilindros separados sobre un agitador magnético arriba de una plataforma ajustable (Jiffy Jack) con la salida del formador de gradientes al menos 20 cm por arriba de las placas de vidrio. Se prepararon las soluciones de los geles separadores y concentradores sin agregar TEMED. Inmediatamente después de agregar TEMED y mezclar por vortex, se vertieron en el formador de gradientes con las válvulas cerradas (el de alta concentración más cercano a la salida) y mezclando con agitador magnético se abrieron ambas válvulas. Se aseguró que ambas soluciones bajaran a la misma velocidad (dando ligeros golpes arriba del formador de gradientes para que fluya la solución por el tubo de salida). Antes de que polimerizara el separador se agregó el gel concentrador (1 cm debajo de los pozos) y se puso el peine. Se lavó de inmediato el formador de gradientes antes de que polimerizaran los residuos de las soluciones. Los geles se pueden guardar envueltos en "Ega-Pack" por 2 días a 4 °C para que no se deshidraten. Se cargaron las muestras y se corrió el gel a 30 mA a 4 °C durante ~16 h.

1 Gel	Separador 15%	Separador 5%	Concentrador 4%
Acrilamida 48.5%*	5.7 ml	1.9 ml	0.5 ml
Bis-acrilamida 1.5%			
Amortiguador 3x	6.2 ml	6.2 ml	2 ml
Glicerol 80 %	4.73 ml	1.2 ml	-
H ₂ O	1.9 ml	9.2 ml	3.44 ml
Persulfato de Amonio 10%	50 µl	50 µl	32 µl
TEMED	15 µl	15 µl	9 µl

* La solución de acrilamida 48.5 % puede cristalizar a 4 °C. Guardar a temperatura ambiente.

Amortiguador 3x

100 ml

Ácido ε amino caproico 1.5 M 19.68 g

Bis-Tris 150 mM 3.14 g

pH 7 (HCl)

Amortiguador del cátodo (superior)

1 L

Tricina 50 mM 8.96 g

Bis-Tris 15 mM 3.14 g

Azul de Coomassie Serva G 0.002% 20 mg

Amortiguador del ánodo (inferior)

1 L

Bis-Tris 50 mM 10.46 g

pH 7 (HCl)

Preparación de mitocondrias solubilizadas para BN-PAGE

Se aislaron mitocondrias por centrifugación diferencial y se mantuvieron en hielo (las muestras se prepararon frescas o guardadas en hielo por algunos días). Se centrifugaron a 18400xg por 10 min a 4 °C, la pastilla se resuspendió en 100 µl de amortiguador de lavado por mg de proteína. Se centrifugó a 18400xg por 10 min a 4 °C, la pastilla se resuspendió en 175 µl/mg de amortiguador de carga, se agregaron 20

μl/mg de dodecil- maltósido al 10% y se incubó en hielo por 30 min. Las muestras se centrifugaron a 33,000 rpm (Rotor Beckman TLA 55) por 30 min, se agregó glicerol (5% final) al sobrenadante y se cargaron las muestras en geles azules nativos.

<u>Amortiguador de lavado</u>		<u>100 ml</u>
Sorbitol	250 mM	4.56 g
Bis-Tris	50 mM	1.05 g
pH 7 (HCl)		

<u>Amortiguador de carga</u>		<u>50 ml</u>
Ácido ε amino caproico	750 mM	4.92 g
Bis-Tris	50 mM	0.52 g
pH 7 (HCl)		

Transferencia

En cámara húmeda:

Se corrió un gel SDS-PAGE y se incubó en amortiguador de transferencia. Se equilibraron en amortiguador de transferencia una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) del tamaño del gel, el papel filtro "Whatman" y esponjas. Se colocó en la rejilla (de positivo a negativo): una esponja, 3 papeles filtro, la membrana, el gel, 3 papeles filtro y una esponja (pasando un tubo entre cada capa para eliminar burbujas). Se colocó la rejilla en la cámara de transferencia y se llenó con amortiguador de transferencia. Se transfirió en agitación a 350 mA por 1.5 h o toda la noche a 90 mA, a 4 °C.

<u>Amortiguador de transferencia húmeda</u>		<u>1 L</u>
Tris	25 mM	3 g
Glicina	192 mM	14.4 g
SDS	0.1%	1 g
Metanol	20 %	200 ml

En cámara semi seca:

Se corrió un gel BN-PAGE y se incubó en amortiguador (-) de transferencia junto con 3 papeles filtro "Whatman". Se activó una membrana de PVDF (Millipore #cat: IPVH00010) en metanol por 5 min y posteriormente se equilibró en amortiguador (+) de transferencia junto con 3 papeles filtro. Se colocó en la rejilla (de positivo a negativo): 3 papeles filtro, la membrana, el gel, 3 papeles filtro (pasando un tubo entre cada capa para eliminar burbujas). Se transfirió a 1mA/cm² por 1.5 h.

<u>Amortiguador (-) de transferencia semiseca</u>		<u>1 L</u>
Ácido ε amino caproico	300 mM	39.4 g
pH 8.5-8.7 (añadiendo Tris)		
SDS	0.05%	0.5 g
<u>Amortiguador (+) de transferencia semiseca</u>		<u>1 L</u>
Tris	150 mM	18.2 g
Tricina	50 mM	9 g
Metanol	20%	200 ml

Inmunorélicas tipo Western

Después de la transferencia se lavó la membrana 3 veces con TBS por 5 min y se bloqueó con 3% de gelatina en TBS desde 5 h a toda la noche a temperatura ambiente en agitación. Se lavó 3 veces con solución TTBS, se agregó el primer anticuerpo en una solución al 1% gelatina en TTBS y se incubó de 5 h a toda la noche en agitación. Se lavó 3 veces con TTBS, se agregó el segundo anticuerpo (acoplado a fosfatasa alcalina) en una solución al 1% gelatina en TTBS y se incubó de 5 h a toda la noche en agitación. Finalmente, se lavó 2 veces con TTBS y una vez con TBS. Para revelar, se agregaron 20 ml de una solución reveladora con 200 µl de BCIP y 200 µl de NBT de 3 h a toda la noche en agitación. La reacción se paró lavando la membrana con H₂O.

Anticuerpo Primario	Marca/ No. Cat	Producción	Dilución
α Cox3 (levadura)	Molecular Probes/Descont.	Ratón	1: 20,000
α Atp2 (<i>Polytomella</i>)	Laboratorio	Conejo	1: 50,000
Anticuerpo Secundario			
α ratón	Sigma/ A9316	Cabra	1: 20,000
α conejo	Sigma/ A8025	Cabra	1: 20,000

<u>TBS</u>		<u>10X</u>
Tris-HCl pH 7.5	20 mM	24 g/L
NaCl	0.5 M	292 g/L

<u>TTBS</u>	
TBS 1X	+ 0.05% Tween-20

Solución Reveladora

NaHCO ₃	0.1M
MgCl ₂	1 mM
pH 9.8	

<u>BCIP</u>	30 mg en 4 ml de Dimetilformamida (DMF)
-------------	---

<u>NBT</u>	60 mg en 2.8 ml de DMF y 1.2 ml de H ₂ O
------------	---

iv. Análisis *in silico*

Perfiles de Hidrofobicidad

Los perfiles de hidrofobicidad para las secuencias proteicas de las construcciones de Cox3 se realizaron utilizando el programa TopPred 0.01 utilizando los parámetros estándar (Claros & von Heijne 1994).

Análisis de Hidrofobicidad de Segmentos Transmembranales

Se obtuvieron las secuencias de Cox3 de NCBI Genome (accesible en el sitio: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/GenomesGroup.cgi?taxid=33090&opt=organelle>). Se tomaron todas las secuencias de Cox3 de las plantas clorofitas (total 14, algunas no tienen a Cox3 secuenciado) (apéndice 1). Se alinearon todas las secuencias con Clustal Omega utilizando los parámetros estándar del programa (Sievers et al. 2011). Se determinaron los cruces transmembranales a partir del modelo cristalográfico de Cox3 de *Bos taurus* (PDB 1oco). Se calculó la hidrofobicidad promedio de cada segmento transmembranal usando la escala de Kyte y Doolittle. (en el sitio: <http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/HydroCalc/HydroMCalc.html>). La gráfica de comparación de promedios de hidrofobicidad se realizó utilizando el programa GraphPad Prism4.0. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba T de Student.

Densitometría de Inmunorélicas

Se utilizó el programa “Gel Analyzer 2010a” para cuantificar por densitometría la intensidad de las bandas en las inmunorélicas tipo Western.

VII. RESULTADOS

Fenotipo de la delección del gen mitocondrial COX3

Contamos con una cepa de *S. cerevisiae* donde el gen mitocondrial *COX3* está interrumpido por una versión mitocondrial del gen *ARG8^m*. Esta cepa silvestre carece del gen nuclear *ARG8* (que participa en la vía de biosíntesis del aminoácido arginina) (Steele et al. 1996). Las cepas silvestre y Δcox3 se pueden mantener en medios fermentativos como glucosa, pero la cepa Δcox3 no crece en medios respiratorios como etanol o glicerol ya que carece del gen *COX3* (figura 4A). La cepa Δcox3 puede compensar la falta de arginina en el medio para crecer mientras que la silvestre para *COX3* no cuenta con el gen *ARG8* nuclear ni mitocondrial. En mitocondrias aisladas no se observó la presencia de la proteína Cox3 en la cepa mutante (figura 4B). Sin la proteína Cox3, la citocromo *c* oxidasa no se puede ensamblar apropiadamente, llevando a la regulación negativa de la síntesis de Cox1 y a una cepa Δcox3 desprovista de complejo CcO (Herrmann & Funes 2005).

Ninguna de las dos cepas puede crecer en medio sin uracilo. Utilizamos al plásmido pFL61, con el gen reportero *URA3* (que compensa la falta de uracilo), para expresar las distintas construcciones del DNA de *COX3* en la levadura. Este vector es de alto número de copias y utiliza al promotor del gen fosfoglicerato cinasa (PGK) (Minet et al. 1992).

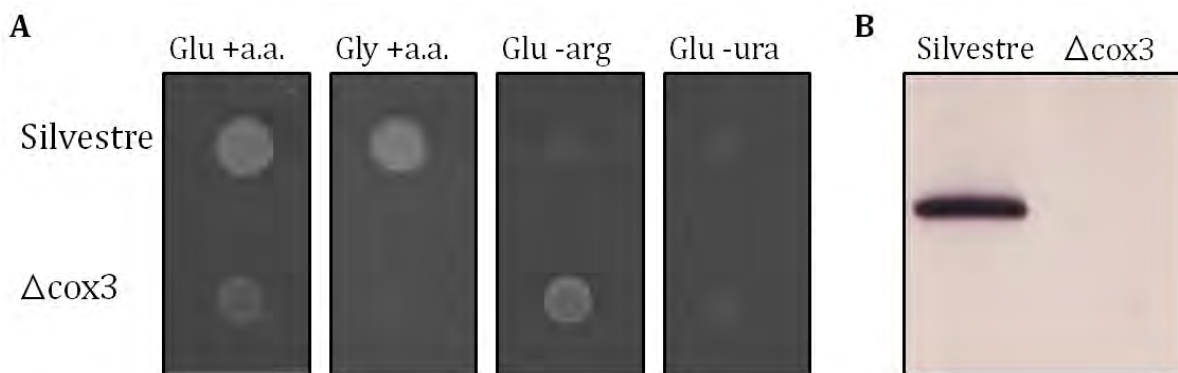


Figura 4. Fenotipo de la delección del gen mitocondrial COX3. A. El gen mitocondrial *COX3* fue interrumpido con el gen *ARG8^m* en una cepa sin el gen nuclear *ARG8*. Esta cepa Δcox3 no crece en medios respiratorios como glicerol (Gly) aún en presencia de todos los aminoácidos (+a.a). Además, la cepa Δcox3 crece en glucosa (Glu) sin arginina (-arg) mientras que la cepa silvestre no. Ninguna de las dos cepas crece en un medio sin uracilo (-ura). B. Niveles de la proteína Cox3 en la cepa silvestre y Δcox3 . Se aislaron mitocondrias, se separaron sus componentes proteicos por electroforesis y se detectó la proteína con anticuerpos que reconocen a Cox3.

Análisis de hidrofobicidad de los cruces transmembranales de Cox3

Calculamos la hidrofobicidad de los segmentos transmembranales de las tres Cox3 nucleares (*Polytomella* sp., *C. reinhardtii* y *V. carteri*) y la comparamos con la de otras secuencias de Cox3 de plantas clorofitas codificadas en la mitocondria (apéndice 1). Los cruces transmembranales uno, cinco y seis de las Cox3 nucleares disminuyeron su hidrofobicidad significativamente, en el resto de los segmentos no hay cambios significativos (figura 5). Observaciones similares ocurren en el caso de la proteína ATP6 (Funes et al. 2002).

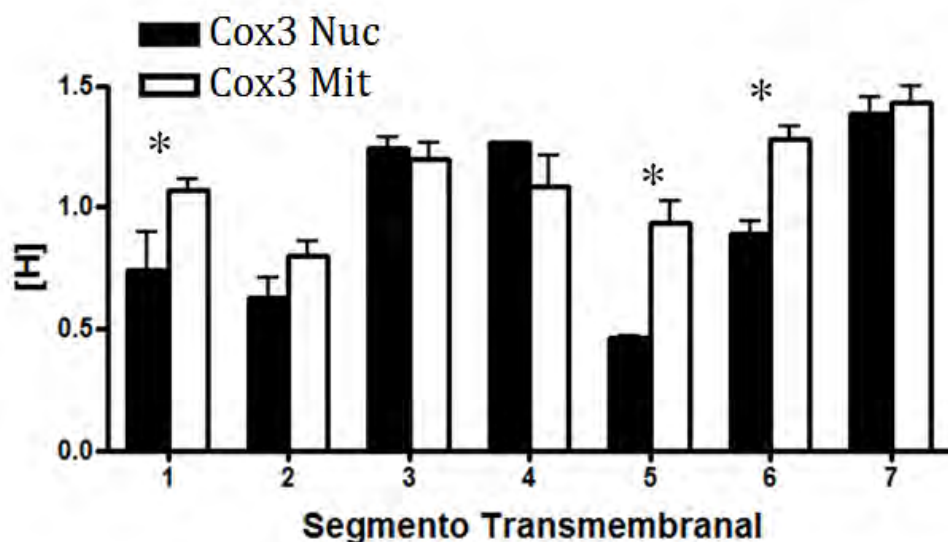


Figura 5. Análisis de la hidrofobicidad promedio de los cruces transmembranales de Cox3. Los valores de hidrofobicidad de cada uno de los 7 cruces transmembranales de Cox3 codificada en el núcleo (*Polytomella* sp., *C. reinhardtii* y *V. carteri*) (barras negras) comparado con la hidrofobicidad de 11 secuencias de Cox3 de plantas clorofitas codificadas en el DNA mitocondrial (barras blancas). Se muestran las desviaciones estándar. (*)Diferencias estadísticamente significativas, p-valor<0.02. La lista de organismos empleados se encuentra en el apéndice 1.

Diseño de Construcciones del gen COX3

En el presente trabajo contamos con cinco construcciones del gen *COX3* recodificadas para su expresión nuclear, dos de ellas son genes quiméricos (*COX3q*) (diseñados y sintetizados por el M. en C. Aláin Macedo Márquez, ver materiales y métodos) y el resto son versiones nucleares del gen *COX3* de *S. cerevisiae* (*ScCOX3*) y las versiones naturalmente nucleares de las algas *Polytomella* sp. (*PsCOX3*) y *C. reinhardtii* (*CrCOX3*) (figura 6A y apéndice 4).

Todas nuestras construcciones fueron fusionadas en el extremo amino terminal a MTSs de proteínas de la membrana interna que han sido utilizadas para la expresión alotópica de otras proteínas mitocondriales hidrofóbicas (Tabla 1). La presecuencia de la proteína Oxa1 de *S. cerevisiae* contiene 42 aminoácidos además de 5 residuos del amino terminal de la proteína madura. La presecuencia de la subunidad 9 de la ATP sintasa del hongo *Neurospora crassa* (Su9) contiene 69 aminoácidos incluyendo 3 de la proteína madura para generar el sitio de edición (figura 6A y apéndice 3).

Las construcciones quiméricas fueron diseñadas con el fin de disminuir la hidrofobicidad de la proteína Cox3 de levadura a valores comparables con la proteína Cox3 nuclear de *Polytomella* sp., se determinaron los segmentos transmembranales de la proteína y se sustituyeron los segmentos de la levadura con los del alga (figura 6B y apéndice 3). Además, el DNA de estas dos construcciones están unidas al extremo 3' no traducido (3' UTR) del gen nuclear *ATP2* (apéndice 4). Se ha demostrado que esta secuencia contiene información para localizar al RNA mensajero a ribosomas citosólicos adosados a la mitocondria y favorece la importación cotraduccional de la proteína (Margeot et al. 2002).

El gen *COX3* de *S. cerevisiae* (*OXA1_ScCOX3*) se recodificó para su expresión nuclear mientras que los genes *COX3* de *Polytomella* sp. y *C. reinhardtii* (*OXA1_PsCOX3* y *OXA1_CrCOX3*) son nucleares y sólo se les fusionó la MTS del gen *OXA1* en el extremo amino terminal.

La proteína quimérica se parece más a Cox3 de *Polytomella* sp., con 74% de identidad, que a la de *S. cerevisiae*, con 57% de identidad. La proteína Cox3 de levadura tiene una identidad de alrededor de 30% con la proteína de las algas, mientras que entre las algas, las Cox3 son 59% idénticas (figura 6C). Estos porcentajes son aún mayores cuando se toma en cuenta la similitud entre estas proteínas. Por ejemplo, la similitud entre Cox3 de *S. cerevisiae* con Cox3 de algas aumenta a 52% (datos no mostrados). De la proteína Cox3 de *S. cerevisiae* se modificaron 114 de un total de 269 residuos (42.4% del total) para generar la proteína quimérica. De estos 114 residuos, 69 (25.65% del total) no tienen o muestran baja similitud con el residuo que los reemplazó en la proteína quimérica (apéndice 3B).

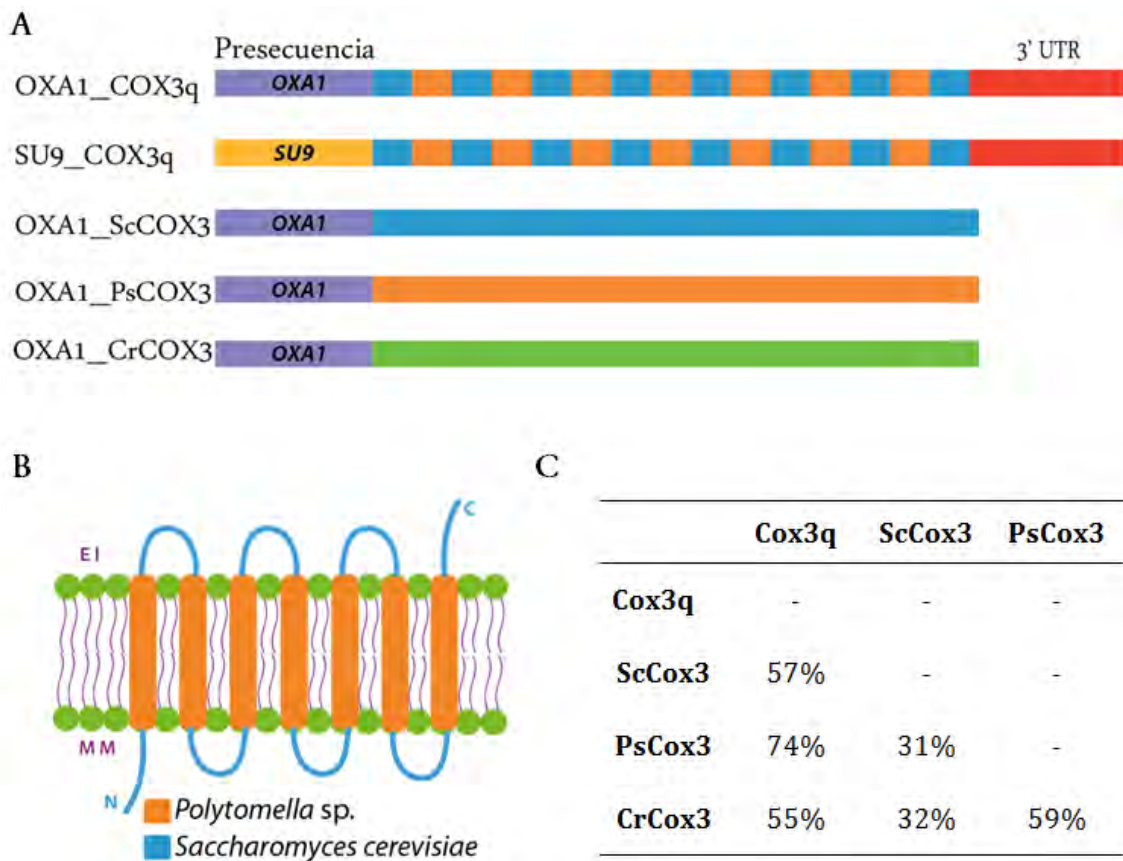


Figura 6. Construcciones de COX3. **A.** Se diseñaron versiones nucleares de genes *COX3* de levadura y algas. Se agregaron secuencias de localización mitocondrial (derivadas de los genes *OXA1* de *S. cerevisiae* o *SU9* de *N. crassa*) y se ajustó el código genético para su expresión nuclear. Para la formación del gen *COX3* quimérico (*COX3q*), se sustituyeron los segmentos hidrofóbicos de *COX3* de *Saccharomyces cerevisiae* por los del alga *Polytomella* sp. Las secuencias de *COX3q* también tienen el extremo 3' no traducido (3'UTR) del gen *ATP2*. Construcciones de *COX3* silvestre de *S. cerevisiae* (*OXA1_ScCOX3*), *Polytomella* sp. (*OXA1_PsCOX3*) y *C. reinhardtii* (*OXA1_CrCOX3*). **B.** Modelo de la topología membranal de la proteína Cox3q al insertar los cruces transmembranales de *Polytomella* sp. (anaranjado) pero conservando las asas de levadura (azul). Espacio Intermembranal (E I), Matriz Mitocondrial (M M) **C.** Porcentaje de identidad entre las proteínas Cox3.

La proteína Cox3q disminuyó su perfil de hidrofobicidad a niveles comparables con el de la proteína Cox3 de *Polytomella* sp. (PsCox3) como se observa en el análisis de hidrofobicidad (figura 7). El programa de predicción sigue detectando 7 segmentos hidrofóbicos que corresponden a los segmentos transmembranales pero los máximos de hidrofobicidad están muy disminuidos con respecto a Cox3 de *S. cerevisiae* (ScCox3), particularmente el primero, segundo y quinto segmento.

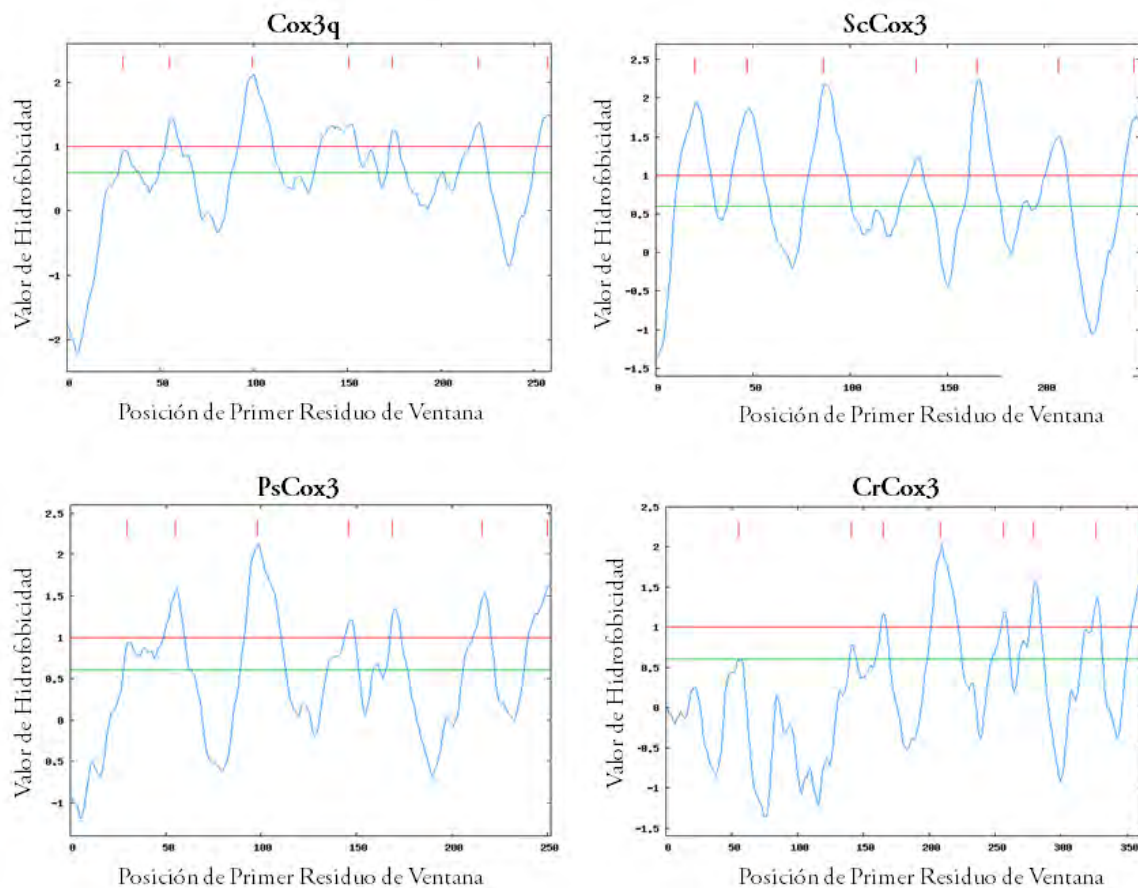


Figura 7. Perfiles de Hidrofobicidad. La proteína Cox3q tiene un perfil hidrofóbico parecido al de Cox3 de *Polytomella* sp. (PsCox3). Se graficaron los valores de hidrofobicidad (línea azul) para ventanas de 10 residuos de longitud. Se establecieron dos líneas de corte para determinar los segmentos hidrofóbicos, el corte bajo (línea verde) se establece en un valor de 0.6 y el corte alto (línea roja) en 1.0. Gráficas obtenidas del programa TopPred 0.01.

Las construcciones de COX3 no recuperan la respiración en cepas Δcox3

Para evaluar si la expresión de nuestras construcciones de Cox3 puede recuperar el fenotipo respiratorio y así lograr una expresión alotópica exitosa, se transformaron distintos diseños de la proteína en las cepas silvestre y en la mutante Δcox3 de *S. cerevisiae*. Se comprobó la viabilidad de todas las transformantes creciendo a las cepas en sustratos fermentativos como glucosa (figura 8).

En todas las cepas silvestres se observa crecimiento en un medio respiratorio compuesto por etanol y glicerol, por otro lado, las cepas Δcox3 son fenotípicamente iguales al control con el plásmido vacío (figura 8). Todas crecen en una fuente de carbono fermentativa pero ninguna recupera la capacidad para formar colonias cuando se duplican a medios respiratorios como etanol/glicerol o lactato, incluso después de más de dos semanas y probando más de 40 colonias de cada clona (datos nos mostrados). También, se intentó facilitar el cambio desde la represión mitocondrial por glucosa hacia el medio respiratorio donde se requiere la función mitocondrial. Las cepas se crecieron en sustratos como rafinosa o galactosa antes de la réplica a los sustratos respiratorios, estas azúcares permiten la fermentación sin reprimir la expresión mitocondrial. Estos cambios graduales de fuente de carbono tampoco permitieron el crecimiento en medios respiratorios.

Para eliminar la posibilidad de que las cepas hayan perdido a su genoma mitocondrial resultando en la pérdida del fenotipo respiratorio, crecimos a todas las cepas Δcox3 transformadas en un medio sin arginina. El crecimiento indica que cuentan con el gen mitocondrial *ARG8^m*, y que por lo tanto tienen genoma mitocondrial y mitocondrias (figura 8). La falta de crecimiento en medios respiratorios se debe a que las construcciones de Cox3 no compensan la falta de la proteína mitocondrial correspondiente para ensamblar a la CcO.

Aunque ninguno de nuestros diseños puede recuperar la respiración de la levadura, decidimos investigar el proceso de internalización de la proteína Cox3 en la mitocondria, desde la expresión de la proteína hasta su ensamblaje en el complejo CcO.

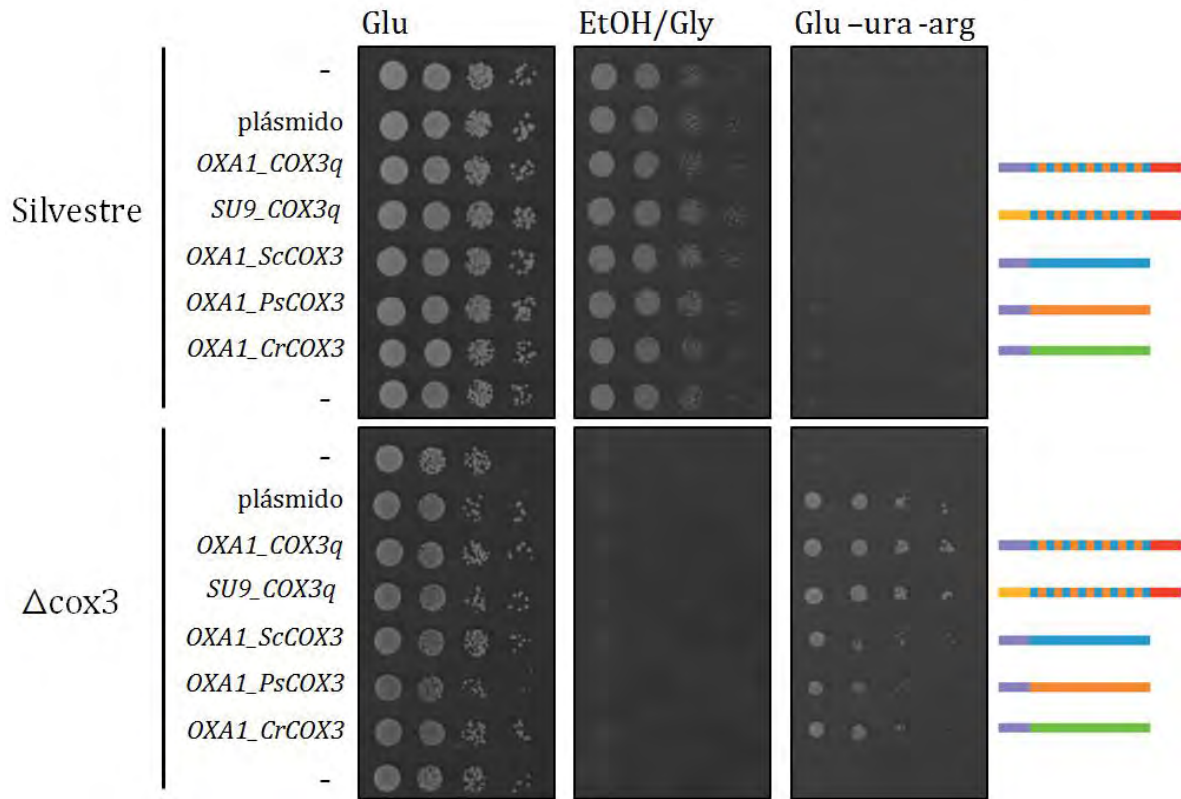


Figura 8. Fenotipo respiratorio. Goteos de diluciones seriadas 1:10 a partir de una D.O.₆₀₀ de 0.5 en medio YPD (Glu), YPEG (EtOH/Gly) y SD sin aminoácidos uracilo ni arginina (Glu -ura -arg) (medios de cultivo en apéndice 2). Se muestran las cepas silvestre y Δ cox3 sin transformar (-), transformadas con el plásmido pFL61 vacío (plásmido) y con cada una de las construcciones descritas en la figura 6. A la derecha se muestran los diagramas de las construcciones que se utilizaron para transformar.

Presencia de Cox3 en extractos totales de levadura

Para determinar si nuestras construcciones dan lugar a la expresión de la proteína, se hicieron extractos totales de todas las transformantes y se analizaron utilizando anticuerpos contra la proteína Cox3 de levadura en inmunoréplicas tipo Western. Todas las cepas silvestres muestran una banda intensa del peso esperado para la proteína Cox3 madura, de menos de 30 kDa. Ni la cepa Δcox3 sin transformar ni Δcox3 transformada con el plásmido vacío contienen a la proteína Cox3 (figura 9A). De las cinco construcciones con las que se transformaron, solamente en dos de ellas se detectan bandas con el anticuerpo que reconoce a Cox3.

En las transformantes silvestre y mutante con la construcción *OXA1_COX3q* se detectan al menos tres bandas con pesos moleculares menores a la proteína Cox3 silvestre (figura 9B). Esta migración indica que la proteína Oxa1_Cox3q tiene una menor masa molecular comparada con la proteína silvestre y posiblemente se está editando o degradando.

La segunda construcción en donde se observan bandas es *OXA1_ScCOX3*. En esta construcción se detecta una banda intensa con un peso molecular mayor a Cox3 silvestre, lo que indica que la MTS de la proteína no se ha removido proteolíticamente, indicando a su vez que la mayoría de la proteína no se está editando (figura 9C). Aunque en menor proporción, con esta construcción también se observa una banda de peso molecular menor a la proteína silvestre. La migración en el gel de las bandas de degradación de Oxa1_Cox3q y Oxa1_ScCox3 no son coincidentes.

Estos resultados indican que la edición de las proteínas Oxa1_Cox3q y Oxa1_ScCox3 ocurre unos aminoácidos más allá de la presecuencia ya que estas proteínas editadas migran más que la proteína Cox3 silvestre. Además, estos cortes proteolíticos ocurren en los mismos sitios, por lo que los patrones de bandas de degradación son consistentes en todos los ensayos de inmunorréplicas hechos con estas transformantes. No obstante, en ninguna de las dos construcciones se observa la banda esperada correspondiente a Cox3 madura de alrededor de 30 kDa.

Por otro lado, el resto de las proteínas (Su9_Cox3q, Ps_Cox3 y Cr_Cox3) no se detectan. La ausencia de bandas en estas transformantes podría deberse a que las proteínas se encuentran en cantidades por debajo de la sensibilidad de la inmunodetección o a que se están degradando rápidamente.

Solamente utilizamos a las dos construcciones donde se observaron bandas para los siguientes experimentos.

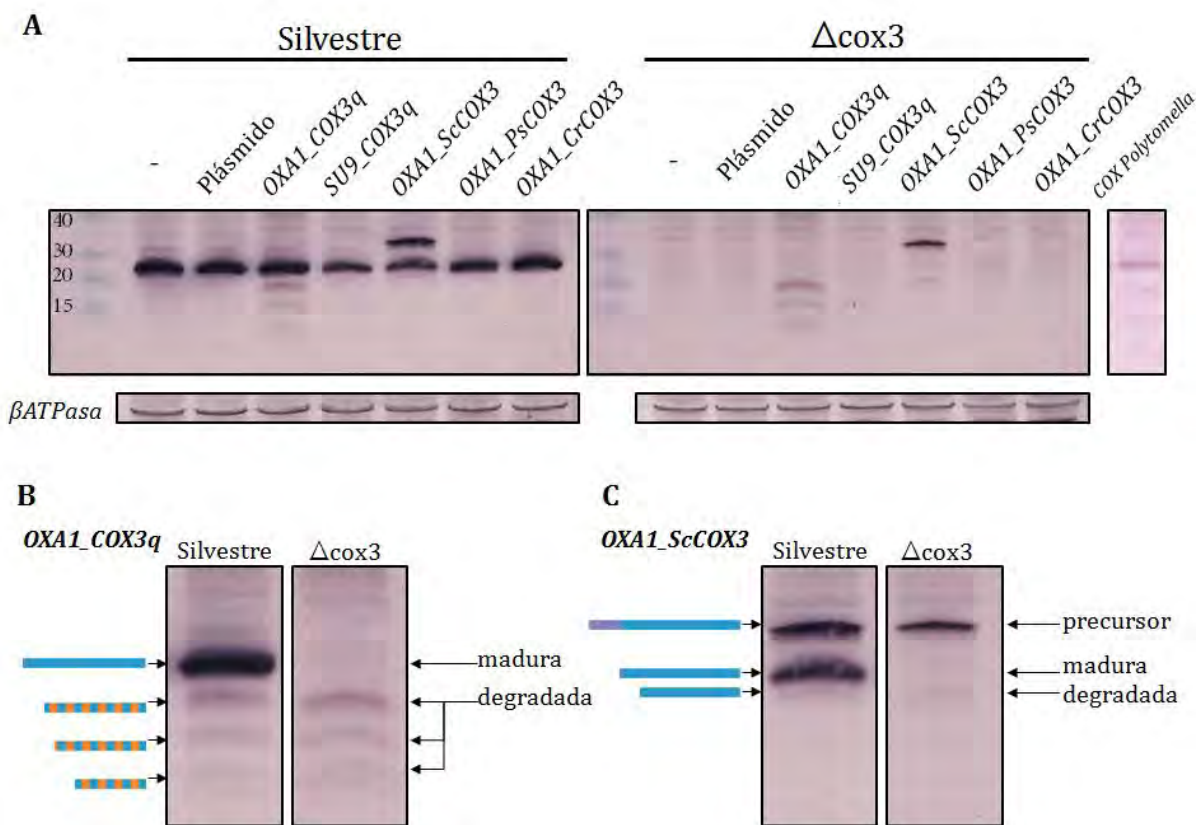


Figura 9. Presencia de Cox3 en extractos totales de levadura. **A.** Se sembraron cultivos con rafinosa como fuente de carbono de la cepa silvestre y Δ cox3 transformadas con todas las construcciones descritas en la figura 6. Se corrieron los extractos totales (200 μ g) en geles desnaturalizantes para la inmunodetección de la proteína Cox3 con anticuerpos. El anticuerpo que utilizamos también reconoce a la proteína Cox3 de *Polytomella*. En las transformantes silvestre y mutante con las construcciones OXA1_COX3q u OXA1_ScCOX3 se detectan bandas de pesos moleculares distintos a la proteína Cox3 silvestre. **B.** Ampliación de los carriles de las cepas silvestre y mutante con la construcción OXA1_COX3q. **C.** Ampliación de los carriles de las cepas silvestre y mutante con la construcción OXA1_ScCOX3. Se indica con flechas la altura en la que migran las proteínas precursoras, maduras y degradadas.

Migración de Cox3 a la mitocondria

Aislamos fracciones mitocondriales para estudiar si las proteínas que observamos en lisados totales se encuentran en la mitocondria. Corrimos la mitad de cantidad de proteína que en lisados totales para observar si se enriquecen las bandas. Al igual que la proteína Cox3 silvestre, las bandas correspondientes a Oxa1_Cox3q y Oxa1_ScCox3 se enriquecen en esta fracción (figura 10). El patrón de bandas de degradación y de precursor es igual que en los lisados totales, incluso observamos más bandas de Oxa1_ScCox3.

Como observamos en las inmunorréplicas de extractos totales, la movilidad en geles desnaturalizantes de las proteínas Cox3, silvestre y alotópica, es desigual. Lo que sugiere que estas proteínas son procesadas de manera distinta.

Purificar mitocondrias nos permitió identificar que el anticuerpo reconoce a Cox3 y que las bandas corresponden a esta proteína. El resto de las bandas inespecíficas de los extractos totales desaparecen en las inmunorréplicas hechas con mitocondrias.

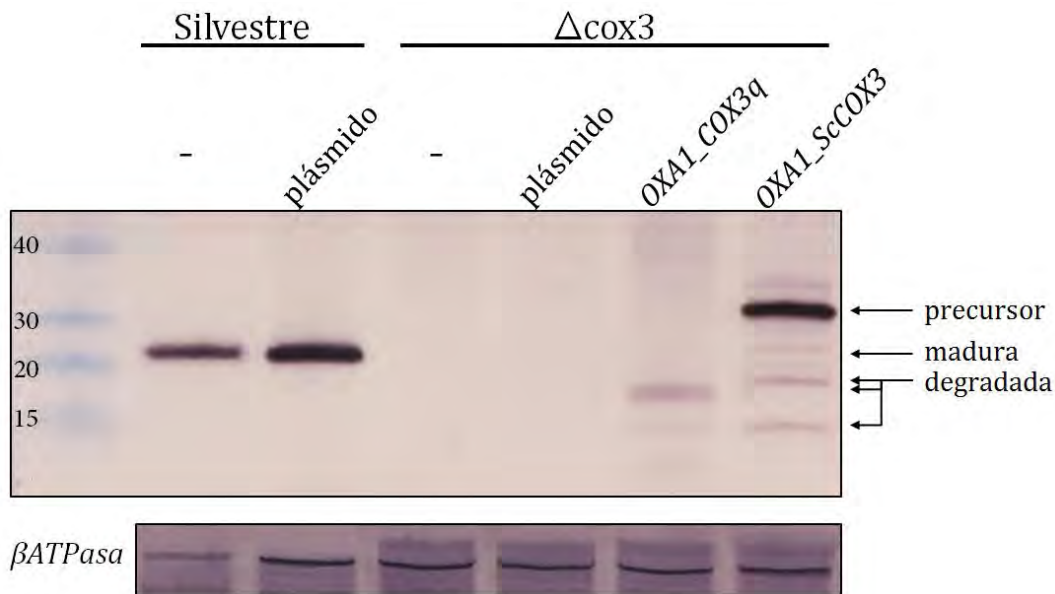


Figura 10. Presencia de Cox3 en mitocondrias aisladas por centrifugación diferencial. Se sembraron cultivos con galactosa como fuente de carbono de la cepa silvestre y $\Delta cox3$ transformada con las construcciones descritas en la figura 9B y 9C. Se corrieron las fracciones mitocondriales (100 μ g) en geles desnaturalizantes para la inmunodetección de la proteína Cox3 con anticuerpos. Las bandas de degradación y de precursor se enriquecen en la fracción mitocondrial.

Ensamblaje de Cox3 en su complejo

Para verificar si nuestras construcciones de la proteína Cox3 se ensamblan en su complejo CcO, hicimos geles azules nativos e inmunorrélicas tipo Western para observar la presencia de Cox3 ensamblada en su complejo. Los geles azules nativos (Wittig et al. 2006) separan a los complejos proteicos sin desnaturalizarlos en sus subunidades. De esta manera podemos identificar la migración de la CcO y si Cox3 migra junto con este complejo.

En la figura 11A se observan los resultados de la separación de mitocondrias en un gel azul nativo y su tinción con azul de Coomassie. Las bandas correspondientes al complejo V (ATP sintetasa) y al complejo III (citocromo *bc1*) se observan tanto en la cepa silvestre como en la mutante Δcox3 . Sólo se observa complejo IV en la cepa silvestre transformada con el plásmido vacío. Para aumentar la sensibilidad de ensayo y poder detectar a Cox3 hicimos inmunorrélicas tipo Western utilizando anticuerpos que reconocen a esta proteína (figura 11B), solamente detectamos a Cox3 en la cepa silvestre en la banda que coincide con la migración del complejo CcO. Las proteínas Oxa1_Cox3q y Oxa1_ScCox3 no ensambladas en la CcO corren con un peso molecular más bajo y se salen del gel azul nativo. Sabemos que estas proteínas están presentes porque las observamos en inmunorrélicas de geles desnaturizantes (figura 10).

Estos resultados nos indican que aunque las construcciones de Cox3 provenientes desde el citoplasma llegan a la mitocondria (figura 10), estas proteínas no llegan a ensamblarse en su complejo. La subunidad Cox3 es de las primeras en formar parte del complejo durante la vía de ensamblaje. La falta de esta proteína frena la formación de todo el complejo CcO (Herrmann & Funes 2005; Soto et al. 2011).

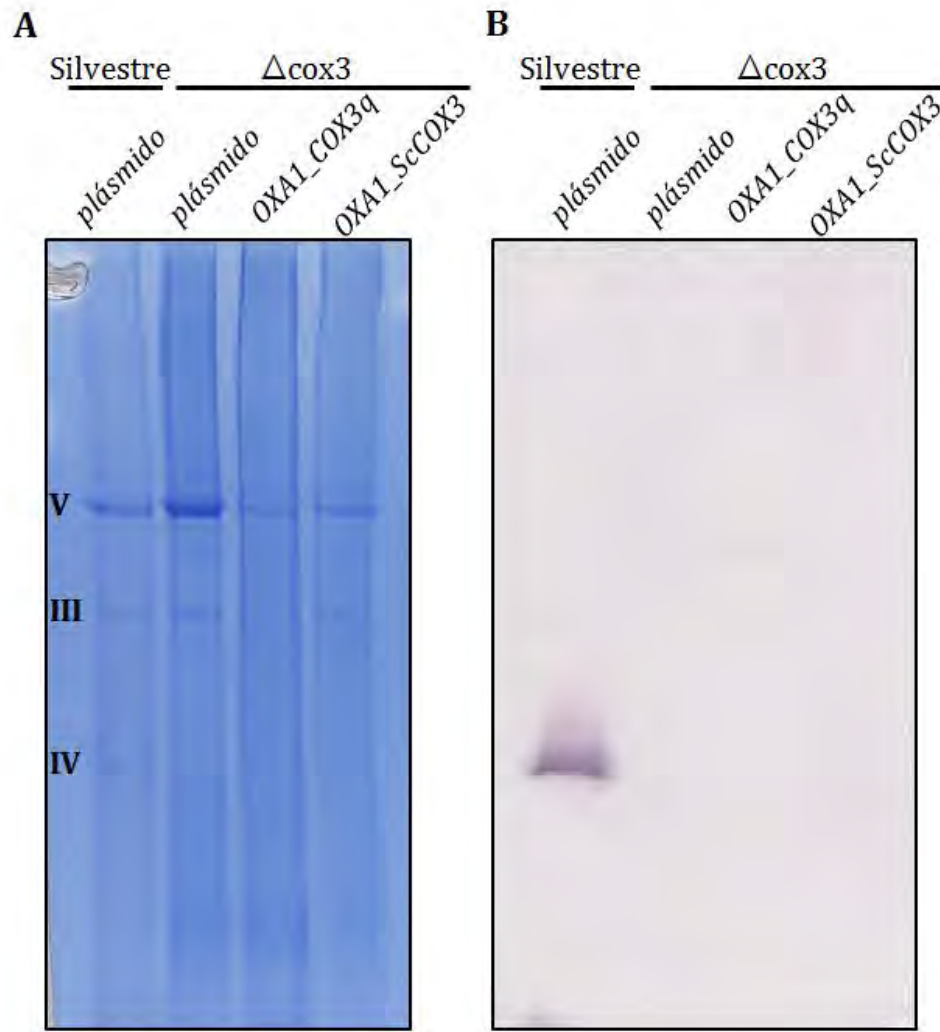


Figura 11. Inmunodetección de Cox3 en geles azules nativos de mitocondrias aisladas. Se muestra a la cepa silvestre transformada con el plásmido vacío y la Δcox3 transformada con el plásmido vacío o con las construcciones Oxa1_Cox3q u Oxa1_ScCox3. **A.** Tinción de Coomassie, se marca la altura de las bandas correspondientes a los complejos III, IV y V. **B.** Inmunodetección utilizando un anticuerpo que reconoce a Cox3, la migración de esta proteína coincide con la de su complejo CcO. Únicamente detectamos a Cox3 en la cepa silvestre en la banda que coincide con la migración del complejo CcO.

La proteasa del espacio intermembranal degrada a Cox3 alotópica

Es probable que proteasas mitocondriales degraden una fracción de Cox3 alotópica que llega a la membrana interna o al espacio intermembranal. Un candidato puede ser la proteasa de la membrana interna i-AAA (un oligómero de Yme1) como se ha reportado en otros casos de expresión alotópica de proteínas mitocondriales (Bietenhader et al. 2012). Nos preguntamos si aumenta la expresión alotópica cuando expresamos las construcciones de Cox3 en cepas $\Delta yme1$.

Las masas moleculares aparentes de la Cox3 alotópica no coinciden con el de la banda de Cox3 silvestre. Aunque no contamos con cepas dobles mutantes $\Delta cox3/\Delta yme1$, utilizamos una cepa $\Delta yme1$. Así podemos observar en el mismo carril tanto a la banda correspondiente a Cox3 silvestre como a las bandas de degradación y de precursor de nuestras construcciones.

Las bandas de la proteína Cox3 silvestre mantienen su intensidad. La presencia o ausencia de la proteasa intermembranal no modifica los niveles de proteína (figura 12). La banda correspondiente a Oxa1_Cox3q es tenue tanto en la cepa silvestre como en la cepa mutante $\Delta yme1$ y no se aprecia a simple vista. En un análisis densitométrico de esta membrana se observa un aumento de alrededor de 5 veces en la cantidad de Cox3 quimérica en la cepa con la delección de la proteasa. Entonces, aunque sí la degrada, Yme1 no parece ser la proteasa que degrada principalmente a Cox3q ya que aún en presencia de esta proteasa los niveles de proteína son bajos.

En la cepa $\Delta yme1$, el aumento en la intensidad de banda es visible en las bandas de precursor y de degradación de Oxa1_ScCox3, el precursor aumenta 1.4 veces y la banda de degradación aumenta 5.3 veces comparado con el control silvestre. Esta proteína es más hidrofóbica que Cox3q (figura 7), lo que la hace un mejor candidato para ser reconocida y degradada por la proteasa Yme1.

Tanto la banda de Oxa1_Cox3q como las de Oxa1_ScCox3 aumentan en ausencia de la proteasa de espacio intermembranal i-AAA. Concluimos que esta proteasa reconoce y degrada proteínas exógenas provenientes del citosol, como lo son las proteínas de expresión alotópica. Esto concuerda con que nuestras construcciones se encuentran

en la fracción de mitocondrias aisladas, estas proteínas se localizan en la mitocondria ya que, en parte, son degradadas por proteasas mitocondriales.

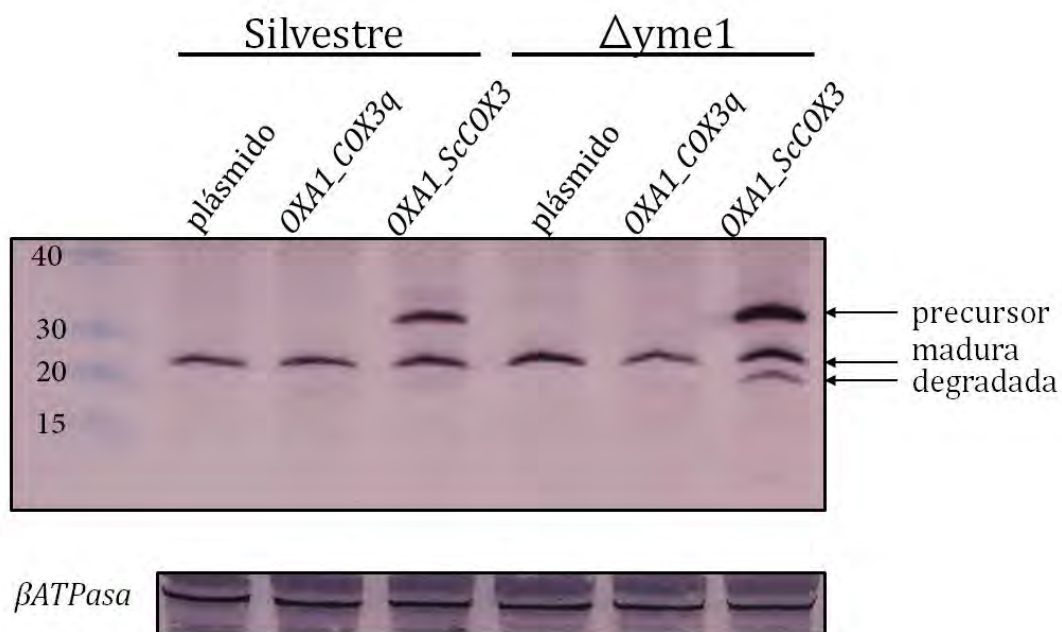


Figura 12. Análisis de expresión de la proteína Cox3 en ausencia de proteasa de espacio intermembranal i-AAA. Extractos totales (200 μ g) de levaduras crecidas en galactosa como fuente de carbono. Se hicieron inmunorréplicas tipo Western utilizando un anticuerpo que reconoce a Cox3. Como control de carga se utilizó un anticuerpo que reconoce a la subunidad β de la ATP sintasa. En la cepa $\Delta yme1$, el aumento en la intensidad de banda es más notorio en el precursor y la banda de degradación en Oxa1_ScCox3.

Cox3 alotópica disminuye en ausencia de la translocasa Oxa1

La eficiencia de Cox3 para insertarse en la membrana interna mitocondrial depende de la translocasa de membrana interna Oxa1 (Hell et al. 2001). Suponemos que esta translocasa también inserta a nuestras construcciones de Cox3 provenientes desde el citoplasma. Nos preguntamos cómo se comportan las bandas de las proteínas Cox3 alotópicas transformadas en ausencia de la translocasa Oxa1. Para esto utilizamos la cepa mutante $\Delta oxa1$, la cual transformamos con las construcciones Oxa1_Cox3q y Oxa1_ScCox3 e hicimos extractos totales.

En ausencia de Oxa1, la Cox3 silvestre sintetizada en la mitocondria se inserta de manera defectuosa en la membrana interna (Hell et al. 2001). Observamos una notoria disminución en la intensidad de la banda de Cox3 silvestre (figura 13). Las subunidades que no se ensamblan son degradadas por proteasas de la membrana interna (Soto et al. 2011). Asimismo, las bandas de Oxa1_Cox3q y Oxa1_ScCox3 editadas que observamos en las cepas silvestres no se detectan en $\Delta oxa1$. La banda de precursor de Oxa1_ScCox3 también disminuye aunque en menor cantidad que la Cox3 silvestre.

La delección de la translocasa Oxa1 disminuye la inserción de la proteína Cox3 silvestre y resulta en su degradación por proteasas mitocondriales. Oxa1 también está encargada de insertar a proteínas de la membrana interna que generan el potencial electroquímico, como son las subunidades de la CcO. Este potencial es necesario para la importación de proteínas provenientes desde el citosol como es el caso de las construcciones de Cox3 alotópica. Pensamos que en cepas $\Delta oxa1$, la falta del potencial de membrana evita que las construcciones de Cox3 migren a la mitocondria y que estas terminen por ser degradadas en el citoplasma.

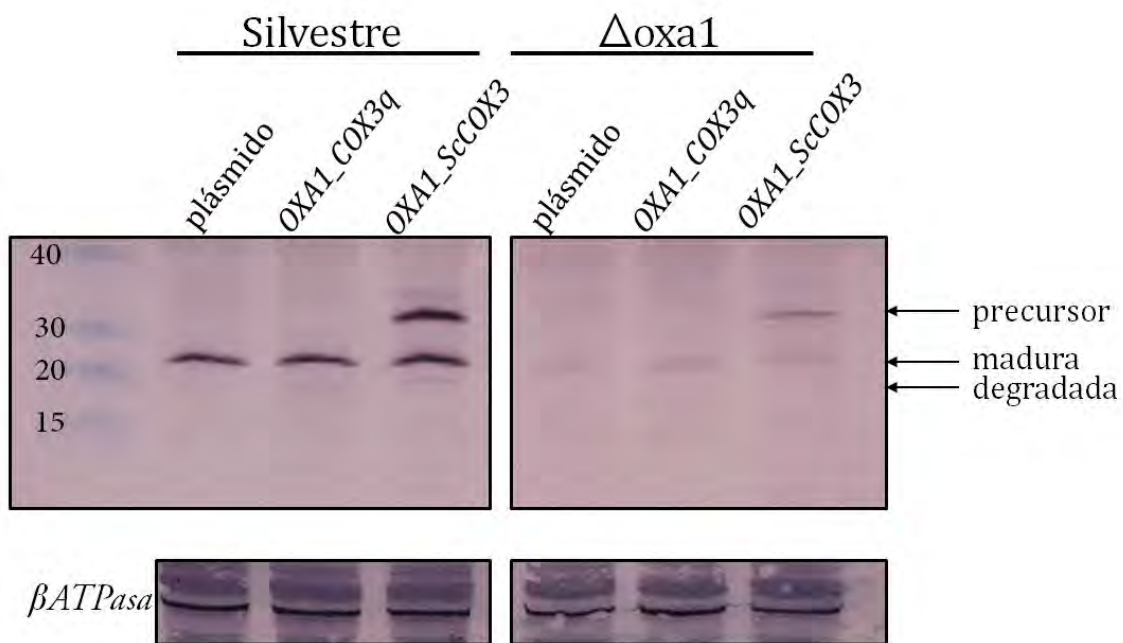


Figura 13. Análisis de expresión de la proteína Cox3 en ausencia de la translocasa de la membrana interna Oxa1. Extractos totales (200 μ g) de levaduras crecidas en galactosa como fuente de carbono. Se hicieron inmunorreplicas tipo Western utilizando un anticuerpo que reconoce a Cox3. Como control de carga se utilizó un anticuerpo que reconoce a la subunidad β de la ATP sintasa.

VIII. DISCUSIÓN

La proteína Cox3 es altamente hidrofóbica, ya que tiene siete cruces transmembranales. Los reportes de expresión alotópica exitosa en levadura son de proteínas hidrofóbicas con uno o dos cruces como máximo (Tabla 1). Combinaciones de hasta cuatro de ocho cruces transmembranales de la proteína apocitocromo *b* se han logrado importar a la mitocondria desde el citoplasma. La adición de un quinto cruce abate la importación (Claros et al. 1995). Todos los cruces del apocitocromo *b* son capaces de ser traducidos en el citoplasma e importados a la mitocondria, pero el efecto acumulativo de cruces hidrofóbicos frena la importación. Pareciera haber un límite en el número de segmentos hidrofóbicos que pueden ser importados. Sin embargo, se ha reportado *in vivo* que la bacteriorrodopsina, de siete cruces transmembranales, puede ser importada al interior de mitocondrias de *Schizosaccharomyces pombe* (Hoffmann et al. 1994). Para lograr la expresión alotópica de Cox2 en levadura, se hizo la sustitución de un solo amino ácido en el primer segmento transmembranal, un triptófano por una arginina en la posición 56 (W56R). Esta mutación es necesaria y suficiente para disminuir la hidrofobicidad de la proteína y permitir su importación a la membrana interna de la mitocondria (Supekova et al. 2010). Entonces, el número de segmentos transmembranales así como la hidrofobicidad promedio de las secuencias proteicas definen la capacidad de importación hacia la mitocondria.

En el presente trabajo investigamos la expresión alotópica de distintas versiones de la proteína Cox3. Se modificó a esta proteína para su expresión nuclear, se fusionó a MTSs y se disminuyó su hidrofobicidad para parecerse a la Cox3 naturalmente codificada en el núcleo del alga *Polytomella* sp. Este enfoque experimental nos permite utilizar las modificaciones que relocalizaron naturalmente al gen *COX3* al núcleo en las algas clorofíceas *Polytomella* sp., *C. reinhardtii* y *V. carteri*.

En nuestro laboratorio se diseñaron construcciones de Cox3 quiméricas (Cox3q) sustituyendo los siete segmentos transmembranales de la proteína de levadura por los del alga *Polytomella* sp. Al aproximar el problema de disminución de

hidrofobicidad se deben tomar en cuenta los residuos que puedan afectar la función o estructura de la proteína para modificarla lo menos posible.

El perfil de hidrofobicidad de la proteína Cox3q se parece más al perfil de Cox3 de *Polytomella* sp. que al de *S. cerevisiae* (figura 7). Los cruces 1, 2 y 5 disminuyen notoriamente su hidrofobicidad. Estos mismos cruces también disminuyen su hidrofobicidad en los tres casos de algas con el gen *COX3* en el núcleo (*Polytomella* sp., *C. reinhardtii* y *V. carteri*) comparados con sus contrapartes mitocondriales (figura 5). La preferencia de disminuir la hidrofobicidad en estos cruces se atribuye a que probablemente no tienen una función importante, lo que los hace más susceptibles a cambios de residuos por unos menos hidrofóbicos. Los cruces 1 y 3 encaran a la subunidad Cox1, en las algas, sólo el cruce 3 mantiene su nivel de hidrofobicidad independiente de la procedencia (citoplásmica o mitocondrial) de la proteína (figura 5). Nuestra construcción Cox3q también mantiene la hidrofobicidad del tercer cruce pero la del primero disminuye. Pensamos que la baja hidrofobicidad del primer cruce favorece la entrada de Cox3 a la mitocondria. En el caso de Cox2 de levadura, la disminución en la hidrofobicidad del primer cruce es suficiente para su importación a la mitocondria (Supekova et al. 2010). En promedio, las subunidades Cox2 expresadas en el núcleo de leguminosas disminuyen la hidrofobicidad del primer cruce transmembranal comparados a sus versiones mitocondriales (Daley, Clifton, et al. 2002).

Las sustituciones de Cox3q conservan todos los aminoácidos de unión a fosfolípidos descritos en el artículo de la estructura de Cox3 obtenida por cristalografía (Tsukihara et al. 1996). También, los autores describen dos residuos de unión a una molécula de ácido cólico, que tiene un tamaño y estructura similar al del ADP. Un triptófano del tercer cruce transmembranal (W118 de Cox3q madura) está muy conservado y la proteína quimérica mantiene al residuo. Cuatro residuos adelante, también en el tercer segmento, generalmente hay una histidina (en Cox3 de bovino, levadura y del alga *C. reinhardtii*), sin embargo, en *Polytomella* sp. hay un glutamato en esta posición (D122 de Cox3q madura). La sustitución de todo el tercer segmento incluyó a este residuo, el cual podría ser importante para la regulación de la enzima con ADP.

Aunque no observamos recuperación de la función mitocondrial al transformar con las construcciones de Cox3, decidimos investigar qué sucedía con las proteínas correspondientes. Para favorecer la localización del RNA mensajero de *COX3* a la mitocondria, las proteínas quiméricas se fusionaron al extremo 3' UTR de *ATP2*. Se ha reportado que esta secuencia localiza al mensajero de *ATP2* y de otros transcritos con polisomas unidos a la mitocondria (Margeot et al. 2002). Incluso con esta secuencia 3' UTR, la construcción Oxa1_Cox3q se encuentra en niveles muy bajos en la mitocondria (figura 10). La construcción de Cox3 silvestre de *S. cerevisiae* (*OXA1_ScCox3*) no está fusionada al extremo 3' UTR y los niveles de la proteína en la mitocondria son mayores que los de Oxa1_Cox3q. No investigamos si la expresión de Oxa1_ScCox3 aumenta al agregar la secuencia 3' UTR de *ATP2*. En la expresión alotópica de la proteína Cox2 (Supekova et al. 2010) se comprobó que la presencia de esta secuencia 3'UTR no promueve una mayor acumulación de la proteína en la mitocondria. Por lo que es poco probable que el 3' UTR favorezca la localización del RNA mensajero de *COX3* a la mitocondria.

En los extractos totales de levadura no observamos proteína en las construcciones Oxa1_PsCox3 y Oxa1_CrCox3. Esto podría deberse a que se encuentran en niveles indetectables por el ensayo. Ninguna de las construcciones que utilizamos son endógenas del citoplasma de la levadura, especialmente las proteínas Cox3 de *Polytomella* sp. y de *C. reinhardtii*. Pensamos que estas proteínas son degradadas eficientemente por las proteasas de levadura. La proteína Su9_Cox3q tampoco se detecta en extractos totales, mientras que con la presecuencia de Oxa1 sí se observa (figura 9A). Debemos verificar la secuencia de esta construcción, así como su transcripción y traducción para asegurarnos que efectivamente se está expresando.

Sólo observamos presencia de proteína en dos de nuestras construcciones: la construcción quimérica, Oxa1_Cox3q y la versión nuclear de Cox3 de *S. cerevisiae*, Oxa1_ScCox3. Por eso decidimos continuar trabajando con estas dos construcciones.

La presecuencia de Oxa1 fusionada a las construcciones de Cox3 contiene los primeros cinco aminoácidos de la proteína madura. Esto se diseñó a propósito con la

intención de que se mantuviera el sitio de corte y que la edición liberara a una proteína Cox3 madura con un peso molecular igual al de Cox3 silvestre. Observamos que no se utiliza este sitio de corte ya que no hay bandas del peso molecular esperado. Sin embargo, se generan nuevos sitios de corte ya que el patrón de bandas de degradación es igual en todos los extractos proteicos que realizamos (figura 9 y 10). La intersección entre los segmentos de alga y levadura en la construcción quimérica pudieron haber generado nuevos sitios de proteólisis, dando lugar a un patrón de bandeado característico (figura 9B y 10).

Las técnicas que utilizamos no permitieron determinar la localización de las construcciones de Cox3 dentro del organelo. Las proteínas importadas a la mitocondria podrían estar en la matriz o en el espacio intermembranal o solamente unidas al lado citosólico de la membrana externa mitocondrial. Sabemos que Oxa1_Cox3q y Oxa1_ScCox3 migran hacia la mitocondria porque se enriquecen en mitocondrias aisladas (figura 10) pero no llegan a ensamblarse en el complejo CcO (figura 11).

Pensamos que las proteínas que corresponden a las bandas de degradación se localizan en la matriz ya que la maduración ocurre generalmente en este compartimiento. Esta degradación es específica porque corta en el mismo sitio de la proteína resultando en el patrón distintivo de bandas. Entonces, la podemos considerar como una edición distinta a la que ocurre con Cox3 silvestre. Generalmente la edición de las proteínas mitocondriales ocurre en la matriz por la peptidasa de procesamiento mitocondrial (MPP) (Schmidt et al. 2010). Pensamos que las bandas de menor peso molecular de Oxa1_Cox3q y Oxa1_ScCox3 que observamos se encuentran en la matriz porque han sido editadas por la MPP (figura 10 y 14A). Mientras que la banda de precursor de Oxa1_ScCox3 se encuentra en la membrana externa, o bien, se queda en su paso a través de las translocasas TOM y TIM ya que la encontramos sin editar en la fracción mitocondrial (figura 10 y 14B). La proteasa i-AAA, encargada de degradar proteínas que pasan por el espacio intermembranal, también degrada al precursor de Oxa1_ScCox3. Entonces al menos parte de la proteína precursora se

encuentra en el espacio intermembranal ya que una proteasa con la misma localización es capaz de degradarla.

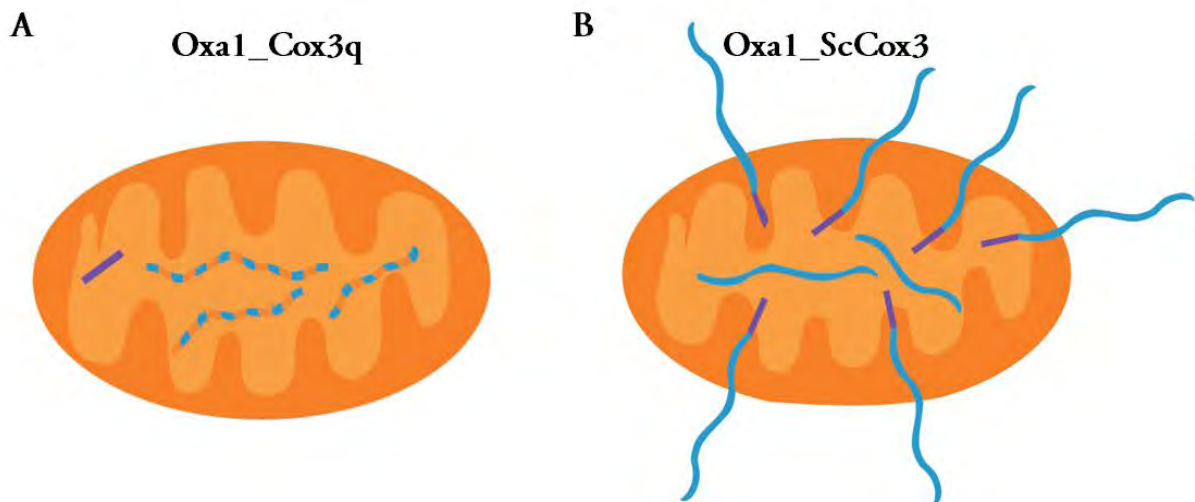


Figura 14. Modelo de internalización en la mitocondria de Oxa1_Cox3q y Oxa1_ScCox3. **A.** La construcción Oxa1_Cox3q se localiza en la matriz mitocondrial donde se edita en distintos sitios dando lugar a proteínas de distinto peso molecular. **B.** La mayoría de la proteína Oxa1_ScCox3 no llega a la matriz y se queda en su paso a través de TOM y TIM. La fracción que se internaliza a la matriz es editada en distintos sitios de la proteína.

De las construcciones que llegan a la mitocondria, ninguna se ensambla en el complejo CcO (figura 11). Probablemente porque no alcanzan el compartimiento correcto o no se unen con las chaperonas adecuadas o su edición es defectuosa. Si no se encuentran las siguientes subunidades en la línea de ensamblaje de la CcO (en este caso es Cox3), el complejo no se forma. La subunidad Cox1 cuenta con un mecanismo que autorregula su expresión para asegurar que se sintetice la proteína en una tasa adecuada. Esto evita que la actividad pro oxidante de Cox1 sea deletérea para las células (Mick et al. 2011).

Aunque la disminución de la hidrofobicidad aumenta la internalización de Cox3 en la mitocondria, proponemos otras modificaciones que pudieran favorecer la importación de proteínas hidrofóbicas. Se ha demostrado que las propiedades de las MTSs también participan en la importación. Las algas *Polytomella* sp. y *C. reinhardtii* son los únicos organismos estudiados que son capaces de importar a la matriz e insertar en la membrana interna mitocondrial a proteínas hidrofóbicas como Cox3, Cox2, Atp6,

Nad3 y Nad4L (Pérez-Martínez et al. 2000; Pérez-Martínez et al. 2001; Funes et al. 2002; Cardol et al. 2006). La MTS de Cox3 de *C. reinhardtii* contiene 110 residuos (generalmente las MTS contienen de 20-50 residuos), se piensa que ésta tiene una naturaleza bipartita que permite que el primer segmento de la MTS localice a la proteína hacia la matriz y que el segundo sea identificado por componentes de la membrana interna que guíen a la proteína para su inserción.

Al igual que en *C. reinhardtii* y *Polytomella* sp., el gen COX2 migró al núcleo en algunas leguminosas (Adams et al. 1999). En la soya, Cox2 tiene una hidrofobicidad disminuida y cuenta con una MTS tripartita de 136 residuos encargada de dirigirla a la matriz, importarla eficientemente y permitir su correcta maduración (Daley, Adams, et al. 2002). Entonces, tomando en cuenta los casos de algas y leguminosas, proponemos que se deben hacer dos adaptaciones para lograr una expresión alotópica exitosa: disminuir la hidrofobicidad de los cruces transmembranales y contar con una MTS que contenga la información adecuada para internalizar proteínas con múltiples segmentos transmembranales y que sea procesada correctamente.

Hay que tomar en cuenta que la vía de importación que sigue la Cox3 alotópica en la levadura no es la natural ya que proviene desde el citosol y no de la matriz mitocondrial. Pensamos que la vía que puede adoptar Cox3 sería equivalente a la que ocurre normalmente en las algas *Polytomella* sp. y *C. reinhardtii*. Al reconstruir la maquinaria de importación mitocondrial en *C. reinhardtii* se identificaron los homólogos de los complejos de translocación TOM, TIM23 y Oxa1 (Figueroa-Martínez et al. 2008). Probablemente éstas conforman la vía que internaliza a Cox3 del alga en la mitocondria y la inserta en la membrana interna: la proteína Cox3 proveniente desde el citoplasma cruza la membrana externa a través de TOM y la membrana interna a través de TIM23 (figura 15A), en la matriz mitocondrial se edita la presecuencia y la translocasa Oxa1 inserta los cruces transmembranales de Cox3 en pares como “hairpins” o pasadores (figura 15B), así también atraviesan los seis primeros cruces, el séptimo cruce no se transfiere a la matriz sino que se queda en TIM23 para ser liberado hacia la membrana interna por difusión lateral, este proceso también se conoce como “stop-transfer” (figura 15C). Finalmente, la proteína se

encuentra en la membrana interna para poder ser ensamblada en el complejo correspondiente (figura 15D). Aunque suponemos que ésta también es la vía que seguiría Cox3 alotópica en levadura, puede ser que la proteína no cuente con chaperonas que la guíen a su destino haciéndola susceptible a degradación. En este trabajo observamos que las construcciones de Cox3 no llegan a ensamblarse en el complejo CcO, por lo que pensamos que se quedan en el espacio intermembranal o en la matriz mitocondrial (figura 14). Probablemente, lleguen a la matriz a través de TOM y TIM23 donde se editan pero no se insertan en la membrana interna. Es necesario comprobar la localización extramembranal de estas proteínas por extracción alcalina de proteínas extrínsecas de membrana.

La proteína Cox3 silvestre codificada en la mitocondria se inserta a través de la translocasa Oxa1. En cepas $\Delta oxa1$, la expresión de Cox3 silvestre disminuye pero no se abate (Hell et al. 2001). Es probable que haya una vía alternativa por la que se inserta. Un candidato es la insertasa Cox18, esta proteína de membrana interna es un homólogo de Oxa1 y participa en la inserción y ensamblaje de la CcO. En el caso de las construcciones de Cox3 alotópicas, pensamos que su importación a la mitocondria disminuye debido a que se abate el potencial transmembranal (figura 13), aunque es necesario corroborar este resultado utilizando mitocondrias donde se haya abatido el potencial transmembranal. Oxa1 inserta a las proteínas que generan el potencial, en ausencia de éste, se abate la importación hacia la mitocondria y las construcciones alotópicas son degradadas en el citoplasma. Entonces, la translocasa Oxa1 se requiere para la inserción de la proteína Cox3. Ya sea para insertarla en la membrana interna desde la matriz, o bien, para generar indirectamente el potencial transmembranal y facilitar la internalización de Cox3 alotópica en la mitocondria.

En conclusión, el tratamiento de enfermedades mitocondriales utilizando expresión alotópica aún requiere de más esfuerzos para lograr su aplicación. Sólo se ha reportado la expresión alotópica funcional de proteínas de la fosforilación oxidativa con dos o menos cruces transmembranales: las subunidades Cox2, Atp8 y Atp9 en la levadura (Supekova et al. 2010; Nagley et al. 1988; Bietenhader et al. 2012), así como

la subunidad 7 (NAD7) del complejo I de la planta de tabaco *Nicotiana sylvestris* (Pineau et al. 2005).

En células humanas, se ha explorado la expresión alotópica de proteínas de la cadena respiratoria de múltiples cruces transmembranales con resultados contradictorios. Hay reportes positivos para las subunidades ND1 y ND4 del complejo I, con 8 y 15 cruces respectivamente (Guy et al. 2002; Bonnet et al. 2007; Bonnet et al. 2008), aunque también existen resultados negativos sobre la incorporación de ND4 en su complejo (Oca-Cossio et al. 2003). También, hay reportes sobre la expresión alotópica exitosa de ATP6 o subunidad α de la ATP sintasa, de 5 segmentos transmembranales (Manfredi et al. 2002; Ojaimi et al. 2002; Zullo et al. 2005; Bonnet et al. 2007). A su vez, hay datos que reportan que ATP6 no se integra en el complejo maduro (Bokori-Brown & Holt 2006; Figueroa-Martínez et al. 2011). La proteína ATP8 (subunidad A6L) se localizó dentro de la mitocondria pero no se examinó su incorporación en la ATP sintasa (Oca-Cossio et al. 2003). Por último, se ha reportado la expresión alotópica del gen *cox1* de bovino que codifica para la subunidad I de la CcO, con 12 cruces transmembranales (Tsukihara et al. 2003; Shimokata et al. 2007).

Todas estas aproximaciones tienen potencial a largo plazo en la terapia génica, aunque no se ha demostrado directamente y con evidencia bioquímica que proteínas expresadas alotópicamente con más de dos cruces transmembranales se integran funcionalmente a los complejos respiratorios. Aún se requieren análisis adicionales de electroforesis para demostrar inequívocamente que las proteínas importadas a la mitocondria se ensamblan en sus complejos (Kyriakouli et al. 2008). Se debe tener extrema precaución en la interpretación de los resultados y contar con los controles adecuados para demostrar el rescate de la función mitocondrial por expresión alotópica (Perales-Clemente et al. 2011).

El presente trabajo tomó como modelo a las características de la Cox3 naturalmente nuclear en el alga *Polytomella* sp. Construimos secuencias de Cox3 que se asemejaran al perfil hidrofóbico del alga. Con esta aproximación observamos que la disminución en la hidrofobicidad sería necesaria pero no suficiente para restaurar la función

mitocondrial. Es probable que existan otras características que permitieron la relocalización natural en las algas. Es necesario seguir trabajando en los parámetros a modificar en estas proteínas para alcanzar la expresión alotópica exitosa.

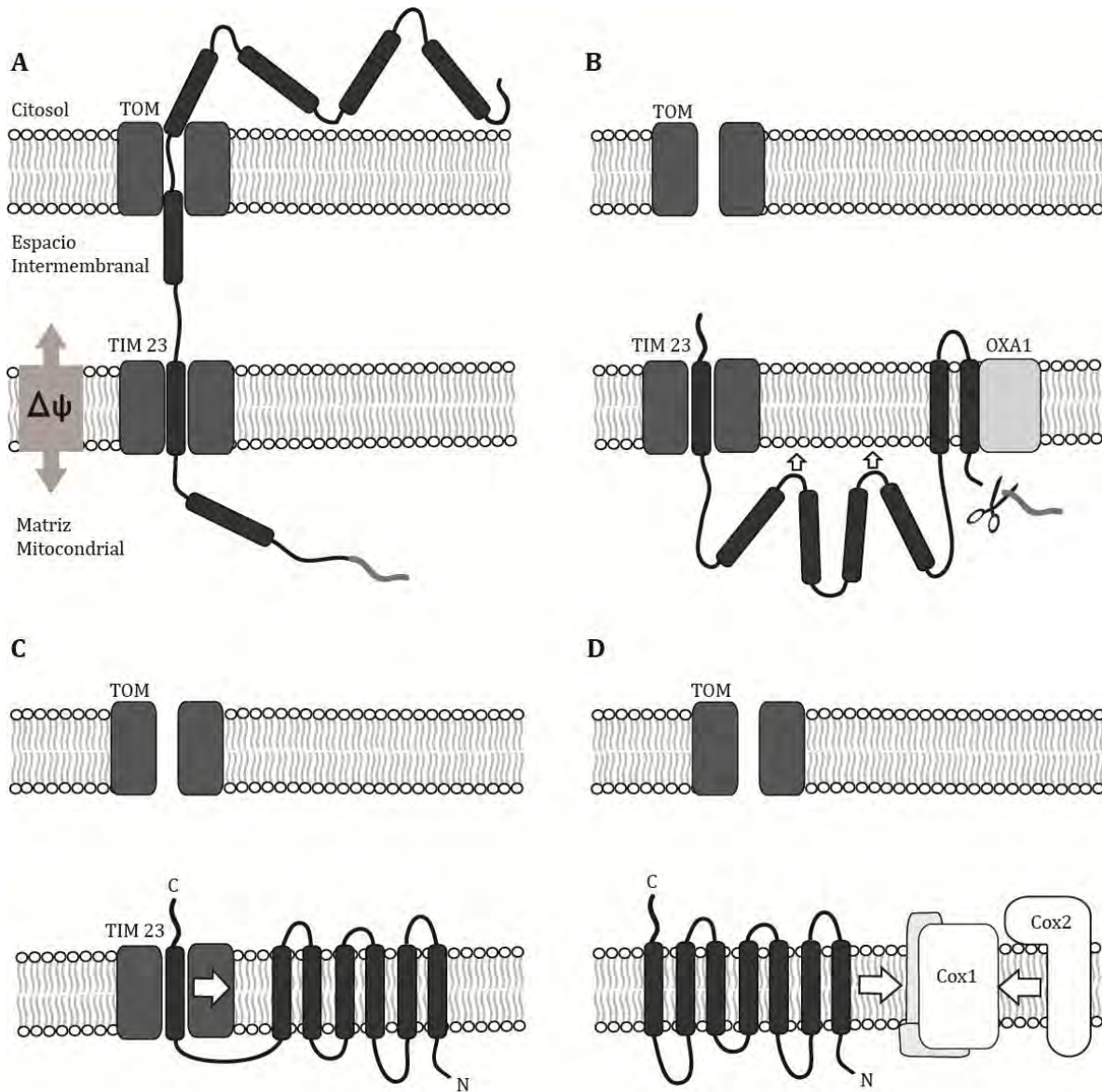


Figura 15. Modelo de Inserción de Cox3 en la Membrana Interna Mitocondrial. Con base en la vía de inserción de Cox3 que pensamos que ocurre en el alga *C. reinhardtii*, proponemos un modelo por el cual la proteína Cox3 alotópica se puede insertar en la membrana interna mitocondrial. **A.** La proteína Cox3 ingresa a la matriz mitocondrial a través del complejo TOM y TIM23 en un proceso dependiente del potencial de membrana ($\Delta\psi$). **B.** En la matriz se edita la MTS y Oxa1 inserta los cruces transmembranales en pares como "hairpins". **C.** El último cruce transmembranal se retiene en TIM23 y es liberado lateralmente a la membrana interna. **D.** Todos los cruces transmembranales de la proteína Cox3 se encuentran insertados en la membrana y puede continuar el ensamblaje del complejo CcO.

IX. CONCLUSIONES

1. Ninguna de las cinco construcciones de Cox3 alotópicas transformadas en levadura recuperó el fenotipo respiratorio.
2. Sólo las construcciones Oxa1_Cox3q y Oxa1_ScCox3 expresan una versión de la proteína Cox3 correspondiente.
3. Las proteínas expresadas a partir de estas dos construcciones migran hacia la mitocondria.
4. Aunque se localizan en la fracción mitocondrial, las versiones de Cox3 alotópica no se ensamblan en su complejo.
5. Una fracción de estas proteínas son degradadas por la proteasa mitocondrial de la membrana interna, i-AAA.
6. La ausencia de la translocasa Oxa1 disminuye los niveles de proteína Cox3 silvestre y alotópica.

X. PERSPECTIVAS

1. Importación *in vitro*.

Realizar la importación *in vitro* de las construcciones de Cox3 en mitocondrias aisladas. Así podremos seguir el curso de tiempo de la internalización del precursor de Cox3 en la mitocondria.

2. Edición de las proteínas Cox3 alotópicas.

Si la proteína Cox3 se importa y se edita *in vitro*, se podría utilizar el inhibidor de metaloproteasas 1,10-ortofenantrolina para evaluar si la edición de Cox3 se lleva a cabo por la proteasa de procesamiento mitocondrial (MPP) sensible a este inhibidor.

3. El papel del potencial transmembranal para la importación.

La vía de importación por TIM23 es dependiente del potencial transmembranal ($\Delta\psi$). Se puede evaluar la importación *in vitro* de Cox3 utilizando inhibidores y ionóforos que colapsan el $\Delta\psi$.

4. Localización de las construcciones de Cox3 dentro de la mitocondria.

Ubicar a la proteína Cox3 por ensayos de proteólisis en mitocondrias aisladas o en mitoplastos (mitocondrias sin membrana externa). Analizar si Cox3 es integral de membrana por su resistencia a extracción alcalina con carbonato de sodio.

5. Proteasas mitocondriales.

Probar otras mutantes de proteasas que puedan estar degradando a la proteína Cox3 que se importa a la mitocondria. Por ejemplo, las proteínas Mgr1 y/o Mgr3, subunidades que se asocian entre sí y también con la proteasa Yme1. O bien, la proteasa m-AAA compuesta por las subunidades homólogas Yta10 y Yta12.

6. Disminución de la hidrofobicidad de Cox3 de *S. cerevisiae*.

Diseñar construcciones de Cox3 con hidrofobicidad disminuida haciendo alineamientos de la proteína de *S. cerevisiae* con las de algas clorofíceas con Cox3 nuclear, o bien, hacer alineamientos con las Cox3 de distintas levaduras y sustituir en cada posición por el residuo menos hidrofóbico. Así podríamos disminuir la hidrofobicidad de la proteína y conservar la similitud de los aminoácidos.

XI. APÉNDICES

APÉNDICE 1.

Lista de plantas clorofitas con *COX3* nuclear utilizadas para la figura 5.

	No. de acceso
<i>Polytomella</i> sp.	AAG17278.1
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	BAB21505.1
<i>Volvox carteri</i>	EFJ47759.1

Lista de plantas clorofitas con *COX3* mitocondrial utilizadas para la figura 5.

	No. de acceso
<i>Coccomyxa subellipsoidea</i>	YP_004339015.1
<i>Helicosporidium</i> sp.	YP_006280979.1
<i>Micromonas</i> sp.	YP_002860126.1
<i>Nephroselmis olivácea</i>	YP_665681.1
<i>Oltmannsiellopsis viridis</i>	ABC96368.1
<i>Ostreococcus tauri</i>	YP_717297.1
<i>Prototheca wickerhamii</i>	NP_042253.1
<i>Pseudendoclonium akinetum</i>	AQ18744.1
<i>Pycnococcus provasolii</i>	YP_003495125.1
<i>Acutodesmus obliquus</i>	NP_057979.1
<i>Trebouxiophyceae</i> sp.	AFQ93754.1

APÉNDICE 2.

Medios de cultivo

Bacterias

LB

NaCl	1%
Bacto-triptona	1%
Bacto-extracto de levadura	0.5%
Enfriar a 55 °C y agregar 100 µg/ml de Ampicilina (stock 100 mg/ml)	

Levaduras

YPD

Bacto-extracto de levadura	1%
Bacto-peptona	2%
Glucosa	2%

YPEG

Bacto-extracto de levadura	1%
Bacto-peptona	2%
Glicerol	3%
Etanol	3% (agregar después de esterilizar)

MEDIO MÍNIMO SINTÉTICO

Base Nitrogenada	0.17%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5%
Glucosa o Rafinosa o Galactosa	2%
Amino ácidos (ver siguiente tabla)	

Los medios líquidos y sólidos tienen la misma composición excepto que se agregó agar al 1.75% para solidificar.

Todos los medios se esterilizaron por autoclave 20 min a 121 °C (250 °F).

Amino ácidos	Stock (g/100ml)	Vol. del stock para 1 L de medio (ml)	Concentración final en el medio (mg/litro)	Vol. del stock para esparcir en caja petri (ml)
Adenine	0.2*	10	20	0.2
Uracil	0.2*	10	20	0.2
L-Arginine HCl	1	2	20	0.1
L- Ácido Aspártico	1*,#	10	100	0.2
L- Ácido Glutámico	1*	10	100	0.2
L- Histidine HCl	1	2	20	0.1
L- Isoleucina	1	3	30	0.1
L- Leucina	1	10	100	0.1
L- Lisina	1	3	30	0.1
L- Metionina	1	2	20	0.1
L- Fenilalanina	1*	5	50	0.1
L- Serina	8	5	400	0.1
L- Treonina	4*,#	5	200	0.1
L- Triptófano	1	2	20	0.1
L- Tirosina	0.2	15	30	0.2
L- Valina	3	5	150	0.1

**Guardar a temperatura ambiente*

Esterilizar por filtración y agregar después de esterilizar el medio en autoclave

APÉNDICE 3.

3A. Secuencias de Proteína de las Construcciones de Cox3

Clave:

Presecuencia

Parte de la proteína madura

Sitio de corte de BgIII (Cox3q) en itálicas

Segmentos transmembranales en negritas

>Oxa1_Cox3q

MFKLTSR~~LVTSRFAASSRLATARTIVLPRPHPSWISFQAKRFNSTGPR~~SMSSDAGHHLSPREHLERSRHQQHP
FHMVMPSP**WPLFGSWAACNVFLG**LAQYF****HGYIGNM**LLFGSVAHL**TL**LAIT**WWR****RDIVAEATYLGDHTMAVR**KN**
MVSGMWVFISEAVLF**IGLLWACMDLG**MSPDVTLGACWPPV**GI**EAVQ**TELALVMSAVLAAS**YYSANIAM**VAL**
IAGNRNK**VLAALSTTVGFGAMFLYDQ**F**LEYTNA**AFTIS**SDGVYGT**TTFFMTTGFHGMHVLVGTIYLA**AVTARMRN
YHLTAGHHVGYE**TSVLYWHFVDIVWIAVYGI**IYWWGV**

>Su9_Cox3q

MASTRVLASRLASQMAASAKVARPAVRVAQVSKRTIQ**TGSPLQTLKRTQ**MTSIVNAT**TRQAFQ**KRAYSS**RS**SM
SSDAGHHLSPREHLERSRHQQHPFHMVMPSP**WPLFGSWAACNVFLG**LAQYF****HGYIGNM**LLFGSVAHL**TL**LA**
ITWWRRDIVAEATYLGDHTMAVR**KNMVSGMWVFI**SEAVLF**IGLLWACMDLG**MSPDVTLGACWPPV**GI**EAVQ**P**
TELALVMSAVLAAS**YYSANIAM**VALIAGNRNK**VLAALSTTVGFGAMFLYDQ**F**LEYTNA**AFTIS**SDGVYGT**TTFF**
MTTGFHGMHVLVGTIYLAAVTARMRNYHLTAGHHVGYE**TSVLYWHFVDIVWIAVYGI**IYWWGV**

>Oxa1_ScCox3

MFKLTSR~~LVTSRFAASSRLATARTIVLPRPHPSWISFQAKRFNSTGPT~~H**LER**SRHQHPFHMVMPSP**WPIV**
SFALLSLALSTALTMHGYIGNM**NMYYLALFVLLTSSILW**FRDIVAEATYLGDHTMAVR**KGINLGF**LMFVL**SE**
VLIFAGLFWAYFHSAMSPDVTLGACWPPV**GI**EAVQ**TEPL**LLNT**IILLSSGATVTYSH**HALIAGNRNK**ALSG**
LLITFWLIVIVFTCQYIEY**TNA**AFTISDGVY**GSV**FYAG**TGLHFLHMVLAAMLG**VNYWRMRNYHLTAGHHV**G**
Y**ETTIIYTHVLDVIWLF**LYV**VF**YWWGV

>Oxa1_PsCox3

MFKLTSR~~LVTSRFAASSRLATARTIVLPRPHPSWISFQAKRFNSTGPR~~SSDAGHHLSPREHYLVHTANRHPFH
VLPD**SPWPLFGSWAACNVFLG**LAQYF****HGVAGSAP**LLFGSVAHL**TL**LAIT**WWR****DCAIEAEMGMHTDVSR**QNMV**
SGMWVFISEAVLF**IGLLWACMDLG**ISPSVHVQMQWPPVGVHAI**GWDNRALVMSAVLAAS**YYSANIAM**VAKD**
PK**TVLAALSTTVGFGAMFLYDQ**F**LEY**TQ**TPFT**LTDS**PYGT**TT**FFMTTGFHGMHVLVGTIYLA**AVTAMYSRT**KK**
AGVAL**TTSVLYWHFVDIVWIAVYGI**IYV**GQY**

>Oxa1_CrCox3

MFKLTSR~~LVTSRFAASSRLATARTIVLPRPHPSWISFQAKRFNSTGPR~~GSHAAGHQ**TAK**E**FYMEHIGKR**HPFH
VLP**PSWPMLAGWGTYV**SC**LGMAAWFHN**MPTGGAL**MAFGMANIAWTAITWWR**DCAIEGDMGMHTEVVR**KNFI**
SGMWAFISEALL**FVGLLWACLHL**GMSP**SVALQMQWPPV**GI**EPIGWDKRALVMSAVLAAS**YYSANVAM**VAKD**
PK**VVMGALATTIGLGAMFLADQY**LE**NETPFTIT**DS**PYGT**TT**FFVTTGFHGMHVL**LG**SLYLTAAL**MMYKR**THN**
AGAALK**SSILYWHFVDIVWIAVYGI**IYV**GQY**

3B. Alineamiento de las Secuencias de la Proteína Cox3

Clave:

Segmentos transmembranales en negritas

Residuos de Cox3 de *Polytomella* sp. en la proteína quimérica Cox3q

```

Cox3q      MSSDAGHHLSPREHLERSRHQQHPFHMVMPSPWPLFGSWAACNVFLGLAQYFHGYIGNMN
ScCox3     -----MTHLERSRHQQHPFHMVMPSPWPIVVSFALLSLALSTALTMHGYIGNMN
PsCox3     MSSDAGHHLSPREHYLVHTANRHFPFHVLPDSPWPLFGSWAACNVFLGLAQYFHGVAGSAP
CrCox3     MGSHAAGHQTAKEFYMEHIGKRHPFHVLPSPWPLAGWGTIVSCLGMAAWFHNMPTGGA
           .          : : * * * * : : * * * * . . . . * . * : *

Cox3q      LLFGSVAHLTLLAITWWRDIVAEATYLGDHTMAVRKNMVSGMWVFIVSEAVLFIGLLWAC
ScCox3     MVYLALFVLLTSSILWFRDIVAEATYLGDHTMAVRGINLGFLMFVLSEVLIFAGLFWAY
PsCox3     LLFGSVAHLTLLAITWWRDCAIEA-EMGMHTDVSRQNMVSGMWVFIVSEAVLFIGLLWAC
CrCox3     LMAFGMANIAWTAITWWRDCAIEG-DMGMHTEVVRKNFISGMWFIVSEALLFVGLLWAC
           : : . : : * * : * * . * . : * : * : * : * : * : * : *

Cox3q      MDLGMSPDVTLGACWPPVGIEAVQPTELALVMSAVLAASYYSANIAMVALIAGNRNKVLA
ScCox3     FHSAMSPDVTLGACWPPVGIEAVQPTELPLLNTIILLSSGATVTYSHHALIAGNRNKALS
PsCox3     MDLGISPSVHVQMQWPPVGIVHAIGWDNRALVMSAVLAASYYSANIAMV---KDPKTVLA
CrCox3     LHLGMSPSVALQMQWPPVGIEPIGWDKRALVMSAVLAASYYSANVAMV---KDPKVVMG
           : . . : * * . * : * * * : . : : * : : * : * : . . : * : : . .

Cox3q      ALSTTVGFGAMFLYDQFLEYTNAAFTISDGVYGTTFFMTTGFHGMHVLVGTIYLAAVTAR
ScCox3     GLLITFWLIVIFVTCQYIEYTNAAFTISDGVYGSVFYAGTGLHFLHMVLAAMLGVNYWR
PsCox3     ALSTTVGFGAMFLYDQFLEYTQTPFTLDSPYGTTFFMTTGFHGMHVLVGTIYLAAVTAM
CrCox3     ALATTIGLGAMFLADQYLEYNETPTFTITDSPYGTTFFVTTGFHGMHVLLGSLYLTAALMM
           . * * . : . : * : * * : * : * . * * : * : * : * : * : * .

Cox3q      MRNYHLTAGHHVGYETSVLYWHFVDIVWIAVYGIIYWWGV
ScCox3     MRNYHLTAGHHVGYETTIIYTHVLDVIWLFLYVVFYWWGV
PsCox3     Y---SRTKKAGVALTTSVLYWHFVDIVWIAVYGIIYVGQY
CrCox3     Y---KRTHNAGAALKSSILYWHFVDIVWIAVYGIIYVGQY
           * . . : : * * : * : * : * : *
    
```

APÉNDICE 4.

Secuencias de DNA de Construcciones

Clave:

PRESECUENCIA

GEN

3'UTR *ATP2*

ATG de Inicio

Codón de Paro

Tabla de Sitios de Restricción de las Proteínas Cox3 quiméricas

Enzima	Secuencia de corte	Sitio de corte
NotI	gcggccgc	Antes del ATG y al final del 3'UTR
BglII	agatct	Libera la presecuencia (se cambió la base 209 una T (0.26) por A (0.21), el codón de serina se mantuvo pero no se generó el sitio de restricción)
AflII	cttaag	Después del codón de paro, para intercambiar UTR's
EagI	cggccg	Después del codón de paro, compatible con Not1
SacI	gagctc	Después del 3'UTR
SmaI	cccggg	Después del codón de paro
SphI	gcatgc	Después del codón de paro

Tabla de Sitios de Restricción de las Proteínas ScCox3, PsCox3 y CrCox3

Enzima	Secuencia de corte	Sitio de corte
NotI	gcggccgc	Antes del ATG y después del codón de paro
BamHI	ggatcc	Antes del ATG
SacII	ccgctg	Antes del ATG
PstI	ctgcag	Después del codón de paro

>OXA1_COX3q

GCGGCCGCATGTTCAAACCTCACCTCTCGACTCGTCACGTCAAGGTTTGCTGCCTCTTCCAG
ACTGGCCACCGCTCGAACCATAGTATTGCCCCGGCCCCATCCGTCATGGATCTCTTTTCAG
GCCAAAAGATTTAATTCGACGGGCCCAAGATCTATGCTTTCTGATGCTGGTCATCATTTGT
CTCCAAGAGAACATTTGGAAAGATCAAGACATCAACAACATCCATTTTCATATGGTTATGCC
ATCTCCATGGCCATTGTTTGGTTCTTGGGCTGCTTGTAAATGTTTTTTGGGTTTGGCTCAA
TATTTTCATGGTTATATTGGTAATATGAATTTGTTGTTTGGTTCTGTTGCTCATTTGACTT
TGTTGGCTATTACTTGGTGGAGAGATATTGTTGCTGAAGCTACTTATTTGGGTGATCATA
TATGGCTGTTAGAAAAAATATGGTTTCTGGTATGTGGGTTTTTATTGTTTCTGAAGCTGTT
TTGTTTATTGGTTTGTGTTGGGCTTGTATGGATTTGGGTATGTCTCCAGATGTTACTTTGG
GTGCTTGTGGCCACCAGTTGGTATTGAAGCTGTTCAACCAACTGAATTGGCCTTTGGTTAT
GTCTGCTGTTTTGGCTGCTTCTTATTATTCTGCTAATATTGCTATGGTTGCTTTGATTGCT
GGTAATAGAAATAAAGTTTTGGCTGCTTTGTCTACTACTGTTGGTTTTGGTGCTATGTTTT
TGTATGATCAATTTTTGGAATATACTAATGCTGCTTTTACTATTTCTGATGGTGTATATGG
TACTACTTTTTTTATGACTACTGGTTTTTCATGGTATGCATGTTTTGGTTGGTACTATTTAT
TTGGCTGCTGTTACTGCTAGAATGAGAAATTATCATTGACTGCTGGTCATCATGTTGGTT
ATGAAACTTCTGTTTTGTATTGGCATTTTGTTGATATTGTTTGGATTGCTGTTTATGGTAT
TATTTATTGGTGGGGTGTTTAACTTAAGCCCGGGGCATGCCGGCCGAAGAAATAAAGCTTA
AACCAAGGGAAGCAAAATTTGAAATACCGAAGGTAGAACAATAAGGATGATGGGAAAAAAA
AGATAATTTTTTTTTTTTGGTTTTTCCCTGCTTCCTTCTTGTATTATTGGTATTATTATGTTA
CGATATTCATTCATTATCCTATTGATATTTCTTTATATTCACTAAAAAAAATTTATTCT
ATAAGACTGACTATAATTTTTTTTACTCCCAACTGTAAGTAAATAAAGACTCACCTACGCA
TACATTTTTTATATATACTATAAGATGTAGGATCTTAAAGAAAAATAAAGAGAAAAAGAGA
AGCACACAACCTGCGATAAGTTGTGAGCTCGCGCCGC

>SU9_COX3q

GCGGCCGCATG GCCTCCACTCGTGTCTCGCCTCTCGCCTGGCCTCCCAGATGGCTGCTTC
CGCCAAGGTTGCCCCGCCCTGCTGTCCGCGTTGCTCAGGTCAGCAAGCGCACCATCCAGACT
GGCTCCCCCCTCCAGACCCTCAAGCGCACCCAGATGACCTCCATCGTCAACGCCACCACCC
GCCAGGCTTTCCAGAAGCGCGCCTACTCTTCCAGATCTATGCTTTCTGATGCTGGTCATCA
TTTGTCTCCAAGAGAACATTTGGAAAGATCAAGACATCAACAACATCCATTTCATATGGTT
ATGCCATCTCCATGGCCATTGTTTGGTTCCTGGGCTGCTTGTAAATGTTTTTTGGGTTTGG
CTCAATATTTTCATGGTTATATTGGTAATATGAATTTGTTGTTTGGTTCCTGTTGCTCATT
GACTTTGTTGGCTATTACTTGGTGGAGAGATATTGTTGCTGAAGCTACTTATTTGGGTGAT
CATACTATGGCTGTTAGAAAAAATATGGTTTCTGGTATGTGGGTTTTTATTGTTTTCTGAAG
CTGTTTTGTTTATTGGTTTGTGTTGGGCTTGTATGGATTTGGGTATGTCTCCAGATGTTAC
TTTGGGTGCTTGTGGCCACCAGTTGGTATTGAAGCTGTTCAACCAACTGAATTGGCTTTG
GTATGTCTGCTGTTTTGGCTGCTTCTTATTATTCTGCTAATATTGCTATGGTTGCTTTGA
TTGCTGGTAATAGAAATAAAGTTTTGGCTGCTTTGTCTACTACTGTTGGTTTTGGTGCTAT
GTTTTTGTATGATCAATTTTTGGAATATACTAATGCTGCTTTTACTATTTCTGATGGTGTT
TATGGTACTACTTTTTTTATGACTACTGGTTTTTCATGGTATGCATGTTTTGGTTGGTACTA
TTTATTTGGCTGCTGTTACTGCTAGAATGAGAAATTATCATTGACTGCTGGTCATCATGT
TGGTTATGAACTTCTGTTTTGTATTGGCATTGTTGATATTGTTTGGATTGCTGTTTAT
GGTATTATTTATTGGTGGGGTGTTTAACTTAAGCCCGGGGCATGCCGGCCGAAGAAATAAA
GCTTAAACCAAGGGAAGCAAAATTTGAAATACCGAAGGTAGAACAATAAGGATGATGGGAA
AAAAAAGATAATTTTTTTTTTTTGGTTTTTCCCTGCTTCCTTCTTGTTTATTGGTATTATTA
TGTTACGATATTCATTCATTATCCTATTGATATTTCTTTATATTCATAAAAAAAATTT
ATTCTATAAGACTGACTATAATTTTTTTTACTCCCAACTGTAAGTAAATAAAGACTCACCT
ACGCATACATTTTTTATATATACTATAAGATGTAGGATCTTAAAGAAAAATAAAGAGAAAA
AGAGAAGCACACAACCTGCGATAAGTTGTGAGCTCGCGCCGC

>OXA1_ScCOX3

GCGGCCGC GGATCC ATG TTTAAACTTACTTCAAGATTGGTAACCAGCAGATTCGCCGCATC
GTCACGTCTTGCTACCGCTAGAACTATCGTCCTACCTCGTCCACATCCATCTTGGATCTCC
TTTCAGGCTAAGAGATTTAATTCAACTGGTCC TACACATTTGGAAAGAAGTCGTCATCAGC
AACATCCTTTTTCATATGGTAATGCCTAGTCCATGGCCGATAGTAGTCTCTTTTGCCCTGTT
GTCACTGGCATTGTGACCGCACTTACTATGCATGGTTACATTGGAAATATGAATATGGTA
TATTTAGCCCTTTTTGTGTTACTAACGAGTTCAATTCTGTGGTTTAGAGATATAGTTGCAG
AGGCTACGTATTTGGGTGATCACACAATGGCCGTTAGGAAAGGTATCAACCTTGGTTTCTT
GATGTTTGTACTAAGCGAAGTCCTAATTTTCGCAGGTCTATTTTGGGCTTACTTTTCATTCCG
GCAATGTCCCCGACGTTACACTAGGTGCCTGCTGGCCCCCTGTCGGCATCGAAGCTGTCC
AACCAACTGAGCTTCCATTGTTAAATACTATCATATTACTTTTCATCTGGAGCGACGGTCAC
GTACTCCCATCACGCTTTAATCGCTGGTAATAGAAATAAAGCACTATCTGGACTTTTAATC
ACATTCTGGTTGATCGTAATATTCGTTACCTGCCAGTACATTGAATATACTAATGCCGCTT
TTACTATTTCCGATGGTGTCTACGGCTCCGTATTTTATGCGGGTACTGGATTACATTTCCCT
ACATATGGTTATGTTAGCAGCGATGTTGGGGTTAATTACTGGAGAATGCGTAATTATCAT
TTAACTGCTGGGCATCATGTGGGTTATGAGACTACCATCATATACACCCATGTATTGGACG
TAATTTGGTTGTTTCTATATGTCGTTTTCTACTGGTGGGGCGTC TAA CTGCAG GCGGCCGC

>OXA1_PsCOX3

GCGGCCGC GGATCC ATG TTTAAACTTACTTCAAGATTGGTAACCAGCAGATTCGCCGCATC
GTCACGTCTTGCTACCGCTAGAACTATCGTCTACCTCGTCCACATCCATCTTGGATCTCC
TTTCAGGCTAAGAGATTTAATTCAACTGGTCC TTCAAGTGATGCTGGTCACCATTTAAGTC
CTAGGGAACATTATTTAGTACACACAGCGAATAGACATCCATTTACGTCTTGCCAGATTC
ACCTTGGCCCTTGTTTGGTTCTTGGGCTGCCTGCAACGTTTTCTTAGGTCTGGCGCAATAT
TTTCATGGCGTTGCTGGCTCCGCACCTCTATTGTTTCGGTAGTGTTCGCACACTTAACTCTTC
TGGCCATTACCTGGTGGCGTGACTGTGCTATAGAAGCTGAAATGGGTATGCATACAGATGT
ATCAAGACAAAATATGGTTTCAGGTATGTGGGTATTCATCGTCTCAGAAGCTGTACTATTT
ATAGGACTTTTGTGGGCTTGTATGGATCTTGGCATAATCCCCAGCGTTCATGTTCAAATGC
AATGGCCTCCTGTCGGAGTTCATGCAATTGGATGGGATAATAGAGCTTTAGTAATGTCTGC
TGTATTAGCAGCTTCTTACTATAGTGCTAATATTGCAATGGTGGCTAAAGATCCTAAAACC
GTCCTAGCAGCACTTTCCACGACCGTAGGCTTTGGCGCTATGTTTCTATACGATCAATTTT
TGGAATATACGCAAACCTCTTTTACTTTAACAGATTCTCCGTACGGAACAACCTTCTTCAT
GACAACAGGCTTTCATGGTATGCACGTGCTAGTAGGTACGATATACTGGCAGCTGTCACA
GCTATGTACAGTAGAACAAGAAAGCGGGTGTGCTCTAACAACATCTGTCTTATACTGGC
ATTTTCGTCGACATTGTATGGATAGCCGTCTATGGAATCATATATGTAGGTCAATAT TAACT
GCAG GCGGCCGC

>OXA1_CrCOX3

GCGGCCGC GGATCC ATG TTTAAACTTACTTCAAGATTGGTAACCAGCAGATTCGCCGCATC
GTCACGTCTTGCTACCGCTAGAACTATCGTCCTACCTCGTCCACATCCATCTTGGATCTCC
TTTCAGGCTAAGAGATTTAATTCAACTGGTCC TGGAAATCATGCAGCCGGTCATCAAAC TG
CTAAAGAATTCTACATGGAACATATCGGCAAAGGCACCCATTCACGTCTTACCACCTAG
TCCGTGGCCTATGCTGGCCGGGTGGGGTACATATGTTAGCTGTCTTGGCATGGCCGCATGG
TTTCATAATATGCCTACCGGTGGGGCTCTTATGGCATT TGGCATGGCAAATATAGCTTGGA
CTGCTATAACTTGGTGGAGAGATTGTGCAATAGAAGGCGATATGGGTATGCATACTGAAGT
CGTTAGAAAGAACTTCATTTCTGGAATGTGGGCATTTATTGTCTCAGAAGCCTTGCTATTC
GTGGGCTTGTTGTGGGCATGTTTACACTTAGGCATGTCGCCGTCTGTAGCCCTGCAAATGC
AATGGCCCCCAGTGGGTATTGAGCCAATTGGATGGGATAAAAGGGCGTTGGTAATGAGCGC
CGTTTTAGCGGCTTCTTATTACTCAGCGAATGTGGCAATGGTCGCAAAGGACCCAAAAGTA
GTCATGGGGGCTTTGGCCACTACCATCGGATTAGGTGCTATGTTTCTTGCAGACCAATACC
TTGAGTACAATGAAACACCTTTCACAATTACTGATAGCCCATACGGTACCACTTTCTTTGT
TACGACTGGCTTTCACGGCATGCACGTGCTTCTGGGAAGTCTATACCTAACTGCTGCTCTA
ATGATGTACAAAAGAACTCATAATGCAGGTGCCGCCCTGAAGTCAAGTATTCTATACTGGC
ATTTTGTTCGATATAGTGTGGATTGCTGTTTACGGCATAATATACGTTGGTCAGTAC TAACT
GCAG GCGGCCGC

APÉNDICE 5.

Oligonucleótidos utilizados para secuenciación

Promotor PGK 5' de plásmido pFL61

PGK-F CAGATCATCAAGGAAGTAATTATC

Promotor PGK 3' de plásmido pFL61

PGK-R CTATTATTTTAGCGTAAAGGATG

Oligo interno de las secuencias Cox3 quiméricas

iCox3q-R GCAGTCAAATGATAATTTCTCATTCTAGCA

Oligo interno de la secuencia Cox3 de S. cerevisiae

iScCox3-R TTTATTTCTATTACCAGCGATTAAAGCGTG

Oligo interno de la secuencia Cox3 de Polytomella sp.

iPsCox3-R CTTTAGCCACCATTGCAATATTAGCACTAT

Oligo interno de la secuencia Cox3 de C. reinhardtii

iCrCox3-R CCTTTGCGACCATTGCCACATTCGCTGAGT

Nota:

Los oligonucleótidos utilizados para la construcción de las proteínas quiméricas se encuentran en (Macedo-Márquez 2010).

XII. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, K. & Palmer, J.D., 2003. Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29(3), pp.380–395.
- Adams, K.L. et al., 1999. Intracellular gene transfer in action: dual transcription and multiple silencings of nuclear and mitochondrial *cox2* genes in legumes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(24), pp.13863–8.
- Alberts, B. et al., 2008. *Molecular Biology of the Cell* 5th ed., Garland Science.
- Allen, J.F., 2003. Why chloroplasts and mitochondria contain genomes. *Comparative and functional genomics*, 4(1), pp.31–6.
- Amiott, E. a & Jaehning, J. a, 2006. Mitochondrial transcription is regulated via an ATP “sensing” mechanism that couples RNA abundance to respiration. *Molecular cell*, 22(3), pp.329–38.
- Banroques, J., Delahodde, A. & Jacq, C., 1986. A mitochondrial RNA maturase gene transferred to the yeast nucleus can control mitochondrial mRNA splicing. *Cell*, 46(6), pp.837–44.
- Bietenhader, M. et al., 2012. Experimental relocation of the mitochondrial ATP9 gene to the nucleus reveals forces underlying mitochondrial genome evolution. *PLoS genetics*, 8(8), p.e1002876.
- Bokori-Brown, M. & Holt, I.J., 2006. Expression of Algal Nuclear ATP Synthase Subunit 6 in Human Cells Results in Protein Targeting to Mitochondria but No Assembly into ATP Synthase. *Rejuvenation Research*, 9(4), pp.455–469.
- Bolender, N. et al., 2008. Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins. *EMBO reports*, 9(1), pp.42–9.
- Bonnefoy, N. & Fox, T.D., 2007. Directed alteration of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial DNA by biolistic transformation and homologous recombination. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 372, pp.153–66.
- Bonnefoy, N. & Fox, T.D., 2000. In vivo analysis of mutated initiation codons in the mitochondrial COX2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* fused to the reporter gene ARG8m reveals lack of downstream reinitiation. *Molecular Genetics and Genomics*, 262(6), pp.1036–1046.
- Bonnet, C. et al., 2007. Allotopic mRNA Localization to the Mitochondrial Surface Rescues Respiratory Chain Defects in Fibroblasts Harboring Mitochondrial DNA Mutations Affecting Complex I or V Subunits. *Rejuvenation Research*, 10(2), pp.127–144.
- Bonnet, C. et al., 2008. The optimized allotopic expression of ND1 or ND4 genes restores respiratory chain complex I activity in fibroblasts harboring mutations in these genes. *Biochimica et biophysica acta*, 1783(10), pp.1707–17.

- Botstein, D. & Fink, G.R., 1988. Yeast : An Experimental Organism for Modern Biology. *Science*, 240(June), pp.1439–1443.
- Brachmann, C.B. et al., 1998. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast (Chichester, England)*, 14(2), pp.115–32.
- Burger, G., Gray, M.W. & Lang, B.F., 2003. Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends in Genetics*, 19(12), pp.709–716.
- Calvo, S.E. & Mootha, V.K., 2010. The mitochondrial proteome and human disease. *Annual review of genomics and human genetics*, 11, pp.25–44.
- Cardol, P. et al., 2006. ND3 and ND4L subunits of mitochondrial complex I, both nucleus encoded in *Chlamydomonas reinhardtii*, are required for activity and assembly of the enzyme. *Eukaryotic cell*, 5(9), pp.1460–7.
- Claros, M.G. et al., 1995. Limitations to in vivo import of hydrophobic proteins into yeast mitochondria. The case of a cytoplasmically synthesized apocytochrome b. *European Journal of Biochemistry*, 228, pp.762–771.
- Claros, M.G. & von Heijne, G., 1994. TopPred II: An Improved Software for Membrane Protein Structure Predictions. *CABIOS*, 10, pp.685–6.
- Daley, D.O., Adams, K.L., et al., 2002. Gene transfer from mitochondrion to nucleus: novel mechanisms for gene activation from Cox2. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 30(1), pp.11–21.
- Daley, D.O., Clifton, R. & Whelan, J., 2002. Intracellular gene transfer: reduced hydrophobicity facilitates gene transfer for subunit 2 of cytochrome c oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(16), pp.10510–5.
- Emanuelsson, O. et al., 2000. Predicting Subcellular Localization of Proteins Based on their N-terminal Amino Acid Sequence. *Journal of Molecular Biology*, 300(4), pp.1005–1016.
- Figuroa-Martínez, F. et al., 2008. Reconstructing the mitochondrial protein import machinery of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics*, 179(1), pp.149–55.
- Figuroa-Martínez, F. et al., 2011. What limits the allotopic expression of nucleus-encoded mitochondrial genes? The case of the chimeric Cox3 and Atp6 genes. *Mitochondrion*, 11(1), pp.147–54.
- Foury, F. et al., 1998. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 440(0014-5793 (Print)), pp.325–331.
- Funes, S. et al., 2011. Evolution of YidC/Oxa1/Alb3 insertases: three independent gene duplications followed by functional specialization in bacteria, mitochondria and chloroplasts. *Biological chemistry*, 392(1-2), pp.13–9.

- Funes, S. et al., 2002. The typically mitochondrial DNA-encoded ATP6 subunit of the F1F0-ATPase is encoded by a nuclear gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Journal of biological chemistry*, 277(8), pp.6051–8.
- Gietz, R.D. & Schiestl, R.H., 2007. Quick and easy yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nature protocols*, 2(1), pp.35–7.
- Gilderson, G. et al., 2003. Subunit III of cytochrome c oxidase of *Rhodobacter sphaeroides* is required to maintain rapid proton uptake through the D pathway at physiologic pH. *Biochemistry*, 42(24), pp.7400–9.
- Glaser, E. et al., 1998. Mitochondrial protein import in plants – Signals, Sorting, Targeting, Processing and Regulation. *Plant Molecular Biology*, 38(1-2), pp.311–338.
- Goffeau, A. et al., 1996. Life with 6000 genes. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5287), pp.546, 563–7.
- González-Halphen, D. et al., 2004. Genetic Correction of Mitochondrial Diseases. *Annals New York Academy of Sciences*, 1019, pp.232–239.
- Guy, J. et al., 2002. Rescue of a mitochondrial deficiency causing Leber hereditary optic neuropathy. *Annals of Neurology*, 52(5), pp.534–542.
- Von Heijne, G., Steppuhn, J. & Herrmann, R.G., 1989. Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *European journal of biochemistry / FEBS*, 180(3), pp.535–45.
- Hell, K., Neupert, W. & Stuart, R. a, 2001. Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA. *the The European Molecular Biology Organization Journal*, 20(6), pp.1281–1288.
- Herrmann, J.M. & Funes, S., 2005. Biogenesis of cytochrome oxidase-sophisticated assembly lines in the mitochondrial inner membrane. *Gene*, 354, pp.43–52.
- Hoffmann, A. et al., 1994. Photoactive mitochondria: in vivo transfer of a light-driven proton pump into the inner mitochondrial membrane of *Schizosaccharomyces pombe*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(20), pp.9367–71.
- Karlberg, O. et al., 2000. The dual origin of the yeast mitochondrial proteome. *Yeast (Chichester, England)*, 17(3), pp.170–87.
- Kyriakouli, D.S. et al., 2008. Progress and prospects: gene therapy for mitochondrial DNA disease. *Gene therapy*, 15(14), pp.1017–23.
- Macedo-Márquez, A., 2010. *Expresión del gen cox3 de Polytomella sp. en la levadura Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.

- Manfredi, G. et al., 2002. Rescue of a deficiency in ATP synthesis by transfer of MTATP6, a mitochondrial DNA-encoded gene, to the nucleus. *Nature Genetics*, 30, pp.394–399.
- Maréchal, A. et al., 2012. Yeast cytochrome c oxidase: a model system to study mitochondrial forms of the haem-copper oxidase superfamily. *Biochimica et biophysica acta*, 1817(4), pp.620–8.
- Margeot, A. et al., 2002. In *Saccharomyces cerevisiae*, ATP2 mRNA sorting to the vicinity of mitochondria is essential for respiratory function. *The EMBO journal*, 21(24), pp.6893–904.
- Martin, W. & Menten, M., 2010. The Origin of Mitochondria. *Nature Education*, 3(9), p.58.
- Matagne, R.F. et al., 1989. Induction and Characterization of Mitochondrial DNA Mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*. *JCB*, 108(April), pp.1221–1226.
- Meisinger, C., Sickmann, A. & Pfanner, N., 2008. The mitochondrial proteome: from inventory to function. *Cell*, 134(1), pp.22–4.
- Mick, D.U., Fox, T.D. & Rehling, P., 2011. Inventory control: cytochrome c oxidase assembly regulates mitochondrial translation. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12(1), pp.14–20.
- Mileshina, D. et al., 2011. Transfection of plant mitochondria and in organello gene integration. *Nucleic acids research*, 39(17), pp.1–13.
- Minet, M., Dufour, M. & Lacroute, F., 1992. Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* auxotrophic mutants by *Arabidopsis thaliana* cDNAs. , 2(3), pp.417–422.
- Mitchell, P., 1961. Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-osmotic type of Mechanism. *Nature*, 191, pp.144–148.
- Nagley, P. et al., 1988. Assembly of functional proton-translocating ATPase complex in yeast mitochondria with cytoplasmically synthesized subunit 8, a polypeptide normally encoded within the organelle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(7), pp.2091–2095.
- Neupert, W. & Herrmann, J.M., 2007. Translocation of proteins into mitochondria. *Annual review of biochemistry*, 76, pp.723–49.
- Nolden, M. et al., 2006. Quality control of proteins in the mitochondrion. *Topics in Current Genetics*, 16, pp.119–147.
- Oca-Cossio, J. et al., 2003. Limitations of Allotopic Expression of Mitochondrial Genes in Mammalian Cells. *Genetics*, 165(October), pp.707–720.
- Ojaimi, J. et al., 2002. An Algal Nucleus-encoded Subunit of Mitochondrial ATP Synthase Rescues a Defect in the Analogous Human Mitochondrial-encoded Subunit. *Molecular Biology of the Cell*, 13(November), pp.3836–3844.

- Peña, A. et al., 1977. A novel method for the rapid preparation of coupled yeast mitochondria. *FEBS letters*, 80(1), pp.209–13.
- Perales-Clemente, E. et al., 2011. Allotopic expression of mitochondrial-encoded genes in mammals: achieved goal, undemonstrated mechanism or impossible task? *Nucleic acids research*, 39(1), pp.225–34.
- Pérez-Martínez, X. et al., 2001. Subunit II of cytochrome c oxidase in Chlamydomonad algae is a heterodimer encoded by two independent nuclear genes. *The Journal of biological chemistry*, 276(14), pp.11302–9.
- Pérez-Martínez, X. et al., 2000. Unusual location of a mitochondrial gene. Subunit III of cytochrome C oxidase is encoded in the nucleus of Chlamydomonad algae. *The Journal of biological chemistry*, 275(39), pp.30144–52.
- Pfanner, N., 2000. Protein sorting: recognizing mitochondrial presequences. *Current biology : CB*, 10(11), pp.R412–5.
- Pineau, B. et al., 2005. Targeting the NAD7 subunit to mitochondria restores a functional complex I and a wild type phenotype in the *Nicotiana sylvestris* CMS II mutant lacking nad7. *The Journal of biological chemistry*, 280(28), pp.25994–6001.
- Popot, J.L. & de Vitry, C., 1990. On the microassembly of integral membrane proteins. *Annual review of biophysics and biophysical chemistry*, 19, pp.369–403.
- Rasmusson, A.G. et al., 1999. Homologues of yeast and bacterial rotenone-insensitive NADH dehydrogenases in higher eukaryotes: two enzymes are present in potato mitochondria. *The Plant Journal*, 20(1), pp.79–87.
- Rehling, P. et al., 2010. Co-translational membrane insertion of mitochondrially encoded proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1803(6), pp.767–775.
- Reinders, J. et al., 2006. Toward the complete yeast mitochondrial proteome: multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics. *Journal of proteome research*, 5(7), pp.1543–54.
- Remacle, C. et al., 2006. High-efficiency biolistic transformation of Chlamydomonas mitochondria can be used to insert mutations in complex I genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(12), pp.4771–6.
- Remacle, C. et al., 2001. Mutations inactivating mitochondrial genes in Chlamydomonas reinhardtii. *Biochemical Society Transactions*, 29(4), pp.442–446.
- Roise, D. & Gottfried, S., 1988. Mitochondrial Presequences. Minireview. *Journal of Biological Chemistry*, 263(April), pp.4509–4511.
- Sagan, L., 1967. On the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology*, 14, pp.255–274.

- Sanchirico, M. et al., 1995. Relocation of the unusual VAR1 gene from the mitochondrion to the nucleus. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 73(11-12), pp.987–95.
- Schmidt, O., Pfanner, N. & Meisinger, C., 2010. Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(9), pp.655–67.
- Schneider, G. et al., 1998. Feature-extraction from endopeptidase cleavage sites in mitochondrial targeting peptides. *Proteins*, 30(1), pp.49–60.
- Shimokata, K. et al., 2007. The proton pumping pathway of bovine heart cytochrome c oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(10), pp.4200–4205.
- Sickmann, A. et al., 2003. The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(23), pp.13207–12.
- Sievers, F. et al., 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology*, 7, p.539.
- Soto, I.C. et al., 2011. Biogenesis and assembly of eukaryotic cytochrome c oxidase catalytic core. *Biochimica et biophysica acta*, 1817(6), pp.883–97.
- Steele, D.F., Butler, C.A. & Foxt, T.D., 1996. Expression of a recoded nuclear gene inserted into yeast mitochondrial DNA is limited by mRNA-specific translational activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, pp.5253–5257.
- Supekova, L. et al., 2010. A single mutation in the first transmembrane domain of yeast COX2 enables its allotopic expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(11), pp.5047–52.
- Tsukihara, T. et al., 2003. The low-spin heme of cytochrome c oxidase as the driving element of the proton-pumping process. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26), pp.15304–15309.
- Tsukihara, T. et al., 1996. The Whole Structure of the 13-Subunit Oxidized Cytochrome c Oxidase at 2.8 Å. *Science*, 272(may), pp.1136–1144.
- Uribe, S., Ramirez, J. & Peña, A., 1985. Effects of beta-pinene on yeast membrane functions. *Journal of bacteriology*, 161(3), pp.1195–1200.
- Wikström, M., 2010. Cytochrome c Oxidase. *Encyclopedia of Life Sciences*, pp.1–10.
- Wittig, I., Braun, H.-P. & Schägger, H., 2006. Blue native PAGE. *Nature protocols*, 1(1), pp.418–28.
- Yoshikawa, S. et al., 1998. Redox-Coupled Crystal Structural Changes in Bovine Heart Cytochrome c Oxidase. *Science*, 280(June), pp.1723–1729.

Zullo, S. et al., 2005. Stable transformation of CHO Cells and human NARP cybrids confers oligomycin resistance (oli(r)) following transfer of a mitochondrial DNA-encoded oli(r) ATPase6 gene to the nuclear genome: a model system for mtDNA gene therapy. *Rejuvenation Research*, 8(1), pp.18-28.